

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANA ELISA DOTTA MADDALOZZO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CURATIVOS DE LÁTEX DE  
BORRACHA NATURAL COM ADIÇÃO DE HIDROXIAPATITA E  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USOS BIOMÉDICOS**

Orientadora: Janaina da Silva Crespo

Co-orientadora: Mariana Roesch-Ely

CAXIAS DO SUL

2021

Ana Elisa Dotta Maddalozzo

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CURATIVOS DE LÁTEX DE  
BORRACHA NATURAL COM ADIÇÃO DE HIDROXIAPATITA E  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USOS BIOMÉDICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Janaina da Silva Crespo

Co-orientadora: Mariana Roesch-Ely

Caxias do Sul

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M179o Maddalozzo, Ana Elisa Dotta

Obtenção e caracterização de curativos de látex de borracha natural com adição de hidroxiapatita e nanopartículas de prata para usos biomédicos [recurso eletrônico] / Ana Elisa Dotta Maddalozzo. – 2021.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: Janaina da Silva Crespo.

Coorientação: Mariana Roesch Ely.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Curativos. 2. Hidroxiapatita. 3. Prata. 4. Pulverização catódica. 5. Látex. I. Crespo, Janaina da Silva, orient. II. Ely, Mariana Roesch, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 620.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Ana Elisa Dotta Maddalozzo

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CURATIVOS DE LÁTEX DE  
BORRACHA NATURAL COM ADIÇÃO DE HIDROXIAPATITA E  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USOS BIOMÉDICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Janaina da Silva Crespo

Co-orientadora: Mariana Roesch-Ely

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo (orientadora)

Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Mariana Roesch-Ely (co-orientadora)

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Cristiane Krause Santin

Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Profa. Dra. Larissa Nardini Carli

Universidade Federal de Santa Catarina

## PUBLICAÇÕES

A relação a seguir contempla os artigos publicados, submetidos e em redação durante o período de concessão da bolsa de mestrado CAPES.

### Artigos Publicados / Patentes Depositadas

**1) Título:** Ti, Zr and Ta coated UHMWPE aiming surface improvement for biomedical purposes.

**Autores:** Melissa Machado Rodrigues, Cristian Padilha Fontoura, Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Leonardo Mathias Leidens, Higor Gomes Quevedo, Klester dos Santos Souza, Janaina da Silva Crespo, Alexandre Fassini Michels, Carlos Alejandro Figueroa e Cesar Aguzzoli.

**Periódico:** Composites Part B: Engineering, Volume 189, 15 Maio 2020 (Fator de impacto = 7,635).

**2) Título:** Enriched natural rubber films for occlusive wound healing application: biological behavior from adipose derived stem cells.

**Autores:** Charlene Silvestrin Celi Garcia, Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Paulo Miguel Celi Garcia, Cristian Padilha Fontoura, Melissa Machado Rodrigues, Marcelo Giovanela, João Antônio Pegas Henriques, Cesar Aguzzoli, Janaina da Silva Crespo e Mariana Roesch-Ely.

**Periódico:** Materials Research, Volume 24, 14 de janeiro de 2021 (Fator de impacto = 1,468).

**3) Título:** Filmes, processos de obtenção dos filmes e uso dos filmes.

**Autores:** Marcelo Giovanela, Janaína da Silva Crespo, Mariana Roesch-Ely, João Antônio Pegas Henriques, Cesar Aguzzoli, Ana Elisa Dotta Maddalozzo e Charlene Garcia.

**Patente:** Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190107154, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/05/2019.

### **Artigo Submetido**

**1) Título:** Nitrogen incorporation into Ta thin films deposited over Ti6Al4V: a detailed material and surface characterization.

**Autores:** Cristian Padilha Fontoura, Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Melissa Machado Rodrigues, Rodrigo Antônio Barbieri, Janaina da Silva Crespo, Carlos Alejandro Figueroa e Cesar Aguzzoli.

**Periódico:** Journal of Materials Engineering and Performance (Fator de impacto = 1,88).

### **Artigos em andamento**

**1) Título:** Biological and physicochemical insights on surface engineered titanium nitride coatings by thin film deposition and plasma nitriding.

**Autores:** Cristian Padilha Fontoura, Patrícia Bertele, Melissa Machado Rodrigues, Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Rafaele Frassini, Charlene Garcia, Janaína da Silva Crespo, Sandro Martins, Carlos Figueroa, Mariana Roesch-Ely e Cesar Aguzzoli.

**2) Título:** Characterization of latex dressings with addition of hydroxyapatite and silver nanoparticles for biomedical applications.

**Autores:** Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Rafaele Frassini, Caroline Frozza, Cristian Padilha Fontoura, Melissa Machado Rodrigues, Carlos Figueroa, Marcelo Giovanela, Cesar Aguzzoli, Mariana Roesch-Ely e Janaina da Silva Crespo.

## AGRADECIMENTOS

Meu projeto de mestrado foi realizado em um período atípico, onde uma pandemia assolou a população e muitos costumes foram remodelados. Não foi uma época fácil: a convivência com os colegas de laboratório diminuiu, boa parte do trabalho foi realizada de casa e a locomoção para a universidade tornou-se uma questão de medo em contaminar familiares. Perdi meu pai para a COVID-19 no final de 2020 e passei pelo momento mais triste da minha vida. Dito isso, gostaria de agradecer aqueles que me ajudaram a enfrentar essa fase conturbada:

Primeiramente, meu muito obrigada a minha mãe e ao meu pai, que mesmo não estando mais aqui me ensinou a ser corajosa e a batalhar pelos meus objetivos. Sem vocês eu não teria chegado tão longe, ou obtido o apoio e carinho que me foram essenciais.

Agradeço aos meus colegas de laboratório do LESTT (Cristian, Carina, Murilo, Melissa e Bruna) pela força e pelos momentos de descontração. Às meninas do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparos de DNA (Carol e Rafeale), minha enorme gratidão pela ajuda prestada com os experimentos!

Janaína e Mariana, minhas orientadoras, muito obrigada! A paciência e aprendizado que obtive de vocês é imensurável. Cada contribuição dada enriqueceu de maneira inestimável essa pesquisa, e agradeço por terem aguentado uma aluna tão ansiosa quanto eu! Ao professor Cesar Aguzzoli deixo meu sincero reconhecimento por tudo que fez por mim e pelo trabalho em questão. Você foi meu mentor nesse universo da pesquisa desde o princípio, e aprendi muito com você.

Agradeço, também, a CAPES pela bolsa de fomento à pesquisa e aos recursos que permitiram esse trabalho ser passível de realização, bem como a Universidade de Caxias do Sul e ao PPGBIO.

Agradeço à banca pelos reforços valiosos fornecidos a esse projeto de mestrado, tornando-o mais completo e detalhado, melhorando sua qualidade científica.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS E QUADROS .....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1. OBJETIVOS.....	18
1.1.1. OBJETIVO GERAL .....	18
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1. QUEIMADURAS E CURATIVOS INTELIGENTES .....	20
2.2. QUEIMADURAS E PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE.....	20
2.3. BIOMATERIAIS.....	25
2.4. CURATIVOS .....	25
2.5. MATERIAIS UTILIZADOS ATUALMENTE NA CONFECÇÃO DE CURATIVOS .....	26
2.6. LÁTEX NATURAL (NRL) .....	30
2.7. HIDROXIAPATITA (HA).....	33
2.8. NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	34
2.9. INFECÇÃO POR BACTÉRIAS NO LEITO DA FERIDA E FATORES QUE INFLUENCIAM NA ADESÃO DOS MICRORGANISMOS .....	35
2.10. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
2.11. ADESÃO BACTERIANA.....	36
2.12. PRODUÇÃO DE CURATIVOS ATRAVÉS DA ENGENHARIA DE SUPERFÍCIES .....	38
2.13. ENGENHARIA DE SUPERFÍCIES.....	38
2.14. DEPOSIÇÃO FÍSICA DE VAPOR .....	38
2.15. <i>MAGNETRON SPUTTERING</i> .....	39
2.16. ESTERILIZAÇÃO A PLASMA .....	41
3. METODOLOGIA .....	43
3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
3.2. PREPARAÇÃO DOS FILMES DE LÁTEX NATURAL .....	44
3.3. DEPOSIÇÃO DE PRATA (Ag) E HIDROXIAPATITA (HA) .....	44

3.4.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	46
3.4.1.	ANÁLISE QUANTITATIVA ELEMENTAR.....	46
3.4.2.	QUANTIFICAÇÃO DE PRATA E CÁLCIO POR ICP-OES .....	47
3.4.3.	MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO (WCA) .....	48
3.4.4.	RUGOSIDADE (Ra) .....	48
3.4.5.	CÁLCULO DA TAXA DE ABSORÇÃO DE LÍQUIDO DOS FILMES.....	48
3.5.	BIOCOMPATIBILIDADE DOS FILMES .....	49
3.5.1.	CITOTOXICIDADE INDIRETA (MTT) .....	49
3.5.2.	TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR .....	50
3.5.3.	DETERMINAÇÃO DE MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA E PARÂMETROS DE ADESÃO DE CÉLULAS L929 .....	51
4.	RESULTADOS.....	52
4.1.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
4.2.	ANÁLISE QUANTITATIVA ELEMENTAR.....	55
4.3.	QUANTIFICAÇÃO DE PRATA E CÁLCIO POR ICP-OES .....	61
4.4.	ÂNGULO DE CONTATO E RUGOSIDADE .....	63
4.5.	CÁLCULO DA TAXA DE ABSORÇÃO DE LÍQUIDO DOS FILMES) .....	67
4.6.	CITOTOXICIDADE INDIRETA (MTT) .....	69
4.7.	TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR .....	72
4.8.	DETERMINAÇÃO DE MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA E PARÂMETROS DE ADESÃO DE CÉLULAS L929.....	76
5.	CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS.....	80
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – classificação das queimaduras conforme a camada de pele acometida.

**Figura 2** – fases do processo de cicatrização.

**Figura 3** - estrutura química do mero de borracha natural.

**Figura 4** - esquema da estrutura de uma partícula de borracha e seus invólucros.

**Figura 5** - representação da formação do *Staphylococcus aureus* na superfície de um material.

**Figura 6** - representação esquemática da medição do ângulo de contato.

**Figura 7** - esquema de funcionamento do *magnetron sputtering*.

**Figura 8** - *magnetron sputtering* localizado no LESTT I – UCS.

**Figura 9** - esquema representativo da produção do curativo.

**Figura 10** - diagrama de Pareto para o ângulo de contato em função da potência (W) e do tempo (s).

**Figura 11** - superfície de resposta para o ângulo de contato em função da potência (W) e do tempo (s).

**Figura 12** - superfície de resposta em 3 dimensões para o ângulo de contato em função da potência (W) e do tempo (s).

**Figura 13** - espectro da amostra 3 (23W 10s) mostrando os picos relacionados aos elementos presentes: C, N, O e Ag. Nota-se que a simulação coincide com o espectro obtido, fruto de uma curva de calibração prévia em energia dos elementos. O pico de prata é inserido na “primeira camada” da simulação, indicando que a mesma está na superfície do material.

**Figura 14** - esquema do crescimento de filmes finos produzidos por *sputtering*.

**Figura 15** - espectro da amostra de látex natural contendo hidroxiapatita, mostrando os picos relacionados aos elementos presentes: C, N, O e P e Ca.

**Figura 16** - reação do fosfato heptacálcico com o isômero ácido láctico L desprotonado.

**Figura 17** - comportamento apresentado pelas amostras durante o período de um ano. Observa-se que após o primeiro mês, os valores de ângulo de contato mantêm-se constantes e hidrofílicos. As linhas conectando os pontos servem como guia para os olhos.

**Figura 18** - comparação das amostras antes (a) e depois (b) da análise com imersão em PBS.

**Figura 19** - porcentagem de absorção de fluido das amostras em relação ao tempo de imersão em PBS. As linhas entre os pontos servem de guia.

**Figura 20** - efeito citotóxico obtido pelo teste indireto MTT dos extratos comparados ao controle negativo - CN (meio DMEM, 10% SFB e 1% P/S) e ao controle positivo - CP (meio DMEM, 10% SFB, 1% P/S e 5% DMSO). A linha pontilhada representa a viabilidade de 70%, valor mínimo requerido para comprovar viabilidade celular.

**Figura 21** - efeito citotóxico obtido pelo teste indireto MTT do extrato da amostra de látex + HA comparando ao controle negativo - CN.

**Figura 22** - amostras plaqueadas com culta de *S. aureus* em ágar nutriente. (a) amostras 1, 2, 3 e controle (látex puro) e (b) amostras 4, 5, 6 e controle.

**Figura 23** - amostras plaqueadas com culta de *E. coli* em ágar nutriente. (a) amostras 1, 2 e controle (látex puro), (b) amostras 3, 4 e 5 e (c) amostras 6 e HA (látex + hidroxiapatita).

**Figura 24** - análise das amostras com coloração DAPI sob luz UV após contato com a *S. aureus*.

**Figura 25** – análise das amostras com coloração DAPI sob luz UV após contato com a *E. coli*.

**Figura 26** – análise de FEG das amostras em contato com os fibroblastos durante 1, 2 e 7 dias.

**Figura 27** – análise de FEG das amostras em contato com os fibroblastos durante 1, 2 e 7 dias.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1** - tipos de curativos, suas características e aplicações.

**Tabela 2** - especificações do DCCR utilizado nesse estudo. A variável  $x_1$  representa a potência de deposição em watts e  $x_2$  simboliza o tempo de deposição em segundos.

**Tabela 3** - parâmetros de deposição da Ag.

**Tabela 4** - parâmetros de deposição da HA.

**Tabela 5** - resultados de WCA em função da potência e do tempo de deposição.

**Tabela 6** - amostras classificadas como parâmetros ótimos.

**Tabela 7** - quantidade de prata depositada em cada amostra.

**Tabela 8** - quantidade de prata e cálcio em cada amostra. O limite de quantificação para a Ag é 0,0093 mg/kg e para o Ca é 0,0440 mg/kg.

**Tabela 9** - quantidade de prata e cálcio no meio após imersão em água Milli-Q®. O limite de quantificação para a Ag é 0,0093 mg/kg e para o Ca é 0,0440 mg/kg.

**Quadro 1** - ângulo de contato e rugosidade das amostras contendo Ag + HA (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e de látex natural puro.

**Quadro 2** - tempo de prateleira (ângulo de contato x tempo) das amostras.

## RESUMO

Neste trabalho, filmes de NRL foram enriquecidos com hidroxiapatita e nanopartículas de prata com o objetivo de se obter curativos com propriedades específicas - tais como molhabilidade, rugosidade, atividade bactericida - para evitar a adesão celular e permitir a regeneração tecidual sem contaminação de microrganismos. O fosfato de cálcio e o metal nanoparticulado foram incorporados na superfície da matriz polimérica através da técnica de *magnetron sputtering*, gerando seis amostras com parâmetros distintos. Em geral, os filmes de NRL com modificações apresentaram caráter hidrofílico (ângulo de contato entre 23° e 42°), uma condição favorável para aplicações biomédicas, e com rugosidade aumentada após os revestimentos. A análise estatística do planejamento experimental comprovou que o parâmetro de processo que mais influencia na molhabilidade dos filmes é a potência. Os resultados de RBS mostraram que a prata está provavelmente na forma de nanoaglomerados na superfície das amostras. Além disso, a estequiometria do fosfato de cálcio foi obtida e a razão Ca/P encontrada foi de 0,7, indicando que haverá uma degradação maior do material cerâmico no leito da ferida. Ensaios de viabilidade celular MTT revelaram que efeitos não citotóxicos foram observados para quase todos os extratos das amostras (viabilidade acima de 70%) e a análise de halo em ágar mostrou que as membranas apresentam atividade bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* e *E. coli*. Esse trabalho inova no acréscimo de fosfato de cálcio junto ao látex, bem como na aplicação da engenharia de superfícies para modificar esse material. Foi demonstrado no estudo *in vitro* que os filmes NRL enriquecidos devem ser considerados promissores para aplicação na cicatrização de feridas.

**Palavras-chave:** curativos, hidroxiapatita, prata, *magnetron sputtering*, látex.

## ABSTRACT

In this work, NRL films were enriched with hydroxyapatite and silver nanoparticles in order to obtain dressings with specific properties - such as wettability, roughness, bactericidal activity - to prevent cell adhesion and allow tissue regeneration without contamination by microorganisms. Calcium phosphate and nanoparticulate metal were incorporated into the surface of the polymeric matrix using the magnetron sputtering technique, generating six samples with different parameters. In general, modified NRL films showed hydrophilic character (contact angle between 23° and 42°), a favorable condition for biomedical applications, and with increased roughness. The statistical analysis of the experimental design proved that the process parameter that actually influences the wettability of films is power. The RBS results showed that silver is likely to be in the form of nanoclusters on the surface of the samples. Furthermore, the calcium phosphate stoichiometry was obtained and the Ca/P ratio found was 0.7, indicating that there will be a greater degradation of the ceramic material in the wound bed. MTT cell viability assays revealed that non-cytotoxic effects were observed for almost all sample extracts (viability above 70%) and halo agar analysis showed that the membranes showed bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. This work innovates in the addition of calcium phosphate together with latex, as well as in the application of surface engineering to modify this material. It was shown in the *in vitro* study that enriched NRL films should be considered promising for application in wound healing.

**Keywords:** wound dressings, hydroxyapatite, silver, magnetron sputtering, latex.



## 1. INTRODUÇÃO

As lesões por queimaduras são consideradas como a terceira causa de morte acidental mundial e representam um grave risco à saúde [1]. Um recobrimento tecidual deficiente acarreta em infecções e possibilita a proliferação de microrganismos. Além disso, a pele perde sua capacidade de proteção contra bactérias, traumas e lesões, facilitando contaminações [2]. Nesse cenário, os biomateriais aplicados como curativos garantem a integridade do tecido e sua função protetora.

Classificando-se como um material capaz de curar queimaduras por meio de ações biológicas que promovem a angiogênese [3], o látex natural tem tomado lugar proeminente dentre os biomateriais [4]. O mesmo pode ser aplicado no tratamento de pessoas que possuam diabetes e, conseqüentemente, demonstrem dificuldade de cicatrização [5].

Um problema preocupante gerado pelas queimaduras são as infecções, responsáveis por 75% dos óbitos registrados dentre os pacientes [6]. Assim sendo, a incorporação de materiais que possuam propriedades antimicrobianas torna-se vital para minimizar quadros infecciosos [7]. Nesse contexto, a prata na dimensão de nanopartículas vem sendo amplamente empregada na área biomédica devido ao fato de possuir baixa toxicidade às células humanas e atividade contra bactérias e vírus [8].

Além da proteção contra microrganismos, um curativo deve impedir a adesão de fibroblastos para que sua remoção não danifique o tecido recém-formado, evitando o surgimento de dor [9][10]. Ademais, um curativo deve ser hidrofílico, pois essa condição acelera a cicatrização [11]. Do contrário, superfícies com baixa molhabilidade estimulam o crescimento de bactérias, comprometendo o processo de regeneração [10]. Com o intuito de modificar a

superfície da borracha de látex natural, que naturalmente é hidrofóbica, foi utilizada a incorporação da hidroxiapatita na matriz polimérica. Além de possuir caráter hidrofílico [12], a mesma auxilia no processo de reepitelização [13].

Dessa maneira, esse trabalho objetivou a produção de filmes de borracha de látex natural com adição de hidroxiapatita e nanopartículas de prata para uso como curativos na cicatrização de queimaduras ou lesões em pele. Os mesmos foram produzidos pelo método de *casting* do látex com incorporações por *magnetron sputtering* e caracterizados quanto a seu caráter físico-químico e de biocompatibilidade.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. OBJETIVO GERAL**

Obter curativos de borracha de látex natural com incorporação de hidroxiapatita e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas, bem como caracterizar esses filmes em relação às suas propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade.

### **1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Incorporar hidroxiapatita e nanopartículas de prata na superfície de uma matriz de látex natural pela técnica *magnetron sputtering*, formando um produto homogêneo.

Quantificar a prata e estimar a estequiometria do fosfato de cálcio pela técnica de espectrometria de retroespalhamento Rutherford.

Calcular a concentração de Ag e Ca por espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES) para análise da lixiviação desses elementos.

Mensurar durante 1 ano a molhabilidade dos curativos pela medida de ângulo de contato, utilizando para isso um goniômetro.

Medir a rugosidade dos curativos com o auxílio de um perfilômetro.

Averiguar a taxa de absorção de líquidos utilizando solução salina tamponada com fosfato em contato com os curativos.

Avaliar a citotoxicidade dos curativos pelo método indireto MTT, utilizando fibroblastos de camundongos L929.

Avaliar a atividade bactericida dos filmes que foram enriquecidos com

hidroxiapatita e prata pelo teste de difusão em ágar e com auxílio de coloração DAPI.

Observar a morfologia, proliferação e adesão celular da linhagem L929 sobre os filmes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. CURATIVOS INTELIGENTES E QUEIMADURAS**

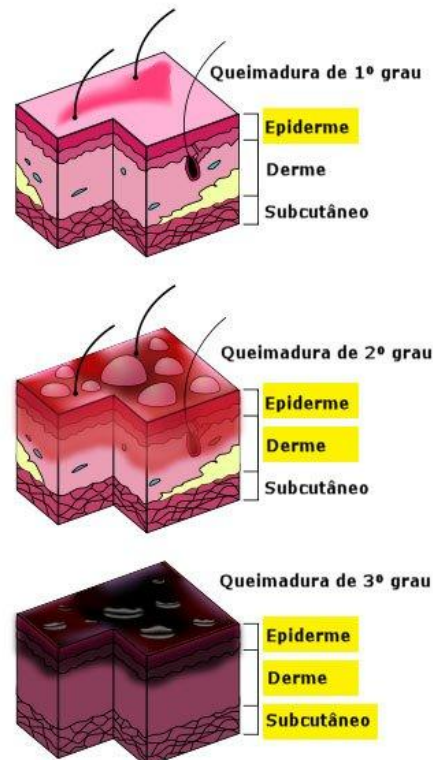
Essa seção traz uma revisão sobre como ocorrem as lesões por queimaduras, além da maneira efetiva de tratá-las com o auxílio de curativos produzidos a partir de biomateriais com propriedades específicas.

### **2.2. QUEIMADURAS E PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE**

A pele, maior órgão do corpo humano, possui três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. As mesmas são possuidoras de inúmeras funções, tais como proteção aos órgãos internos contra a invasão microbiana e radiação UV, bem como regulação da temperatura corporal. Ademais, a pele auxilia no sistema imunológico e no processo de detecção sensorial de estímulos ambientais. As células localizadas em sua superfície são continuamente substituídas por novas células das camadas internas [14].

Ainda que as queimaduras sejam conhecidas por acometer majoritariamente a região do tegumento, em que a pele se localiza, diferentes estruturas corpóreas podem ser afetadas, como as vias aéreas, pulmões, músculos, ossos e demais órgãos internos. Essas fatalidades ocasionam desfiguração, limitação funcional e estigma social [15], gerando enormes gastos financeiros e sequelas psicológicas e sociais ao paciente e a sua família. A maioria dos casos ocorre em casa e são relacionados a lapsos na atenção aos perigos domésticos [16], podendo ser causados pela exposição ao fogo, produtos químicos ou descargas elétricas; sua gravidade depende principalmente da temperatura do agente que os gerou, bem como do tempo de exposição e da área afetada. As queimaduras são consideradas graves quando a

extensão da lesão é maior do que 20% para adultos e 10% para menores de 18 anos [17]. A prevalência de feridas por trauma térmico está relacionada às crianças, e o principal agente é a água quente (com cerca de 37% dos casos) [18]. A classificação das queimaduras conforme o seu grau de gravidade está exemplificada na **Figura 1**. Os curativos produzidos nesse trabalho serão melhor aplicados e eficazes nas queimaduras de primeiro grau.



**Figura 1:** classificação das queimaduras conforme a camada de pele acometida [19].

A Sociedade Brasileira de Queimaduras afirma que ocorrem cerca de um milhão de acidentes por queimaduras no país a cada ano. Destes, 100.000 pacientes irão procurar auxílio médico, e cerca de 2.500 irão falecer direta ou indiretamente de suas lesões [20]. A maioria dos casos resultam em lesões de aproximadamente 20 a 25% de extensão, sendo a face, os membros superiores e o tronco as principais regiões corporais atingidas [17]. A maior parte dos óbitos são causados pelas infecções, fato justificado pela exposição dos pacientes queimados a um número elevado de procedimentos invasivos e por adquirirem

maior grau de imunossupressão [15]. O risco de sepse, definido como resposta destrutiva do corpo a uma infecção, vem sendo drasticamente reduzido devido ao avanço na medicina cirúrgica e nas formas de tratamento. Ademais, as estadias em hospitais são de menor duração, e há a diminuição da taxa de mortalidade [21][22][23]. Nesse contexto, a busca por novos biomateriais que possuam propriedades capazes de assessorar a cicatrização de ferimentos e apresentem atividade bactericida tem se mostrado como prioritária na ciência e na indústria [7], uma vez que é previsto cerca de 20 – 60 milhões de pessoas sofrendo de feridas crônicas até 2026 [24][25].

A principal função da pele é atuar como uma barreira protetiva contra o ambiente externo [26]. As lesões cutâneas, independentemente de sua causa, prejudicam o tecido e causam danos. A resposta fisiológica ao fator nocivo resulta em sangramento, contração dos vasos com conseqüente coagulação sanguínea e resposta inflamatória [27].

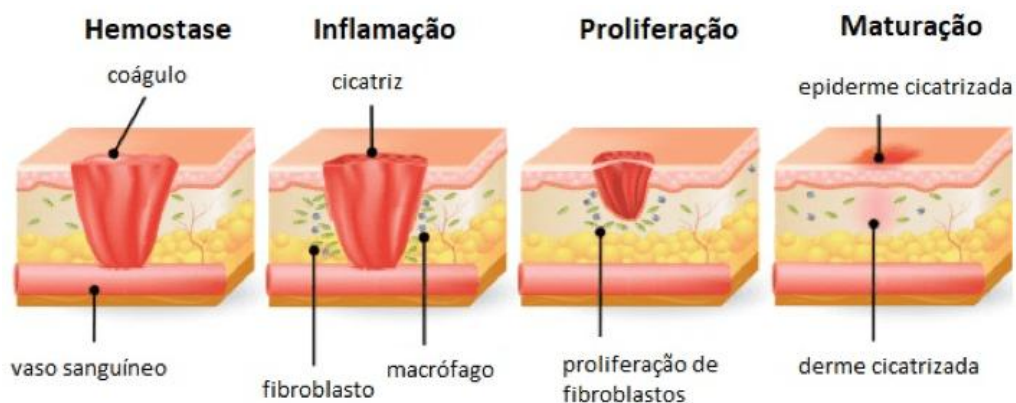
O processo de tratamento de feridas deve ser capaz de fechar a lesão e gerar uma cicatriz funcional e de aparência satisfatória [28]. O desenvolvimento da cicatrização consiste em um conjunto de processos altamente integrados e dependentes, como a hemostasia, inflamação, diferenciação, proliferação e migração de células mesenquimais para o local da ferida, angiogênese, reepitelização, síntese, reticulação e alinhamento do colágeno para fornecer força ao tecido cicatrizante [29].

Existem muitos fatores que podem afetar a cicatrização de feridas (gênero, idade, oxigenação, doenças, nutrição e medicações utilizadas), levando ao reparo inadequado do tecido. Conforme envelhecemos, há um atraso na epitelização e baixa concentração de colágeno (tipo I e tipo III) [30], enquanto alguns fatores como diabetes mellitus, uso de antibiótico sistêmico, doença renal crônica e tabagismo também diminuem a velocidade de cura [31]. Nesse

contexto, uma dieta balanceada ajuda no processo cicatricial, uma vez que a deficiência nutricional também dificulta a reparação tecidual [32].

As feridas que não conseguem progredir nos estágios normais de cicatrização frequentemente entram em um estado de inflamação patológica, devido a um processo de reparo adiado, incompleto ou descoordenado. A maioria das feridas crônicas são úlceras associadas a isquemia, diabetes mellitus ou insuficiência venosa [33].

O processo de cicatrização ocorre em três fases distintas: fase exsudativa ou inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação [34][35][36][37][38]. Um esquema representativo desse processo é mostrado na **Figura 2**.



**Figura 2:** fases do processo de cicatrização [39].

2.2.1 Fase exsudativa/inflamatória: possui o encargo de estimular o sistema de coagulação, ocasionar o debridamento (remoção de tecidos debilitados a fim de preparar o leito da lesão para a nova cobertura) e defender a ferida contra microrganismos. A execução dessa fase é composta por três subfases, que ocorrem praticamente ao mesmo tempo. As mesmas encontram-se listadas a seguir.

2.2.1.1 Fase trombocítica: ocorre o desenvolvimento da hemostasia, que constitui a primeira resposta à lesão e é definida pela vasoconstrição



(diminuição do diâmetro dos vasos sanguíneos). São os trombócitos os responsáveis pela aglomeração das plaquetas e por impulsionar a coagulação.

2.2.1.2 Fase granulocítica: ocorre a liberação de enzimas proteolíticas mediadoras, tais como elastases, colagenases e hidrolases ácidas, além da vasodilatação (aumento do fluxo de sangue). Ademais, essa fase é caracterizada pela produção de exsudato, que leva à perda de proteínas, líquidos e células devido à maior permeabilidade capilar. A fagocitose também está presente nessa fase, onde neutrófilos e macrófagos digerem restos celulares e bactérias.

2.2.1.3 Fase macrofágica: é constituída pelo início da reparação tecidual, em que os macrófagos secretam proteases, fatores de crescimento e substâncias vasoativas que são responsáveis por dar continuidade ao desbridamento e controlar as posteriores fases de cicatrização.

2.2.2 - Fase proliferativa: ocorre a granulação, epitelização e contração. A granulação compreende a formação de um novo tecido que é constituído por capilares, proteoglicanas que hidratam a matriz celular e colágeno. A liberação de fatores responsáveis pela angiogênese ocorre pelos macrófagos, que promovem a proliferação de células endoteliais dos vasos sanguíneos e permitem a formação neocapilar. Além disso, nessa fase, os fibroblastos serão responsáveis pela produção de colágeno. Na epitelização ocorrerá a formação de um novo tecido conjuntivo, que se desenvolverá mediante a redução de capilarização e aumento da produção de colágeno. Essa subfase compreende a migração e divisão mitótica das células basais encontradas nas bordas da lesão. A fase de contração prevê a redução do tamanho da ferida através da ação dos fibroblastos. Além disso, as bordas da ferida realizam um movimento centrípeto.

2.2.3 Fase de maturação: há a ocorrência da remodelação do colágeno e redução da capilarização, tornando a cicatriz mais clara e plana. A remodelação

terá a duração de meses, aumentando a força de tensão presente na cicatriz e diminuindo sua espessura. Alguns dos fatores envolvidos nesse processo são a reabsorção de água e o melhoramento nos componentes da fibra colágena.

### **2.3. BIOMATERIAIS**

Os biomateriais possuem a capacidade de substituir uma parte ou função do corpo de maneira segura, econômica, confiável e fisiologicamente aceitável [40]. Podendo ser aplicados como suturas, próteses, implantes, cateteres e curativos, constituem os principais instrumentos na cura de ferimentos e doenças. Sua eficiência está intrinsecamente relacionada a três fatores principais: a condição de saúde do paciente, as propriedades e biocompatibilidade do material e a competência do profissional que aplica o artefato no receptor [41].

Pertencentes a todas as categorias de materiais (naturais, cerâmicos, poliméricos, metálicos e compósitos), os biomateriais possuem uma ampla gama de utilizações. Os materiais poliméricos, por exemplo, apresentam diversas propriedades singulares que lhes conferem utilidade em aplicações dentais, ortopédicas, instrumentos cardiovasculares e em substituições teciduais. Os componentes poliméricos constituem a maior classe de biomateriais utilizados na medicina [42].

Dentre seu variado espectro de aplicabilidade, os biomateriais podem ser empregados como dispositivos para liberação controlada de fármacos e outras substâncias. Nesse trabalho, as partículas de Ag dispersas na superfície de uma matriz polimérica foram lixiviadas, deixando em aberto locais vagos que permitiram a difusão das demais partículas para o leito da ferida. Dessa maneira, a liberação pode ser prolongada durante horas, dias e semanas [43].

### **2.4. CURATIVOS**

Os curativos constituem um dos principais artefatos confeccionados a partir de polímeros biocompatíveis, sendo aplicados nos tratamentos clínicos desenvolvidos para auxiliar na reparação tecidual. A escolha do material ideal para o curativo baseia-se no conhecimento fisiopatológico e bioquímico dos mecanismos de cicatrização [44]. Os curativos podem ser caracterizados como um meio terapêutico que depende da limpeza e da aplicação do material sobre uma ferida para sua proteção, absorção e drenagem, com o intuito de aprimorar as condições do leito da lesão e auxiliar em sua cura [45].

Dentre os atributos que um curativo moderno e funcional deve apresentar, destacam-se os seguintes [10]:

- a) Prover um ambiente úmido, mas não saturado, a fim de melhorar o processo de cicatrização;
- b) Absorver certo volume de exsudato da ferida, que estimula o crescimento de bactérias;
- c) Fornecer atividade antimicrobiana eficaz e de maneira controlada;
- d) Não apresentar toxicidade às células humanas;
- e) Não promover aderência ao tecido recém formado.

## **2.5. MATERIAIS UTILIZADOS ATUALMENTE NA CONFECÇÃO DE CURATIVOS**

O primeiro curativo moderno foi desenvolvido em meados dos anos 80, proporcionando características essenciais, como fornecimento de um ambiente úmido e absorção de fluidos. Posteriormente, curativos sintéticos passaram a incluir diferentes classes de produtos, tais como hidrogéis, adesivos de tecido, espumas, filmes permeáveis e malhas de silicone [14].

Um curativo é selecionado mediante tipo, profundidade, localização e extensão da ferida, bem como em relação a sua quantidade de secreção e

infecção. Com base no desempenho clínico, o curativo é classificado como antimicrobiano, absorvente, oclusivo, aderente e de debridamento. De acordo com a forma física, os curativos estão disponíveis em forma de pomada, filme, espuma e gel. Devido à origem do material, eles são divididos em três grupos: origem animal, herbal e sintética [14].

Dentre os curativos de origem animal, os mais importantes são esponjas de colágeno com alta porosidade e alta absorção de água. Contudo, seu uso é limitado devido ao alto custo de produção e dificuldade de armazenamento. Além disso, nanofibras fabricadas a partir do método de eletrospinning mostraram resultados promissores nas aplicações de engenharia de tecidos, como a esponja fabricada a partir do colágeno da tilápia [14]. Destaca-se, também, o uso da própolis, um produto resinoso produzido pelas abelhas, como aditivo em curativos para regeneração tecidual. A mesma é rica em flavonoides, que possuem ações biológicas como atividade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana e antifúngica [3].

No que se refere a curativos de origem vegetal, a capacidade de absorção do exsudato é determinada pela propriedade hidrofílica e pela porosidade da matriz. O material mais utilizado nessa categoria é o algodão, além de seivas como a do bambu e ervas, *Hypericum perforatum*, por exemplo. Esses curativos possuem a vantagem como baixa toxicidade às células humanas [14]. Outras ervas que vem sendo estudadas por possuírem propriedades bactericidas são a *Agrimonia eupatoria* (rosácea agrimônia) e a *Satureja hortensis* (segurelha-das-hortas) [46]. A *Aloe vera* (babosa) também é largamente empregada na indústria biomédica devido ao fato de ser uma planta herbácea dotada de atividade anti-inflamatória, antitumoral e antibacteriana [47].

Em relação aos curativos de origem sintética, destaca-se a necessidade de utilização de materiais de baixo custo, como tem sido o caso do poliuretano (PU). O PU vem ganhando destaque devido a sua boa biocompatibilidade,

aceitável propriedade mecânica, baixa citotoxicidade, flexibilidade adequada e permeabilidade. Outros polímeros comumente empregados nesse ofício são o gel de poli(N-isopropil acrilamida) e a espuma de poliuretano-ureia [14]. Também pode-se citar o polidimetilsiloxano (silicone), que possui boa compatibilidade e boa elasticidade, bem como o poli( $\epsilon$ -caprolactona) [48]. A **Tabela 1** exemplifica resumidamente os tipos de curativos utilizados atualmente.

**Tabela 1:** tipos de curativos, suas características e aplicações (adaptada de [14]).

<b>TIPO DE CURATIVO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>APLICAÇÕES</b>
<b>Origem animal (i.e., esponja de colágeno)</b>	Possui propriedades hidrofílicas, poros, alta capacidade de absorção e alto custo.	Feridas agudas e feridas recalcitrantes.
<b>Origem vegetal (i.e., algodão)</b>	Celulose, viscosa (ou combinação de ambos) e altamente aderente à pele.	Feridas de queimaduras, feridas crônicas e úlceras.
<b>Origem sintética (i.e., poliuretano)</b>	Baixo custo, boa distribuição de poros e alta resistência mecânica.	São adequados para feridas relativamente rasas e possuem alta composição absorvente.
<b>Alginato (i.e., ácido algínico)</b>	Fibrosos e altamente absorventes.	Feridas infectadas e não infectadas, inadequados para feridas secas.
<b>Hidrogel (i.e., popilenoglicol)</b>	Transparente, mantém a ferida em ambiente umidificado e apropriado com exsudato baixo a moderado.	Queimaduras, úlceras por pressão e feridas cirúrgicas.
<b>Hidrocoloide (i.e., agar-agar)</b>	Oclusivo, inibe o crescimento de bactérias e é apropriado para feridas de drenagem moderada.	Úlceras por pressão, queimaduras leves, lesões traumáticas e úlceras de perna.
<b>Medicamentoso</b>	Período de utilização mais curto, evita infecções nas feridas, facilita a remoção de tecidos necrosados e promove a regeneração dos tecidos.	Feridas infectadas.

Um artigo publicado em 2019 na revista *Annals of Biomedical Engineering* por ALJGHAMI traz uma revisão sobre os materiais tecnológicos que vêm sendo implementados na fabricação de curativos inteligentes [49]. Os tópicos abaixo são provenientes desse compilado de informações.

- Curativo de nanofibra de fibronectina [50][51][52]: utiliza fibronectina extraída da pele fetal, devido ao fato de que feridas que aparecem no feto antes do terceiro trimestre não deixam cicatrizes. Este curativo recruta células-tronco, que desempenham um papel crucial na cicatrização. Verificou-se que as lesões tratadas com esse material em ensaios *in vivo* cicatrizaram mais rapidamente do que em comparação com curativos normais. Os pesquisadores também descobriram que as feridas cicatrizadas recuperaram epiderme e derme, além de folículos capilares e tecido adiposo.

- Curativo de nanofibra a base de proteína de soja [53][54][55][56]: esse artefato contém moléculas semelhantes ao estrogênio que aumentam o crescimento celular. Como o estrogênio ajuda na cicatrização de feridas em mulheres grávidas, os pesquisadores acreditam que o mesmo pode ajudar na cura de lesões em demais pacientes. Esse novo curativo mostrou proliferação e migração de fibroblastos em ensaios *in vitro* e reepitelização acelerada e menos cicatrizes formadas em estudos *in vivo* comparado ao grupo controle.

- Curativo com membrana de casca de ovo [57]: membranas de casca de ovo foram incorporadas na fabricação de curativos com propriedades reparadoras semelhantes às daquelas da placenta humana. Os pesquisadores responsáveis fazem uso do grande número de cascas de ovos descartados e as transformam em um volume considerável de curativos devido à alta disponibilidade dessas membranas. Esse artefato mostrou capacidade de cura 21% mais rápida do que em comparação ao controle nos estágios iniciais da cicatrização.

- Curativo com mudança de cor frente contato com micróbios [58]: pesquisadores desenvolveram um curativo que muda de cor quando a ferida é infectada. A membrana é feita de agarose, um polissacarídeo geralmente extraído de algas vermelhas, com nanocápsulas de corante espalhadas no interior da matriz, que secretam uma luz fluorescente quando reagem com toxinas bacterianas. O estudo mostrou mudanças na cor dentro de 4 horas, dependendo das cepas de bactérias.

- Curativo híbrido de espuma de hidrofibra [59][60][61][62]: é um artefato constituído de três camadas. A camada mais externa é impermeável e protege contra a camada de exsudato e migração bacteriana, enquanto a camada mais interna é composta de fibras de carboximetilcelulose de sódio que formam um gel quando entram em contato com o exsudato, mantendo o ambiente úmido. Além disso, esse curativo possui atividade antimicrobiana devido à incorporação de prata iônica.

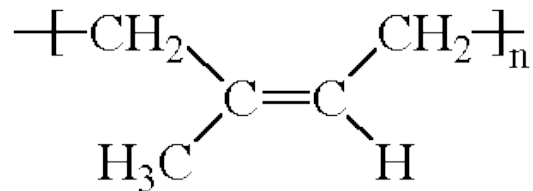
## 2.6. LÁTEX NATURAL (NRL)

Proveniente da árvore do gênero *Hevea brasiliensis*, o látex natural vem tomando lugar proeminente dentre os biomateriais devido ao fato de ser um agente de cura natural [63] que viabiliza a formação de novos vasos sanguíneos, um processo conhecido como angiogênese [64].

Alguns trabalhos já comprovaram a eficácia desse material na cura de feridas cutâneas, diminuindo o tempo de fechamento da lesão [63]. Além disso, o látex também já provou aumentar a proliferação de fibras colágenas e hemácias [65].

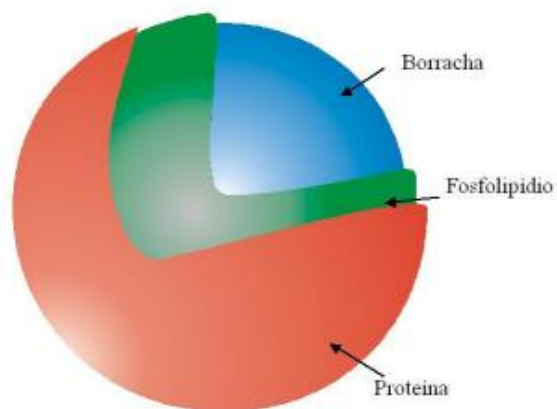
Composto majoritariamente formado por micelas de borrachas, lipídios, aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas, o látex é um sistema coloidal polifásico [66]. Esse material é constituído principalmente por unidades de cis-

1,4-poliisopreno (30 a 45%), conforme estrutura indicada na **Figura 3**, que lhe confere caráter amorfo [67]. Os lutóides equivalem de 10 a 20% do volume total e, além deles, há os chamados complexos de *Frey-Wyssling*. O soro no qual as partículas estão dispersas é denominado soro C.



**Figura 3:** estrutura química do mero de borracha natural.

As partículas de borracha de látex natural mantem-se envoltas por uma película de fosfolipídios e proteínas, que lhe concedem uma carga negativa e geram sua estabilidade coloidal. Os fosfolipídios têm carga positiva e as proteínas têm carga negativa, levando à associação iônica entre dois tipos de moléculas [68]. O esquema de uma partícula de borracha está representado na **Figura 4**.



**Figura 4:** esquema da estrutura de uma partícula de borracha e seus invólucros [68].



O soro B, formado majoritariamente pelos lutóides, possui vários cátions (cálcio, magnésio, cobre e potássio), além de proteínas catiônicas que apresentam ação floculante sobre as partículas de borracha. Por essa razão, o látex é comumente estabilizado com hidróxido de amônio, que intensifica a carga negativa das proteínas a fim de evitar a coalescência. A coloração amarelada do látex é proveniente dos complexos de *Frey-Wyssling*, que são constituídos de carotenóides e lipídios. Os lutóides e os complexos de *Frey-Wyssling* são dissolvidos quando o látex recém coletado é estabilizado com hidróxido de amônio, fornecendo ao produto final um sistema bifásico contemplado pelas partículas de borracha e pelo soro [69][70].

Uma vez que as proteínas conduzem ações biológicas que promovem a angiogênese, o látex natural vem sendo aplicado na neoformação em feridas de pacientes diabéticos que demonstram dificuldade de cicatrização. Ademais, a literatura suporta que sua utilização compreende membranas para a regeneração óssea controlada, matrizes poliméricas para transporte de fármacos e proteínas e lentes no tratamento contra doença de acuidade visual [71][72].

A angiogênese é mais pronunciada quando o tratamento térmico conferido ao látex natural durante sua secagem está na faixa de temperatura entre 65 e 85°C. Essa ocorrência pode ser explicada pelo fato de que a essa temperatura, as partículas de borracha coagulam mais rapidamente durante a evaporação de subprodutos do látex, fazendo com que haja uma maior presença de fosfolipídios e proteínas não ligados por partículas de borracha. Essas proteínas são responsáveis pela atividade de angiogênese do látex [68]. Algumas das proteínas encontradas no látex podem ocasionar reações alérgicas, porém as mesmas são retiradas no momento em que o látex é centrifugado antes de sua distribuição comercial [72].

## 2.7. HIDROXIAPATITA (HA)

A hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) é um material cerâmico de alta porosidade constituído de fosfato de cálcio e amplamente utilizado na indústria biomédica devido a seu alto grau de compatibilidade com o corpo humano. Esse fato é explicado devido a sua similaridade química com os componentes encontrados no tecido ósseo [73], possibilitando a proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Além disso, a superfície da hidroxiapatita possui a capacidade de interagir com moléculas de água, proteínas e colágeno por intermédio de forças moleculares do tipo dipolo, induzindo a regeneração tecidual [74].

Devido ao fato de não possuir toxicidade, esse material cerâmico pode ser empregado como prótese ortopédica, dentária, componente em filtros solares e preenchimento cutâneo, reduzindo a visibilidade de veias e tendões [75][76].

Nesse trabalho, a hidroxiapatita foi acrescida à matriz de látex natural. Materiais que possuem a presença de cálcio regulam a homeostase desse elemento no corpo humano, controlando processos inflamatórios e a proliferação de fibroblastos [77].

O ambiente das feridas é conhecido por possuir um pH ácido em torno de 5-6, devido ao acúmulo de ácido láctico resultante da hipóxia celular, além do aumento de oxigênio necessário para as vias metabólicas durante a cicatrização. Essa acidez presente no seio das lesões leva à desintegração da HA e consequente liberação de cálcio. Esse processo aumenta a velocidade e eficácia de cicatrização das feridas [53], uma vez que a liberação de íons de Ca causa um efeito de contração da lesão e sua consequente diminuição [78].

Além de participar do processo de cicatrização, a literatura suporta que a hidroxiapatita pode ser utilizada em demais tratamentos da pele, como correção de sulcos, preenchimento de cicatrizes e amenização de rugas. Sua

capacidade de induzir a formação de tecido conjuntivo e colágeno faz com que esse material tenha aplicações viáveis no setor estético [79].

## **2.8. NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)**

De acordo com a definição das diversas organizações ISO e ASTM, uma partícula com diâmetro variando entre 1 e 100 nm pode ser considerada como nanopartícula [80]. Em sua forma nanoparticulada, a prata possui atividade antimicrobiana em relação a um número considerável de patógenos, incluindo bactérias, vírus e até mesmo alguns protozoários. Graças a essa propriedade e à baixa toxicidade às células humanas, a mesma vem sendo implementada em uma variada gama de aplicações, dentre elas o tratamento de feridas e infecções, odontologia e sistemas de filtração, em que a atividade patogênica pode acarretar em problemas graves à saúde [81]. Além disso, a permanente resistência contra antibióticos exige o desenvolvimento de novas estratégias bactericidas capazes de combater as infecções [82].

Por efeito de seu tamanho nanoparticulado, a prata obtém uma maior área superficial, logo suas propriedades serão mais pronunciadas e intensas [83]. AgNPs menores demonstram efeitos antibacterianos mais potentes [84]. Apesar de ainda não haver consenso na literatura sobre o mecanismo da atividade bactericida da prata [40], a hipótese mais aceita é de que as nanopartículas permeiam a membrana externa da bactéria, formando os denominados "pits", locais onde a estrutura primária da parede celular, ou seja, cada um dos filamentos de glicano e/ou ramos peptídicos, possam ser afetados pelas AgNPs. O peptidoglicano (PGN) é uma substância específica e essencial na parede celular de quase todas as bactérias. Sua principal característica estrutural são as cadeias lineares de glicano reticuladas por peptídeos curtos. Capazes de destruir as ligações intermoleculares presentes na parede, as AgNPs mostram-se como inibidoras eficientes do crescimento bacteriano [84].

O uso de um agente bactericida junto ao látex é imprescindível, pois as bactérias metabolizam muito provavelmente as proteínas presentes no NRL, permitindo assim a formação de um biofilme. Como as proteínas são essenciais para a formação de novos vasos sanguíneos, a Ag mostra-se como um material capaz de evitar a contaminação do meio [80].

## **2.9. INFECÇÃO POR BACTÉRIAS NO LEITO DA FERIDA E FATORES QUE INFLUENCIAM NA ADESÃO DOS MICRORGANISMOS**

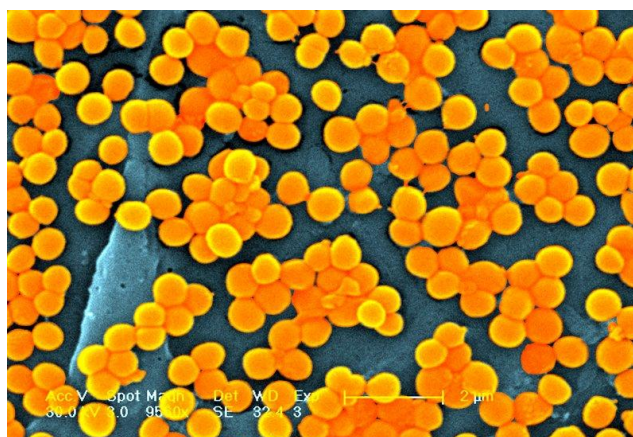
Essa seção expõe uma revisão sobre a bactéria mais recorrente em lesões cutâneas e propriedades dos curativos que afetam a adesão e proliferação desse microrganismo.

### **2.10. *Staphylococcus aureus***

A *S. aureus* é considerada a mais virulenta dentre os representantes de seu gênero devido à alta produção de toxinas, além de ser uma das espécies patogênicas mais corriqueiras. Essa bactéria Gram-positiva apresenta-se na forma esférica, os denominados cocos, possuindo cerca de 1 micrometro de diâmetro. A **Figura 5** mostra os cocos formando um aglomerado com aspecto de cachos de uvas de coloração amarelada em razão da produção de carotenoides [85].

Diversos estudos indicam que a *S. aureus* é um dos principais patógenos detectados em amostras de sangue oriundas de pacientes queimados portadores de bacteremia, ou seja, presença de bactérias na corrente sanguínea, com letalidade de aproximadamente 30%. O contágio provocado por *S. aureus* provoca hipertermia, leucocitose e secreção purulenta, podendo desenvolver resistência contra diversos antimicrobianos, principalmente a penicilina [6]. Por

esse motivo, o uso de nanopartículas de Ag foi escolhido para proteger o ambiente da queimadura contra esse patógeno.



**Figura 5:** representação da formação do *Staphylococcus aureus* na superfície de um material [86].

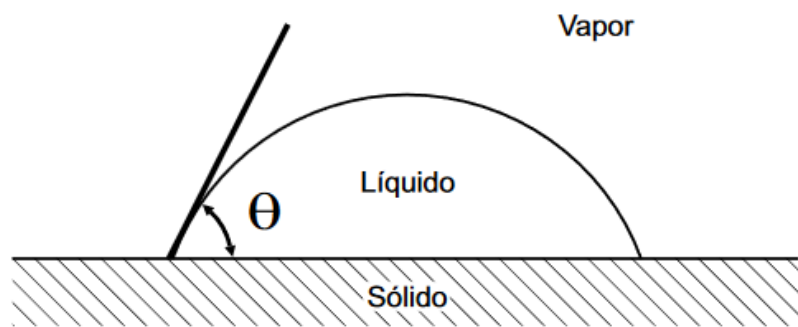
O estudo realizado por BESSA, 2015 [87] mostrou que dentre um grupo amostral de 321 feridas, 217 (69,5%) foram consideradas infectadas e uma ou mais espécies microbianas com importância clínica foram isoladas delas. Um total de 28 espécies microbianas diferentes foram isoladas; 44,2% eram Gram-positivos e 55,8% eram Gram-negativos. As espécies bacterianas mais comuns detectadas foram a *Staphylococcus aureus* (37%), seguidas por *Pseudomonas aeruginosa* (17%), *Proteus mirabilis* (10%), *Escherichia coli* (6%) e *Corynebacterium spp.* (5%).

## 2.11. ADESÃO BACTERIANA

Diversos fatores são responsáveis por ditar como será a adesão de microrganismos na superfície dos materiais, tais como a presença de matéria orgânica, temperatura, pH e propriedades como molhabilidade [88].

A molhabilidade é definida como o contato contínuo de um líquido com uma superfície sólida resultante de uma interação física entre ambos. Essa

característica é importante na análise de uma vasta gama de aplicações. Uma superfície de molhabilidade considerável, ou seja, que possua um ângulo de contato entre o líquido e o sólido menor que 90 graus, é dita hidrofílica e possui alta afinidade com a água [89]. Já no caso em que o ângulo de contato é maior do que 90 graus, a mesma recebe a denominação hidrofóbica [90]. A **Figura 6** representa como é realizada a medida de ângulo de contato.



**Figura 6:** representação esquemática da medição do ângulo de contato [91].

A hidrofobicidade das bactérias afeta diretamente a taxa e intensidade com a qual a adesão microbiana acontece, pois as interações hidrofóbicas aumentam com o acréscimo das ligações/compostos não polares da superfície. Portanto, materiais não hidrofílicos tendem a propiciar a colonização, já que os mesmos favorecem a aproximação de bactérias pela eliminação da camada de água presente na interface [85][88][92].

Quando trata-se de feridas e queimaduras, o exsudato é um líquido que permite a proliferação e adesão bacteriana. Quando parte dessa substância é removida, junto a ela são retiradas bactérias e enzimas protease – ambas prejudiciais ao processo cicatricial [93]. As enzimas proteases degradam os fatores de crescimento e proteínas de adesão presentes na matriz extracelular, quebrando as ligações que unem os aminoácidos [94].

## **2.12. PRODUÇÃO DE CURATIVOS ATRAVÉS DA ENGENHARIA DE SUPERFÍCIES**

Essa seção exemplifica como as técnicas que englobam a engenharia de superfícies podem se mostrar aliadas importante na produção de curativos inteligentes.

## **2.13. ENGENHARIA DE SUPERFÍCIES**

A engenharia de superfícies é uma aliada ao aprimoramento das propriedades de um material, sejam elas tribológicas, de corrosão ou de biocompatibilidade [95]. Seu desígnio é estudar os fenômenos que ocorrem na superfície ou em regiões próximas a ela, com o benefício de não modificar significativamente o *bulk*. Além disso, a engenharia de superfícies é dividida em dois grupos majoritários: o primeiro com formação de interface (filmes e revestimentos) e o segundo sem formação de interface (modificação superficial) [96].

No caso dos biomateriais, a superfície é de extrema importância, pois irá guiar a maneira como o material será empregado no meio biológico. As propriedades de suma importância são aquelas relacionadas à biocompatibilidade, topografia, compatibilidade celular e atividade antimicrobiana [97]. Nesse contexto, os materiais poliméricos utilizados como biomateriais podem ter suas superfícies modificadas por técnicas que utilizam plasma, como a deposição física de vapor [98].

## **2.14. DEPOSIÇÃO FÍSICA DE VAPOR**

A deposição física de vapor inclui processos que depositam filmes finos através da remoção de átomos ou moléculas de um alvo sólido, que serão transportadas até o substrato ou amostra a ser revestida.

Essa técnica é efetuada em câmaras de alto vácuo a fim de aumentar o livre caminho médio, distância média de duas colisões entre partículas, garantindo assim a deposição de um revestimento homogêneo. Além disso, baixas pressões asseguram a boa qualidade da amostra final, uma vez que diminuem a quantidade de contaminantes na atmosfera de trabalho [99].

## **2.15. MAGNETRON SPUTTERING**

Esse processo faz parte das técnicas de deposição física de vapor e é responsável pela deposição de filmes finos e nanopartículas em inúmeras aplicações, como revestimentos de alta resistência mecânica, biomateriais, anticorrosivos, decorativos e com propriedades ópticas e elétricas especiais [100].

Essa técnica permite a deposição de revestimentos de ótima qualidade em áreas relativamente grandes, proporcionando boa aderência ao substrato. Ademais, esse método é capaz de produzir filmes de estequiometria e composição controladas com taxas de deposição relativamente altas e baixa presença de impureza [101].

Nesse procedimento de pulverização catódica, o material de um alvo sólido será removido através do impacto gerado por partículas energéticas e sua consequente transferência de momento [102]. Essa operação é realizada por íons de um gás nobre com alta massa atômica, como o argônio, pois são quimicamente inertes e servirão apenas para arrancar os átomos da superfície do alvo. A ionização ocorre mediante uma diferença de potencial, que originará



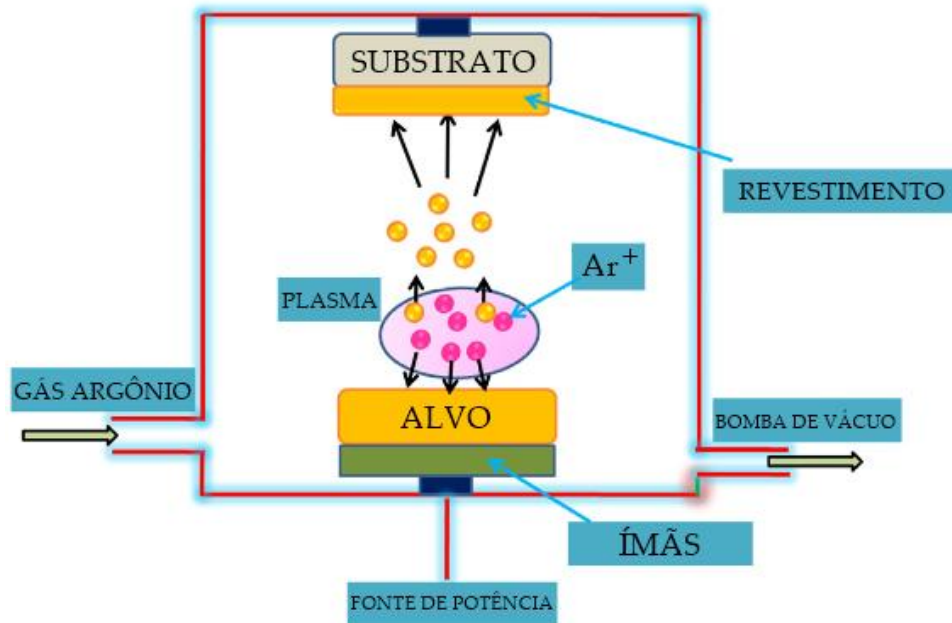
o plasma (cuja cor é geralmente violeta/azul). Então, os cátions gerados serão acelerados em direção ao alvo, bombardeando o mesmo devido a sua tensão negativa, levando à ejeção do material constituinte até o substrato (amostra) [103].

O plasma presente no processo consiste em um gás ionizado a baixas pressões, eletricamente neutro, portanto possui um número equivalente de íons positivos e elétrons. É importante ressaltar que o alto vácuo é empregado a fim de que as potências empregadas não sejam demasiadamente elevadas, estando na ordem de centenas de watts. Caso as pressões fossem altas, o livre caminho médio seria pequeno, acarretando no desvio das partículas do alvo. Sendo assim, as mesmas não seriam capazes de formar um revestimento uniforme sobre as amostras.

Os ímãs localizados próximos ao alvo são responsáveis por gerar linhas de campo magnético que se fecham em frente ao mesmo, atuando como armadilhas de elétrons, que agora irão percorrer um caminho maior. Dessa maneira, a taxa de bombardeamento do alvo irá aumentar, gerando um maior número de átomos ejetados, propiciando a eficiência do processo [99].

A técnica magnetron sputtering é autossustentável (uma vez que os elétrons do plasma vão ionizando mais átomos de argônio), *eco-friendly* (já que não libera gases nocivos na atmosfera), reprodutível e versátil (pois podem-se depositar revestimentos muito ou pouco espessos, dependendo da potência aplicada ao alvo).

A **Figura 7** representa como ocorre a deposição de filmes finos em um *magnetron sputtering* e a **Figura 8** mostra o equipamento localizado no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos da UCS.



**Figura 7:** esquema de funcionamento do *magnetron sputtering* (adaptado de [104]).



**Figura 8:** *magnetron sputtering* localizado no LESTT I – UCS.

## 2.16. ESTERILIZAÇÃO A PLASMA

A esterilização pode ser definida como um processo físico ou químico que destrói ou elimina microrganismos. Os métodos tradicionais de

esterilização incluem autoclave, gás óxido de etileno (OE) e irradiação de raios gama/UV, que são confiáveis e bem compreendidos. Contudo, essas técnicas possuem suas desvantagens. A autoclave pode não ser adequada para materiais com baixo ponto de fusão, como os biopolímeros. Um tratamento de OE é altamente tóxico e até mesmo cancerígeno. A radiação também pode fazer com que os materiais sofram alterações químicas e estruturais significantes durante a esterilização [105][106][107].

Devido à sua flexibilidade em relação ao tamanho e forma do material, os tratamentos à base de plasma estão ganhando mais visibilidade. O método a plasma é eficiente na esterilização de dispositivos biomédicos e oferece várias vantagens, pois é um processo rápido e limpo que ocorre em uma ampla faixa de temperaturas, incluindo a temperatura ambiente [108]. O efeito biocida é possível devido à formação de espécies reativas que atacam sítios nucleofílicos nos microrganismos, inativando-os [109].

A modificação aplicada nos curativos através da deposição por *sputtering* pode ser eficaz como um processo de esterilização [105], principalmente devido à presença do plasma. Além disso, por ser uma técnica que é realizada em alto vácuo, bactérias aeróbicas tendem a ser desativadas devido ao fato de não obterem ATP como fonte de energia. Assim sendo, a utilização do *magnetron sputtering* mostra-se eficaz para minimizar custos e tempo em processos industriais, pois o tratamento e a esterilização das amostras ocorrem concomitantemente.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

No caso de haver duas ou três variáveis independentes, como nessa pesquisa, é recomendado a utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) [110]. Esse trabalho foi planejado com um DCCR  $2^2$ , com  $\alpha$  (distância dos pontos axiais que estendem o delineamento a uma faixa maior de variáveis) igual a 1,4, conforme mostra a **Equação 1**.

$$\text{(Eq. 1)} \quad \alpha = (2^k)^{1/4}$$

Nesse estudo, os pontos axiais representantes dos parâmetros para a deposição de Ag foram escolhidos com base em projetos realizados anteriormente no laboratório [111][112][113]. Como o objetivo dessa pesquisa é produzir nanopartículas de prata, valores baixos de potência ( $x_1$ , Watts) e tempo de deposição ( $x_2$ , segundos) foram empregados. Os parâmetros 1 e -1 representam uma faixa escolhida e 0, o ponto médio. A **Tabela 2** mostra um esquema representativo do DCCR utilizado.

**Tabela 2:** especificações do DCCR utilizado nesse estudo. A variável  $x_1$  representa a potência de deposição em watts e  $x_2$  simboliza o tempo de deposição em segundos.

Experimento	$x_1$	$x_2$	$x_1'$ (W)	$x_2'$ (s)
1	-1	-1	23	4
2	1	-1	37	4
3	-1	1	23	10
4	1	1	37	10
5	-1,4	0	20	7
6	1,4	0	40	7
7	0	-1,4	30	3
8	0	1,4	30	12
9	0	0	30	7
10	0	0	30	7
11	0	0	30	7

As amostras 9, 10 e 11 possuem parâmetros iguais com o intuito de calcular o erro. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software Statistica versão 10.0, com confiabilidade de 95 e  $p = 0,05$ . Além disso, foram obtidos o gráfico de Pareto e a superfície de resposta em relação à variável dependente (ângulo de contato), um dos parâmetros mais importantes desse trabalho e variáveis independentes (potência e tempo). A análise de variância (ANOVA) foi efetuada com o método quadrático de duas vias.

### 3.2. PREPARAÇÃO DOS FILMES DE LÁTEX NATURAL

O látex natural líquido (Imperial Borrachas Industriais) empregado como matriz para os curativos foi uma cortesia da empresa Borrachas Vipal. O mesmo já havia passado pelo processo de centrifugação (60%), com o objetivo principal de diminuir a quantidade de proteínas alergênicas. Além disso, o polímero é estabilizado com hidróxido de amônio a fim de evitar sua coagulação.

Os filmes foram produzidos pelo método de *casting*, vertendo-se 40mL de látex em uma placa de Petri. A mesma foi posteriormente inserida em uma estufa da marca Sanchis durante 24 horas a 65°C, até sua secagem completa.

### 3.3. DEPOSIÇÃO DE PRATA (Ag) E HIDROXIAPATITA (HA)

A deposição de prata ocorreu na superfície do filme de látex natural. As amostras foram inseridas na câmara de vácuo do *magnetron sputtering*, localizado no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos I – UCS, que foi posteriormente evacuado até uma pressão de base de  $3 \times 10^{-7}$  mbar (alto vácuo). Em seguida, através de uma diferença de potencial, gás argônio (LINDE - pureza de 99,9999%) foi ionizado, formando o plasma. Os cátions de Ar gerados, devido ao fato de possuírem uma carga elétrica positiva,

são atraídos ao alvo de prata (pureza de 99,9%), que está sob um potencial negativo e encontra-se a 6 centímetros da amostra. Resultante de uma transferência de momento linear proveniente nessa colisão, átomos do alvo serão ejetados e depositados sobre a superfície dos filmes de látex, conforme parâmetros presentes na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** parâmetros de deposição da Ag.

<b>Pressão de trabalho (mbar)</b>	<b>Potência DC (W)</b>	<b>Fluxo de argônio (cm<sup>3</sup>/min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de deposição (s)</b>
3x10 <sup>-3</sup>	23 a 40	5	25	4 a 12

A deposição de HA ocorreu de maneira semelhante a da prata, dessa vez utilizando-se um alvo sólido de hidroxiapatita (Macashew Tecnologias, Brasil, pureza 99,99%), localizado a 5 centímetros de distância em relação aos curativos. O material cerâmico foi depositado sobre a amostra de látex natural contendo as partículas de Ag. A tendência de agregação das nanopartículas de prata pode diminuir a intensidade de suas propriedades bactericidas exclusivas em nanoescala e reduzir a hidrofobicidade da superfície [114][115][116]. Portanto, com o intuito de evitar esse fenômeno e de prevenir a liberação rápida das AgNPs, reduzindo sua taxa de toxicidade às células humanas e aumentando o tempo útil do curativo [114], a hidroxiapatita foi depositada posteriormente às partículas metálicas. Os parâmetros utilizados na deposição de hidroxiapatita, bem como os de prata, foram escolhidos com base em um estudo prévio realizado no laboratório e estão presentes na **Tabela 4**. Vale ressaltar que o objetivo é depositar um revestimento de pouca espessura de HA, a fim de que a liberação de Ag não seja demasiadamente retardada. A taxa de deposição do material cerâmico é bastante inferior àquela do metal, por isso o tempo de processo, o fluxo de argônio e a potência utilizada são maiores. Nesse experimento, o alvo encontrou-se a 5 cm do substrato. A **Figura 9** mostra um esquema representativo da produção do curativo.

Tabela 4: parâmetros de deposição da HA.

Pressão de base (mbar)	Potência RF (W)	Fluxo de argônio (cm <sup>3</sup> /min)	Temperatura (°C)	Tempo de deposição (min)
1x10 <sup>-2</sup>	50	22	25	10

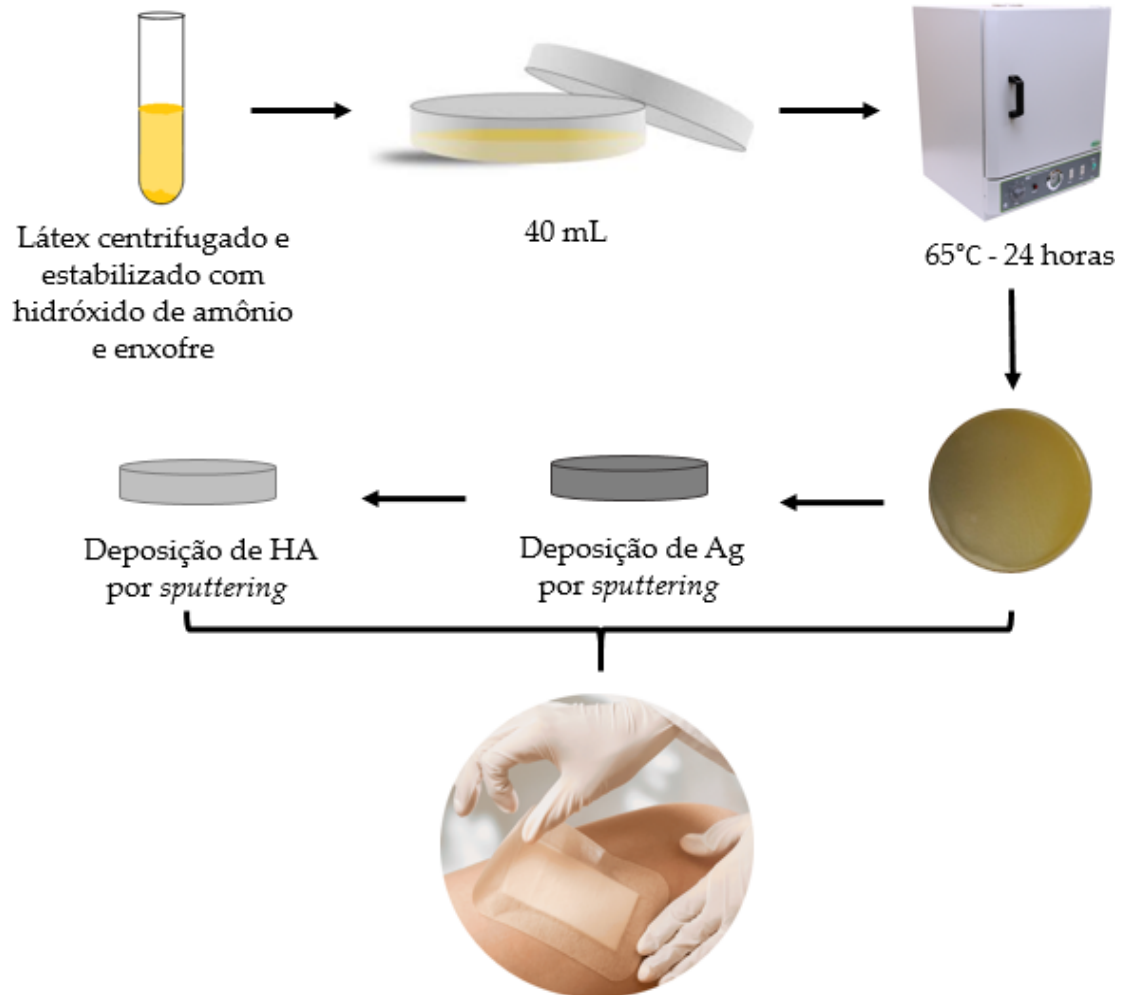


Figura 9: esquema representativo da produção do curativo.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

#### 3.4.1. ANÁLISE QUANTITATIVA ELEMENTAR

A análise quantitativa elementar das amostras foi efetuada a partir da técnica de espectrometria de retroespalhamento Rutherford (RBS), que

encontra-se no Laboratório de Implantação Iônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Utilizou-se um acelerador de íons do tipo Tandem de 3 MV com feixe de íons monoenergético de He<sup>+</sup> de 2 MeV e ângulo de detecção de retroespalhamento de 165°. O objetivo dessa análise foi obter o espectro da composição elementar dos filmes, para que assim a quantidade de Ag fosse averiguada, bem como a estequiometria do fosfato de cálcio. Para isso, empregou-se o uso do software de simulação SIMNRA 7.02. Diferentemente das demais análises empregadas nessa pesquisa, que foram aplicadas aos filmes contendo Ag + HA, a caracterização de RBS foi efetuada com amostras de látex contendo apenas prata (6) e amostra de látex contendo somente hidroxiapatita (1).

#### **3.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE PRATA E CÁLCIO POR ICP-OES**

A prata e o cálcio presentes nas amostras foram quantificados por meio da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES), utilizando um espectrômetro ICP-OES ICAP série 7200-duo da THERMO SCIENTIFIC do Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais (LAPAM) da Universidade de Caxias do Sul. Os métodos empregados foram o 3120B e o 3030E, descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW) 23ª edição (Standard, 2017). Para essa caracterização, realizou-se a dissolução das amostras em HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) por 3 h. O ensaio ocorreu à temperatura de 23°C ± 5°C.

A lixiviação de Ag e Ca foi realizada no mesmo equipamento, dessa vez colocando-se 2,6 gramas de cada amostra em contato com água Milli-Q® durante 48 horas à temperatura ambiente. As amostras boiam sobre a água devido ao fato de possuírem baixa densidade, fazendo com que apenas o lado



com revestimento fique em contato com o fluído. A água Milli-Q® foi escolhida em razão de sua pureza, que não mascara o resultado do ICP.

#### **3.4.3. MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO (WCA)**

Com a técnica da gota séssil foi possível medir o ângulo de contato dos filmes, utilizando-se o equipamento goniômetro (localizado no LCMAT, sala 201 A do bloco V da UCS, Modelo 300, SEO Phoenix, Coreia do Sul). A fim de determinar a molhabilidade dos filmes, foram analisadas três gotas por amostra, e cada gota foi medida dez vezes. Nesse teste, o líquido empregado foi a água destilada. Além disso, o tempo de prateleira das amostras foi mensurado durante 1, 2, 3 e 52 semanas, com o intuito de verificar a manutenção da hidrofiliabilidade após 1 ano de estocagem. As amostras foram armazenadas à temperatura/luz ambiente dentro de uma placa de Petri para evitar parte do efeito da umidade.

#### **3.4.4. RUGOSIDADE (Ra)**

A rugosidade média (Ra) das amostras foi averiguada a partir de medições em um perfilômetro (112, TaylorHobson, Inglaterra), utilizando-se 3 trilhos de 10mm em 3 direções distintas (0°, 45°, 90°). O equipamento encontra-se no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos II.

#### **3.4.5. CÁLCULO DA TAXA DE ABSORÇÃO DE LÍQUIDO DOS FILMES**

A metodologia em questão foi adaptada de ADATI, 2006 [117], que também procurou estudar a taxa de absorção de filmes que posteriormente seriam utilizadas como curativos. As massas das amostras foram medidas antes

e depois (1 e 24 horas) da imersão em solução salina tamponada com fosfato – PBS (pH = 7,4). A porcentagem de absorção do líquido foi calculada de acordo com a **Equação 2**.

$$\text{(Eq. 2) Taxa de absorção de líquidos (\%)} = \frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa seca}} \times 100$$

### **3.5. BIOCOMPATIBILIDADE DOS FILMES**

#### **3.5.1. CITOTOXICIDADE INDIRETA (MTT)**

Inicialmente o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina / estreptomicina (P/S) foi colocado em contato com todas as amostras em concentração de 0,1 g de amostra/mL de meio durante 24 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, a citotoxicidade foi avaliada pelo método indireto do ensaio de MTT conforme ISO 10993-12 [118]. Essa técnica é baseada na redução do MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) pela enzima desidrogenase mitocondrial na formação de cristais de formazan. As células L929 foram semeadas a uma densidade de 5x10<sup>4</sup> células/mL em 100 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Após obtenção de confluência 70-80%, as células foram tratadas com a solução de extração obtida pela imersão das amostras durante 1, 2 e 7 dias. Para o controle negativo, utilizou-se meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S) e para o controle positivo utilizou-se DMSO 5% (dimetilsulfóxido) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi removido e 1 mg/mL de MTT em meio isento de SFB e P/S foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37°C durante 2h em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, retirou-se a solução de MTT e dissolveu-se os cristais de

formazan em 100 µL de DMSO. Realizou-se a leitura espectrofotométrica a 570 nm em um leitor de microplacas (espectros Me<sup>2</sup>, Molecular Devices, EUA) e os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade. A absorvância do controle negativo representou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle.

### 3.5.2. TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Para essa análise, foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli*. A diluição do inóculo da bactéria em solução salina esterilizada foi realizada de modo a apresentar a mesma turbidez da escala 0,5 de MacFarland, a fim de obter uma densidade celular aproximada de  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente, as placas foram inoculadas com *swab* estéril.

No teste de difusão, placas de meio de cultura (Müeller-Hinton) foram inoculadas de modo uniforme e separadamente com *S. aureus* e *E. coli*. Após, amostras com 1 centímetro de diâmetro foram colocadas sobre as placas com o inóculo. As mesmas ficaram incubadas em estufa bacteriológica durante 24 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  e as zonas de inibição foram analisadas.

Além disso, foi utilizado o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), corante fluorescente que emite a cor azul brilhante, amplamente utilizado para marcar DNA. Deste modo, após a incubação das amostras com *S. aureus* e *E. coli* durante 24 h, os filmes foram retirados e 10 µL de corante fluorescente DAPI foram adicionados na região que ficou diretamente em contato com o microrganismo. Em seguida, as amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência, considerando a presença de “pontos” de cor azul brilhante como indicativo de viabilidade bacteriana.

### 3.5.3. DETERMINAÇÃO DE MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA E PARÂMETROS DE ADESÃO DE CÉLULAS L929

Para a determinação de parâmetros de adesão, distribuição topográfica e morfologia, células L929 foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/mL sobre as amostras para as análises de 1, 2 e 7 dias. Utilizou-se 2000  $\mu$ L de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) sobre os filmes durante 1, 2 e 7 dias. Posteriormente, fixou-se as células com solução de glutaraldeído 3% em PBS (v/v) durante 15 minutos e com etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (v/v) durante 10 minutos para cada concentração, a fim de permitir o seu manuseio no interior do microscópio eletrônico. As amostras foram mantidas em um dessecador até a realização da análise de MEV-FEG.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir estão relacionados com as amostras produzidas com base no planejamento experimental. De um total de 11 filmes, após a análise estatística foram escolhidos os 6 que possuem o menor ângulo de contato para as caracterizações.

### 4.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

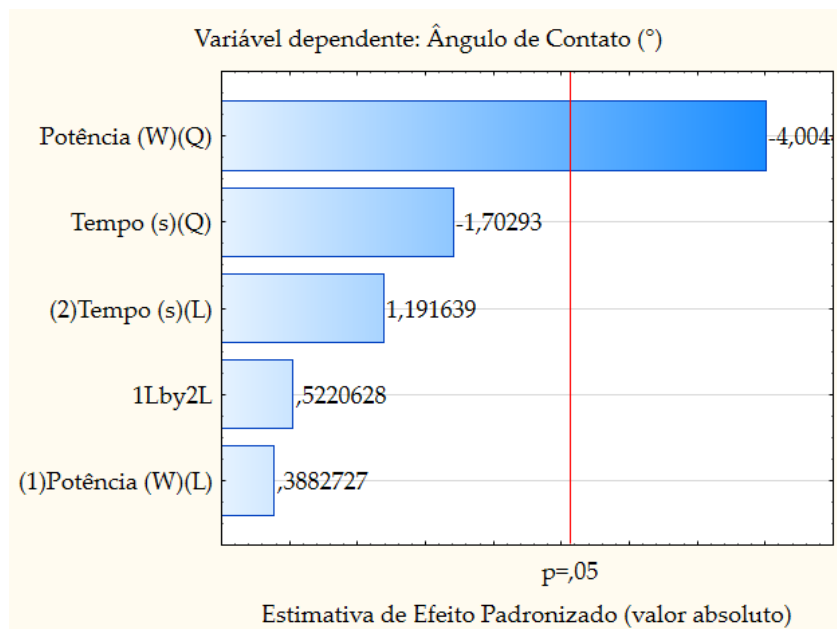
É imprescindível que um projeto científico, antes de ser iniciado, deva passar por uma análise de condições experimentais a fim de restringir o uso de verbas, equipamentos e materiais de consumo. Além disso, o tempo disposto para a realização da pesquisa pode ser drasticamente reduzido quando são utilizadas ferramentas para otimizar parâmetros e indicadores [119] [120].

A análise estatística dos dados foi realizada em razão da medida do ângulo de contato, parâmetro relevante para a pesquisa. Os resultados que serviram como objeto de estudo são apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** resultados de WCA em função da potência e do tempo de deposição.

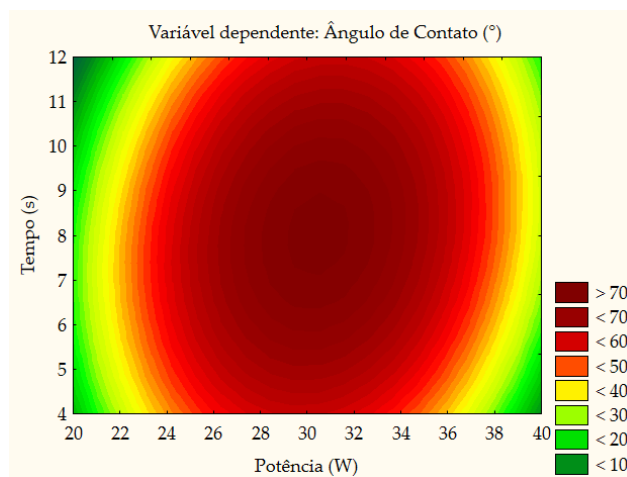
<b>Experimento</b>	<b>WCA</b>
1 (23W 4s)	$33 \pm 2^\circ$
2 (37W 4 s)	$37 \pm 1^\circ$
3 (23W 10s)	$23 \pm 1^\circ$
4 (37W 10s)	$42 \pm 3^\circ$
5 (20W 7s)	$38 \pm 2^\circ$
6 (40W 7s)	$33 \pm 3^\circ$
7 (30W 3s)	$48 \pm 1^\circ$
8 (30W 12s)	$75 \pm 3^\circ$
9 (30W 7s)	$78 \pm 2^\circ$
10 (30W 7s)	$78 \pm 2^\circ$
11 (30W 7s)	$78 \pm 2^\circ$

O diagrama de Pareto (**Figura 10**) compara a relevância estatística dos efeitos principais lineares (L), dos efeitos quadráticos (Q) e dos efeitos das interações.

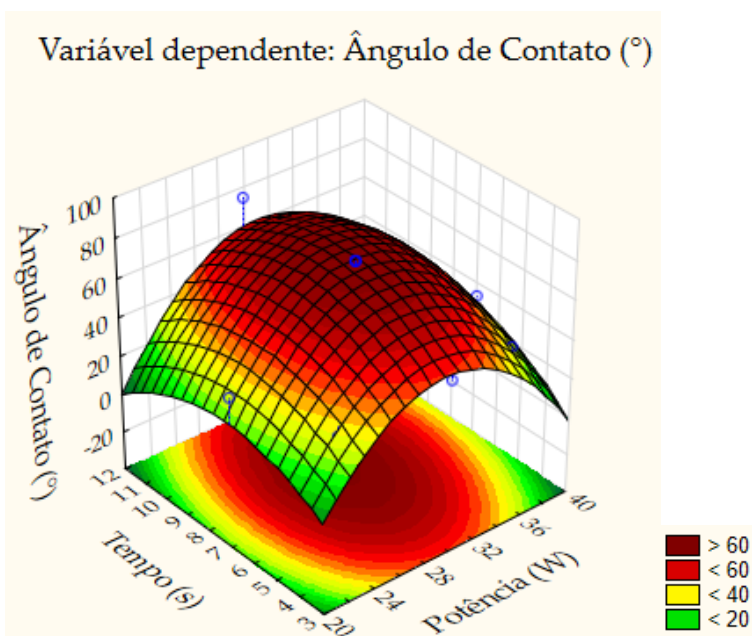


**Figura 10:** diagrama de Pareto para o ângulo de contato em função da potência (W) e do tempo (s).

O fator quadrático da potência mostra-se como o único parâmetro influente, pois o seu nível de significância encontra-se acima do valor de  $p$ . É possível concluir, portanto, que há uma associação estatisticamente significativa entre o ângulo de contato e a potência aplicada à deposição de prata. Quando o coeficiente para um termo ao quadrado é significativo, observa-se que a relação entre o fator e a resposta segue uma linha curva [121], assim como demonstrado nas superfícies de resposta (**Figuras 11 e 12**).



**Figura 11:** superfície de resposta para o ângulo de contato em função da potência (W) e do tempo (s).



**Figura 12:** superfície de resposta em 3 dimensões para o ângulo de contato em função da potência (W) e do tempo (s).

Observa-se que os menores valores de ângulo de contato (regiões verde e amarela) encontram-se entre duas faixas principais de potência: 20-23 W e 37-40 W. A explicação para esse fenômeno baseia-se, em um primeiro momento, no estado da arte, que suporta que quanto maior forem as nanopartículas, maior será o ângulo de contato. Esse fato que pode explicar a diminuição da molhabilidade conforme a potência atinge os 30 W [122]. Potências maiores

acarretam em partículas maiores depositadas sobre o substrato. Contudo, ao começarem a se aglomerar, as nanopartículas de prata formarão *nanoclusters*, estado mais estável, com caráter mais hidrofílico [123][113]. O surgimento desses aglomerados ocorre provavelmente depois dos 30 W de potência, uma vez que o ângulo de contato das amostras diminuiu. Para completar e confirmar essa hipótese, uma análise de microscopia eletrônica de transmissão deve ser realizada. Além disso, no caso do experimento realizado nesse trabalho, que possui baixo tempo de deposição (4 a 12 segundos), constata-se que esse parâmetro não é influente sobre a molhabilidade da superfície do material.

A fim de dar continuidade às análises dos curativos, foram escolhidas as 6 amostras que apresentaram menor ângulo de contato, segundo os experimentos destacados em vermelho na **Tabela 5**. A numeração dos filmes foi reorganizada conforme apresentado na **Tabela 6**:

**Tabela 6:** amostras classificadas como parâmetros ótimos.

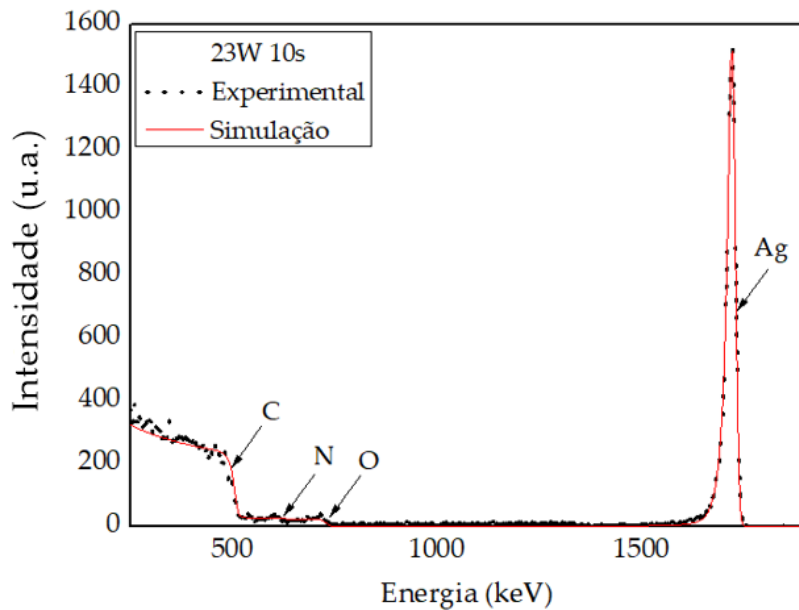
<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Amostra 4</b>	<b>Amostra 5</b>	<b>Amostra 6</b>
20W 7s	23W 4s	23W 10s	37W 4s	37W 10s	40W 7s

#### 4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA ELEMENTAR

A análise de RBS nos filmes proporcionou uma visão geral da composição elementar. Os espectros obtidos mostram um pico referente ao carbono, componente principal do cis-1,4-poliisopreno, além do nitrogênio e oxigênio, que estão relacionados às proteínas e à umidade.

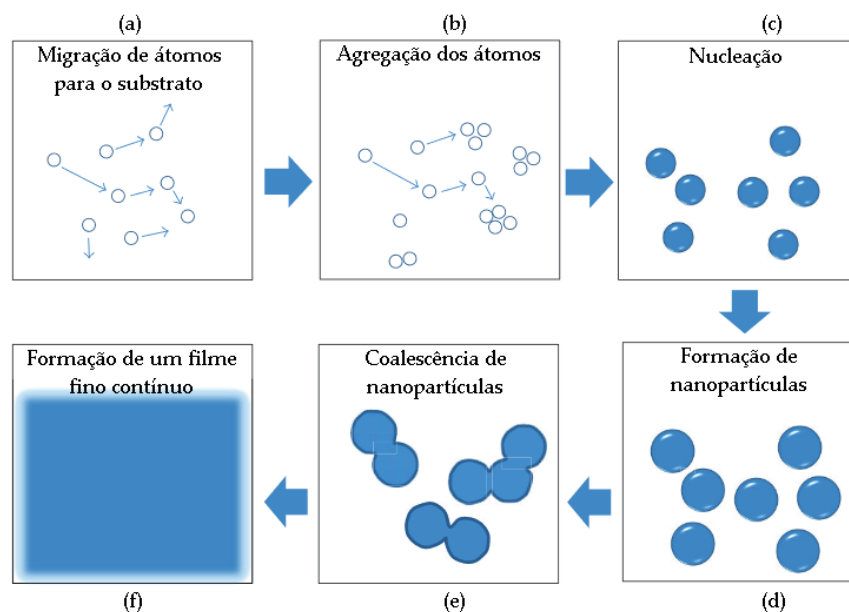
Já em relação ao pico de Ag encontrado nesse trabalho (**Figura 13**), nota-se que há muita semelhança com aquele encontrado em BOIS, 2009 (referente à amostra Fag20siNaB) [124].





**Figura 13:** espectro da amostra 3 (23W 10s) mostrando os picos relacionados aos elementos presentes: C, N, O e Ag. Nota-se que a simulação coincide com o espectro obtido, fruto de uma curva de calibração prévia em energia dos elementos. O pico de prata é inserido na “primeira camada” da simulação, indicando que a mesma está na superfície do material.

BOIS et al. afirmam em seu estudo que a amostra intitulada Fag20siNaB apresenta um agregado de nanopartículas. Isso é um indicativo de que as AgNPs desse trabalho podem se encontrar na mesma configuração, formando ilhas. A **Figura 14** traz um esquema de como formam-se as ilhas de NPs. A formação de nanopartículas por *sputtering* é majoritariamente dependente da distância substrato-alvo, tempo e potência de deposição [125]. Se houvesse a formação de um filme fino metálico, o pico de Ag apareceria como um platô, diferentemente da curva estreita obtida nesse trabalho.



**Figura 14:** esquema do crescimento das partículas na formação de filmes finos produzidos por sputtering (adaptado de [125]). No presente trabalho, há indícios de que a configuração alcançada é aquela presente na figura (e).

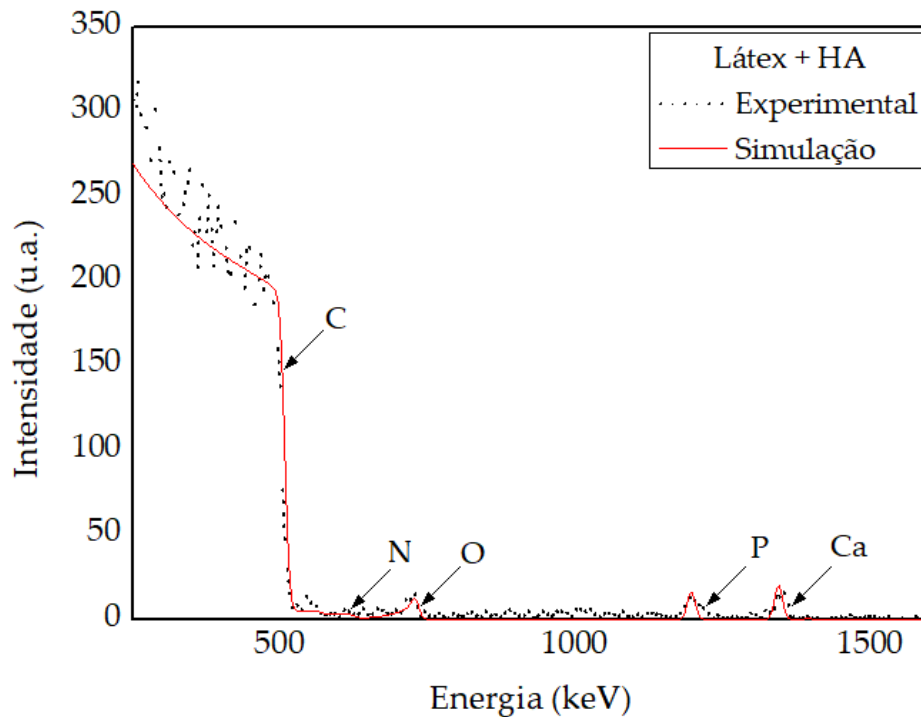
A simulação de espectros de RBS através de softwares como o SIMNRA possibilita o cálculo da concentração elementar na amostra analisada. A quantidade de prata depositada em cada curativo foi avaliada e os resultados encontram-se na **Tabela 7**. A amostra 2 (23W 4s) mostrou um problema durante a análise, por isso não consta na tabela. Sabe-se que quanto maior o tempo e a potência de deposição, maior será a quantidade de material depositado. Quando a potência aumenta, maior será a energia do plasma, gerando quantidades mais significativas de espécies reativas ( $\text{Ag}^+$ ) e consequentemente mais átomos ejetados do alvo [126]. Por sua vez, tempos maiores permitem que mais partículas sejam depositadas sobre a amostra, aumentando sua concentração areal. Essa relação fica bem explícita ao se compararem amostras com tempos de deposição iguais (3 e 5) e potências iguais (4 e 5).

**Tabela 7:** quantidade de prata depositada em cada amostra.

1 (20W 7s)	3(23W 10s)	4 (37 W 4s)	5(37W 10s)	6 (40W 7s)
4,75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	8,64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	5,83 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	31,39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	19,73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Na análise realizada pelo SIMNRA, uma camada de prata contendo uma pequena quantidade de oxigênio foi simulada para que as curvas simuladas e experimentais se sobrepujassem (**Figura 13**). Essa ocorrência pode estar relacionada à incorporação de oxigênio na superfície do material devido à umidade, uma vez que as amostras não foram armazenadas em um dessecador. Ademais, a formação de pequena quantidade de óxido de prata na superfície das AgNPs pode se desenvolver, como previamente reportado pela literatura [127]. Esse fenômeno de alta atividade oxidativa das nanopartículas de prata gera a oxidação parcial das mesmas para íons prata, que pode resultar em vários efeitos nos sistemas biológicos, induzindo citotoxicidade, respostas imunológicas e morte celular [128]. Íons de prata e óxido de prata já foram eficientemente utilizados contra bactérias tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [129][130], uma vez que os  $Ag^+$  possuem um potencial aumentado de toxicidade em relação à prata metálica e às AgNPs [128]. Além disso, pode ocorrer a presença de proteínas do látex (que contém grupos oxigenados) ao redor de AgNPs, que auxiliam em sua estabilização [127][131].

Além de caracterizar a prata presente na amostra, a análise de RBS permitiu avaliar o fosfato de cálcio depositado. A razão Ca/P da amostra contendo hidroxiapatita foi calculada, e o valor encontrado foi de 0,7. O espectro em questão encontra-se exposto na **Figura 15**.



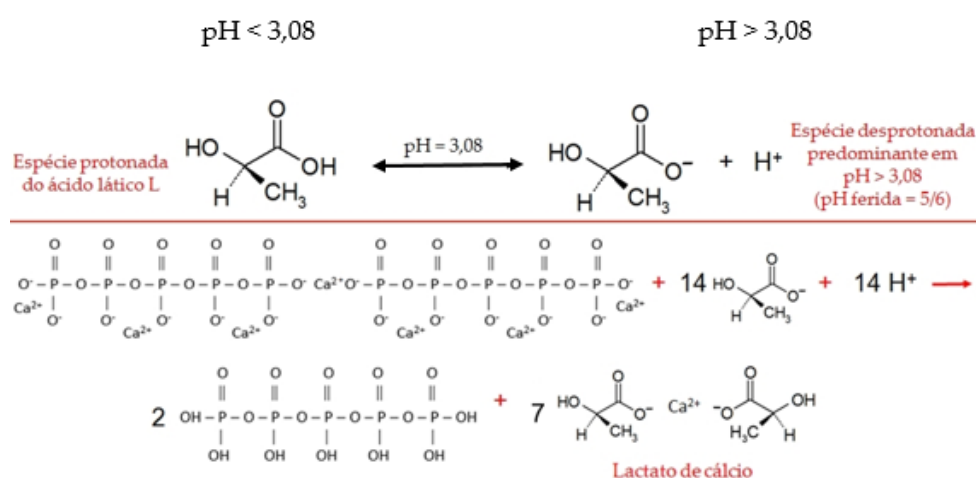
**Figura 15:** espectro da amostra de látex natural contendo hidroxiapatita, mostrando os picos relacionados aos elementos presentes: C, N, O e P e Ca.

A razão entre esses dois elementos está fortemente ligada às propriedades mecânicas e à taxa de biodegradação do fosfato de cálcio [132]. Conforme visto na literatura [133], A HA possui  $\text{Ca/P} = 1,67$  e elevada resistência mecânica, que torna-se inferior nos demais casos de estequiometria, como  $\text{Ca/P} = 1,57$  e  $\text{Ca/P} = 1,87$ , por exemplo. Todavia, o fator que tem mais importância no presente estudo é a liberação de íons cálcio, que em um pH ácido como o do leito da ferida é maior, contribuindo com a função terapêutica de contração e fechamento o leito da lesão [134].

A literatura já demonstrou que o fosfato de cálcio pode ser empregado em aplicações biomédicas, mesmo quando não apresenta a razão  $\text{Ca/P}$  estequiométrica ( $\text{Ca/P} = 1,67$ ) [135]. Inclusive, quanto menor a razão molar  $\text{Ca/P}$ , mais ácido e solúvel em água o fosfato de cálcio será, além de ter a taxa de degradação maior [136][137], fatores que serão benéficos na aplicação almejada

nesse trabalho. Essa diferença na estequiometria ocorre porque vários parâmetros empregados no processo de *sputtering* modificam as características do material, tais como temperatura, potência, tempo e taxa de deposição. Pesquisas encontradas no estado da arte, como a da YAMAGUCHI et al., 2006, afirmam que uma maior potência utilizada para gerar o plasma aumenta a razão Ca/P. Como o cálcio possui uma taxa de deposição baixa, uma potência maior será capaz de remover esses átomos do alvo com maior eficácia [138]. A densidade de potência utilizada nesse trabalho foi de 2,55 W/cm<sup>2</sup>, enquanto em [138] o valor foi de 5,1 W/cm<sup>2</sup> (tempo de deposição = 3 horas, pressão de base = 3x10<sup>-5</sup> e pressão de trabalho = 1x10<sup>-3</sup> mbar).

Na literatura, o fosfato cuja razão Ca/P é 0,7 denomina-se heptacálcico [139], e a estrutura proposta encontra-se na **Figura 16**. No corpo, o ácido presente no seio da lesão é o isômero ácido láctico L [140], cuja espécie desprotonada é predominante em um valor de pH acima de 3,08 [141], sendo que o pH da ferida é de aproximadamente 5. A reação estimada entre a espécie desprotonada e o fosfato pode ser observada na **Figura 16**, obtendo-se o lactato de cálcio como produto. A formação desse sal impede a acidificação excessiva do leito da ferida, e sabe-se que um pH mais alto exerce efeito inibidor sobre a adesão de bactérias, como a *S. aureus* [142].



**Figura 16:** reação do fosfato heptacálcico com o isômero ácido láctico L desprotonado.

#### 4.3. QUANTIFICAÇÃO DE PRATA E CÁLCIO POR ICP-OES

A quantificação de prata e cálcio nas amostras tratadas e sem revestimento foi realizada por ICP-OES e os resultados encontram-se na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** quantidade de prata e cálcio em cada amostra. O limite de quantificação para a Ag é 0,0093 mg/kg e para o Ca é 0,0440 mg/kg.

Elemento/ amostra	Látex puro	1 (20W7s)	2 (23W4s)	3 (23W10s)	4 (37W4s)	5 (37W10s)	6 (40W7s)
Prata (mg/kg) ou (ppm)	0,04	26,98	16,46	27,30	22,04	54,84	53,71
Cálcio (mg/kg) ou (ppm)	39,11	87,61	82,76	95,40	86,24	97,41	82,21

Comparando-se esse resultado com aquele obtido para a prata no RBS, nota-se uma concordância entre os dados. Na técnica de espectrometria de retroespalhamento Rutherford, a ordem crescente de quantidade de Ag (excluindo a amostra 2, que apresentou um problema na hora da medição) foi a seguinte: 1-4-3-6-5, enquanto que para o ICP-OES foi 2-4-1-3-6-5. A diferença observada é oriunda das metodologias diferentes empregadas nos ensaios. Como cada membrana produzida possui cerca de 10 g, a quantidade de Ag presente variará entre 0,16 e 0,48 mg. A pequena quantidade de prata na amostra de látex puro pode ser oriunda da composição mineralógica do solo.

Além disso, é importante destacar que o valor de concentração de prata nesse estudo está em concordância com a literatura, que já demonstrou que uma parte por milhão (1 ppm) ou menos desse elemento é eficaz contra bactérias [143]. Para corroborar ainda mais com essa constatação, o estado da arte demonstrou que 5-50 partes de prata por milhão é tóxico para a maioria das bactérias, e curativos comerciais como o Acticoat®, Aquacel Ag® e Silvasorb®

fornecem concentrações de 1–100 ppm [144][145]. Esses valores são seguros à saúde humana, uma vez que o Environmental Protection Agency-USA prevê que doses de 5 mg/Kg de massa corpórea/dia de prata são aceitáveis com improváveis riscos, sendo a dose limite de 14 mg/Kg de massa corpórea/ dia. Assim, uma pessoa com massa de 70 Kg em uma dieta regular pode consumir até 90 mg/dia de prata [146].

Já em relação ao cálcio, é possível inferir que o látex puro já possui certa quantidade desse material em sua composição devido aos cátions presentes no soro B. Após a deposição do metal por sputtering, a quantidade do mesmo nas amostras aumentou, ficando em uma média de 88,605 mg/kg. Os valores obtidos para todas as condições de revestimento são parecidos, uma vez que o parâmetro utilizado para a incorporação do Ca foi igual em todas os curativos. Em cada filme de cerca de 10 gramas, haverá uma média de 0,89 mg de cálcio.

Após a obtenção desses resultados, avaliou-se a lixiviação de Ca e Ag em meio aquoso (água Milli-Q®). A quantificação dos elementos encontra-se na **Tabela 9**.

**Tabela 9:** quantidade de prata e cálcio no meio após imersão em água Milli-Q®.

O limite de quantificação para a Ag é 0,0093 mg/kg e para o Ca é 0,0440 mg/kg.

Elemento/ amostra	Água Milli-Q®	Látex puro	1 (20W7s)	2 (23W4s)	3 (23W10s)	4 (37W4s)	5 (37W10s)	6 (40W7s)
Prata (mg/L) ou (ppm)	0,00	0,00	0,08	0,06	0,17	0,07	0,07	0,05
Cálcio (mg/L) ou (ppm)	0,00	0,22	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02

Em relação à liberação de cálcio, observa-se que a única amostra capaz de lixiviar o elemento no fluido em questão foi a de látex puro. Isso pode ocorrer devido ao fato de que o Ca que se encontra intrinsecamente no látex está sendo

liberado, enquanto o cálcio presente na HA dos demais filmes não pode ser detectado, uma vez que sua solubilidade ocorre em meios mais ácidos (como o das feridas) [147]. Como as amostras ficam apenas com o lado tratado em contato com a água, o cálcio que já está no próprio polímero não consegue migrar para a superfície quando há a deposição de Ag e HA.

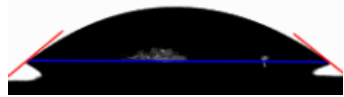





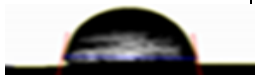
A prata, por sua vez, teve uma média de lixiviação de  $0,066 \pm 0,011$  mg/L após 48 horas de imersão em água Milli-Q®, considerando-se as amostras 1, 2, 4, 5 e 6. A amostra 3, porém, mostrou um aumento na liberação do metal, chegando a 0,17 mg/L. Isso pode ter acontecido em decorrência de que a Ag foi depositada com baixo tempo e em baixa potência, portanto as NPs devem ser pequenas. Contudo, através da primeira análise de ICP, observou-se que ela possui mais prata do que as amostras 1 e 2, demonstrando que há uma combinação de fatores entre tamanho e quantidade de partículas [148]. Resultados similares foram encontrados na literatura, como em amostras comerciais de tecidos contendo prata em contato com suor sintético (pH 6,5) [148]. Nesse trabalho desenvolvido por Kulthong et al., 2010, nos tecidos comerciais cuja lixiviação de prata ocorreu entre 0,05 e 0,36 mg/kg, houve atividade bactericida contra *E. coli* e *S. aureus*, o que indica que a quantidade de prata depositada nessa dissertação está de acordo com o esperado.

#### 4.4. ÂNGULO DE CONTATO E RUGOSIDADE

A amostra de látex natural puro apresenta um ângulo de contato de  $81 \pm 1^\circ$ , que beira um caráter hidrofóbico; a rugosidade, por sua vez, apresenta um valor médio de  $426 \pm 22$  nm. No **Quadro 1** observa-se que as amostras que foram revestidas com prata e hidroxiapatita mostraram redução considerável no ângulo de contato, bem como um aumento substancial na rugosidade.



**Quadro 1:** ângulo de contato e rugosidade das amostras contendo Ag + HA (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e de látex natural puro.

1 (20W 7s)	2 (23W 4s)	3 (23W 10s)	
WCA = $38 \pm 2^\circ$	WCA = $33 \pm 2^\circ$	WCA = $23 \pm 1^\circ$	
			
Ra = $1507 \pm 28$ nm	Ra = $2393 \pm 103$ nm	Ra = $2589 \pm 82$ nm	
4 (37 W 4s)	5 (37W 10s)	6 (40W 7s)	Látex
WCA = $37 \pm 1^\circ$	WCA = $42 \pm 3^\circ$	WCA = $33 \pm 3^\circ$	WCA = $81 \pm 1^\circ$
			
Ra = $1349 \pm 100$ nm	Ra = $2324 \pm 180$ nm	Ra = $1481 \pm 102$ nm	Ra = $426 \pm 22$ nm

Os resultados estão em concordância com a literatura, que descreve o aumento da rugosidade e diminuição do ângulo de contato de uma amostra quando a hidroxiapatita é acrescida à superfície [149][150]. Além disso, a incorporação de AgNPs é responsável por proporcionar o efeito bactericida e também por aumentar a molhabilidade em uma matriz [151]. As diferenças observadas nos ângulos podem ser oriundas dos diferentes tamanhos/dispersões das partículas na superfície.

Logo, uma vez que a hidrofiliabilidade está correlacionada com a melhora na cicatrização e na regeneração tecidual [152], as amostras mostram-se potencialmente positivas para a utilização no tratamento de queimaduras com o intuito de promover cura acelerada [153]. Superfícies hidrofílicas são responsáveis pela diminuição da incrustação de microrganismos, embora o aumento da rugosidade possa levar ao aumento da adesão bacteriana [154][155].




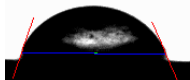








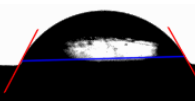

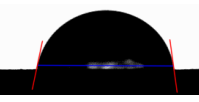

Outro fator importante a ser avaliado é o tempo de prateleira dos filmes (**Quadro 2**), ou seja, averiguar por quanto tempo se manterão hidrofílicos. Esse

teste determina o tempo máximo de armazenamento do curativo antes de sua aplicação no corpo humano. Há uma tendência conhecida que relaciona o aumento do ângulo de contato de um material em função do tempo. Esse fenômeno ocorre em razão do denominado efeito de envelhecimento, que é proporcionalmente dependente da temperatura, tipo de polímero e umidade durante a estocagem [156][152].

As AgNPs contidas nas amostras também são responsáveis pelo aumento do ângulo de contato. Com o passar do tempo, elas tendem à formação de agregados maiores, diminuindo a hidrofiliicidade [115][116]. Um dos fatores mais decisivos na formação de agregados é a exposição à luz e à temperatura, que aumentam a taxa de colisão entre as partículas, promovendo uma aglomeração acelerada [157].

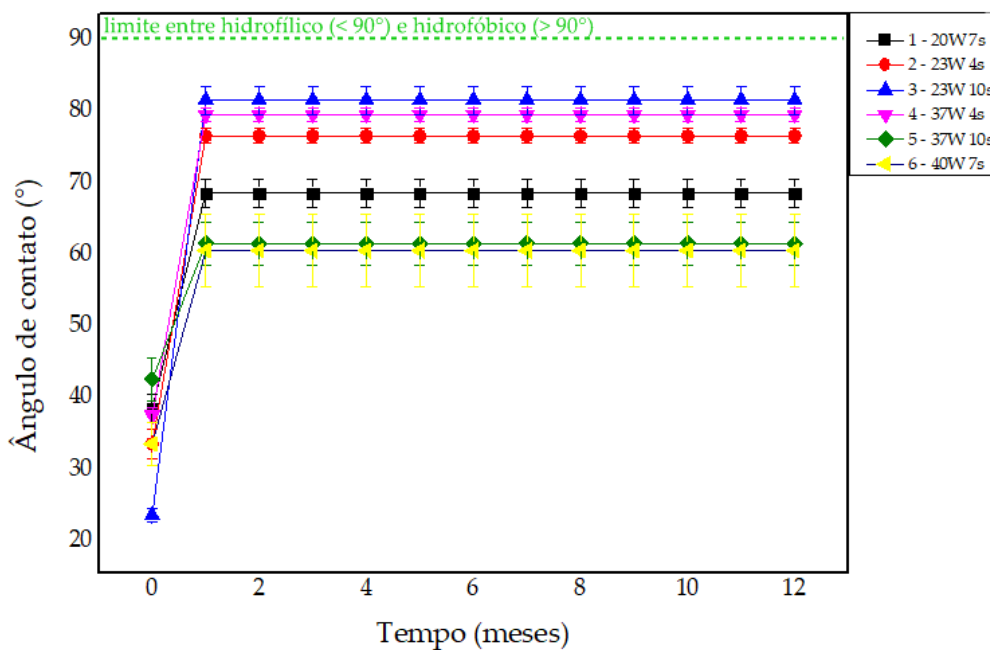
Para investigar o efeito de envelhecimento, o ângulo de contato das amostras foi medido ao longo de um ano.

**Quadro 2:** tempo de prateleira (ângulo de contato x tempo) das amostras.

Tempo/ Amostra	1 semana	2 semanas	3 semanas	1 ano
1 (20W 7s)	44 ± 1° 	45 ± 2° 	53 ± 1° 	68 ± 2° 
2 (23W 4s)	54 ± 1° 	57 ± 1° 	74 ± 1° 	76 ± 1° 
3 (23W 10s)	42 ± 1° 	54 ± 1° 	84 ± 1° 	81 ± 2° 
4 (37 W 4s)	60 ± 1° 	61 ± 1° 	80 ± 1° 	79 ± 2° 

5 (37W 10s)	$45 \pm 2^\circ$	$49 \pm 1^\circ$	$59 \pm 4^\circ$	$61 \pm 3^\circ$
6 (40W 7s)	$46 \pm 4^\circ$	$46 \pm 3^\circ$	$57 \pm 3^\circ$	$60 \pm 5^\circ$

Analisando-se os resultados obtidos, é possível inferir que há um aumento no ângulo de contato durante as três primeiras semanas, como era esperado, mas os valores mantêm-se relativamente estáveis a partir desse período. Essa tendência fica melhor explícita no gráfico da **Figura 17**.



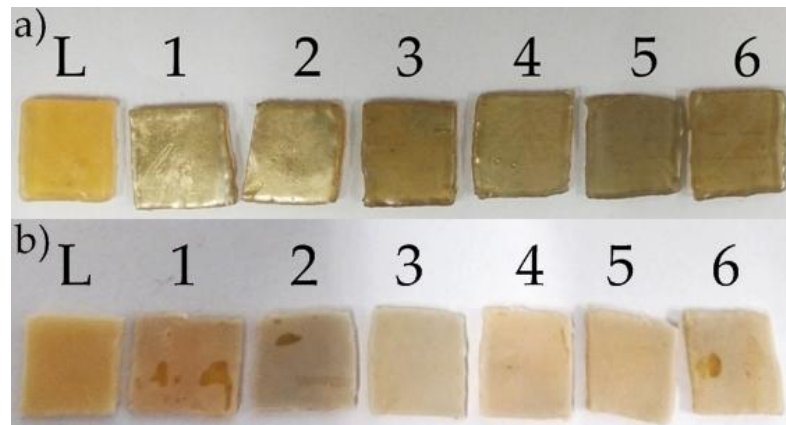
**Figura 17:** comportamento apresentado pelas amostras durante o período de um ano. Observa-se que após o primeiro mês, os valores de ângulo de contato mantêm-se constantes e hidrofílicos. As linhas conectando os pontos servem como guia para os olhos.

O comportamento apresentado pelas amostras demonstra que estas mantêm o caráter hidrofílico mesmo um ano após sua confecção, garantindo

propriedades ideais para a área biomédica, uma vez que a alta molhabilidade evita a adesão de microorganismos. Considerando-se somente essa análise, recomenda-se a utilização das amostras 1, 5 e 6, uma vez que mostraram melhores resultados. Além disso, é indicado que os curativos sejam acondicionados longe da exposição de luz (radiação UV) e temperatura, pois permanecerão com alta molhabilidade por um tempo mais extenso.

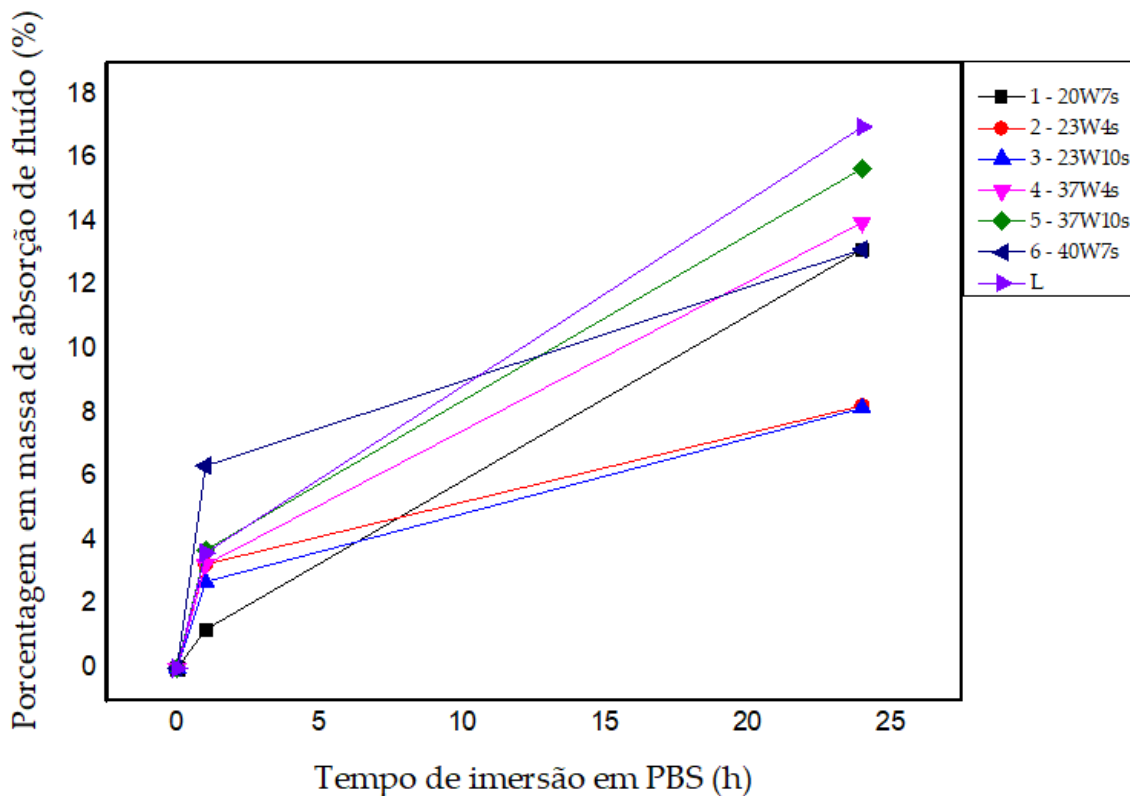
#### 4.5. CÁLCULO DA TAXA DE ABSORÇÃO DE LÍQUIDO DOS FILMES

Após a retirada das amostras do PBS, pode-se perceber visualmente que as mesmas adotaram um espectro esbranquiçado oriundo da absorção do fluído. A **Figura 18** mostra a diferença entre o antes e o depois dessa análise. Nota-se que, a princípio, os filmes que passaram pelo tratamento de superfície apresentam coloração mais escura do que o filme de látex puro (L), uma vez que há a presença de prata e hidroxiapatita, além de estarem visivelmente homogêneos.



**Figura 18:** comparação das amostras antes (a) e depois (b) da análise com imersão em PBS.

A taxa de absorção foi calculada e devidamente apresentada no gráfico da **Figura 19**, que mostra a evolução do parâmetro com o tempo.



**Figura 19:** porcentagem da absorção de fluido das amostras em relação ao tempo de imersão em PBS. As linhas entre os pontos servem de guia.

É possível inferir que a taxa de absorção aumenta consideravelmente com o passar das horas, e os valores encontrados após 24 h estão na faixa entre 8 – 17%. Ou seja, o curativo será capaz de absorver de 8 a 17% de seu peso em massa de exsudato. A absorção do mesmo pela membrana mantém o nível de umidade necessário para a cicatrização e para a indução da hemostasia, além de evitar o surgimento de coágulo na superfície da ferida. Esse coágulo é inconveniente, uma vez que dificulta a proliferação das células epiteliais, demandando maior atividade metabólica e tempo para a cura [158]. A presença de HA e das AgNPs pode impedir o líquido de ser absorvido, uma vez que bloqueiam o caminho da difusão para o interior do material. Resultados semelhantes já foram vistos na literatura [159]. Por essa razão, a amostra de látex natural puro apresentou a maior porcentagem de absorção após 24 horas.

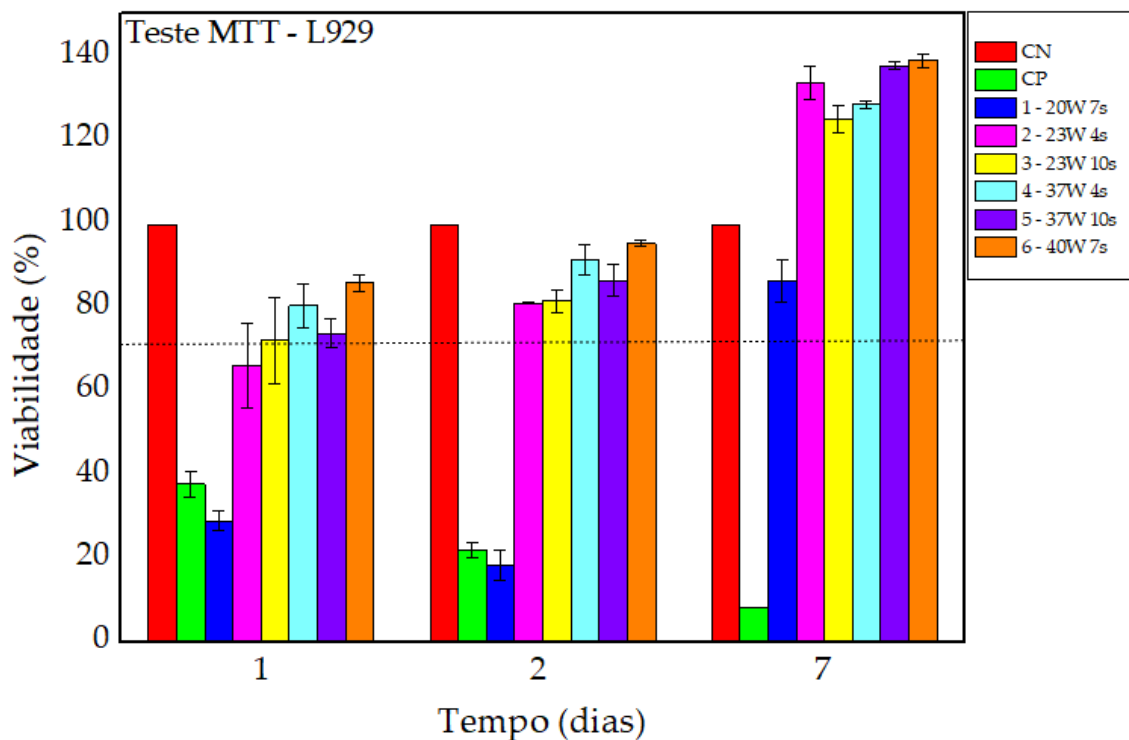
Como o látex não é um material de alta porosidade quando é utilizado para

a produção de artefatos por *casting*, poderia ser alternativamente empregado na fabricação de esponjas e espumas, que absorveriam uma maior quantidade de exsudato. Esses processos, contudo, são mais complexos e custosos.

Vale ressaltar que o PBS foi escolhido para ser utilizado nesse teste devido ao fato de se assemelhar mais aos fluídos corpóreos do que a água deionizada, por exemplo, que possui o pH de 5,6 – 6,4 e concentrações baixa de eletrólitos. Os íons presentes na solução tampão diminuem o gradiente osmótico entre o interior da matriz polimérica e o meio, diminuindo a entrada de água na estrutura [160]. Além disso, não considerou-se correto liofilizar as amostras antes dessa análise, diferentemente do que é visto em algumas metodologias do estado da arte [161][117]), já que dificilmente os curativos passarão por esse procedimento previamente a serem comercializados.

#### 4.6. CITOTOXICIDADE INDIRETA (MTT)

Os filmes foram submetidos a testes de citotoxicidade após caracterização, sendo realizadas três réplicas de cada ensaio. O resultado do ensaio de citotoxicidade com MTT referente aos extratos das amostras encontra-se exposto na **Figura 20**.



**Figura 20:** efeito citotóxico obtido pelo teste indireto MTT dos extratos comparados ao controle negativo - CN (meio DMEM, 10% SFB e 1% P/S) e ao controle positivo – CP (meio DMEM, 10% SFB, 1% P/S e 5% DMSO). A linha pontilhada representa a viabilidade de 70%, valor mínimo pela norma ISSO 10993-12.

De acordo com a ISO 10993-12, um material é considerado citotóxico quando a redução da viabilidade celular é superior a 30% depois de 24 horas de exposição. Comparando-se os resultados dos filmes em pesquisa com a classificação dos padrões internacionais, é possível afirmar que após o período de 24 horas, a amostra 1 apresenta toxicidade evidente, compatível com o controle positivo do experimento, e se estabiliza após 7 dias de incubação. Por outro lado, as amostras 3, 4, 5 e 6 mostram-se adequados à sobrevivência celular. A amostra 2 apresentou nas primeiras 24h uma média de valor de toxicidade entre 60-70%, indicando que esta amostra poderia ser classificada como segura. Os tempos seguintes de cultivo revelam a recuperação na viabilidade celular da amostra 2, situação que fica evidente quando

comparamos com a amostra de controle positivo, a qual continua a apresentar níveis progressivos de citotoxicidade em relação ao tempo. Dentre todas as amostras, não indica-se a utilização do filme 1 como curativo, pois a citotoxicidade inicial pode causar dano à ferida do paciente.

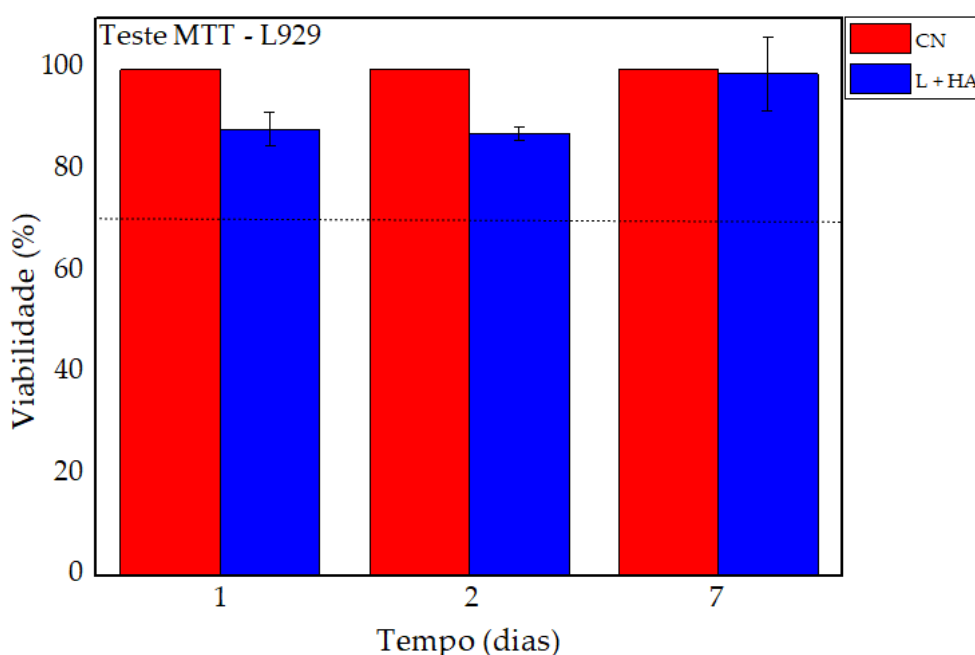
O efeito citotóxico das NPs está intrinsicamente associado ao seu tamanho, química e molhabilidade da superfície, formato, distribuição e concentração [162]. Algumas das principais características afetadas pelo uso de parâmetros distintos no *sputtering* são o formato e agregação das partículas, mas, principalmente, seu tamanho [125]. Sabe-se que as nanopartículas possuem tamanho semelhante aos dos componentes celulares e proteínas, por isso são capazes de ultrapassar barreiras e membranas celulares, podendo causar dano as mesmas. Nesses casos, as AgNPs tendem a diminuir as funções mitocondriais e induzem necrose e apoptose celular [163]. Além disso, elas podem se deslocar até o sistema circulatório e distribuírem-se através dos principais órgãos do corpo, como o fígado, rim e cérebro. Aquelas de menor tamanho ou que encontram-se em maior quantidade tendem a gerar efeito tóxico mais pronunciado – tanto para células, como para bactérias [164][165][166].

Esse efeito pode explicar porque as amostras que mostram indício de conterem partículas de menor tamanho, ou seja, aquelas que foram depositadas com tempo e potência de deposição baixos, apresentaram alta toxicidade. Contudo, no sétimo dia podemos observar um aumento substancial na viabilidade celular de todos os extratos. Tal fenômeno pode estar baseado em dois fatores: (1) as células L929 criaram resistência às nanopartículas e desenvolveram adaptação ou (2) a hidroxiapatita contida nos filmes auxiliou na proliferação de fibroblastos, mesmo com a presença da prata.

A hipótese (1) não parece ser a mais viável, pois raros são os casos descritos na literatura. Ademais, um trabalho anterior desenvolvido pelo nosso



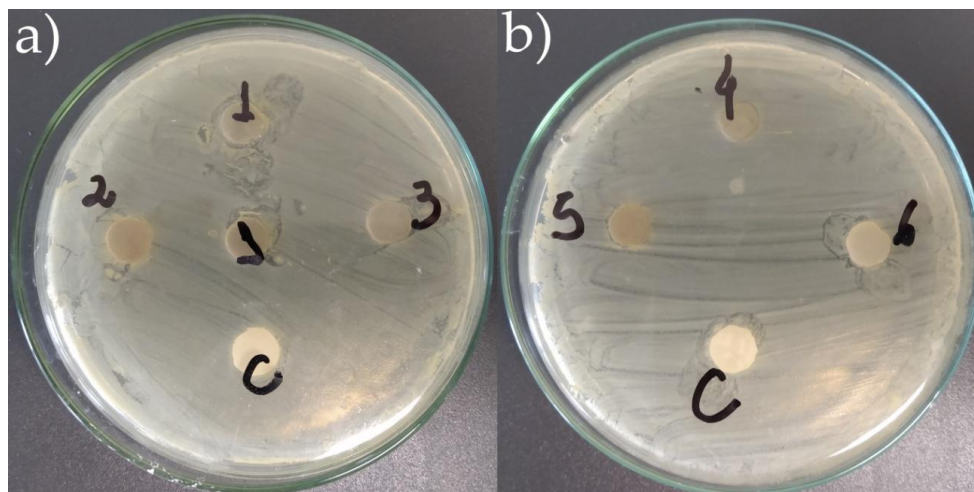
grupo de pesquisa mostrou que membranas de látex com a adição de nanopartículas de prata tiveram um decréscimo de viabilidade no sétimo dia de tratamento com MTT [111][113]. Logo, o pressuposto (2) mostra-se mais adequado, pois a hidroxiapatita pode contribuir para a proliferação de fibroblastos, como já descrito pelo estado da arte [149]. A fim de corroborar com essa hipótese, realizou-se um ensaio de MTT com amostras de látex contendo apenas HA. O resultado apresentado na **Figura 21** permite a constatação de que a viabilidade celular aumenta no sétimo dia, indicando que o fosfato de cálcio pode sim ser o agente responsável pela ocorrência da mesma. Resultados semelhantes já foram encontrados na literatura [167]. Um trabalho prévio a essa dissertação de mestrado realizado pelo grupo de pesquisa demonstrou que amostras de látex natural puro ou contendo apenas prata possuem diminuição de viabilidade celular no sétimo dia [113], portanto a hidroxiapatita parece estar cumprindo a função almejada.



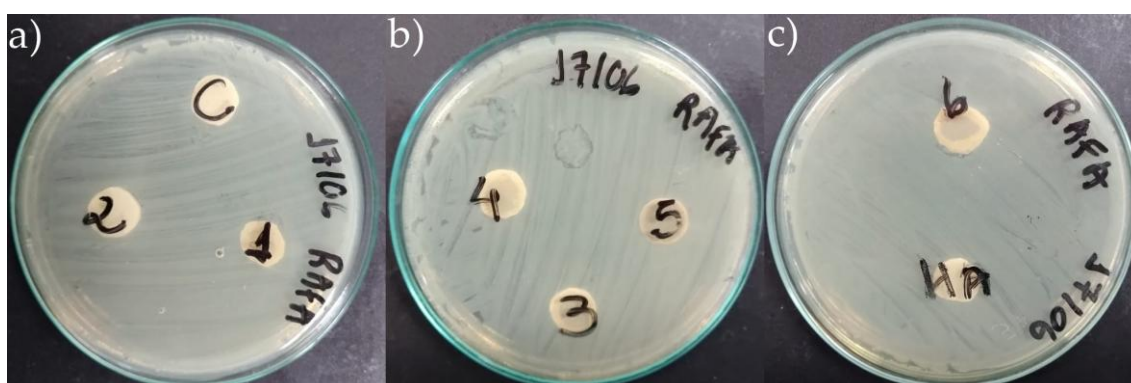
**Figura 21:** efeito citotóxico obtido pelo teste indireto MTT do extrato da amostra de látex + HA comparado ao controle negativo - CN.

#### 4.7 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Após a incubação das amostras com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, observou-se que não houve formação de um halo ao redor dos filmes, conforme apresentado na **Figura 22** e **Figura 23**.



**Figura 22:** amostras plaqueadas com cultura de *S. aureus* em ágar nutriente. (a) amostras 1, 2, 3 e controle (látex puro) e (b) amostras 4, 5, 6 e controle.

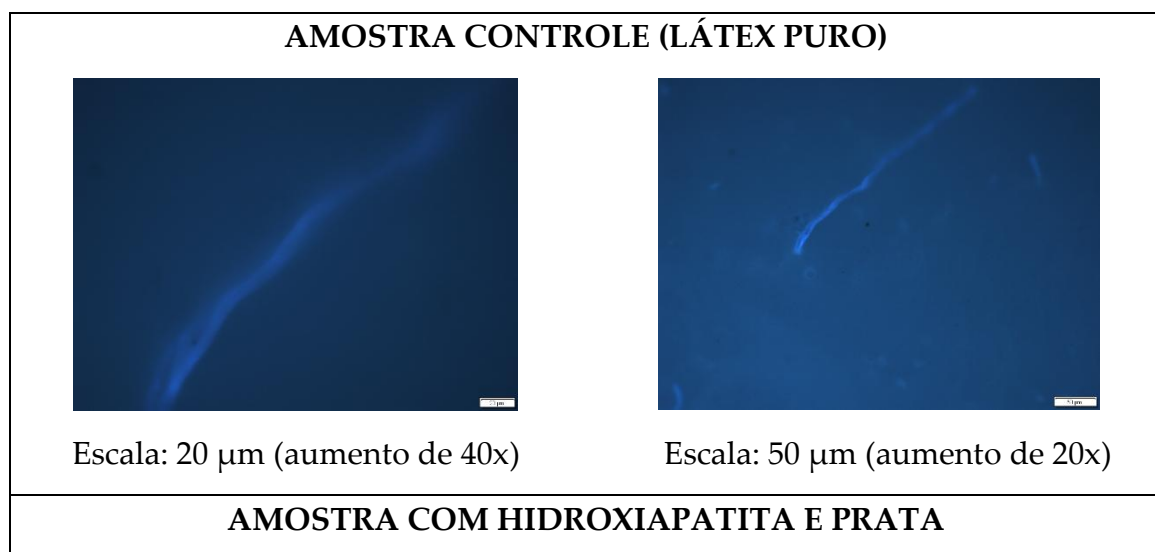


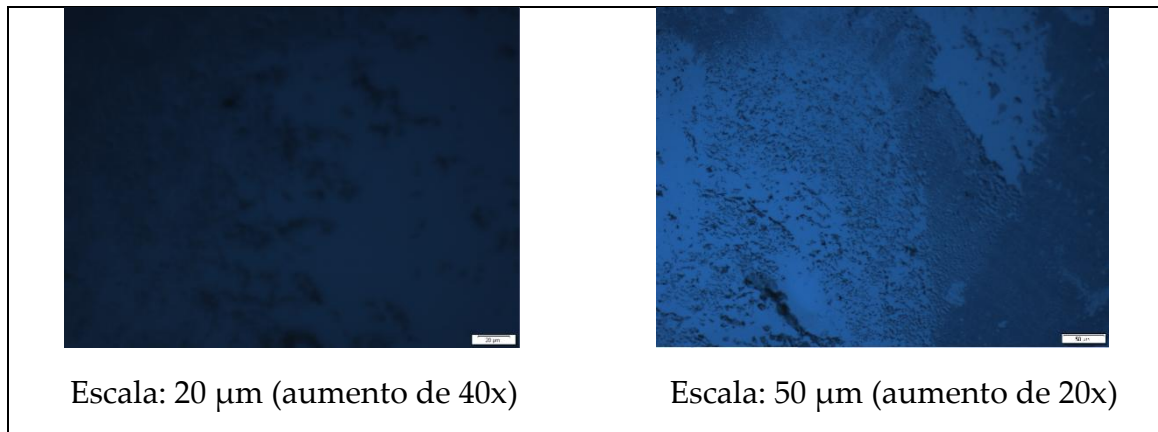
**Figura 23:** amostras plaqueadas com cultura de *E. coli* em ágar nutriente. (a) amostras 1, 2 e controle (látex puro), (b) amostras 3, 4 e 5 e (c) amostras 6 e HA (látex + hidroxiapatita).

A quantidade de prata depositada sobre as membranas parece ser suficiente para a aplicação almejada, uma vez que o estado da arte demonstra que diferentes curativos podem conter concentrações de nanopartículas de prata entre  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $1,34 \text{ mg}/\text{cm}^2$  [168][169][170]. Além disso, o ensaio de ICP-OES

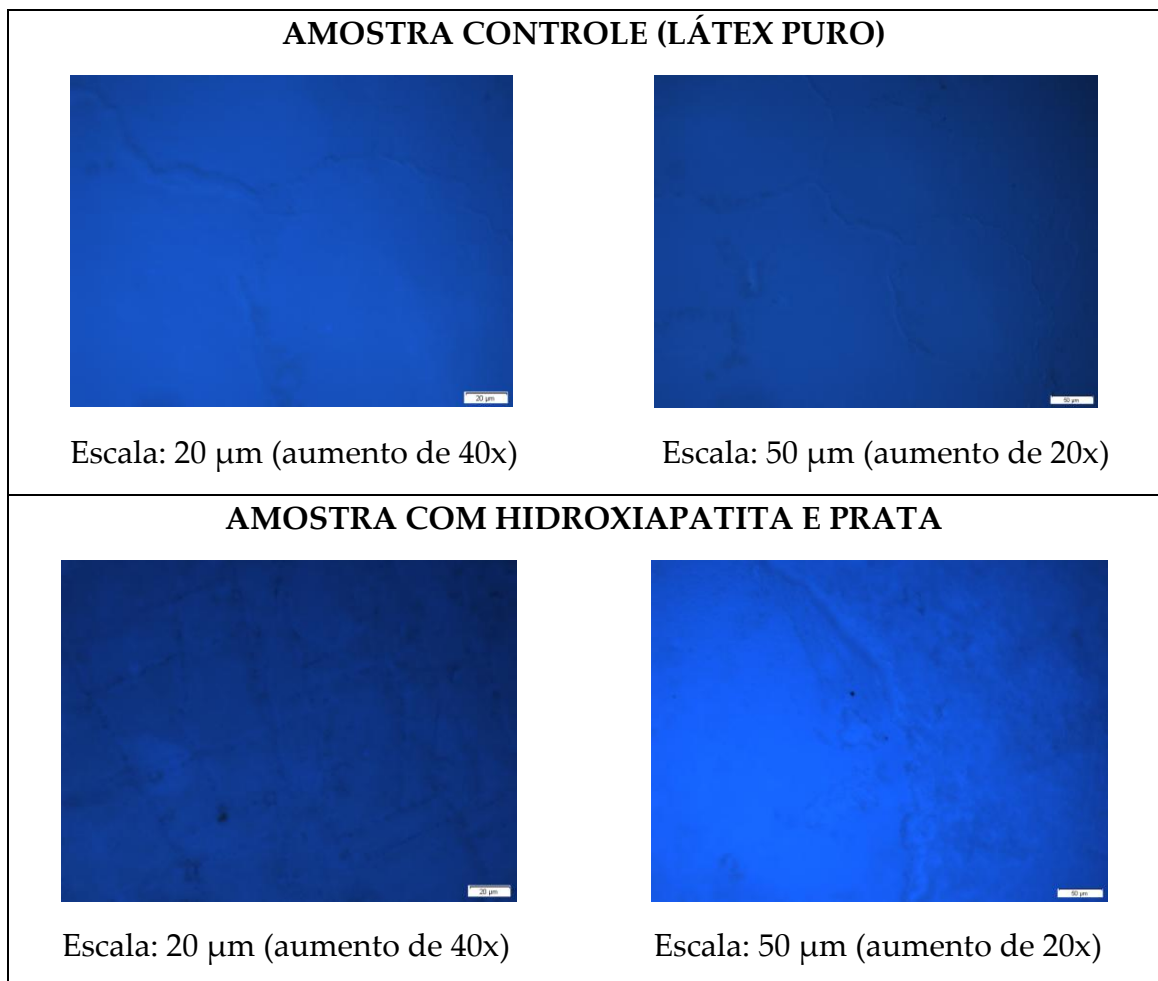
provou que o metal está sendo lixiviado em meio líquido com concentrações satisfatórias. Contudo, esse resultado por ser um indicativo de que as partículas de prata tenham dificuldade ao passarem por um processo de lixiviação diretamente para um meio sólido, como é o caso do ágar Mueller-Hinton. Esse fenômeno já foi observado anteriormente, tanto em um trabalho do grupo de pesquisa [111][113], quanto na literatura [171]. Conforme demonstra a análise de RBS, o fato das nanopartículas estarem provavelmente agregadas pode dificultar a liberação das mesmas em relação à matriz, que caracteriza-se como um material não poroso. A aglomeração das partículas é um processo energeticamente favorável, uma vez que diminui sua elevada área de superfície, como explicado anteriormente [172].

Contudo, ao retirarem-se as membranas da placa de Petri, visualmente pode-se averiguar que não houve uma formação de colônia bacteriana na região em que os filmes se encontravam. Para corroborar com essa constatação, a coloração DAPI foi utilizada para detectar a presença de bactérias sob radiação ultravioleta. Conforme mostrado na **Figura 24** e **Figura 25**, não ocorreu o aparecimento de pontos fluorescentes, indicando que o corante não encontrou nenhum DNA ao qual se ligar.





**Figura 24:** análise das amostras com coloração DAPI sob luz UV após contato com a *S. aureus*.



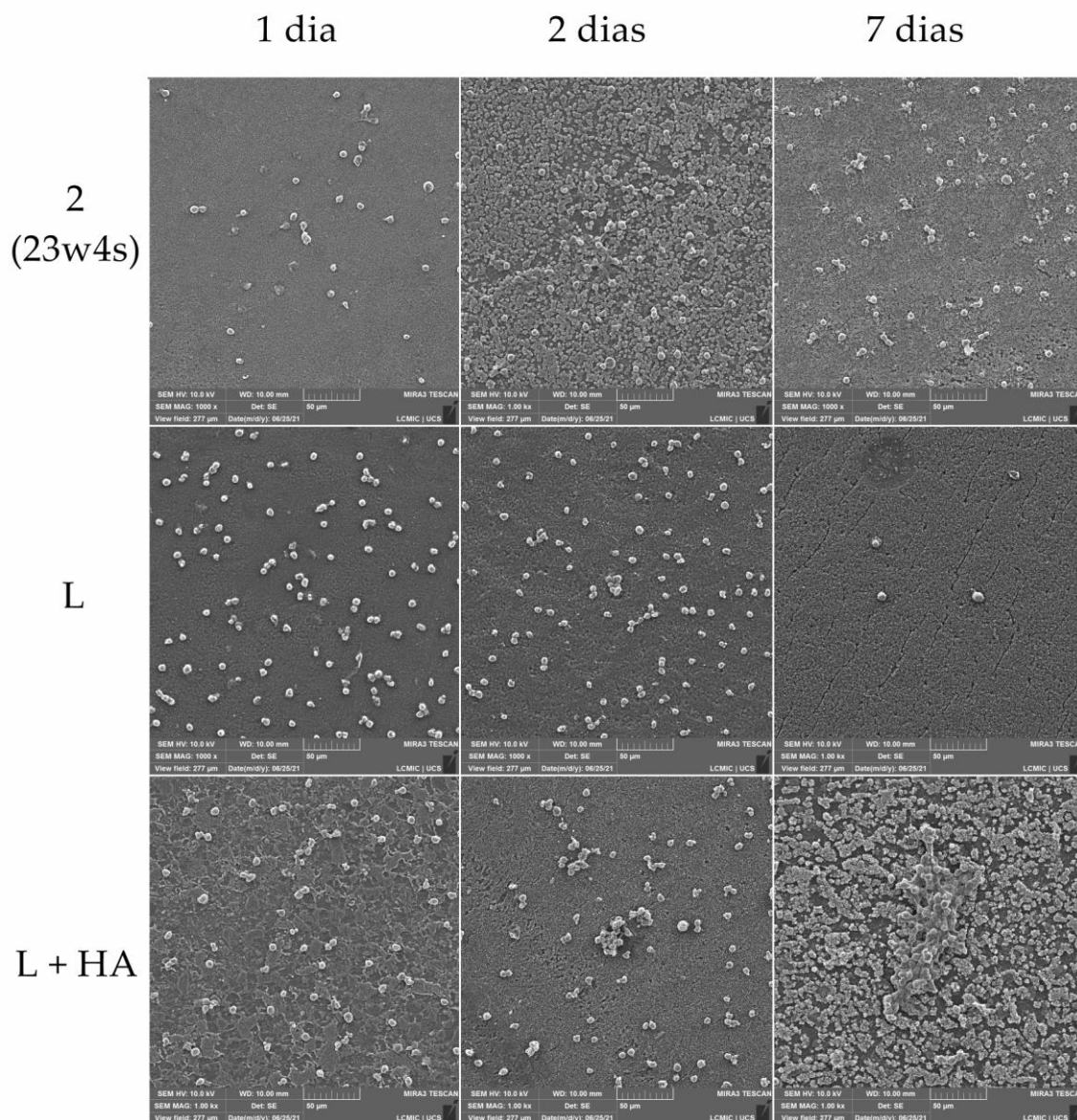
**Figura 25:** análise das amostras com coloração DAPI sob luz UV após contato com a *E. coli*.

Resultados semelhantes já foram vistos na literatura ao empregar membranas de látex contra micro-organismos [173]. Essa análise indica que as amostras apresentam atividade bacteriostática, oriunda da prata e do próprio polímero. As proteínas da borracha natural podem impedir a multiplicação de bactérias, como a heveína, rica em cisteína [174][175][176]. Dessa maneira, ao ser colocado sobre um ferimento, o curativo produzido nesse estudo não permitiria que infecções se propagassem no leito da ferida, aumentando o tempo de cura e diminuindo a chance de sepse.

#### **4.8 DETERMINAÇÃO DE MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA E PARÂMETROS DE ADESÃO DE CÉLULAS L929**

Foram avaliadas a adesão, distribuição topográfica e análise morfológica de células L929 em contato com os filmes. Esses parâmetros são essenciais quando se trata de biomateriais, pois estão relacionados a sua biocompatibilidade.

Na **Figura 26**, observou-se que houve maior proliferação celular na amostra contendo revestimento, sendo esse fato mais um indício de que a hidroxiapatita auxilia na proliferação de fibroblastos. A membrana de látex, por sua vez, apresentou uma diminuição de viabilidade no sétimo dia, provavelmente devido à sua baixa rugosidade, que não favorece o crescimento e ancoragem das células, semelhante ao que já foi reportado na literatura [177].

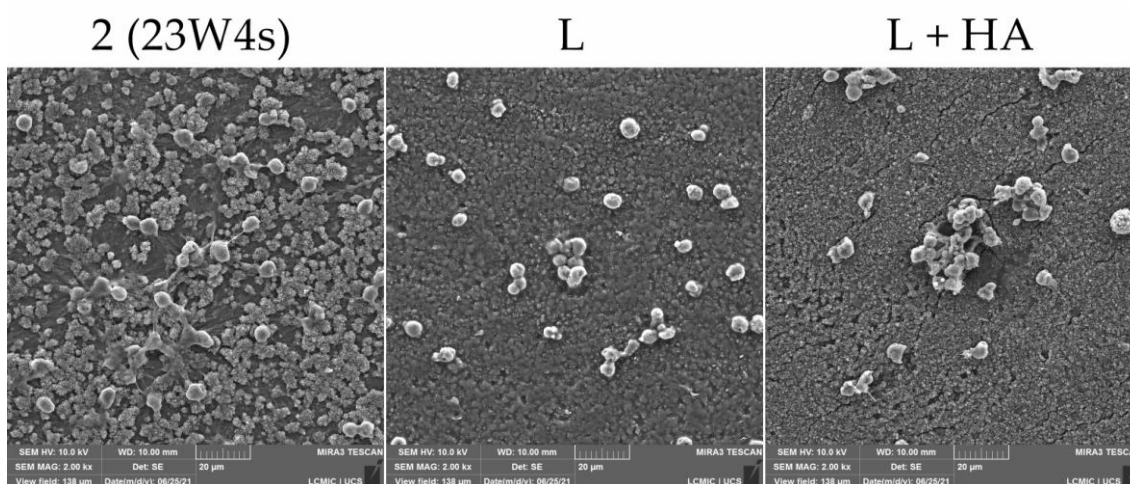


**Figura 26:** análise de FEG das amostras em contato com os fibroblastos durante 1, 2 e 7 dias. Para simbolizar as amostras contendo HA e Ag, a número 2 foi escolhida.

Além disso, observa-se que a morfologia das amostras com revestimento possuem uma característica singular em relação à amostra de látex natural puro, como já visto no estado da arte [178]. Essa configuração é associada ao fosfato de cálcio, última camada a ser depositada.

A adesão celular é um fator dependente de uma série de parâmetros dos biomateriais, como a química de superfície e sua molhabilidade. No MEV, os fibroblastos mais aderentes ao substrato são aqueles que possuem o citoplasma mais espalhado, enquanto os com menor adesão são caracterizadas pelo citoplasma contraído (forma esférica).

Percebe-se na Figura 27 que nas amostras mais hidrofílicas (ou seja, aquelas que passaram pela deposição de Ag e HA) as células mostraram pouca aderência, fator positivo para a aplicação como curativos. É indesejável que o tecido recém-formado seja prejudicado pela remoção da membrana. Um estudo publicado por Rodrigues et al., 2019 demonstra que a linhagem L929 tem afinidade por substratos poliméricos hidrofóbicos [106], estando de acordo com o resultado encontrado nessa dissertação. A adesão na amostra de látex puro não parece ser grande, mas vale frisar que as células, nesse caso, tiveram a menor viabilidade celular dentre todos os filmes. Isso pode ser um indício de que um processo de lise está ocorrendo, devido à liberação direta de proteínas para as células L929. Resultados semelhantes já foram vistos na literatura, onde elastômeros feitos a partir de látex apresentam lise maior em relação aos que não são produzidos com esse material de origem natural [179][180].



**Figura 27:** análise de FEG das amostras em contato com os fibroblastos.

Conclui-se, portanto, que as amostras produzidas nesse trabalho possuem um aumento de proliferação celular com o passar do tempo e não mantêm um alto grau de adesão, caracterizando os filmes como ideais para a aplicação biomédica desejada.



## 5. CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS

Com base nas análises nesse trabalho, é possível concluir que todas as amostras que tiveram prata e hidroxiapatita depositadas em sua superfície cumpriram com os requisitos básicos de um curativo (apresentados na seção 2.4):

**1) Prover um ambiente úmido, mas não saturado, a fim de melhorar o processo de cicatrização;**

**2) Absorver certo volume de exsudato da ferida, que estimula o crescimento de bactérias;**

Os fatores 1 e 2 foram comprovados pela análise de absorção de fluído, que mostrou uma absorção de até 16% de PBS. Esse valor está de acordo com a literatura, e permitirá com que certa quantidade de exsudado da ferida seja removido, sem deixar, contudo, o leito da lesão ressecado.

**3) Fornecer atividade antimicrobiana eficaz e de maneira controlada;**

O teste de difusão em halo e posterior análise com coloração DAPI mostrou que as amostras são bacteriostáticas, uma vez que as próprias proteínas do látex e a prata possuem atividade contra microrganismos. Assim sendo, as membranas não permitirão a proliferação de bactérias na área lesionada.

**4) Não apresentar toxicidade às células humanas;**

O ensaio de viabilidade celular MTT provou que todas as amostras (excluindo a número 1) podem ser aplicadas no corpo, uma vez que não prejudicam os fibroblastos; na verdade, a proliferação dos mesmos é maior devido à hidroxiapatita. A viabilidade está relacionada, principalmente, ao tamanho e quantidade de nanopartículas presentes nas membranas.

## 5) Não promover aderência ao tecido recém-formado.

A análise por MEV mostrou que as células L929 não possuem boa aderência sobre as membranas, pois as mesmas são hidrofílicas, dificultando sua ancoragem. Entretanto, a proliferação celular foi evidente com o passar do tempo, indicando que o curativo auxiliará na reprodução tecidual e na remoção do mesmo sem que haja dano ao tecido recém-formado.

Outras considerações foram feitas nesse trabalho, como o tempo de prateleira, que mostrou que os filmes mantêm-se hidrofílicos mesmo um ano após sua produção. Por sua vez, a análise estatística comprovou que a potência de deposição é o fator crucial que determina a molhabilidade dos curativos. Além disso, a análise de RBS propiciou o cálculo da razão Ca/P da HA: 0,7, indicando a formação de fosfato heptacálcico. Esse valor implica em uma facilidade da decomposição do cerâmico no leito ácido das feridas, onde terá função de auxiliar na proliferação de fibroblastos. Ademais, a reação química proposta entre o fosfato e o ácido láctico L prediz a formação de um sal que aumentará o pH da lesão, evitando acúmulo de bactérias na região. Pela análise quantitativa elementar também foi possível inferir que a prata apresenta-se em uma possível configuração de aglomerados e encontra-se na superfície das amostras.

Futuramente, serão efetuadas caracterizações complementares para estudar de maneira ainda mais efetiva o material, como a microscopia eletrônica de transmissão e ensaios *in vivo*.

Conclui-se, portanto, que os resultados aqui presentes corroboram com a hipótese de que o acréscimo de hidroxiapatita e prata na superfície de látex natural é um tratamento eficiente para a aplicação do mesmo na indústria biomédica. Os objetivos desse estudo foram cumpridos, uma vez que obtiveram-se curativos hidrofílicos, não citotóxicos e bacteriostáticos. Através dos resultados de todas as análises realizadas, recomenda-se o uso prioritário

das amostras 5 e 6 na biomedicina, pois mantém-se com ângulo de contato mais baixo mesmo após um ano de armazenamento, além de possuírem viabilidade celular superior a 70% durante o período de 1 a 7 dias de uso.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Who, World Health Organization Facts about injuries: burn, (n.d.). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/> (accessed June 3, 2020).
- [2] B.G.B. Suzanne C. Smeltzer, Brunner & Suddarth: tratado de enfermagem médico-cirúrgica, 12th ed., 2011.
- [3] T. Krupp, B.D. dos Santos, L.A. Gama, J.R. Silva, W.W. Arrais-Silva, N.C. de Souza, M.F. Américo, P.C. de Souza Souto, Natural Rubber - Propolis Membrane Improves Wound Healing in Second-Degree Burning Model, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 980–988. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.147>.
- [4] M.M. Rippel, F.D.C. Bragança, Borracha natural e nanocompositos com argila, *Quim. Nova.* 32 (2009) 818–826. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300024>.
- [5] R.D. Herculano, C.P. Silva, C. Ereno, S.A.C. Guimaraes, A. Kinoshita, C.F. de Oliveira Graeff, Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR), *Mater. Res.* 12 (2009) 253–256. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392009000200023>.
- [6] L.C.T. Rempel, M.R.P. a Tizzot, J.F.M. Vasco, Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba, *Rev. Bras. Queimaduras.* 10 (2011) 3–9.
- [7] S.L. Hinrichsen, DIP: Doenças infecciosas e parasitária, 2005.
- [8] S. Iravani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari, Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods, *Res. Pharm. Sci.* 9 (2014) 385–406.
- [9] V.T. Kimura, C.S. Miyasato, B.P. Genesi, P.S. Lopes, C.M.P. Yoshida, C.F. Da Silva, The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film, *Polimeros.* 26 (2016) 168–175. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2013>.
- [10] D. Depan, R.D.K. Misra, Hybrid nanoscale architecture of wound dressing with super hydrophilic, antimicrobial, and ultralow fouling attributes, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 308–318. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1908>.
- [11] D. Archana, J. Dutta, P.K. Dutta, Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies, *Int. J. Biol.*

- Macromol. 57 (2013) 193–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.002>.
- [12] A.S. Giroto, N.S. De Almeida, C. Ribeiro, Síntese de nanocompósitos utilizados como modelo para liberação lenta de fosfatos minerais, Simpósio Nac. Instrumentação Agropecuária Siagro. (2014) 455–458.  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/115708/1/455siagro-2014-print01.pdf>.
- [13] E.C.C. Reis, A.P.B. Borges, P.M. Oliveira, S.M.C.M. Bicalho, A.M. Reis, C.L. Da Silva, Desenvolvimento e Caracterização de Membranas Rígidas, Osteocondutoras e Reabsorvíveis de Polihidroxibutirato e Hidroxiapatita para Regeneração Periodontal, Polimeros. 22 (2012) 73–79.  
<https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000007>.
- [14] E. Rezvani Ghomi, S. Khalili, S. Nouri Khorasani, R. Esmaeely Neisiany, S. Ramakrishna, Wound dressings: Current advances and future directions, J. Appl. Polym. Sci. 136 (2019) 1–12.  
<https://doi.org/10.1002/app.47738>.
- [15] D. de M. Henrique, L.D. Silva, A.C.R. Costa, A.P.M.B. Rezende, J.A. Santos, M.M. Menezes, T.C. Maurer, Controle de infecção no centro de tratamento de queimados: revisão de literatura, Rev Bras. Queimaduras. 12 (2013) 230–234.
- [16] B. De, F. Cruz, P.B.L. Cordovil, K. De, N.M. Batista, F. Cruz, Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura, 11 (2012) 246–250.
- [17] R.C. Oliveira, K.N.G. Borges, C.B. dos S. Azevedo, M.D. Inocencio, M. dos S. Luz, M.G.M. Maranhão, M.M. De Lucena, M.B. De Paula, R.S. Oliveira, L.G.M. Pellizzer, Trauma por queimaduras: uma análise das internações hospitalares no Brasil, Rev. Eletrônica Acervo Saúde. 12 (2020) 1–9.  
<https://doi.org/10.25248/reas.e5674.2020>.
- [18] E.C.S. do Vale, Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista, An. Bras. Dermatol. 80 (2005) 9–19.  
<https://doi.org/10.1590/s0365-05962005000100003>.
- [19] P. Pinheiro, Queimaduras: graus, complicações e tratamento, (n.d.).  
<https://www.mdsaude.com/dermatologia/queimaduras/> (accessed May 4, 2020).
- [20] K. de N.M.B. Bruno de F.cruz, Pedro B.L.Cordovil, Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura Epidemiological profile of patients who suffered burns in Brazil: literature review, Rev Bras Queimaduras. 11 (2012) 246–250.

- [21] M.G. Jeschke, L.-P. Kamolz, S. Shahrokhi, *Burn Care and Treatment*, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1133-8>.
- [22] A. Hussain, Surgical treatment of acute burns, *Wounds UK*. 9 (2013) 54–59.
- [23] A. Burd, Burns: Treatment and Outcomes, *Semin. Plast. Surg.* 24 (2010) 262–280. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1263068>.
- [24] L.P. Da Silva, R.L. Reis, V.M. Correlo, A.P. Marques, Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 21 (2019) 145–169. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-060418-052422>.
- [25] A. Bal-Öztürk, B. Özkahraman, Z. Özbaş, G. Yaşayan, E. Tamahkar, E. Alarçin, Advancements and future directions in the antibacterial wound dressings – A review, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 109 (2020) 703–716. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34736>.
- [26] A.J. Singer, R.A.F. Clark, Cutaneous wound healing, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 738–746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>.
- [27] T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms, *J. Int. Med. Res.* 37 (2009) 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>.
- [28] R.A.F. Clark, *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 1988. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0185-9>.
- [29] A. Gosain, L.A. DiPietro, Aging and Wound Healing, *World J. Surg.* 28 (2004) 231–236. <https://doi.org/10.1007/s00268-003-7397-6>.
- [30] M. de L.P. Biondo-Simões, S.O. Ioshii, K.S. Borsato, E. Zimmermann, O processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento: estudo da cicatrização da parede abdominal, em ratos, *Acta Cir. Bras.* (2005). <https://doi.org/10.1590/s0102-86502005000700021>.
- [31] E.L. Borges, Fatores associados à cicatrização de feridas cirúrgicas complexa mamária e abdominal: estudo de coorte retrospectivo, (2016). <https://doi.org/10.1590/1518-8345.1398.2811>.
- [32] D.C. Mendes, A importância da nutrição no processo de cicatrização de feridas, *Rev. Científica Univiçosa*. 9 (2017).
- [33] D. Mathieu, J.C. Linke, F. Wattel, Non-healing wounds, in: *Handb. Hyperb. Med.*, 2006: pp. 401–428. <https://doi.org/10.1007/1-4020-4448-8-20>.
- [34] R. Residentes, *Dermatología, Acta Médica Colomb.* 43 (2019) 55–58. <https://doi.org/10.36104/amc.2018.1394>.

- [35] Dermatology Image Atlas (DermAtlas), Choice Rev. Online. (2011). <https://doi.org/10.5860/choice.49-1213>.
- [36] S.H. Mandelbaum, É.P. Di Santis, M.H. Sant'Ana Mandelbaum, Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I, An. Bras. Dermatol. 78 (2003) 393–408. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400002>.
- [37] L. DeLong, Inflammation and repair, in: Gen. Oral Pathol. Dent. Hyg., 2013. [https://doi.org/10.5005/jp/books/14184\\_4](https://doi.org/10.5005/jp/books/14184_4).
- [38] K.H. Adati, Preparação e avaliação das propriedades físico-químicas de membranas de quitosana para uso biomédico e farmacêutico, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006.
- [39] F. Lopes, Curativos Bioativos: aliando biotecnologia ao tratamento de feridas, Profissão Biotec. (2018). <https://profissaobiotec.com.br/curativos-bioativos-aliando-biotecnologia-ao-tratamento-de-feridas/> (accessed March 19, 2021).
- [40] D. Duraccio, F. Mussano, M.G. Faga, Biomaterials for dental implants: current and future trends, J. Mater. Sci. 50 (2015) 4779–4812. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9056-3>.
- [41] J. Park, R.S. Lakes, Biomaterials: An introduction: Third edition, 2007. <https://doi.org/10.1007-978-0-387-37880-0>.
- [42] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, 2004.
- [43] L.G. Griffith, Polymeric biomaterials, Acta Mater. 1 (2000) 263–277. [https://doi.org/10.1016/S1359-6454\(99\)00299-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(99)00299-2).
- [44] P.H. de S. Smaniotto, M.C. Ferreira, C. Isaac, R. Galli, Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas, Rev. Bras. Cir. Plástica. 27 (2012) 623–626. <https://doi.org/10.1590/s1983-51752012000400026>.
- [45] K.G. Harding, H.L. Morris, G.K. Patel, Healing chronic wounds, BMJ. 324 (2002) 160–163. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7330.160>.
- [46] H. Avci, H. Gergeroglu, Synergistic effects of plant extracts and polymers on structural and antibacterial properties for wound healing, Polym. Bull. 76 (2019) 3709–3731. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2578-5>.
- [47] J. Yin, L. Xu, Batch preparation of electrospun polycaprolactone/chitosan/aloe vera blended nanofiber membranes for novel wound dressing, Int. J. Biol. Macromol. 160 (2020) 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.211>.

- [48] N. Kohli, V. Sharma, S.J. Brown, E. García-Gareta, Synthetic polymers for skin biomaterials, in: *Biomater. Ski. Repair Regen.*, Elsevier Ltd, 2019: pp. 125–149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102546-8.00005-4>.
- [49] M.E. Aljghami, S. Saboor, S. Amini-Nik, Emerging Innovative Wound Dressings, *Ann. Biomed. Eng.* 47 (2019) 659–675. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-02186-w>.
- [50] H.P. Lorenz, N.S. Adzick, Scarless skin wound repair in the fetus, *West. J. Med.* 159 (1993) 350–355.
- [51] U. Rowlatt, Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus, *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* 381 (1979) 353–361. <https://doi.org/10.1007/BF00432477>.
- [52] C.O. Chantre, P.H. Campbell, H.M. Golecki, A.T. Buganza, A.K. Capulli, L.F. Deravi, S. Dauth, S.P. Sheehy, J.A. Paten, K. Gledhill, Y.S. Doucet, H.E. Abaci, S. Ahn, B.D. Pope, J.W. Ruberti, S.P. Hoerstrup, A.M. Christiano, K.K. Parker, Production-scale fibronectin nanofibers promote wound closure and tissue repair in a dermal mouse model, *Biomaterials.* 166 (2018) 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.006>.
- [53] S. Ahn, C.O. Chantre, A.R. Gannon, J.U. Lind, P.H. Campbell, T. Grevesse, B.B. O'Connor, K.K. Parker, Soy Protein/Cellulose Nanofiber Scaffolds Mimicking Skin Extracellular Matrix for Enhanced Wound Healing, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701175>.
- [54] G.S. Ashcroft, T. Greenwell-Wild, M.A. Horan, S.M. Wahl, M.W.J. Ferguson, Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1137–1146. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65217-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65217-0).
- [55] G.S. Ashcroft, S.J. Mills, K.J. Lei, L. Gibbons, M.J. Jeong, M. Taniguchi, M. Burow, M.A. Horan, S.M. Wahl, T. Nakayama, Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1309–1318. <https://doi.org/10.1172/JCI16288>.
- [56] S.J. Mills, J.J. Ashworth, S.C. Gilliver, M.J. Hardman, G.S. Ashcroft, The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors, *J. Invest. Dermatol.* 69 (2005) 1053–1062. [https://doi.org/10.2193/0022-541X\(2005\)069\[1053:PCICTM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0022-541X(2005)069[1053:PCICTM]2.0.CO;2).
- [57] F. Guarderas, Y. Leavell, T. Sengupta, M. Zhukova, T.L. Megraw, Assessment of chicken-egg membrane as a dressing for wound healing, *Adv. Ski. Wound Care.* 29 (2016) 131–134.



<https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000480359.58866.e9>.

- [58] N.T. Thet, D.R. Alves, J.E. Bean, S. Booth, J. Nzakizwanayo, A.E.R. Young, B. V. Jones, A.T.A. Jenkins, Prototype Development of the Intelligent Hydrogel Wound Dressing and Its Efficacy in the Detection of Model Pathogenic Wound Biofilms, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 14909–14919. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07372>.
- [59] A. Krejner, T. Grzela, Modulation of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 activity by hydrofiber-foam hybrid dressing - Relevant support in the treatment of chronic wounds, *Cent. Eur. J. Immunol.* 40 (2015) 391–394. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.54605>.
- [60] D.G. Metcalf, D. Parsons, P.G. Bowler, Clinical safety and effectiveness evaluation of a new antimicrobial wound dressing designed to manage exudate, infection and biofilm, *Int. Wound J.* 14 (2017) 203–213. <https://doi.org/10.1111/iwj.12590>.
- [61] D. Metcalf, D. Parsons, P. Bowler, A next-generation antimicrobial wound dressing: A real-life clinical evaluation in the UK and Ireland, *J. Wound Care*. 25 (2016) 132–138. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.3.132>.
- [62] D. Stang, The use of Aquacel Ag in the management of diabetic foot ulcers., *Diabet. Foot J.* 7 (2004) 188–191.
- [63] R.J. Mendonça, V.B. Maurício, L. De Bortolli Teixeira, J.J. Lachat, J. Coutinho-Netto, Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*, *Phyther. Res.* 24 (2010) 764–768. <https://doi.org/10.1002/ptr.3043>.
- [64] R.D. Herculano, A.A. Alencar De Queiroz, A. Kinoshita, O.N. Oliveira, C.F.O. Graeff, On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 272–275. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.09.007>.
- [65] M. Zimmermann, F.F. Mendes, D.F. Rodrigues, M.R. Faleiro, G.S. Campos, E.G. Araújo, Membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis* auxilia no processo de reparação tecidual em bovinos, *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* (2018). <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9189>.
- [66] R. Wititsuwannakul, K. Rukseree, K. Kanokwiroon, D. Wititsuwannakul, A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation, *Phytochemistry*. 69 (2008) 1111–1118. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.12.007>.
- [67] A.C. Dall'Antonia, M.A. Martins, R.M.B. Moreno, L.H.C. Mattoso, A.E. Job, F.C. Ferreira, P.S. Gonçalves, Avaliação de clones de borracha natural

- crua por ensaios padrão e análise dinâmico-mecânica, *Polimeros*. 16 (2006) 239–245. <https://doi.org/10.1590/s0104-14282006000300015>.
- [68] D. Agostini, Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- [69] M. Zimmermann, Caracterização da membrana de látex *Hevea brasiliensis* e reação tecidual após implante no subcutâneo de equinos e bovinos., Universidade Federal de Goiás, 2012.
- [70] A. Sanches, Obtenção e caracterização elétrica e morfológica de compósitos de borracha natural com PZT, UNESP, 2012.
- [71] É.J. Guidelli, A. Kinoshita, A.P. Ramos, O. Baffa, Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1536-2>.
- [72] J. Alves, R. Brasília, Development and Functional Assessment of Natural Latex Membranes: a New Proposal for the Treatment of Amblyopia Universidade De Brasília Faculdade De Tecnologia, (2016). [http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22340/1/2016\\_JaquelineAlvesRibeiro.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22340/1/2016_JaquelineAlvesRibeiro.pdf).
- [73] A.C.F.M. Costa, M.G. Lima, L.H.M.A. Lima, V. V Cordeiro, K.M.S. Viana, C. V Souza, H.L. Lira, Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações, *Rev. Eletrônica Mater. e Process.* 4 (2009) 29–38.
- [74] T.M. Volkmer, L.A. Dos Santos, Influência do tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas, *Ceramica*. 53 (2007) 429–435. <https://doi.org/10.1590/s0366-69132007000400015>.
- [75] T.S. De Araujo, T.A.R.M. Lima, M.E.G. Valerio, Estudo Espectroscópico de Fe 3 + em Hidroxiapatita para Aplicações como Filtros Solares, 3 (2007) 285–291.
- [76] M.M. Shono, A.B.M. Niwa, N.E.S. Osório, Tratamento para rejuvenescimento das mãos com hidroxiapatita de cálcio, *Surg. Cosmet. Dermatology*. 4 (2012) 186–188.
- [77] M. Berthet, Y. Gauthier, C. Lacroix, B. Verrier, C. Monge, Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 770–784. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.005>.
- [78] S.M.B. I. V. Fadeeva, D. Ferro, A. S. Fomin, E. G. Polupudnova, Composite materials of starch with hydroxyapatite on the cotton tissue as material for wound dressings, *Powder Metall. Prog.* 15 (2015) 50–54.

- [79] B.Z. Velasques, Efeito da hidroxiapatita de coral implantada na derme de ratos., Universidade de Brasília, 2006.
- [80] K. Mam, R. Dangtungee, Effects of silver nanoparticles on physical and antibacterial properties of natural rubber latex foam, *Mater. Today Proc.* 17 (2019) 1914–1920. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.230>.
- [81] V.T. Noronha, A.J. Paula, G. Durán, A. Galembeck, K. Cogo-Müller, M. Franz-Montan, N. Durán, Silver nanoparticles in dentistry, *Dent. Mater.* 33 (2017) 1110–1126. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.002>.
- [82] B. Buszewski, K. Rafińska, P. Pomastowski, J. Walczak, A. Rogowska, Novel aspects of silver nanoparticles functionalization, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 506 (2016) 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.058>.
- [83] M.V.D. Garcia, Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis, Univ. Estadual Campinas, Campinas. (2011).
- [84] F. Mirzajani, A. Ghassempour, A. Aliahmadi, M.A. Esmaili, Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *Res. Microbiol.* 162 (2011) 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009>.
- [85] T.P.S. Zamboni, Estudo da ação bactericida em regiões próximas à superfície de titânio e aisi 304 pela incorporação de prata, Doutorado (2017).
- [86] E. Ockerman, German Scientists Found a New Antibiotic — and It's In Your Nose, *Time*. (2016). <https://time.com/4426641/antibiotic-nose-superbug/> (accessed March 19, 2021).
- [87] L.J. Bessa, P. Fazii, M. Di Giulio, L. Cellini, Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection, *Int. Wound J.* 12 (2015) 47–52. <https://doi.org/10.1111/iwj.12049>.
- [88] M. Simões, L.C. Simões, M.J. Vieira, A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT - Food Sci. Technol.* 43 (2010) 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>.
- [89] G. V. Salmoria, W.F.M. Martins, D.M. Fúcio, Tratamento da Superfície de Cateteres de Poliamida 11 por Plasma de Oxigênio, *Polimeros.* 23 (2013) 565–569. <https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.046>.
- [90] E. Burkarter, Construção de Imagens por Padrões Hidrofóbico/Hidrofilico, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- [91] F.G. Wolf, L.O.E. dos Santos, P.C. Philippi, Formação e dinâmica da

- interface líquido-vapor simulada pelo método Lattice-Boltzmann, *Rev. Bras. Ensino Fis.* 28 (2006) 167–175. <https://doi.org/10.1590/S0102-47442006000200008>.
- [92] A.E. Zeraik, M. Nitschke, Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity, *Curr. Microbiol.* 61 (2010) 554–559. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9652-z>.
- [93] R. White, K.F. Cutting, Modern exudate management : a review of wound treatments, *World Wide Wounds*. (2006). <http://www.worldwidewounds.com/2006/september/White/Modern-Exudate-Mgt.html> (accessed March 19, 2021).
- [94] M.C.F. Cesar Isaac, Pedro Ribeiro Soares de Ladeira, Francinni Mambrini Pires do Rêgo, Johnny Conduto Borda Aldunate, Rafael Mamoru Carneiro Tutihashi, Alterações no processo de reparo fisiológico, *Rev Bras Queimadura*. 10 (2011) 61–65.
- [95] T. Bell, Surface engineering: Past, present, and future, *Surf. Eng.* 6 (1990) 31–40. <https://doi.org/10.1179/sur.1990.6.1.31>.
- [96] F. Echeverrigaray, Estudo da ação antimicrobiana pela modificação de regiões próximas à superfície de aço inoxidável, Universidade de Caxias do Sul, 2014.
- [97] P.K. Chu, Surface engineering and modification of biomaterials, *Thin Solid Films*. 528 (2013) 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.07.144>.
- [98] H. Yasuda, M. Gazicki, Biomedical applications of plasma polymerization and plasma treatment of polymer surfaces, *Biomaterials*. 3 (1982) 68–77. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(82\)90036-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(82)90036-9).
- [99] D. Roman, Deposição de filmes finos de nitreto de zircônio para aplicação em biomateriais, Universidade de Caxias do Sul, 2008.
- [100] D.A. Duarte, Crescimento de subóxidos de Ti por grid-assisted magnetron sputtering reativo: modificações das propriedades ópticas elétricas através da inserção de oxigênio, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2018.
- [101] I. Safi, Recent aspects concerning DC reactive magnetron sputtering of thin films: A review, *Surf. Coatings Technol.* 127 (2000) 203–218. [https://doi.org/10.1016/s0257-8972\(00\)00566-1](https://doi.org/10.1016/s0257-8972(00)00566-1).
- [102] D.M. Mattox, *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*, 2007. <https://doi.org/10.1016/c2009-0-18800-1>.
- [103] F.I. Medeiros, Deposição De Filmes Finos De Cr E Cr-N Via Descarga

Híbrida De Pulverização Catódica E Implantação Iônica Por Imersão Em Plasma, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2018.

- [104] K. Sahu, A. Bisht, S.A. Khan, I. Sulania, R. Singhal, A. Pandey, S. Mohapatra, Thickness dependent optical, structural, morphological, photocatalytic and catalytic properties of radio frequency magnetron sputtered nanostructured Cu<sub>2</sub>O–CuO thin films, *Ceram. Int.* 46 (2020) 14902–14912. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.017>.
- [105] S. Shahidi, M. Ghoranneviss, Sterilization of cotton fabrics using plasma treatment, *Plasma Sci. Technol.* 15 (2013) 1031–1033. <https://doi.org/10.1088/1009-0630/15/10/13>.
- [106] M.M. Rodrigues, C.P. Fontoura, C.S.C. Garcia, S.T. Martins, J.A.P. Henriques, C.A. Figueroa, M. Roesch-Ely, C. Aguzzoli, Investigation of plasma treatment on UHMWPE surfaces: Impact on physicochemical properties, sterilization and fibroblastic adhesion, *Mater. Sci. Eng. C.* 102 (2019) 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.048>.
- [107] Y.H. An, F.I. Alvi, Q. Kang, M. Laberge, M.J. Drews, J. Zhang, M.A. Matthews, C.R. Arciola, Effects of sterilization on implant mechanical property and biocompatibility, *Int. J. Artif. Organs.* 28 (2005) 1126–1137. <https://doi.org/10.1177/039139880502801110>.
- [108] Q.Q. Qiu, W.Q. Sun, J. Connor, Sterilization of biomaterials of synthetic and biological origin, in: *Compr. Biomater.* II, 2017: pp. 180–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10186-9>.
- [109] S. Muhl, A. Pérez, The use of hollow cathodes in deposition processes: A critical review, *Thin Solid Films.* 579 (2015) 174–198. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2015.02.066>.
- [110] A.T.C.A. Chaves, Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*hellianthus annuus*) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR), UFPB, 2008.
- [111] M. Giovanela, J. da S. Crespo, M. Roesch-Ely, J.A.P. Henriques, C. Aguzzoli, A.E.D. Maddalozzo, C.S.C. Garcia, Filmes, processos de obtenção dos filmes e uso dos filmes., BR1020190107154, 2019.
- [112] C.A. Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Tatiana Pacheco Soares, Caren MachadoMenezes, Carlos Alejandro Figueroa, Jadna Catafesta, Caracterização físico-química de filmes finos de nitreto de zircônio e prata para aplicações biomédicas, (2015). [http://www.jovenspesquisadores.com.br/2015/restrito/easypdf/includes/resumos/2014/Ana\\_Elisa\\_Dotta\\_Maddalozzo\\_11\\_37\\_31.pdf](http://www.jovenspesquisadores.com.br/2015/restrito/easypdf/includes/resumos/2014/Ana_Elisa_Dotta_Maddalozzo_11_37_31.pdf) (accessed March 19, 2021).

- [113] C.S.C. Garcia, A.E.D. Maddalozzo, P.M. Garcia, C.P. Fontoura, M.M. Rodrigues, M. Giovanela, J.A.P. Henriques, C. Aguzzoli, M. Roesch-Ely, J. da S. Crespo, Natural rubber films incorporated with red propolis and silver nanoparticles aimed for occlusive dressing application, *Mater. Res.* 24 (2021). <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0415>.
- [114] J. Wu, Y. Zheng, W. Song, J. Luan, X. Wen, Z. Wu, X. Chen, Q. Wang, S. Guo, In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 762–771. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.093>.
- [115] A. Zille, M.M. Fernandes, A. Francesko, T. Tzanov, M. Fernandes, F.R. Oliveira, L. Almeida, T. Amorim, N. Carneiro, M.F. Esteves, A.P. Souto, Size and Aging Effects on Antimicrobial Efficiency of Silver Nanoparticles Coated on Polyamide Fabrics Activated by Atmospheric DBD Plasma, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 13731–13744. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04340>.
- [116] M.Y. Yüce, A.L. Demirel, The effect of nanoparticles on the surface hydrophobicity of polystyrene, *Eur. Phys. J. B.* 64 (2008) 493–497. <https://doi.org/10.1140/epjb/e2008-00042-0>.
- [117] K.H. Adati, *Preparação e avaliação das propriedades físico-químicas de membranas de quitosana para uso biomédico e farmacêutico*, Universidade de São Paulo, 2006.
- [118] EN-ISO-10993-12, Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials, ISO 10993-12:2008. (2008).
- [119] E.R. Pereira-Filho, R.J. Poppi, M.A.Z. Arruda, Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS, *Quim. Nova.* 25 (2002) 246–253. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200013>.
- [120] M.W.M. Cunico, M.M. Cunico, O.G. Miguel, S.F. Zawadzki, P. Peralta-Zamora, N. Volpato, Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica, *Visão Acadêmica.* 9 (2008) 23–32. <https://doi.org/10.5380/acd.v9i1.14635>.
- [121] Interpretar os principais resultados para Analisar experimento de superfície de resposta, *Suporte Ao Minitab.* (n.d.). <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/response-surface/analyze-response-surface-design/interpret-the-results/interpret-the-results/> (accessed July 14, 2020).
- [122] L. Dreesen, F. Cecchet, S. Lucas, DC magnetron sputtering deposition of

- titanium oxide nanoparticles: Influence of temperature, pressure and deposition time on the deposited layer morphology, the wetting and optical surface properties, *Plasma Process. Polym.* 6 (2009) S849–S854. <https://doi.org/10.1002/ppap.200932201>.
- [123] M. Irfan, S. Perero, M. Miola, G. Maina, A. Ferri, M. Ferraris, C. Balagna, Antimicrobial functionalization of cotton fabric with silver nanoclusters/silica composite coating via RF co-sputtering technique, *Cellulose*. 24 (2017) 2331–2345. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1232-y>.
- [124] L. Bois, F. Chassagneux, S. Parola, F. Bessueille, Y. Battie, N. Destouches, A. Boukenter, N. Moncoffre, N. Toulhoat, Growth of ordered silver nanoparticles in silica film mesostructured with a triblock copolymer PEO-PPO-PEO, *J. Solid State Chem.* 182 (2009) 1700–1707. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2009.01.044>.
- [125] P. Asanithi, S. Chaiyakun, P. Limsuwan, Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/963609>.
- [126] Z. et al. Yu, Influence of sputtering power on composition, structure and electrical properties of RF sputtered  $\text{CuIn}_{1-x}\text{Ga}_x\text{Se}_2$  thin films, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 5222–5229. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.01.152>.
- [127] D.M. Ballottin, *Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos*, UNICAMP, 2014.
- [128] M. Akter, M.T. Sikder, M.M. Rahman, A.K.M.A. Ullah, K.F.B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito, M. Kurasaki, A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>.
- [129] K.J. Woo, C.K. Hye, W.K. Ki, S. Shin, H.K. So, H.P. Yong, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>.
- [130] Z. Hu, W.L. Chan, Y.S. Szeto, Nanocomposite of chitosan and silver oxide and its antibacterial property, *J. Appl. Polym. Sci.* 108 (2008) 52–56. <https://doi.org/10.1002/app.26822>.
- [131] T. Suwatthanarak, B. Than-Ardna, D. Danwanichakul, P. Danwanichakul, Synthesis of silver nanoparticles in skim natural rubber latex at room temperature, *Mater. Lett.* 168 (2016) 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.01.026>.

- [132] M.A. Fanovich, J.M. Porto López, Influence of temperature and additives on the microstructure and sintering behaviour of hydroxyapatites with different Ca/P ratios, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9 (1998) 53–60. <https://doi.org/10.1023/A:1008834712212>.
- [133] W.D.T. S. Ramesh, C. Y. Tan, M. Hamdi, I. Sopyan, The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics, *Int. Conf. Smart Mater. Nanotechnol. Eng.* 6423 (2015) 64233A-1-64233A–6. <https://doi.org/10.1117/12.779890>.
- [134] S.M.B. I. V. Fadeeva, D. Ferro, A. S. Fomin, E. G. Polupudnova, COMPOSITE MATERIALS OF STARCH WITH HYDROXYAPATITE ON THE COTTON TISSUE AS MATERIAL FOR WOUND DRESSINGS, *Powder Metall. Prog.* 15 (2015) 50–54.
- [135] H. Wang, J.K. Lee, A. Moursi, J.J. Lannutti, Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 67 (2003) 599–608. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10538>.
- [136] S. V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications., *Biomater.* 1 (2011) 121–164. <https://doi.org/10.4161/biom.18790>.
- [137] P. Tomlins, *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*, 2015. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-16452-5>.
- [138] T. Yamaguchi, Y. Tanaka, A. Ide-Ektessabi, Fabrication of hydroxyapatite thin films for biomedical applications using RF magnetron sputtering, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 249 (2006) 723–725. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2006.03.126>.
- [139] A.C. Guastaldi, A.H. Aparecida, Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos, *Quim. Nova.* 33 (2010) 1352–1358. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000600025>.
- [140] European Commission, Environmental factsheet: lactic acid, (n.d.). [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/BISO-EnvSust-Bioproductions-LA\\_140930.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/BISO-EnvSust-Bioproductions-LA_140930.pdf) (accessed February 25, 2021).
- [141] Equilíbrio ácido base (aula da UFJF), (n.d.). <https://www.ufjf.br/nupis/files/2017/09/aula-1-Equilíbrio-ácido-base.pdf> (accessed February 25, 2021).
- [142] A. Nostro, L. Cellini, M. Di Giulio, M. D'Arrigo, A. Marino, A.R. Blanco, A. Favalaro, G. Cutroneo, G. Bisignano, Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation, *APMIS.* 120 (2012) 733–742. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02900.x>.



- [143] D. Leaper, E.A. Ayello, K. Carville, J. Fletcher, D.H. Keast, Appropriate Use of Silver Dressing in Wounds, *Wounds Int.* (2012).
- [144] L.G. Ovington, The truth about silver., *Ostomy. Wound. Manage.* 50 (2004) 1S-10S.
- [145] D.J. Leaper, Silver dressings: Their role in wound management, *Int. Wound J.* 3 (2006) 282–294. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00265.x>.
- [146] E.A.B. Neto, C. Ribeiro, V. Zucolotto, Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens, *Comun. Técnico EMBRAPA.* (2008).  
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/31734/1/CT992008.pdf> (accessed March 18, 2021).
- [147] H.C. Margolis, E.C. Moreno, Kinetics of hydroxyapatite dissolution in acetic, lactic, and phosphoric acid solutions, *Calcif. Tissue Int.* 50 (1992) 137–143. <https://doi.org/10.1007/BF00298791>.
- [148] K. Kulthong, S. Srisung, K. Boonpavanitchakul, W. Kangwansupamonkon, R. Maniratanachote, Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat, *Part. Fibre Toxicol.* 7 (2010) 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-8>.
- [149] X. Ma, Z.H. Li, Y.F. Huang, Y.J. Lu, L.Y. Wang, J.X. Huang, Hydroxyapatite modified titanium promotes superior adhesion and proliferation of corneal fibroblast in comparison with pure titanium, *Int. J. Ophthalmol.* 1 (2007) 311–314.
- [150] D.S. Gomes, A.M.C. Santos, G.A. Neves, R.R. Menezes, A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine, *Ceramica.* 65 (2019) 282–302. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653742706>.
- [151] J.H. Li, X.S. Shao, Q. Zhou, M.Z. Li, Q.Q. Zhang, The double effects of silver nanoparticles on the PVDF membrane: Surface hydrophilicity and antifouling performance, *Appl. Surf. Sci.* 265 (2013) 663–670. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.11.072>.
- [152] M.H.A. Van Dongen, R.O.F. Verkuijlen, R. Aben, J.P.C. Bernardis, Wettability and aging of polymer substrates after atmospheric dielectrical barrier discharge plasma on demand treatment, *J. Imaging Sci. Technol.* 57 (2013) 1–5. <https://doi.org/10.2352/J.ImagingSci.Technol.2013.57.3.030503>.
- [153] L. Feller, Y. Jadwat, R.A.G. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, J. Lemmer, Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 1–8.

- <https://doi.org/10.1155/2015/171945>.
- [154] F. Rupp, R.A. Gittens, L. Scheideler, A. Marmur, B.D. Boyan, Z. Schwartz, J. Geis-Gerstorfer, A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2894–2906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>.
- [155] M. Jäger, H.P. Jennissen, F. Dittrich, A. Fischer, H.L. Köhling, Antimicrobial and osseointegration properties of nanostructured titanium orthopaedic implants, *Materials (Basel)*. 10 (2017) 1–28. <https://doi.org/10.3390/ma10111302>.
- [156] I. Banik, K.S. Kim, Y. Il Yun, D.H. Kim, C.M. Ryu, C.S. Park, G.S. Surd, C.E. Park, A closer look into the behavior of oxygen plasma-treated high-density polyethylene, *Polymer (Guildf)*. 44 (2003) 1163–1170. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00847-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00847-9).
- [157] E. Izak-Nau, A. Huk, B. Reidy, H. Uggerud, M. Vadset, S. Eiden, M. Voetz, M. Himly, A. Duschl, M. Dusinska, I. Lynch, Impact of storage conditions and storage time on silver nanoparticles' physicochemical properties and implications for their biological effects, *RSC Adv.* 5 (2015) 84172–84185. <https://doi.org/10.1039/c5ra10187e>.
- [158] D. Franco, L.F. Gonçalves, Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado, *Rev. Col. Bras. Cir.* 35 (2008) 203–206. <https://doi.org/10.1590/s0100-69912008000300013>.
- [159] R. Augustine, A. Hasan, V.K. Yadu Nath, J. Thomas, A. Augustine, N. Kalarikkal, A.E. Al Moustafa, S. Thomas, Electrospun polyvinyl alcohol membranes incorporated with green synthesized silver nanoparticles for wound dressing applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6169-7>.
- [160] I.G. Veiga, Â.M. Moraes, Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes, *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2012) E154–E160. <https://doi.org/10.1002/app.35526>.
- [161] N.R. de Barros, Estudo da incorporação e liberação de peptídeos hormonais utilizando membranas de látex natural como carreador, Universidade Estadual Paulista, 2016.
- [162] T. Zhang, L. Wang, Q. Chen, C. Chen, Cytotoxic potential of silver nanoparticles, *Yonsei Med. J.* 55 (2014) 283–291. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>.
- [163] H.J. Yen, S.H. Hsu, C.L. Tsai, Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes, *Small*. 5 (2009) 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/smll.200900126>.

- [164] H. Peng, X. Zhang, Y. Wei, W. Liu, S. Li, G. Yu, X. Fu, T. Cao, X. Deng, Cytotoxicity of silver nanoparticles in human embryonic stem cell-derived fibroblasts and an L-929 cell line, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/160145>.
- [165] M.V.D.Z. Park, A.M. Neigh, J.P. Vermeulen, L.J.J. de la Fonteyne, H.W. Verharen, J.J. Briedé, H. van Loveren, W.H. de Jong, The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles, *Biomaterials.* 32 (2011) 9810–9817. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>.
- [166] A.L. Neal, What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?, *Ecotoxicology.* 17 (2008) 362–371. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0217-x>.
- [167] H. Samadian, M. Salehi, S. Farzamfar, A. Vaez, A. Ehterami, H. Sahrapeyma, A. Goodarzi, S. Ghorbani, In vitro and in vivo evaluation of electrospun cellulose acetate/gelatin/hydroxyapatite nanocomposite mats for wound dressing applications, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) S964–S974. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1439842>.
- [168] R. Arvidsson, S. Molander, B.A. Sandén, Impacts of a Silver-Coated Future, *J. Ind. Ecol.* 15 (2011) 844–854. <https://doi.org/10.1111/j.1530-9290.2011.00400.x>.
- [169] C. Rigo, M. Roman, I. Munivrana, V. Vindigni, B. Azzena, C. Barbante, W.R.L. Cairns, Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care, *Burns.* 38 (2012) 1131–1142. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.06.013>.
- [170] M.S. Cohen, J.M. Stern, A.J. Vanni, R.S. Kelley, E. Baumgart, D. Field, J.A. Libertino, I.C. Summerhayes, In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh, *Surg. Infect. (Larchmt).* 8 (2007) 397–403. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.032>.
- [171] C.E. Dos Reis, Estudo da eficácia da amoxicilina incorporada em membranas de látex, Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, 2015.
- [172] N.S. Alahmadi, J.W. Betts, T. Heinze, S.M. Kelly, A. Koschella, J.D. Wadhawan, Synthesis and antimicrobial effects of highly dispersed, cellulose-stabilized silver/cellulose nanocomposites, *RSC Adv.* 8 (2018) 3646–3656. <https://doi.org/10.1039/c7ra12280b>.
- [173] A. de J. Silva, Preparação e caracterização de biomembranas de látex de hevea brasiliensis e própolis de scaptotrigona polysticta para aplicações

médicas, Universidade Federal de Mato Grosso, 2014.

- [174] N. Zhang, H. Cao, Enhancement of the antibacterial activity of natural rubber latex foam by blending it with chitin, *Materials (Basel)*. 13 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/ma13051039>.
- [175] K. Kanokwiroon, R. Teanpaisan, D. Wititsuwannakul, A.B. Hooper, R. Wititsuwannakul, Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms, *Mycoses*. 51 (2008) 301–307. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01490.x>.
- [176] K. Mam, R. Dantungee, Effects of silver nanoparticles on physical and antibacterial properties of natural rubber latex foam, *Mater. Today Proc.* 17 (2019) 1914–1920. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.230>.
- [177] E. Rosqvist, E. Niemelä, A.P. Venu, R. Kummala, P. Ihalainen, M. Toivakka, J.E. Eriksson, J. Peltonen, Human dermal fibroblast proliferation controlled by surface roughness of two-component nanostructured latex polymer coatings, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.064>.
- [178] V. Nelea, C. Morosanu, M. Iliescu, I.N. Mihailescu, Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite thin films grown by RF magnetron sputtering, *Surf. Coatings Technol.* (2003). [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(03\)00729-1](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(03)00729-1).
- [179] R.L. dos Santos, M.M. Pithon, F.O. Martins, M.T.V. Romanos, A.C. de O. Ruellas, Cytotoxicity of latex and non-latex Orthodontic elastomeric ligatures on L929 mouse fibroblasts, *Braz. Dent. J.* (2010). <https://doi.org/10.1590/s0103-64402010000300005>.
- [180] M. Hanson, D. Lobner, In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2003.07.006>.