



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA INCORPORADAS COM
ZINCO COM POTENCIAL ATIVIDADE CICATRIZANTE E
ANTIMICROBIANA**

ANDRÉIA LANGE DE PINHO NEVES

**FLORIANÓPOLIS
2013**

ANDRÉIA LANGE DE PINHO NEVES

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA INCORPORADAS COM
ZINCO COM POTENCIAL ATIVIDADE CICATRIZANTE E
ANTIMICROBIANA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen
Co-orientadora: Prof. Dra. Hellen Karine Stulzer

FLORIANÓPOLIS
2013

**Preparação e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana
Incorporadas com Zinco com Potencial Atividade Cicatrizante e
Antimicrobiana**

por

Andréia Lange de Pinho Neves

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen
orientador

Prof^ª Dr^ª Hellen Karine Stulzer
coorientadora

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado

Prof. Dr. Humberto Gracher Riella

Prof. Dr. José Miguel Müller

Prof. Dr. Elidio Angioletto

Prof^ª Dr^ª Elita Fontenele Urano de Carvalho

Florianópolis, 20 de junho 2013

Dedico esta tese ao meu marido Alarico, minha filha Laura e minha mãe Marisa. Vocês são a razão da minha alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen pela orientação, incentivo e por acreditar em mim na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Gracher Riella por me transmitir seu conhecimento e não medir esforços para que este trabalho fosse concluído.

À Profa. Dra. Hellen Stulzer pela co-orientação e por abrir as portas do Laboratório de Controle de Qualidade me passando seu conhecimento sobre nanopartículas de quitosana.

À toda a equipe do Laboratório de Controle de Processos (LCP) por sempre serem prestativos no auxílio do uso dos equipamentos.

À Profa. Dra. Rosângela e à aluna Valdelúcia do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) pelo conhecimento transmitido e pela parceria, aplicando o material desenvolvido neste trabalho, em animais.

Ao pessoal do laboratório de Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) pela realização das liofilizações.

Ao Pof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère por gentilmente ceder as amostras de quitosana utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica pela dedicação em realizar as análises de microscopia.

À todos os colegas do Labmac por tornarem o trabalho mais prazeroso. Foi muito bom pertencer a este grupo durante estes quatro anos.

Ao aluno Fernando Bellincanta Begnini pela imensa dedicação e pelo auxílio na execução deste trabalho.

À minha mãe por sempre torcer e orar por mim, me apoiando nesta jornada.

Ao meu marido Alarico pelo amor infinito, por sempre me amparar e comemorar minhas vitórias.

À minha filha Laura por me mostrar o verdadeiro valor da vida e que a felicidade está nas pequenas coisas, como seu lindo sorriso.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela oportunidade dada na realização do Doutorado.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

A quitosana (QTS), um biopolímero obtido a partir de desacetilação parcial da quitina, tem atraído a atenção da comunidade científica devido a sua combinação única de propriedades tais como atividade antimicrobiana e cicatrizante, capacidade de formar complexos com metais e baixa toxicidade. O seu efeito antibacteriano está associado com a carga positiva dos grupos amínicos, que se podem ligar à superfície das células bacterianas e interferir com as funções normais da membrana, inibindo o seu crescimento. A quitosana possui muitas propriedades que são vantajosas para cura de feridas como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade hemostática, aceleração de cura e propriedades anti-infecção. Estes efeitos, no entanto, são ainda maiores quando a quitosana encontra-se na forma de nanopartículas (Nano). O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco para a avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana. Para a formação das nanopartículas, foi utilizado o método de gelificação iônica, que consiste em adicionar, a temperatura ambiente, uma fase alcalina contendo tripolifosfato (TPP) em uma fase ácida com quitosana. As Nano+Zn foram obtidas através da adição de nitrato de zinco em suspensão com nanopartículas. As partículas foram analisadas através do tamanho, potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA). A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e a cicatrização de feridas foi estudada em camundongos. Através de um planejamento fatorial 2^3 observou-se que as melhores condições experimentais para a produção de nanopartículas foram ácido acético 0,1 M, pH 4,4 e razão de QTS:TPP de 3:0,8. Com essas condições, foram obtidas partículas com diâmetro médio de 76,2 nm e potencial zeta de 32,6 mV. As melhores condições para promover a adsorção de zinco às nanopartículas foram temperatura ambiente, 8 h de agitação e concentração da solução de Zn^{+2} de 40 mg g_{nano}^{-1} . O teste de FAAS revelou que as nanopartículas incorporaram 84,4% de Zn^{+2} ou 33,8 mg g_{nano}^{-1} . Os resultados de EDX, FTIR e TGA comprovaram a formação das nanopartículas e adsorção dos íons metálicos. A atividade

antimicrobiana das Nano foi maior em relação a *S. aureus*, já que, tanto a CIM quanto a CBM foram de 5 mg mL^{-1} para as Nano e $8,66 \text{ mg mL}^{-1}$ para as Nano+Zn. No 12º dia de tratamento, a reepitelização das feridas dos camundongos tratados com Nano e Nano+Zn não diferiram significativamente entre si, as reduções foram de 90,5 e 96,1%, respectivamente. Este trabalho permite concluir que foi possível produzir nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica, com tamanho e potencial zeta desejados, sendo que, o gel composto por essas partículas apresentou importante ação cicatrizante.

Palavras-chave: quitosana, nanopartículas, tripolifosfato, atividade antimicrobiana, cicatrização de feridas.

ABSTRACT

Chitosan (CTS), a biopolymer obtained from partial deacetylation of chitin, has attracted the scientific community's attention for its unique combination of properties such as antibacterial and healing activity, ability to form metal complexes and low toxicity. Its antibacterial effect is associated with the positive charge of the amino groups, which can bind to the bacterial cell surface and interfere with normal functions of the membrane, inhibiting their growth. Chitosan possess many properties that are advantageous for wound healing like biocompatibility, biodegradability, hemostatic activity, healing acceleration and anti-infection properties. These effects, although, are even greater when chitosan is in the form of nanoparticles (Nano). The aim of this work was to produce chitosan nanoparticles incorporated with zinc (Nano+Zn) to evaluate of the wound healing and antimicrobial activity. For nanoparticles formation it was used the ionotropic gelation method that consists in adding, at room temperature, an alkaline phase with tripolyphosphate (TPP) to an acid phase with chitosan. The Nano+Zn were obtained by adding of zinc nitrate into chitosan's nanosuspensions. The nanoparticles were analyzed by size and zeta potential, transmission electron microscopy (TEM), atomic absorption spectroscopy (AAS), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TG). The antibacterial activities were evaluated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the wound healing was evaluated in mice. Using a 2^3 factorial planning, it was observed that the best experimental conditions for nanoparticles production were acetic acid 0.1 M, pH 4.4 and ratio of CTS:TPP of 3:0.8. With these conditions, particles were obtained with average diameter of 76.2 nm, zeta potential of 32.6 mV. The optimum conditions for promoting the adsorption of zinc to nanoparticles were room temperature, 8 h of magnetic stirring and solution concentration of Zn^{+2} of $40 \text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$. The AAS revealed that the nanoparticles incorporated 84.4% Zn^{+2} or $33.8 \text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$. The results of EDX, FTIR and TG proved the formation of nanoparticles and adsorption of metal ions. The antimicrobial activity of Nano was higher in relation to *S. aureus*, since both the MIC as the MBC were 5 mg mL^{-1} for Nano and 8.66 mg mL^{-1} for Nano+Zn. On the 12th day of treatment, re-epithelialization of wounds of mice treated with Nano and Nano+Zn did not differ significantly, the reductions were 90.5 and 96.1%, respectively. This

work showed that it was possible to produce chitosan nanoparticles by ionic gelation method with desired size and zeta potential, and the gel composed of these particles have significant healing action.

Keywords: chitosan, nanoparticles, tripolyphosphate, antimicrobial activity, wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina.....	32
Figura 2 - Estrutura química da quitina e quitosana.....	34
Figura 3 - Gelificação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio.....	48
Figura 4 - Estruturas propostas para os complexos formados entre quitosana e Zn^{2+}	51
Figura 5 - Curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	69
Figura 6 - Curva da concentração das soluções de quitosana em relação à viscosidade específica.....	71
Figura 7 - Distribuição do (♦) tamanho (nm) e (●) potencial zeta das nanopartículas nas diferentes razões de QTS:TPP.....	73
Figura 8 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 3:1.....	74
Figura 9 - Imagens de MET das nanopartículas de quitosana referente à razão de 3:1 com barras de escala de (a) 1 μm e (b) 20 nm.....	74
Figura 10 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 3:1.....	75
Figura 11 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 6:1.....	76
Figura 12 - Imagem de MET das nanopartículas de quitosana referente à razão de 6:1.....	77
Figura 13 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 6:1.....	77
Figura 14 - Diagrama de pareto relacionado ao tamanho das nanopartículas.....	79
Figura 15 - Diagrama de pareto relacionado ao potencial zeta das nanopartículas.....	80
Figura 16 - Gráficos da análise do efeito do (a) pH, (b) QTS:TPP e (c) [ácido acético] sobre o tamanho e efeito do (d) pH, (e) QTS:TPP e (f) [ácido acético] sobre o potencial zeta das nanopartículas de quitosana.....	81

Figura 17 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 1 do planejamento experimental.....	83
Figura 18 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 1 do planejamento experimental.....	83
Figura 19 - Imagens de MET das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 1 com barras de escala de (a) 1µm e (b) 20 nm.....	84
Figura 20 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 30 min de agitação.....	86
Figura 21 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 30 min de agitação.....	86
Figura 22 - Diagrama de pareto relacionado à adsorção de Zn ⁺² para o primeiro planejamento fatorial 2 ²	88
Figura 23 - Gráficos da análise do efeito do (a) [Zn ⁺²] e (b) temperatura sobre a porcentagem de adsorção de zinco para o primeiro planejamento fatorial 2 ²	88
Figura 24 – Diagrama de pareto relacionado à adsorção de Zn ⁺² para o segundo planejamento fatorial 2 ²	90
Figura 25 - Gráficos da análise do efeito do (a) [Zn ⁺²] e (b) tempo sobre a porcentagem de adsorção de zinco para o segundo planejamento fatorial 2 ²	90
Figura 26 - Espectro de EDX para quitosana.....	91
Figura 27 - Espectro de EDX para as nanopartículas de quitosana.....	92
Figura 28 - Espectro de EDX para as nanopartículas incorporadas com zinco.....	92
Figura 29 – Espectros de infravermelho para a quitosana, nanopartículas e nanopartículas com zinco.....	94
Figura 30 - Termogramas de TGA da QTS (a), Nano (b) e Nano+Zn (c).....	96
Figura 31 - Teste de difusão em ágar da quitosana <i>in natura</i> contra <i>S. aureus</i>	99
Figura 32 - Teste de difusão em ágar das nanopartículas de quitosana contra <i>S. aureus</i>	100

Figura 33 - Teste de difusão em ágar das nanopartículas incorporadas com Zn^{+2} contra <i>S. aureus</i>	100
Figura 34 - Teste de difusão em ágar do ácido acético 0,17 M contra <i>S. aureus</i>	101
Figura 35 - Representação gráfica da média das áreas das feridas dos camundongos dos grupos CN, CPAA, CPZn, Nano e Nano+Zn...	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência natural da quitina.....	33
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra bactérias.....	40
Tabela 3 - Algumas aplicações da quitosana nas áreas industrial, da saúde e nutricional.....	45
Tabela 4 - Reagentes utilizados.....	53
Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 de avaliação do tamanho e potencial zeta das nanopartículas de quitosana.....	57
Tabela 6 - Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial.....	57
Tabela 7 - Matriz do primeiro planejamento fatorial 2^2 de avaliação da adsorção de Zn^{+2} em nanopartículas de quitosana.....	59
Tabela 8 - Níveis das variáveis utilizadas no primeiro planejamento fatorial 2^2	59
Tabela 9 - Matriz do segundo planejamento fatorial 2^2 de avaliação da adsorção de Zn^{+2} em nanopartículas de quitosana.....	59
Tabela 10 - Níveis das variáveis utilizadas no segundo planejamento fatorial 2^2	59
Tabela 11- Tamanho das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta para as diferentes razões de QTS:TPP.....	72
Tabela 12 - Potencial zeta e tamanho das nanopartículas de quitosana obtidas através do planejamento fatorial 2^3	79
Tabela 13 - Tamanho das nanopartículas e potencial zeta para os diferentes tempos de agitação.....	85
Tabela 14 - Porcentagens de adsorção de Zn^{+2} às nanopartículas de quitosana obtidas através do primeiro planejamento fatorial 2^2	87
Tabela 15 - Porcentagens de adsorção de Zn^{+2} às nanopartículas de quitosana obtidas através do segundo planejamento fatorial 2^2	89
Tabela 16 - Análise elementar da quitosana, nanopartículas e nanopartículas adsorvidas de zinco.....	93
Tabela 17 - Diâmetro médio dos halos formados para diferentes amostras em relação à <i>S. aureus</i>	98

Tabela 18 – CIM e CBM (mg mL^{-1}) da quitosana (QTS), Nano e Nano+Zn em relação às bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	102
Tabela 19 - Porcentagens de reduções das lesões dos camundongos do grupo CN, CPAA, CPZn, Nano e Nano+Zn.....	104
Tabela 20 – Imagem das lesões no primeiro e último dia de tratamento dos grupos experimentais.....	107

NOMENCLATURA

ANOVA	Análise de variância
CIM	Concentração inibitória mínima
CN	Controle negativo
CPAA	Controle positivo com ácido acético 0,17 M
F _A	Fração molar dos grupos N-acetil-D-glicosamina ou grau médio de acetilação
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho
GD	Grau de desacetilação
GPC	Cromatografia de permeação em gel
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Concentração inibitória mínima
MIB	Concentração bactericida mínima
Nano	Nanopartículas de quitosana
Nano+Zn	Nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco
PDI	Índice de polidispersão
QTS	Quitosana
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
SEM	Scanning electronic microscope
TGA	Análise termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato de sódio

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Inovação tecnológica do projeto de pesquisa	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 Nanotecnologia.....	31
2.1.1 Nanopartículas poliméricas	31
2.2 Quitina e quitosana.....	32
2.3 Processo de obtenção da quitosana	35
2.4 Propriedades físicas e químicas da quitosana.....	36
2.4.1 Grau de desacetilação.....	37
2.4.2 Massa molar	37
2.4.3 Solubilidade.....	38
2.5 Propriedades biológicas da quitosana.....	39
2.5.1 Atividade antimicrobiana	39
2.5.2 Cicatrização de tecidos.....	42
2.5.2.1 Fase inflamatória.....	42
2.5.2.2 Fase proliferativa.....	43
2.5.2.3 Fase de remodelação.....	44
2.6 Aplicações da quitosana e suas nanopartículas.....	44
2.7 Métodos para obtenção de nanopartículas de quitosana.....	47
2.7.1 Gelificação iônica.....	47
2.8 Zinco	49
2.9 Ação quelante de zinco em quitosana	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Materiais.....	53
3.1.1 Reagentes	53
3.1.2 Equipamentos.....	53
3.2 Métodos de caracterização da quitosana <i>in natura</i> e nanopartículas .	54
3.2.1 Grau de desacetilação (GD)	54
3.2.2 Massa molar	55
3.3 Análise de diferentes razões de qts:tpg na formação de nanopartículas	56
3.4 Avaliação da influência de diferentes parâmetros na formação das nanopartículas	56

3.5 Estudo sobre adsorção de zinco em nanopartículas de quitosana ...	58
3.6 Métodos de caracterização das nanopartículas.....	60
3.6.1 Tamanho médio das nanopartículas	60
3.6.2 Potencial zeta	60
3.6.3 Índice de polidispersão (PDI)	60
3.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	60
3.6.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)	61
3.6.6 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)	61
3.6.7 Análise Termogravimétrica (TGA).....	62
3.6.8 Espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS).....	62
3.7 Ensaio microbiológicos	62
3.7.1 Método de difusão em ágar.....	62
3.7.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	63
3.8 Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i>	64
3.8.1 Procedimentos do modelo de excisão de pele.....	64
3.8.1.1 Procedimentos anestésico e analgésico.....	64
3.8.1.2 Procedimento Cirúrgico e pós-operatório.....	65
3.8.2 Grupos experimentais	65
3.8.2.1 Grupo controle negativo não tratado (CN).....	65
3.8.2.2 Grupo controle positivo tratado com solução de ácido acético (CPAA).....	66
3.8.2.3 Grupo controle positivo tratado com solução de zinco (CPZn).....	66
3.8.2.4 Grupo gel de nanopartículas de quitosana (Nano).....	66
3.8.2.5 Grupo gel de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco (Nano+Zn).....	66
3.8.3 Morfometria da lesão	67
3.9 Análise estatística.....	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Caracterização da quitosana <i>in natura</i>	69
4.1.1 Grau de desacetilação.....	69
4.1.2 Massa molar	70
4.2 Análise de diferentes razões de qts:tpg na formação de nanopartículas	71

4.3 Avaliação da influência de diferentes parâmetros na formação de nanopartículas	78
4.4 Determinação da influência do tempo de agitação na formação de nanopartículas.....	84
4.5 Estudo sobre adsorção de zinco em nanopartículas de quitosana....	86
4.6 Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	91
4.6.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X	91
4.6.2 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)	94
4.6.3 Análise termogravimétrica (TGA)	95
4.7 Análise da atividade antimicrobiana das nanopartículas	97
4.7.1 Difusão em ágar	98
4.7.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	101
4.8 Avaliação da atividade cicatrizante das nanopartículas de quitosana <i>in vivo</i>	103
5 CONCLUSÕES	111
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	133

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a nanociência e a nanotecnologia são consideradas como um dos mais fascinantes avanços nas tradicionais áreas do conhecimento e constituem um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados (AOUADA, 2009). Dentre os polímeros naturais, a quitosana tem sido muito utilizada na produção de nanopartículas por ser um polissacarídeo hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade (SINHA et al., 2004) obtido de fonte renovável e biodegradável.

Industrialmente, a quitosana é produzida a partir da desacetilação alcalina ou enzimática de quitina (OLIVEIRA JUNIOR, 2006) a qual é encontrada nos exoesqueletos de crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. O baixo custo de produção, a abundância de matéria-prima e o aproveitamento dos subprodutos da pesca de crustáceos tornam o processo de produção de quitosana ecologicamente interessante e economicamente viável (CAMPOS, 2007), já que, estas carapaças são rejeitadas por muitas indústrias pesqueiras.

Os polímeros quitina e quitosana têm sido bastante estudados devido ao elevado potencial de aplicações em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, na agricultura e podem também ser utilizados como agentes flocculantes no tratamento de efluentes e como adsorventes na clarificação de óleos (KHOR e LIM, 2003). Já as nanopartículas de quitosana, são desenvolvidas principalmente para aplicação nas áreas farmacêutica e biomédica como carreadoras de fármacos, devido a sua capacidade de liberação lenta e contínua de compostos.

A quitosana apresenta reconhecida propriedade antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e cicatrizante. Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por seus grupos amino que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam aos grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e na inibição do crescimento (RAVI KUMAR, 2000).

É reconhecida a atividade antimicrobiana da quitosana tanto contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, quanto contra bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* (QI et al., 2004). Pela sua versatilidade, este biopolímero é muito utilizado na conservação de carnes (DARMADJI e IZUMIMOTO, 1994), no recobrimento de feridas (CAMPOS et al., 2006), para a proteção de

frutos contra a podridão parda causada por fungos (LI e YU, 2001), entre muitas outras aplicações.

Quando a quitosana encontra-se na forma de nanopartículas, sua atividade antimicrobiana aumenta, pois a maior área superficial e a densidade de cargas fazem com que as nanopartículas tenham um maior grau de interação com a superfície de carga negativa das células bacterianas (SHI et al. 2006), por isso, o potencial bactericida e bacteriostático das nanopartículas de quitosana vem sendo explorado por muitos pesquisadores.

Uma grande variedade de métodos para síntese de nanopartículas de quitosana é encontrada na literatura, no entanto, a gelificação iônica é a técnica mais utilizada por apresentar a vantagem de que as nanopartículas são obtidas espontaneamente sob condições de controle amenas que não envolvem altas temperaturas, utilização de solventes orgânicos ou técnicas de sonicação (CALVO et al., 1997). Este método é baseado no princípio simples de que em condições ácidas os grupos $-NH_2^+$ da quitosana são protonados ($-NH_3$) podendo interagir com ânions, como o tripolifosfato, formando nanopartículas (LEE et al., 2001).

O elevado teor de nitrogênio na quitosana, que excede o teor de 7% (p/p), explica a capacidade que este biopolímero possui de se complexar a íons metálicos. Em meio ácido, os grupos amino protonados da quitosana são capazes de se ligar a ânions metálicos através de mecanismos de troca iônica. Já em meio neutro ou levemente ácido, este biopolímero é capaz de adsorver muitos cátions como urânio, cobre, chumbo e zinco (GUIBAL, 2002), sendo este último, um elemento com considerável ação antimicrobiana e que auxilia na cicatrização.

Outra importante propriedade biológica da quitosana é a sua capacidade de auxiliar na cicatrização de lesões. Isto ocorre porque a quitosana é capaz de ativar os macrófagos, que são células que participam diretamente de toda a resposta do organismo frente a qualquer estímulo agressor físico, químico ou bacteriano (CASTRO et al., 2004). Quando metais como o zinco são adsorvidos à quitosana, tanto a atividade antimicrobiana quanto a cicatrizante deste polímero aumentam, já que o zinco é um micronutriente bacteriostático e essencial no processo de regeneração da pele.

O principal objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco para a avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana.

E os objetivos específicos foram:

- Caracterizar a quitosana *in natura* quanto ao grau de desacetilação, massa molar, espectroscopia dispersiva de raios-X, termogravimetria e espectroscopia na região do infravermelho;
- Testar diferentes razões de quitosana:trifosfato (QTS:TPP) e avaliar a influência no tamanho e potencial zeta das nanopartículas obtidas por gelificação iônica;
- Verificar o efeito das variáveis: concentração de ácido acético, pH e razão de QTS:TPP sobre o tamanho e potencial zeta das nanopartículas de quitosana;
- Determinar a influência do tempo de agitação na formação de nanopartículas;
- Examinar a caracterização das nanopartículas quanto à morfologia, distribuição do potencial zeta, distribuição do tamanho, análise térmica, espectroscopia dispersiva de raios-X e espectroscopia na região do infravermelho;
- Estudar a incorporação de zinco às nanopartícula de quitosana;
- Analisar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana, puras e incorporadas com zinco, em relação às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através do teste de halo, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima;
- Avaliar a ação cicatrizante das nanopartículas de quitosana, puras e incorporadas com zinco, em camundongos.

1.1 Inovação tecnológica do projeto de pesquisa

Nas últimas duas décadas, ocorreu uma mudança de paradigma dos materiais bioestáveis para os biodegradáveis para aplicações biomédicas. A tendência atual prevê que, nos próximos anos, os materiais utilizados para aplicações terapêuticas temporárias serão substituídos por materiais biodegradáveis que possam ajudar o corpo a reparar os tecidos danificados (NAIR e LAURENCIN, 2007). Neste contexto, é importante que se estude a ação cicatrizante da quitosana, já que este polissacarídeo é biodegradável e obtido de fonte abundante e renovável.

Os custos dos tratamentos de patologias relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). A atividade antimicrobiana da quitosana também auxilia no processo de cicatrização, no entanto quando este polímero

está associado a metais como o zinco, sua ação antimicrobiana e cicatrizante aumenta.

Na literatura há muitos trabalhos a respeito da atividade cicatrizante e antimicrobiana da quitosana e de seus derivados, no entanto pouco é encontrado sobre suas nanopartículas, sendo que, trabalhos sobre a atividade cicatrizante de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco são desconhecidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia

O conceito original de nanotecnologia envolve a construção de estruturas em escala molecular e a manipulação de materiais em uma escala atômica (cerca de dois décimos de um nanômetro). A nanotecnologia também pode ser definida como o estudo e uso de estruturas com tamanho entre 1 e 100 nanômetros, sendo que, um nanômetro é definido como um bilionésimo de metro, ou seja, 10^{-9} m.

As pesquisas envolvendo os materiais na escala nanométrica e a síntese destes materiais através da manipulação controlada da sua microestrutura são campos interdisciplinares emergentes (GLEITER, 2000). De acordo com Aouada (2009), a nanotecnologia está rapidamente convergindo com a biotecnologia e tecnologia da informação para alterar radicalmente os sistemas da alimentação e agricultura.

Galambeck e Rippel (2004) destacam que a nanotecnologia é um conjunto de conceitos, conhecimentos e de ferramentas experimentais que permite um novo nível de domínio da matéria nas condições ambientes. Com isso, são criadas novas estruturas organizadas a partir da escala molecular, dotadas de propriedades microscópicas e macroscópicas.

Têm-se buscado métodos para produção de nanopartículas que além de garantir a estabilidade da molécula e a manutenção de sua atividade biológica, possam formar estruturas estáveis, solúveis, com tamanho e carga favorável à aplicação desejada (REIS et al., 2006).

2.1.1 Nanopartículas poliméricas

O termo nanopartícula polimérica inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais se diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, enquanto que as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde a diferenciação de núcleo não é observada, trata-se de uma matriz mais homogênea (AOUADA, 2009).

Nanopartículas poliméricas estão sendo cada vez mais investigadas por suas propriedades de liberação sustentada e por alcançar sítios específicos de ação de fármacos. Um material que vem se

destacando e sendo largamente utilizado é a quitosana, um polissacarídeo de alto peso molecular obtido através da desacetilação parcial da quitina, formado por cadeias de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas com grupos amino disponíveis para reações (DAMIAN et al., 2005).

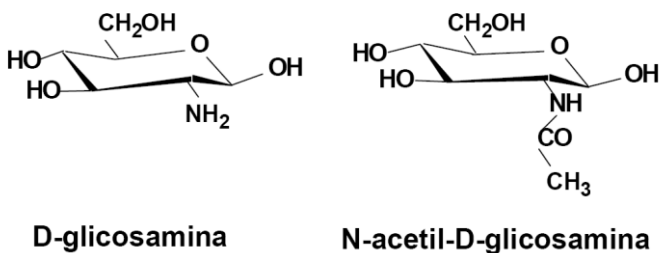
Neste trabalho, foi utilizado o biopolímero quitosana para a obtenção de nanopartículas obtidas através de formação espontânea entre a quitosana e um poliânion.

2.2 Quitina e quitosana

A quitina foi isolada de cogumelos, pela primeira vez em 1811, pelo professor francês Henri Braconnot o qual a nomeou como fungina. Em 1823, Odier isolou uma substância insolúvel contida na carapaça dos insetos e passou a chamá-la de quitina, sendo este nome derivado da palavra grega *Chiton*, que significa carapaça ou caixa protetora (RAVI KUMAR, 2000). O pesquisador afirmou que se tratava da mesma substância encontrada nas plantas, a celulose, no entanto, somente em 1843, Payen detectou que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura e a diferenciou da celulose (ALMEIDA, 2009).

Depois da celulose, a quitina é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza (MOURA, 2008), composto pelos monômeros N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina.



A quitina apresenta estrutura cristalina ou amorfa, insolúvel em água, solvente orgânico e em alguns ácidos e bases diluídas. Em ácidos minerais concentrados ocorre degradação da sua cadeia polimérica. Uma das poucas alternativas para solubilizar a quitina é empregar uma solução de N,N-dimetil acetamida contendo 5% de cloreto de lítio ou utilizar uma solução concentrada à quente de tiocianato de lítio, sendo

que, este polímero precipita com a adição de água, álcool ou acetona (MATHUR e NARANG, 1990).

Apesar da quitina ser amplamente distribuída na natureza, é extraída em larga escala do exoesqueleto de crustáceos como caranguejo e camarão. A quantidade de quitina varia não somente no tipo de animal, mas também nas partes do mesmo. Segundo Peter et al. (2002), as fontes mundiais de quitina em organismos marinhos estão entre 10^6 a 10^7 toneladas por ano. A Tabela 1 contém fontes naturais de quitina.

Tabela 1 - Ocorrência natural da quitina.

Animais Marinhos	Insetos	Microrganismos
Anelídeos	Escorpião	Algas verdes
Moluscos	Aranha	Levedura (tipo B)
Celenterados	Brachiopodos	Fungos (parede celular)
Crustáceos	Formiga	Mycelia Penicillium
Lagosta	Barata	Algas verdes e marrons
Siri	Besouro	Esporos
Camarão		Chytridiaceae
Camarão graúdo		Blastocladiaceae
Krill		Ascomydes

Fonte: MOURA, 2008.

Os resíduos de camarão apresentam de 5 a 7% do seu peso total composto por quitina (SOARES et al., 2003), enquanto que os exoesqueletos de crustáceos, como o siri, podem apresentar entre 15-20% (NACZK et al., 2004).

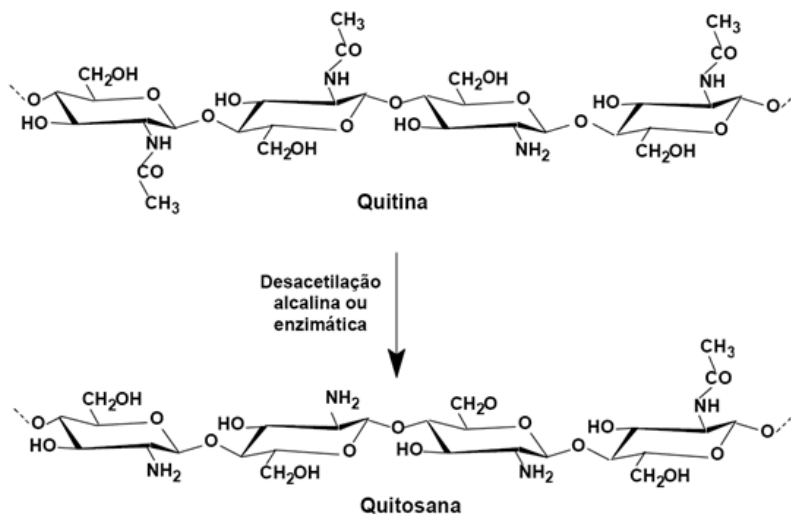
Quitina não é comumente encontrada na natureza como substância pura, uma vez que está associada a outros compostos como proteínas, sais minerais, pigmentos e lipídeos (MACHOVÁ et al., 1999). Na forma pura, este biopolímero foi identificado apenas nas algas diatomáceas *Thalassiosira fluviatis* e *Cyclotella cryptia* (ROBERTS, 1992). Portanto, a quitina é um polissacarídeo obtido após o emprego de processos de purificação rigorosos, os quais removem os componentes indesejados e que também podem provocar modificações na sua estrutura nativa. O principal produto da quitina é a quitosana, que possui maior valor comercial e propriedades de interesse para âmbito industrial e para fins de pesquisa.

A quitosana é um polissacarídeo constituído de unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (Figura 1), unidas por ligações β -1,4, formando uma longa cadeia linear (CAVALCANTI et al., 2005) composta de três grupos funcionais reativos, um grupo amino e dois grupos hidroxilas primário e secundário nas posições dos carbonos C-2, C-3 e C-6 respectivamente.

É encontrada na natureza, particularmente como constituinte da parede celular de alguns fungos especialmente nas espécies do gênero *Mucor* (DAMIAN et al., 2005), mas também pode ser obtida industrialmente através da hidrólise alcalina (SORLIER et al., 2003) ou hidrólise enzimática (OLIVEIRA JUNIOR, 2006) dos grupos N-acetil-D-glicosamina (N-desacetilação) da quitina.

Quitina e quitosana diferem quanto à proporção relativa dessas unidades monoméricas e podem ser distinguidas por suas solubilidades em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (OLIVEIRA JUNIOR, 2006). A quitina, contendo um número $\geq 40\%$ de N-acetil-D-glicosamina ($F_A \geq 0.4$) é insolúvel, visto que os polímeros solúveis são chamados de quitosana (PETER, 2002). Na Figura 2 é apresentada a estrutura química da quitina e quitosana, onde a quitina possui uma fração molar dos grupos N-acetil-D-glicosamina (F_A) de 0,75 e a quitosana possui F_A de 0,25.

Figura 2 - Estrutura química da quitina e quitosana.



Fonte: OLIVEIRA JUNIOR, 2006.

2.3 Processo de obtenção da quitosana

A princípio, a hidrólise dos grupos acetamida da quitina pode ser alcançada em meio ácido ou alcalino, mas a primeira condição não é empregada devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida. De fato, mesmo quando realizada em meio alcalino, a desacetilação da quitina raramente é completa, pois quitosanas são obtidas quando a extensão da reação atinge cerca de 60% (ou mais) e o prolongamento da reação, que gera produtos mais completamente desacetilados, também provoca severa degradação das cadeias poliméricas (MATHUR e NARANG, 1990).

Os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características da quitosana são: temperatura e tempo de reação; concentração da solução de álcali e adição de diluente (alcoóis de cadeia curta e cetonas são empregados); razão quitina/álcali; tamanho das partículas de quitina; atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO et al., 2007).

O processo de obtenção da quitosana é iniciado pelo isolamento da quitina que ocorre em duas etapas: inicialmente, minerais como carbonato e fosfato de cálcio são solubilizados usando ácido clorídrico, após, as proteínas são removidas pelo tratamento com uma solução de hidróxido de sódio diluído e, após lavagem e secagem, é obtido um material em forma de flocos. Finalmente, a quitosana é obtida após o aquecimento da quitina com uma solução concentrada de hidróxido de sódio que hidrolisa os grupos N-cetil. Em alguns casos deve ser realizado o processo de descoloração, com a utilização de solventes orgânicos. O rendimento, a qualidade e as propriedades da quitosana são fortemente dependentes do controle de cada etapa (HIGUCHI, 2002).

De acordo com Ravi Kumar (2000), a quitina desacetilada em 40% de NaOH a 120°C durante 3 h possibilita a obtenção de uma quitosana com grau de desacetilação de 70%.

Segundo Arruda (1999), a obtenção de padrões de quitosana é um problema porque a variabilidade da matéria-prima e dos processos utilizados é muito grande. Os lotes obtidos pelo mesmo processo, nas mesmas condições de desacetilação mostram diferenças no grau de polimerização, na viscosidade e na reatividade química, devido à desacetilação aleatória.

Um aspecto importante na utilização de quitosana diz respeito à sua produção a partir da quitina. Esta deve ser realizada de forma adequada, de maneira que garanta, ao final do processo, a obtenção de

quitosana com alto grau de pureza, sobretudo isenta de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos (KHOR, 2002).

Como o processo de obtenção da quitosana é muito variável, o polímero obtido deve ser caracterizado adequadamente quanto à massa molar, grau de acetilação e distribuição deste grupo ao longo da cadeia polimérica. Estas características podem influenciar na biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando a hidrólise do polissacarídeo (COSTA SILVA et al., 2006).

2.4 Propriedades físicas e químicas da quitosana

As propriedades físico-químicas da quitosana frequentemente mais analisadas são o grau de desacetilação, massa molar, viscosidade e grau de polimerização (MILIOLI, 2011). A área de aplicação deste polímero depende, principalmente, deste conjunto de propriedades.

Comparada a muitos outros polímeros naturais, a quitosana tem a vantagem de possuir carga positiva, o que confere à mesma propriedade de mucoadesividade (AGNIHOTRI et al., 2004). Em soluções aquosas de ácidos diluídos, a quitosana adquire maior número de cargas positivas devido à protonação dos grupos amino de suas cadeias e passa a exibir o comportamento de um polieletrólito catiônico (RINAUDO et al., 1999). Devido a esse comportamento é possível utilizar a quitosana nas mais diversas formas: como membranas, esferas, microesferas e até mesmo géis, já que apresenta caráter higroscópico, sendo capaz de absorver até 400% da sua massa inicial em meio aquoso (CAMPOS, 2007).

A quitosana apresenta características como um grande número de grupos hidroxila e amino reativos em sua estrutura, permitindo o acoplamento de ligantes, alta biodegradabilidade e grande afinidade por metais pesados, que justificam seu uso para fins farmacológicos, biomédicos, alimentícios, na agricultura e no tratamento de água e esgoto (KURITA, 1998). Sua capacidade de complexação com diversos íons metálicos possibilita sua utilização em processos de remoção de zinco, prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo que se encontre em níveis acima dos limites de tolerância e/ou permitidos (RESENDE, 2007).

2.4.1 Grau de desacetilação

A medida do grau de desacetilação (GD) auxilia na definição do polímero como quitina ou quitosana. Quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50%, torna-se solúvel em solução aquosa ácida e é chamada de quitosana (RINAUDO, 2006).

Quitosanas comerciais possuem, geralmente, grau de desacetilação variando de 66 a 95% (AGNIHOTRI et al., 2004). Como muitas das propriedades deste polissacarídeo estão intimamente relacionadas a este parâmetro, torna-se imprescindível a determinação do mesmo para o conhecimento do teor de grupos N-desacetilados e, conseqüentemente, de grupos $-NH_2$ presentes na cadeia polimérica das amostras de quitosana.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para medir o grau de desacetilação da quitosana, tais como: titulação condutométrica e potenciométrica (LAUS et al., 2010), análise elementar (ANTONINO, 2007), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e de carbono (RMN ^{13}C) (GARCIA et al., 2008), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (ROSA, 2009), cromatografia gasosa (DAMIAN et al., 2005), cromatografia de permeação em gel, titulação potenciométrica (OLIVEIRA JUNIOR, 2006), entre outras.

2.4.2 Massa molar

Assim como o grau de desacetilação, a massa molecular da quitosana é bastante variável e depende diretamente da origem e do processamento da quitina. A distribuição de massa molar é influenciada por vários parâmetros, tais como: tempo, temperatura, concentração dos reagentes e condições atmosféricas empregadas na reação de desacetilação da quitina. A massa molecular da quitina natural é freqüentemente maior que 1000 kDa, enquanto que a da quitosana comercial fica em torno de 100 kDa, dependendo das condições de produção (GOMES, 2007).

Na literatura são encontrados diferentes métodos para a caracterizar a massa molar da quitosana como cromatografia de permeação em gel (METHACANON et al., 2003), cromatografia de exclusão por tamanho (NGUYEN et al., 2009) e viscosimetria capilar (CANELLA e GARCIA, 2001). Sendo esta última, uma das técnicas mais utilizadas para determinar a massa molar de polímeros em soluções diluídas, pois não exige uma aparelhagem complexa e de alto custo.

De acordo com Rinaudo (2006), a maior dificuldade encontrada em quantificar a massa molar da quitosana refere-se a solubilidade da amostra e a dissociação de agregados frequentemente presentes em soluções de polissacarídeos. Para evitar este tipo de problema, Rinaudo et al. (1993) propuseram a utilização de uma solução tampão com $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de sódio e $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético ($\text{pH} \sim 4,5$) e relataram que não tiveram nenhuma evidência de agregação com este solvente.

A importância da massa molecular é demonstrada em vários estudos que focalizam a aplicação farmacêutica da quitosana. Pesquisas mostram que, para esta finalidade, torna-se interessante o desenvolvimento de polímeros de baixa massa molecular (SATO et al., 2001).

Zheng e Zhu (2003) demonstraram que a massa molar da quitosana influencia na sua atividade antimicrobiana. Contra bactérias Gram-positivas, a atividade aumenta quanto maior a massa molar, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molar do polímero, maior a atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das Gram-positivas, a hipótese é de que quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos.

Gan et al. (2005) e Ing et al. (2012) avaliaram a influência da massa molar da quitosana no tamanho de suas nanopartículas, obtidas pelo método de gelificação iônica com tripolifosfato, e observaram que o tamanho das partículas formadas com polímeros de baixa, média e alta massa molar cresceu significativamente com o aumento da massa molar.

2.4.3 Solubilidade

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SANTOS et al., 2003). O grau de protonação pode ser determinado pela variação da concentração de quitosana. Para uma dada concentração de ácido, o grau de protonação depende do pK do ácido usado para solubilizar a quitosana (RINAUDO et al., 1999).

A quitosana é solúvel em soluções ácidas como de ácido clorídrico, ácido acético e ácido fórmico, sendo sua solubilidade dependente da força iônica do meio, do pH, do grau de desacetilação da quitosana e da sua massa molar média, portanto, essas características devem ser previamente determinadas para seu uso como biomaterial (BERGER et al., 2004).

Por tratar-se de um polímero catiônico, em condições de pH neutro e alcalino, apresenta grupamentos amino livres sendo, desta forma, insolúvel em água. Em meio ácido, os grupamentos amino podem ser protonados, tornando o polissacarídeo solúvel na faixa de pH entre 2,0 e 6,0 (GOMES, 2007). A alcalinização da solução aquosa de quitosana a valores de pH superiores a 6,2 sistematicamente leva à formação de precipitados gelificados (SORLIER et al., 2003). Usualmente soluções aquosas de ácido acético entre 1 e 3% são utilizadas para solubilizar o polímero.

2.5 Propriedades biológicas da quitosana

A quitosana possui reconhecida atividade cicatrizante e antibacteriana. Este biopolímero tem baixa toxicidade e é seguro ao ser humano, sendo que, sua toxicidade é evidenciada apenas quando é empregado como suplemento alimentar por longos períodos de tempo e está relacionado com o bloqueio da absorção de cálcio e vitaminas lipossolúveis, podendo causar disfunções ósseas, deficiência vitamínica e retardo do crescimento (COSTA SILVA et al., 2006).

2.5.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados foi descoberta por Allan e Hadwiger (1979) que observaram o efeito fungicida dos biopolímeros em diferentes classes de fungos. Neste contexto, a atividade antimicrobiana de quitina, quitosana e seus derivados contra diferentes grupos de microorganismos como bactérias, leveduras e fungos vêm recebendo considerável atenção.

Vários estudos têm demonstrado que a carga superficial da quitosana muda drasticamente em função do pH da solução em que é imersa, gerando uma carga positiva que ataca a parede celular dos microorganismos. Quando os grupos amino da quitosana entram em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos dos microorganismos, resultando na aglutinação

das células microbianas e inibição do crescimento (RAVI KUMAR, 2000).

De acordo com Jung et al. (1999), a atividade antimicrobiana da quitosana pode ser resumida em dois principais mecanismos: a natureza catiônica da quitosana, que favorece ligações com o ácido siálico nos fosfolipídios restringindo o movimento de substâncias microbiológicas; e a penetração através da parede celular que impede a transcrição do DNA em RNA. Ou seja, a atividade antimicrobiana se dá por interação dos grupos amino livres da cadeia polimérica da quitosana.

Como a quitosana exibe atividade antimicrobiana contra a maioria dos fungos filamentosos causadores de doenças alimentares (RHOADES e ROLLER, 2000), é indicada como coadjuvante no processamento em indústrias alimentícias, sendo muito utilizada como revestimento de origem natural para alimentos.

Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de quitina, quitosana e seus derivados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A Tabela 2 contém a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana necessária para inibir o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra bactérias.

Bactéria	Reação de Gram	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	100
<i>Bacillus cereus</i>	+	1000
<i>Corynebacterium michiganence</i>	+	10
<i>Erwinia</i> sp.	-	500
<i>Erwinia carotovora</i> subsp.	-	200
<i>Escherichia coli</i>	-	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	700
<i>Micrococcus luteus</i>	+	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	500

Fonte: RABEA et al., 2003.

Na Tabela 2 pode-se observar o quanto a atividade antibacteriana da quitosana muda de acordo com a bactéria estudada já que este mecanismo está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo (COSTA SILVA et al., 2006).

Micrografias eletrônicas realizadas por Qi et al. (2004) em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na presença de quitosana mostram que a membrana do *S. aureus* foi enfraquecida ou até mesmo fragmentada, enquanto que o citoplasma da *E. coli* foi concentrado e o interstício da célula foi ampliado. De acordo com Wang (1992), altas concentrações de quitosana (1-1,5% p/v) são necessárias para se obter completa inativação de *S. aureus* depois de 2 dias de incubação em pH de 5,5 e 6,5. Em relação a *E. coli*, o autor observou que a bactéria teve seu crescimento completamente inibido depois de 2 dias de incubação na concentração de 1% (p/v) de quitosana em pH 5,5.

Em estudos sobre conservação de carne, Darmadji e Izumimoto (1994) notaram que a concentração de 0,01% (p/v) de quitosana (F_A 0,15) inibiu o crescimento de bactérias como *Pseudomonas fragi*, *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus*. Já Simpson et al. (1997) observaram que somente 0,0075% (p/v) de quitosana (F_A 0,075) foi necessário para inibir completamente o crescimento de diversas bactérias, entre elas *E. coli*, em camarões crus. Os resultados mostram que a quitosana é eficiente no combate a contaminação microbiológica de alimentos, sendo que, quanto menor o grau de acetilação do biopolímero, maior é a sua atividade antibacteriana.

A quitosana tem sido amplamente utilizada no campo biomédico devido ao seu efeito bacteriostático. Campos et al. (2006) investigaram a atividade antibacteriana de soluções com diferentes concentrações de quitosana (0,5, 1 e 1,5% p/v), contra a bactéria *E. coli*, em recobrimento de feridas e constataram que todas as soluções apresentaram o efeito inibitório no crescimento da bactéria, sendo que, quanto maior a concentração do biopolímero, maior a ação antibacteriana.

Os diferentes resultados obtidos nos estudos de atividade antibacteriana da quitosana mostram que este polissacarídeo apresenta o poder de inibir tanto o crescimento das bactérias Gram-negativas quanto das Gram-positivas, com sucesso. E é devido a isto, que cada vez mais a quitosana vem sendo empregada no combate a estes dois tipos de bactérias.

2.5.2 Cicatrização de tecidos

A cicatrização é um processo biológico dinâmico de reparação de injúrias causadas ao organismo que abrange uma vasta gama de processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos. Entre os polímeros naturais mais estudados para a regeneração da pele estão os alginatos, a quitosana, o ácido hialurônico, a celulose, o colágeno, a gelatina e seus derivados. Esses polímeros podem ser usados como agentes gelificantes, excipientes para dar consistência a cremes, matrizes em adesivos, curativos tipo esponja, géis, membranas e adesivos em sistemas de liberação transdérmica (SILVA et al., 2008).

Géis poliméricos têm sido extensamente empregados como curativos porque possuem a capacidade de proteger as feridas de infecções secundárias e proporcionar um ambiente hidratado que auxilia no processo de cura. Outra vantagem do uso de gel é que este material pode ser removido da lesão sem causar trauma (YANG et al., 2010). Segundo Alemdaroglu et al. (2006), géis a base de quitosana atuam como curativos ideais já que este polímero é biocompatível, biodegradável, hemostático, anti-infeccioso e que acelera a cicatrização de feridas.

O processo de cura da lesão cutânea tem sido convenientemente dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: inflamatória, proliferativa e de remodelagem. Cada fase apresenta uma célula ou substância característica sem a qual o processo não evolui normalmente.

2.5.2.1 Fase inflamatória

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a homeostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, organiza matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também, como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (EMENIG et al., 2007)

Os corpos estranhos, que são introduzidos nas feridas durante uma lesão, causam respostas inflamatórias, atrasando a cura e podendo levar até a formação de granulomas ou abscessos (BOATENG et al., 2008). A quitosana auxilia no processo anti-infeccioso, pois possui

propriedade imunomoduladora que ocorre devido à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos.

Macrófagos são células que, após o contato com um agente agressor, liberam citocinas e mediadores pró-inflamatórios, intervindo em defesa do organismo contra infecções. As citocinas fornecem sinais celulares indispensáveis durante o processo de cicatrização, sendo que, em feridas de pacientes diabéticos, há deficiência destas proteínas (WANG et al., 2008).

Além da função de fagocitar microrganismos, fragmentos celulares e corpos estranhos, as células inflamatórias produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais também serão necessários (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

2.5.2.2 Fase proliferativa

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito, se inicia em torno de 48 h após a lesão e tem duração de aproximadamente de três semanas (GARCIA, 2011). Esta fase compreende: reepitelização com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

O tecido de granulação ao se contrair, retrai as bordas da ferida de pele para o centro da ferida permitindo que a área a ser reepitelizada se torne menor. Quando a granulação é excessiva, ocorre um retardamento da cicatrização. A prevenção pode ser obtida pelo favorecimento de uma cicatrização subcrostral, sendo que a formação da crosta em feridas não exsudativa favorece o processo de cicatrização (EURIDES, 1995/1996).

A quitosana possui a capacidade de estimular a formação adequada de tecido de granulação, acompanhada por angiogênese e regular a deposição de fibras finas de colágenos (MUZZARELLI, 2009). Este polímero auxilia no processo proliferativo, pois ativa os macrófagos os quais liberam interleucina-1, que estimulam a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Os

macrófagos liberam também *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana em monômeros de *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina, que são unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (COSTA SILVA et al., 2006). Todas estas propriedades, em conjunto, fazem com que a quitosana auxilie na reparação ideal das lesões epidérmicas.

2.5.2.3 Fase de remodelação

Nessa fase do processo de cicatrização, também chamada de maturação, ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Esta fase é marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanos e colágeno. Depois de três semanas de lesão, há equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno, começando a remodelação da ferida, sendo que, a resolução deste processo em lesões crônicas pode estender-se por anos (GARCIA, 2011).

De acordo com Alemdaroglu et al. (2006), a quitosana também auxilia da fase de remodelação já que aumenta as funções de células inflamatórias tais como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, promovendo assim, a granulação e organização das células durante o processo de epitelização.

Em sua revisão, Ravi Kumar (2000) reporta que, em células tratadas com quitosana, há aumento da atividade da lisozima extracelular, o que estimula a formação de tecido conjuntivo. O autor descreve que lesões tratadas com este biopolímero apresentam menor grau de fibroplasia, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa.

Pelo fato de a lisozima hidrolisar a quitosana em seus monômeros, este polissacarídeo se torna biodegradável e biocompatível com o tecido humano. Essas características, associadas à sua baixa toxicidade, estão sendo exploradas no desenvolvimento de biomateriais comerciais, para tratamento de lesões, como por exemplo, o curativo hidrocolóide Tegisorb[®] da 3M, feito a base de quitosana utilizado na regeneração de feridas crônicas (MUZZARELLI, 2009).

2.6 Aplicações da quitosana e suas nanopartículas

Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e com baixa toxicidade, a quitosana tem sido

proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. A Tabela 3 apresenta algumas aplicações da quitosana em diferentes áreas.

Tabela 3 - Algumas aplicações da quitosana nas áreas industrial, da saúde e nutricional.

Industrial	Saúde/Nutricional
Purificação de água residual de indústrias	Agente absorvedor de gordura
Estabilizante de gordura em preparações de alimentos	Regeneração de fermentos
Estabilizante de aromas	Antiácido
Reserva de troca iônica	Auxiliar no controle de pressão arterial
Aditivos de cosméticos e xampus	Regenerador de estrutura óssea
Adsorventes na remoção de metais e corantes têxteis	Redução do nível de ácido úrico
Proteção bactericida de sementes	Bactericida/Antiviral
Estabilizante de frutas e verduras perecíveis	Inibe a formação de placas dentárias bacterianas
Agente imobilizante de microrganismos	Membranas artificiais

Fonte: MILIOLI, 2011.

Desde 1996, o emprego de membranas de quitosana para purificação de biomoléculas vem sendo estudado visando à recuperação e purificação de proteínas já que este polímero é altamente hidrofílico, possui excelente habilidade de formação de filmes, alta reatividade, alta capacidade de adsorção protéica e também baixo custo (YANG et al., 2002).

Devido a sua versatilidade, a quitosana pode ser utilizada como agente floculante no tratamento de águas e esgotos. Segundo estudos realizados por Zeng et al. (2008), a utilização de floculantes feitos a partir de quitosana reduz mais (7-34%) os custos em tratamentos de água do que o uso de floculantes tradicionalmente utilizados como policloreto de alumínio. O emprego de quitosana é mais atraente economicamente já que é um biopolímero encontrado naturalmente no exoesqueleto de crustáceos, trazendo também benefícios ambientais.

A presença de metais pesados no ambiente é de grande preocupação devido à sua toxicidade e bioacumulação. A quitosana vem sendo amplamente utilizada para a absorção de íons metálicos de efluentes devido a sua capacidade em formar complexos com estes íons (VIEIRA, 2008).

A aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) de seu uso como ingrediente para produtos de beleza (pele e cabelo) tem também aumentado o interesse industrial por este material (BEPPU, 1999). Boriwanwattanak et al. (2008) desenvolveram um hidrogel a base de quitosana para aplicação em cosméticos e observaram que não houve irritação da pele dos voluntários após a sua aplicação, o que indica que este biopolímero não é tóxico e pode ser utilizado em produtos transdérmicos.

Yeh et al. (2009) avaliaram a utilização de membranas de quitosana como substituto de membranas amnióticas no tratamento de distúrbios da superfície ocular, e concluíram que o polímero tem potencial para ser um biomaterial adequado para o tratamento destes distúrbios por apresentar vantagens biológicas tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedade de auxiliar na cicatrização.

É reportada na literatura, a potente ação analgésica tópica tanto da quitina quanto da quitosana. Estudos realizados por Okamoto et al. (2002) mostram que o principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ .

Muitos pesquisadores reportam a utilização de produtos a base de quitosana para a regeneração de tecidos como: peles artificiais (MA et al., 2003), hidrogéis (YANG et al., 2010), fibras (UENO et al., 1999), filmes (ANTONOV et al., 2008), esponjas (WANG et al., 2008) e curativos (ISHIHARA et al., 2002) devido a sua capacidade de auxiliar no combate a infecções.

Na área farmacêutica, a quitosana vem sendo utilizada como um excipiente para modificar a liberação de fármacos em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica. As nanopartículas de quitosana também se destacam nas áreas farmacêuticas e biomédicas como carreadoras de fármacos, formando um sistema de liberação lento e contínuo para a veiculação de proteínas (WANG et al., 2007), vacinas (VILA, 2004), genes (GAN et al., 2005) e insulina (AZEVEDO et al., 2010).

Na área odontológica, nanopartículas de quitosana vêm sendo incorporadas a cimentos endodônticos com a finalidade de aumentar a atividade antimicrobiana destes materiais (BLANCO, 2011).

2.7 Métodos para obtenção de nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana têm vantagem sobre as outras partículas em desenvolvimento por sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos e evitar o uso de solventes perigosos durante a preparação destas nanopartículas, devido à sua solubilidade em solução ácida aquosa (WILSON et al., 2010).

Uma grande variedade de métodos para síntese de nanopartículas de quitosana é encontrada na literatura como polimerização em molde (AOUADA, 2009), gelificação iônica (FAN et al., 2012; NASTI et al., 2009), síntese com carboximetilcelulose (CUI e MUMPER, 2001), formulações que utilizam glutaraldeído (LIU et al., 2005), emulsão (JIN et al., 2011), síntese com alginato (GUPTA e KARAR, 2011), coacervação (MAO et al., 2001) e micelar reverso (KAFSHGARI et al., 2012).

Com os diferentes métodos para obtenção de nanopartículas, os tamanhos das partículas de quitosana-TPP encontrados na literatura são bastante variáveis, entretanto, a maior parte dos trabalhos apresenta tamanhos maiores do que 100 nm. A obtenção de nanopartículas de quitosana com tamanhos menores é um ramo em crescimento e merece atenção no campo da nanotecnologia.

Nos últimos anos, muitos métodos para a síntese de nanopartículas de quitosana têm sido desenvolvidos, entretanto, uma das técnicas mais utilizadas é a gelificação iônica (AGNIHOTRI et al., 2004) a qual foi empregada neste trabalho.

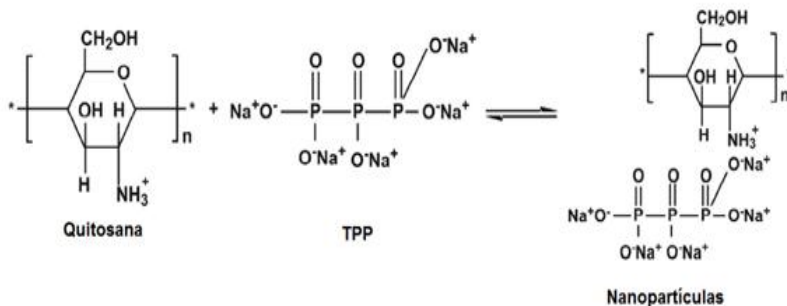
2.7.1 Gelificação iônica

Desde que Bodmeier et al. (1989) publicaram que pequenas partículas podem ser obtidas através do gotejamento de uma solução de quitosana em uma solução de TPP, muitos pesquisadores (AJUN, et al., 2009; AZEVEDO et al., 2010; CHEN e SUBIRADE, 2005; HU et al., 2008; REJINOLD et al., 2011; WANG et al., 2007) têm explorado esse fenômeno como um potencial uso farmacêutico.

Como pode ser observado na Figura 3, a formação das nanopartículas através do método de geleificação iônica está fundamentada na presença de ligações inter e intramoleculares entre a

quitosana e o tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) que é um poliânion multivalente (AJUN et al., 2009), com baixa toxicidade, baixo custo e ao contrário de outros agentes reticulantes, ele não apresenta graves restrições de manuseio e armazenamento.

Figura 3 - Gelificação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio.



Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2011.

Esta técnica envolve a adição, a temperatura ambiente, de uma fase alcalina (pH 7-9) contendo tripolifosfato (TPP) em uma fase ácida (pH 4-6) contendo quitosana. As nanopartículas são formadas espontaneamente após a mistura das duas fases através de ligações inter e intramoleculares formadas entre os fosfatos do TPP e os grupos amino da quitosana (AOUADA, 2009).

O método de gelificação iônica para a obtenção de nanopartículas de quitosana apresenta as seguintes vantagens: as nanopartículas são obtidas espontaneamente sob condições de controle amenas que não envolvem altas temperaturas, utilização de solventes orgânicos ou técnicas de sonicação (CALVO et al., 1997).

A formação de nanopartículas de quitosana-TPP de alto rendimento com tamanho nanométrico e densidade de carga predeterminada, pode ser manipulada e controlada variando-se as condições do processo como concentração de quitosana, razão em massa de quitosana e TPP e valores de pH (AOUADA, 2009). Na literatura existem diferentes trabalhos que tem o objetivo de avaliar o efeito destes parâmetros no tamanho e no potencial zeta das nanopartículas de quitosana (GAN et al., 2005; GRENHA et al., 2005; NASTI et al., 2009).

Pesquisas na formação de nanopartículas de quitosana vêm crescendo muito na área farmacêutica porque estas podem penetrar facilmente tecidos epiteliais através dos finos capilares sanguíneos presentes nestes tecidos. Isto permite que os fármacos sejam eficientemente levados até áreas específicas do corpo (BOWMAN e LEONG, 2006).

Gan et al. (2005) reportaram que o tamanho das nanopartículas é o principal fator determinante no transporte e na absorção dos fármacos carregados pelas partículas através do tecido epitelial, sendo que, partículas menores do que (~ 100 nm) proporcionam absorção arterial 3 vezes maior do que as de maior tamanho (~ 275 nm).

2.8 Zinco

O zinco está envolvido em numerosos aspectos do metabolismo celular. Este mineral é essencial ao organismo e desempenha várias funções, como a participação na estrutura e função de mais de 300 enzimas diferentes (TUBEK et al., 2008). Atua em diversos processos biológicos como na regulação de genes e também na síntese e degradação de glicídios, lipídios e proteínas (KUCCHARZEWSKI et al., 2003).

Visando a cicatrização, o zinco é comumente usado por via tópica, embora não esteja claro quando este elemento foi utilizado pela primeira vez no tratamento de feridas da pele. Após grandes cirurgias, há um declínio acentuado de zinco no sangue e no tecido dos pacientes, podendo chegar a uma redução de até 50% do metal no tecido de granulação e na margem das feridas, sendo que, isto provoca a má cicatrização das lesões (LANSDOWN et al. 2007).

Este elemento é indispensável para a cicatrização de feridas porque estabiliza a membrana celular e é necessário para a proliferação e regeneração normal da pele (HEYLAND et al., 2008). Pacientes com úlceras crônicas têm um metabolismo anormal de zinco e baixos níveis deste oligoelemento no soro sanguíneo (LANSDOWN et al., 2007) por isso, na maior parte dos casos, os médicos realizam o tratamento das úlceras de pele com suplementos de zinco.

Faure et al. (1991) estudaram os efeitos da suplementação diária de 30 mg de zinco na dieta de pacientes submetidos a grandes cirurgias de reconstrução vascular e observaram que, além dos benefícios biológicos esperados, estes pacientes apresentaram cicatrizes significativamente menores do que os pacientes tratados com placebo.

Além de auxiliar na terapia de cicatrização de lesões, a aplicação tópica de zinco no tratamento de lesões da pele auxilia também na redução significativa do consumo de antibiótico pelos pacientes, em comparação com os pacientes tratados com placebo, já que este metal também possui considerável atividade antimicrobiana (AGREN et al., 2006).

Muitos dos estudos realizados nas décadas de 1950 e 1960, pretendendo mostrar o papel intrínseco de zinco e benefícios deste elemento na cicatrização de feridas agudas, foram inconclusivos (LANSDOWN et al., 2007). No entanto, em pesquisa um pouco mais recente, Keefer et al. (1998) demonstraram que a terapia tópica com zinco ($431 \text{ mg Kg}^{-1}_{\text{rato}}$) reduziu os detritos de lesões e contribuiu no avanço da epitelização de queimaduras realizadas em ratos machos. O composto contendo zinco apresentou atividade bacteriostática além de aumentar a degradação do tecido necrótico, mostrando que sua ação tem potencial para melhorar significativamente a cura de feridas em pacientes queimados.

De acordo com Lansdown et al. (2007), em 2004 foi discutido na União Mundial das Sociedades de Tratamento de Feridas, em Paris, a tendência da utilização de zinco no tratamento de feridas, portanto é importante avaliar os potenciais benefícios oferecidos por esse elemento na cicatrização de lesões.

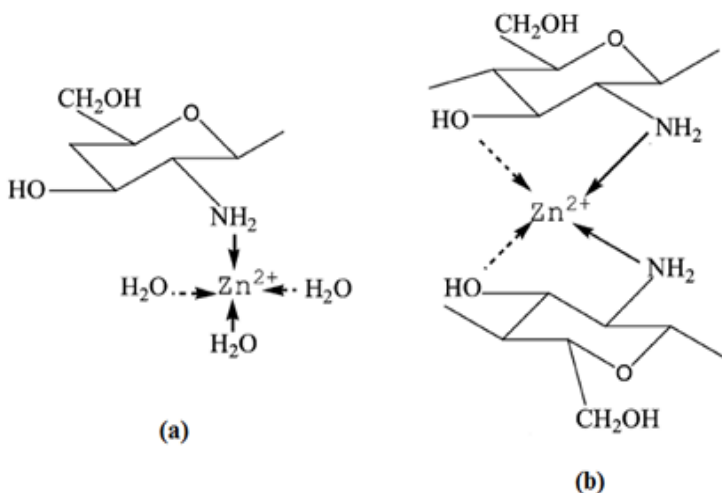
2.9 Ação quelante de zinco em quitosana

A formação de complexos entre a quitosana e metais ocorre devido à presença dos grupos amino presentes neste polímero. Esta complexação pode ser descrita de acordo com a teoria ácido-base de Lewis, onde a quitosana se comporta como uma base, formando ligações covalentes com os íons metálicos, os quais atuam como ácidos, recebendo um par de elétrons do polissacarídeo (LIMA, 2009). Por isso, a adsorção de íons metálicos é mais fortemente evidenciada e altamente favorável para pH mais elevado, pois nestas condições a quitosana não se encontra protonada (MILIOLI, 2011).

Um grama de quitosana apresenta capacidade de adsorção maior do que 1 mmol de cátion metálico para a maioria dos íons metálicos, sendo que, esta capacidade varia de acordo com a cristalinidade, afinidade por água, porcentagem de desacetilação e quantidade de grupos amino presentes no polímero (JANEGITZ et al., 2007). De acordo com Wang et al. (2004) o zinco é um dos íons mais fáceis de ligar à a cadeia polimérica da quitosana.

Alguns modelos têm sido propostos para explicar o mecanismo de coordenação da quitosana com íons metálicos. O primeiro modelo, conhecido como modelo pendente, considera que o íon metálico se encontra ligado aos grupos amino da quitosana, formando apenas um tipo de complexo (Figura 4a). Um segundo modelo, conhecido como modelo em ponte, propõe a formação de um complexo em que o íon metálico se encontra ligado a vários grupos amino e grupos hidroxila da mesma cadeia polimérica ou de cadeias diferentes (Figura 4b) (WANG et al., 2004).

Figura 4 - Estruturas propostas para os complexos formados entre quitosana e Zn^{2+} .



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2004.

A formação do complexo de Zn^{2+} com quitosana depende também do pH do meio. Em baixos valores de pH é sugerida a formação dos complexos propostos no modelo pendente, já com o aumento do pH, correspondendo à neutralização da fração do grupo NH_3^+ , é sugerida a formação de complexos sugeridos no modelo ponte (LIMA, 2009). A capacidade da quitosana se complexar ao zinco tem despertado o interesse de muitos pesquisadores para seu potencial uso em medicamentos ou alimentos (LIMA, 2009; YONEKURA et al., 2003) e como agente antimicrobiano (PATALE e PATRAVALE, 2011; WANG

et al., 2004). No entanto, a incorporação deste metal à nanopartículas de quitosana é pouco mencionada na literatura (DU et al., 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

A quitosana utilizada é da Purifarma (São Paulo, Brasil) e foi cedida pelo Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC. Os demais reagentes utilizados estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula	Fornecedor	Pureza (%)
Ácido acético glacial	CH_3COOH	Synth	99,7
Ácido nítrico	HNO_3	Synth	65
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	99
Nitrato de zinco	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Vetec	98
Tripolifosfato de sódio	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	Sigma-Aldrich	98

3.1.2 Equipamentos

- Ultra-som UltraCleaner 1400, Unique;
- pHmetro PHS-3B da PHTEK;
- Agitador magnético de 6 pontos da DIST;
- Centrífuga 12000 rpm SIGMA 4K15 da Laboratory Centrifuges.

3.2 Métodos de caracterização da quitosana *in natura* e nanopartículas

3.2.1 Grau de desacetilação (GD)

Como existem técnicas distintas para quantificar o GD da quitosana, a escolha deve ser realizada optando-se pelo método mais confiável a que se tem acesso já que frequentemente as diferentes técnicas fornecem resultados distintos. A titulação potenciométrica foi escolhida neste trabalho em função da simplicidade e precisão deste método de caracterização.

Para a titulação potenciométrica foi utilizado um titulador automático Metrohm, modelo Titrino Plus 848 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl) que consiste em um sistema de célula de titulação de vidro termostatizada a 25 °C, selada e sob atmosfera inerte de argônio para eliminar a presença de CO₂ atmosférico. Nesta cela foram adicionados 40 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ para se obter uma boa dispersão do adsorvente, bem como a protonação dos grupos amino da quitosana *in natura* analisada. A força iônica da solução foi mantida com KCl 0,1 mol L⁻¹ e o agente titulante utilizado foi uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹.

A curva dos valores de pH em função do volume de titulante deve apresentar dois pontos de inflexão que correspondem a neutralização do excesso de ácido forte e dos grupos amino do polímero. A diferença entre estes dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino da quitosana. O GD das amostras foi calculado utilizando a Equação 1.

$$\%GD = \frac{M(V_2 - V_1)161}{w} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: M é a concentração da solução de KOH em mol L⁻¹, V₁ e V₂ são os volumes de KOH (mL) utilizados para neutralizar o excesso de HCl e a quitosana protonada, respectivamente, 161 é a massa molar da unidade monomérica da quitosana e W é a massa de amostra em mg utilizada na titulação.

As análises foram realizadas no Laboratório de Equilíbrio Químico do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC.

3.2.2 Massa molar

A massa molar da quitosana foi determinada através da viscosidade intrínseca $[\eta]$ e o método adotado foi o proposto por Signini e Campana Filho (1998).

Foram preparadas cinco soluções diluídas de quitosana *in natura*, que variaram entre 0,1 e 0,5 mg mL⁻¹. O solvente utilizado foi uma solução tampão com 0,2 mol L⁻¹ de acetato de sódio e 0,3 mol L⁻¹ de ácido acético (pH ~ 4,5). As soluções foram mantidas sob agitação constante durante 15 h e após este período, cada solução foi aquecida em banho-maria por 2 min.

Após atingir a temperatura ambiente, as soluções foram filtradas em membrana com porosidade 0,45µm. Alíquotas de 10 mL foram colocadas em viscosímetro capilar de Ostwald da Schott-Geräte o qual foi introduzido em banho termostatizado em 25 ± 0,1 °C.

Os tempos de escoamento foram determinados através de um viscosímetro AVS-350 da mesma marca do capilar e correspondem à média de quatro determinações independentes que apresentaram variação menor do que 0,1%. Estes valores foram utilizados para obter a viscosidade específica de cada solução diluída de quitosana como mostrado na Equação 2.

$$\eta_{\text{esp}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \frac{k \rho t}{k \rho_0 t_0} - 1 = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{Equação 2}$$

onde η é a viscosidade da solução diluída, η_0 é a viscosidade do solvente puro, k é uma constante do viscosímetro, ρ a densidade do líquido, t o tempo de escoamento da solução diluída e t_0 é o tempo de escoamento do solvente puro.

Plotando-se uma curva das concentrações das soluções diluídas (C) pela η_{esp}/C e extrapolando-se os dados de η_{esp}/C para concentração zero se tem a viscosidade intrínseca $[\eta]$. Finalmente, através da equação de Staudinger-Mark-Houwink (Equação 3) calcula-se a massa molar do polímero (M) onde $K = 0,074$ e $a = 0,76$ (SIGNINI e CAMPANA FILHO, 1998). Os valores de K e a são específicos para a mistura de 0,3 mol L⁻¹ de ácido acético e 0,2 mol L⁻¹ de acetato de sódio, a 25 °C.

$$[\eta] = K M^a \quad \text{Equação 3}$$

As análises para a determinação da massa molar da quitosana foram realizadas no Laboratório de Materiais Poliméricos do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC.

3.3 Análise de diferentes razões de QTS:TPP na formação de nanopartículas

Para a formação de nanopartículas de quitosana foi utilizada a técnica de gelificação iônica descrita por Calvo et al. (1997). Primeiramente foi preparada uma solução com $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de quitosana em ácido acético $0,17 \text{ M}$, a qual foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente, durante 1 h seguida de 30 min de sonicação. Após este período, a solução foi filtrada e o pH inicial de $3,6$ foi aumentado para $4,5$ com $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$.

Em seguida, foi preparada uma solução com 1 mg mL^{-1} de tripolifosfato de sódio em água deionizada sob agitação magnética, por 30 min em temperatura ambiente.

Neste estudo preliminar, foram preparadas diluições com a solução mãe de quitosana ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) a fim de se alcançar as proporções de QTS:TPP variando de $2:1$ até $6:1$, a fim de se avaliar a influência destas proporções sobre na formação das nanopartículas. O volume de 10 mL da solução de TPP foi adicionado, com auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL , a 25 mL de solução de quitosana nas diferentes diluições. Após a adição de TPP, as soluções foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 h .

As amostras foram caracterizadas, em triplicata, quanto ao tamanho médio de partículas (medida raio hidrodinâmico), potencial zeta e índice de polidispersão. O tamanho das nanopartículas também foi caracterizado através de microscopia eletrônica de transmissão.

3.4 Avaliação da influência de diferentes parâmetros na formação das nanopartículas

Após a verificação da influência de diferentes razões de QTS:TPP na formação de nanopartículas, avaliou-se novamente a proporção entre o polímero e o tripolifosfato juntamente com o pH e a concentração de ácido acético, na formação de nanopartículas. Os três fatores foram avaliados em dois níveis resultando em um planejamento fatorial 2^3 , totalizando oito experimentos.

O método utilizado para a formação das nanopartículas foi o mesmo descrito no item 3.3, no entanto, foram preparadas duas soluções

de quitosana: a primeira contendo 2 mg mL^{-1} de polímero em ácido acético $0,17 \text{ M}$ e a segunda com a mesma concentração do polissacarídeo em ácido acético $0,1 \text{ M}$. Após a filtragem, ambas as soluções foram divididas em dois volumes iguais mas com pH diferentes, de 4,4 e 4,6.

Em seguida, foi preparada uma solução com 1 mg mL^{-1} de tripolifosfato de sódio. Nos ensaios com a razão de QTS:TPP de 3:1, 10 mL da solução de TPP foi adicionada a 15 mL de solução de quitosana e nos experimentos com a proporção de 3:0,8, adicionou-se 8 mL da solução de TPP na solução de quitosana (15 mL).

As oito diferentes formulações foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 h. Após este período, as nanopartículas foram quantificadas, em triplicata, quanto ao tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão. O tamanho das nanopartículas também foi observado em microscópio eletrônico de transmissão.

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados a matriz do planejamento fatorial 2^3 (duplicata) e os níveis das variáveis, respectivamente, para a avaliação da influência destes fatores no potencial zeta e no tamanho das nanopartículas de quitosana.

Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 de avaliação do tamanho e potencial zeta das nanopartículas de quitosana.

Ensaio	pH	QTS:TPP	[Ácido acético]
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Tabela 6 - Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial.

Parâmetro	Nível -1	Nível + 1
pH	4,4	4,6
QTS:TPP	3:0,8	3:1
[Acido acético]	0,1 M	0,17 M

3.5 Estudo sobre adsorção de zinco em nanopartículas de quitosana

Após avaliar a influência de diferentes parâmetros na formação das nanopartículas, se escolheu as melhores condições para a produção destas partículas em maior quantidade para a realização dos estudos de incorporação de zinco. O gel obtido continha $0,5 \pm 0,05\%$ (p/v) de nanopartículas de quitosana. Esta quantificação foi realizada por gravimetria através da secagem do gel em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Inicialmente foi preparada uma solução com 91 mg L^{-1} de nitrato de zinco que corresponde à concentração de 20 mg L^{-1} de Zn^{+2} . No primeiro planejamento experimental, para cada um dos 4 ensaios, foram pesados 10 g de gel (Becker de 250 mL) que continham cerca de 0,05 g de nanopartículas. Nos frascos relativos aos ensaios 1 e 3 foi adicionado 150 mL da solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ que corresponde à concentração de zinco de $60\text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$. Já nos ensaios 2 e 4 se acrescentou 200 mL da solução de nitrato que equivale à concentração de Zn^{+2} de $80\text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$.

O pH das soluções foi ajustado para $7,0 \pm 0,03$ com o auxílio de soluções com NaOH e HNO_3 , ambas na concentração de 0,1 M. Os frascos foram envolvidos e cobertos com papel alumínio, para evitar possível oxidação do metal, e mantidos sob agitação magnética durante 8 h. Os dois primeiros ensaios foram realizados em temperatura ambiente enquanto que o dois últimos foram mantidos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após o período de agitação, as soluções com nanopartículas incorporadas com zinco foram centrifugadas a 12000 rpm durante 30 min. O gel foi armazenado em refrigerador a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o líquido sobrenadante foi filtrado a vácuo com membrana de acetato de celulose com poros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e diâmetro de 47 mm. O líquido coletado foi utilizado para a quantificação do zinco adsorvido através de espectroscopia de absorção atômica com chama.

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentadas a matriz do primeiro planejamento fatorial 2^2 (duplicata) e os níveis das variáveis, respectivamente, para o estudo exploratório sobre adsorção de zinco em nanopartículas de quitosana.

Tabela 7 - Matriz do primeiro planejamento fatorial 2^2 de avaliação da adsorção de Zn^{+2} em nanopartículas de quitosana.

Ensaio	[Zn⁺²]	T
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

Tabela 8 - Níveis das variáveis utilizadas no primeiro planejamento fatorial 2^2 .

Componente	Nível -1	Nível +1
[Zn ⁺²] (mg g _{nano} ⁻¹)	60	80
T (°C)	amb.	50

Com os resultados do primeiro planejamento fatorial, realizou-se uma nova sequência de experimentos a fim de aumentar a adsorção de zinco nas nanopartículas de quitosana. A metodologia utilizada foi a mesma do planejamento anterior, no entanto avaliou-se diferentes tempos de agitação (8 e 12 h) e novas concentrações de metal (20 e 40 mg g_{nano}⁻¹). Nas Tabelas 9 e 10 são exibidos a matriz do segundo planejamento fatorial 2^2 (duplicata) e os níveis das variáveis, respectivamente.

Tabela 9 - Matriz do segundo planejamento fatorial 2^2 de avaliação da adsorção de Zn^{+2} em nanopartículas de quitosana.

Ensaio	[Zn⁺²]	t
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

Tabela 10 - Níveis das variáveis utilizadas no segundo planejamento fatorial 2^2 .

Componente	Nível -1	Nível +1
[Zn ⁺²] (mg g _{nano} ⁻¹)	20	40
t (h)	8	12

3.6 métodos de caracterização das nanopartículas

3.6.1 Tamanho médio das nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas foi medido através do diâmetro hidrodinâmico médio, que é determinado por espalhamento de luz dinâmico. O espalhamento de luz foi detectado em um ângulo de 90° e a 25°C , já para análise dos dados o dispersante, água teve viscosidade de 0,8872 cP e índice de refração 1,330. Estes dados foram coletados, em triplicata, através do equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvern Instruments, localizado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química da UFSC, Florianópolis, SC.

3.6.2 Potencial zeta

A medida do potencial zeta fornece informações sobre a carga superficial das nanopartículas sendo outra característica importante que se deve determinar para avaliar se há carga disponível para ligações com outros materiais. Estas cargas mudam com a variação dos parâmetros experimentais e através deste potencial pode-se medir a magnitude das interações repulsivas entre partículas e avaliar a estabilidade destas em solução, sendo que a carga de superfície das nanopartículas de quitosana é determinada pelo grau de neutralização dos grupos $-\text{NH}_3^+$ pelos grupos polianiônicos do tripolifosfato de sódio (HU et al., 2008). O potencial zeta para cada amostra foi medido em triplicata no Zetasizer NanoZS.

3.6.3 Índice de polidispersão (PDI)

O índice de polidispersão mede a homogeneidade da distribuição do tamanho das nanopartículas na amostra variando de 0 a 1. Estes dados foram adquiridos, em triplicata, no equipamento Zetasizer NanoZS.

3.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para analisar o tamanho das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), as soluções foram submetidas à sonicação por dois minutos para melhorar a dispersão das partículas e evitar aglomeração. Em seguida, cada amostra foi gotejada sob uma

pequena grade de cobre coberta com carbono e seca durante 24 h a temperatura ambiente.

As imagens foram obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão, da marca Jeol, modelo JEM-1011 TEM e com tensão de aceleração de 100 kV, pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, Florianópolis, SC.

3.6.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)

Através da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X é possível qualificar e também quantificar elementos com número atômico (Z) maior que 11 e com fração mássica superior a 0,1% (GOLDSTEIN et al., 2003) presentes na estrutura analisada.

A análise elementar obtida por EDX foi utilizada para a caracterização qualitativa da quitosana *in natura*, das nanopartículas de quitosana e também das nanopartículas incorporadas com Zn. A quitosana *in natura* em pó foi colada no *stub* (porta-amostra) enquanto que as nanopartículas de quitosana e nanopartículas incorporadas com zinco foram gotejadas e secas nos próprios *stubs*.

Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e analisadas em microscópio de varredura com canhão de emissão por efeito de campo elétrico (FEG-SEM), da marca Jeol e modelo JSM-6701F acoplado com detectores de energia dispersiva de raios-X (EDX). As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, Florianópolis, SC. Os resultados representam a média da análise química de três superfícies distintas para cada tipo de amostra.

3.6.6 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas para a quitosana *in natura*, nanopartículas de quitosana e também para as nanopartículas incorporadas com zinco. Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 2% (p/p) de amostra, sendo que, a quitosana *in natura* foi previamente seca em estufa e as nanopartículas foram liofilizadas, com ciclo de 12 h de congelamento a $-59\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de 24 h de liofilização com vácuo de 50 μHg , em liofilizador L101 da marca LIOTOP, pertencente ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) da UFSC, Florianópolis, SC.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em ampla região, de 400 a 4000 cm^{-1} , em espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo

IR Prestige-21 com transformada de Fourier. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC, Florianópolis, SC.

3.6.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas através de um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 com um programa de temperatura de 25-500 °C, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e vazão de 50 mL min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas na Central de Análises da UFSC, Florianópolis, SC.

3.6.8 Espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS)

FAAS é uma técnica abrangente porque permite determinar, qualitativa e quantitativamente, mais de 70 elementos metálicos e não metálicos. Essa análise pode detectar quantidades de partes por milhão a partes por bilhão e, em alguns casos, concentrações ainda menores (MILIOLI, 2011).

As concentrações residuais de Zn⁺² foram determinadas com o auxílio de espectrômetro de absorção atômica em chama da marca Hitachi (Japão), modelo Z-8230, com correção de fundo por efeito Zeeman polarizado. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco, específica para a quantificação deste metal, também da Hitachi.

As medidas foram efetuadas na Central de Análises da UFSC, Florianópolis, SC e os laudos emitidos encontram-se em Anexos, nas Figuras A41 e A42.

3.7 Ensaios microbiológicos

Os testes microbiológicos foram realizados para determinar se as nanopartículas de quitosana bem como as nanopartículas adsorvidas com zinco são capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As análises foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento de Biomateriais e Materiais Antimicrobianos do IPARQUE/UNESC, em Criciúma-SC.

3.7.1 Método de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi utilizado para avaliar a atividade bacteriostática das nanopartículas de quitosana e das nanopartículas

incorporadas com zinco contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e foram comparadas com a quitosana *in natura* (controle positivo) e ácido acético a 0,17 M (controle negativo).

O meio de cultura utilizado nas placas de petri foi o ágar PCA, sendo que após a inoculação as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h.

Porções de 2 mg das amostras em pó e 100 µL da solução com ácido acético foram depositadas assepticamente sobre a superfície dos meios inoculados, em forma de discos, os quais foram incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido com auxílio do software ImageJ a partir das imagens das placas. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados apresentados correspondem aos valores médios.

3.7.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

As análises de CIM e CBM foram realizadas com a quitosana *in natura* (QTS), nanopartículas de quitosana (Nano) e nanopartículas incorporadas com zinco (Nano+Zn) frente às bactérias de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Ambos os microrganismos foram ativados a partir de cepas congeladas, das quais foram retiradas alíquotas de 50 µL e colocadas em tubos contendo 5 mL de meio LB. Com o objetivo de verificar a pureza de cada cultura, após 24 h de incubação a 37 °C, uma alíquota de cada bactéria foi aplicada, com alça de platina, em placa contendo ágar PCA e incubada novamente por 24 h. A seguir, uma colônia isolada de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio LB e encaminhada à estufa de incubação durante 24 h. Após este período, com cada uma das cepas, fez-se diluição seriada até 10^5 UFC mL⁻¹ com uso de salina 0,9 %.

Diferentes quantidades de cada uma das três amostras foram pesadas em eppendorfs e adicionadas a 2 mL de meio LB a fim de se obter soluções com concentrações de 78; 45; 26; 15; 8,66 e 5 mg mL⁻¹. A seguir, tomou-se uma alíquota de 40 µL dos microrganismos da diluição seriada de 10^{-3} , fez-se a inoculação e incubou-se a 37 °C por 24h.

Na sequência, separou-se em tubos com 9,8 mL de salina, alíquotas de 200 µL de cada eppendorf, com o objetivo de realizar o

teste de CBM. O restante do conteúdo foi encaminhado ao espectrofotômetro de UV-visível para a determinação da concentração inibitória mínima. A leitura foi realizada utilizando-se comprimento de onda de 600 nm.

A concentração bactericida mínima foi realizada, tomando-se alíquotas de 40 µL dos tubos de salina e aplicando em placas de petri com meio de cultura PCA, utilizando-se alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24h, e após este período, realizou-se a determinação do número de colônias por placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*

Para execução desta pesquisa o projeto foi submetido ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado pelo mesmo sob o número PP00744.

Os ensaios para avaliação da atividade cicatrizante foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade. Os experimentos foram realizados com camundongos de linhagem isogênica Balb/c (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do LABIOEX/UFSC.

Os animais foram mantidos conforme recomendações de *Guidelines* reconhecidos internacionalmente e destinados para a criação e o manejo de animais para a pesquisa. Assim, os camundongos foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro - escuro de 12 h, à temperatura de 25 ± 2 °C e 60% de umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum* (BUITRAGO et al., 2008).

3.8.1 Procedimentos do modelo de excisão de pele

Os procedimentos realizados para a remoção ou excisão da pele foram baseados em modelo experimental padronizado previamente no biotério setorial do LABIOEX/ BQA (OLIVEIRA et al., 2000/2001; PEREIRA, 2010).

3.8.1.1 Procedimentos anestésico e analgésico

Todos os animais foram submetidos a procedimento anestésico prévio, com administração de cetamina 10% (100 mg kg⁻¹), xilazina 1%

(10 mg kg⁻¹) e maleato de acepromazina 1% (3 mg kg⁻¹) via intraperitoneal.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram transferidos para gaiolas individuais. Durante todo o período pós-operatório foram administradas diariamente duas doses de 20 mg kg⁻¹ de analgésico (dipirona sódica), via oral por gavagem, para minimizar a dor causada pelo procedimento cirúrgico. O analgésico utilizado, bem como a dose e a via de administração foram selecionados tendo como base sugestões estabelecidas por Mezadri et al. (2004) e Buitrago et al. (2008). Ao final de 12 dias de tratamento, os camundongos foram sacrificados através de aplicação dos anestésicos já mencionados, no triplo da dose terapêutica (superdosagem), para coleta do tecido cicatricial para análise dos parâmetros bioquímicos.

3.8.1.2 Procedimento Cirúrgico e pós-operatório

Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear e assepsia da pele com álcool 70% e delimitação da área de 1 cm², procedendo à excisão desta área de tecido epitelial dorsal com tesoura cirúrgica (OLIVEIRA et al., 2000/2001). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Diariamente as gaiolas foram higienizadas para redução de contaminação nas lesões e na tentativa de manter um ambiente limpo e adequado durante o período experimental.

3.8.2 Grupos experimentais

Os animais tratados receberam aplicações tópicas imediatamente após o procedimento cirúrgico de excisão de pele (PEREIRA, 2010), que foi considerado como o dia 0. A cada três dias os camundongos receberam nova aplicação da substância avaliada no grupo. Foram avaliados cinco diferentes grupos de tratamento com seis animais cada (n=6).

3.8.2.1 Grupo controle negativo não tratado (CN)

Este grupo não recebeu nenhuma aplicação tópica.

3.8.2.2 Grupo controle positivo tratado com solução de ácido acético (CPAA)

Estes animais foram tratados com solução de ácido acético 0,17 M, com pH 5,5 o qual foi ajustado com NaOH 0,1 M. A cada três dias, o volume de 100 μL foi aplicado nos camundongos com o auxílio de uma micropipeta. Este volume foi suficiente para cobrir a lesão inicial de 1 cm^2 correspondendo a uma dose de solução ácida de 5 mL Kg^{-1} .

3.8.2.3 Grupo controle positivo tratado com solução de zinco (CPZn)

Os camundongos deste grupo foram tratados com solução contendo 0,91 g L^{-1} de nitrato de zinco em água destilada, que corresponde à concentração de 0,2 g L^{-1} de Zn^{+2} . O pH da solução foi calibrado à 5,5 e os animais receberam aplicação tópica de 100 $\mu\text{L cm}^{-2}$, sendo que, esta alíquota corresponde a uma quantidade de zinco de 1 mg Kg^{-1} .

3.8.2.4 Grupo gel de nanopartículas de quitosana (Nano)

Para a realização deste grupo experimental, as nanopartículas produzidas por gelificação iônica foram centrifugadas a 12000 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi descartado e o gel foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. Os camundongos foram tratados com gel contendo $0,5 \pm 0,05\%$ (p/v) de nanopartículas de quitosana com pH 5,5. A quantidade de 100 $\mu\text{L cm}^{-2}$ de gel foi aplicado nos camundongos, com uma seringa de 1 mL. Este volume de gel foi capaz de cobrir a lesão, correspondendo a uma dose de gel de 5 mL Kg^{-1} ou a uma dose de nanopartículas de quitosana de 25 mg Kg^{-1} .

3.8.2.5 Grupo gel de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco (Nano+Zn)

Este grupo foi tratado com gel contendo $0,5 \pm 0,03\%$ (p/v) de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco, com concentração de metal de 33,8 $\text{mg g}_{\text{nano}}^{-1}$. Após a incorporação de Zn^{+2} , o pH da solução contendo as nanopartículas foi ajustado para 5,5 e centrifugado a 12000 rpm durante 30 min. O gel resultante da centrifugação foi aplicado nos camundongos (100 μL), representando uma dosagem de zinco de 0,8 mg Kg^{-1} .

3.8.3 Morfometria da lesão

Esse parâmetro inclui a porcentagem de redução da lesão medida através da comparação entre a área lesionada no dia do procedimento cirúrgico e a área cicatrizada. Para determinar a redução da lesão, as feridas foram fotografadas com distância padronizada imediatamente após a cirurgia em intervalos de três dias, até o 12º dia de tratamento (PEREIRA, 2010). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software ImageJ, a partir das fotografias obtidas.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos em triplicata, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) através do teste de Tukey HSD do Programa Statistica (versão 8.0) com o qual avaliou-se se houve diferença significativa entre as médias das amostras num nível de significância de 5%.

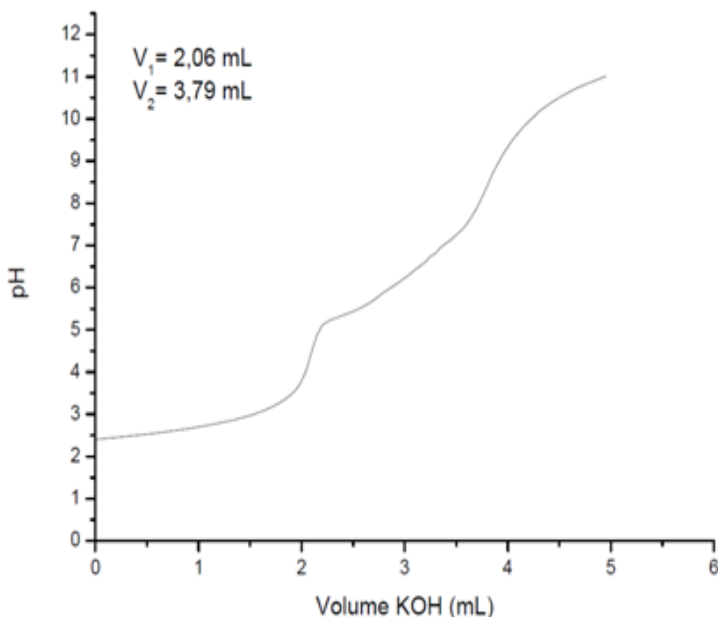
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da quitosana *in natura*

4.1.1 Grau de desacetilação

A medida do grau de desacetilação da quitosana é necessária, pois este parâmetro mede o percentual de grupos amino disponíveis nas cadeias da quitosana que influenciam as propriedades físico-químicas do polímero como solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólito (SHIGEMASA et al., 1996), reatividade, estabilidade e, por consequência, a sua aplicabilidade. Na Figura 5 é apresentada a curva obtida através da titulação potenciométrica para a determinação do grau de desacetilação da quitosana.

Figura 5 - Curva de titulação potenciométrica da quitosana.



A fração de $-NH_2$ da quitosana foi obtida por dissolução do polímero em solução com excesso de HCl. Como pode-se observar na Figura 5, a curva de titulação possui dois pontos de equivalência, sendo que V_1 corresponde ao volume de KOH necessário para neutralizar o excesso de HCl na solução enquanto que V_2 é o volume de base gasto

para a neutralização dos grupos amino do polímero. A diferença entre estes dois volumes corresponde à quantidade de KOH requerida para neutralizar apenas os grupos -NH_2 protonados da quitosana.

Na figura acima é possível observar que os valores de V_1 e V_2 obtidos experimentalmente foram 2,06 e 3,79 mL, respectivamente. Empregando estes valores na Equação 1, com $M = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $W = 34 \text{ mg}$, a quitosana apresentou 81,9% de grau de desacetilação, o que implica dizer que a amostra analisada tem 18,1% de grupos acetilados no substituinte do carbono 2 ou que 81,9% dos grupos ligados são amino livres e disponíveis para se ligar aos mais diversos tipos de compostos como, por exemplo, metais e fármacos. Este resultado também mostra que o polímero utilizado nos experimento é a quitosana, já que seu GD é $\geq 50\%$ (RINAUDO, 2006).

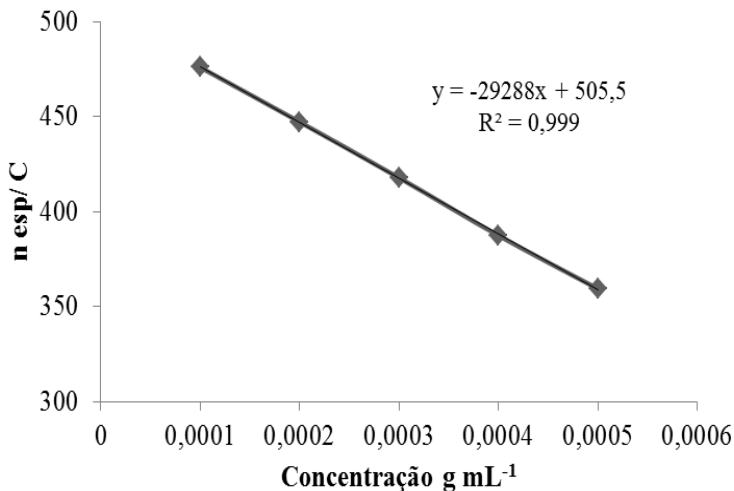
Parize (2009) utilizou a quitosana da Purifarma, do mesmo lote da utilizada neste trabalho, para o desenvolvimento de micropartículas e filmes obtendo, através de titulação condutimétrica, grau de desacetilação de 82,7%, resultado similar ao encontrado neste trabalho por titulação potenciométrica.

4.1.2 Massa molar

A determinação da massa molar da quitosana é muito importante devido sua influência em algumas propriedades como a gelificação com íons fosfato, na solubilidade (BERGER et al., 2004) e também na sua atividade antimicrobiana (ZHENG e ZHU, 2003).

No estudo de soluções diluídas de polímeros é comum determinar-se a viscosidade da solução em relação ao solvente puro. A relação entre a viscosidade da solução e do solvente puro é denominada viscosidade específica (η_{esp}). Para determinar a η_{esp} utilizou-se os valores dos tempos de escoamento medidos no viscosímetro e estes resultados foram utilizados no gráfico para a determinação da viscosidade intrínseca, como mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Curva da concentração das soluções de quitosana em relação à viscosidade específica.



Através da equação da reta da Figura 6 tem-se para a extrapolação da concentração de quitosana igual a zero, que a viscosidade intrínseca é de 505,5. Adicionando este valor na Equação 3, a massa molar da quitosana encontrada é de 111,01 kDa.

Rosa (2009) e Parize (2009) utilizaram em seus experimentos quitosana da Purifarma, do mesmo lote da utilizada neste trabalho, e relataram que este polímero possui 122,7 e 122,3 kDa, respectivamente. O valor obtido através da viscosimetria intrínseca está próximo ao encontrado pelos dois autores, e dentro da faixa de massa molar média para quitosanas comerciais, que fica em torno de 100 kDa (GOMES, 2007).

4.2 Análise de diferentes razões de QTS:TPP na formação de nanopartículas

Como a utilização da quitosana da marca Purifarma para formação de nanopartículas é desconhecida, como estudo preliminar, se avaliou diferentes formulações compostas por quitosana e TPP em razões que variaram de 2:1 até 6:1.

As nanopartículas de quitosana foram facilmente preparadas mediante a mistura de solução TPP com a solução de quitosana porque esta técnica baseia-se no princípio simples de que a quitosana carregada

positivamente liga-se, por meio da gelificação iônica, com o tripolifosfato de sódio negativamente carregado. Devido a esta simplicidade, cada vez mais pesquisadores utilizam este método para associar à quitosana os mais diversos compostos.

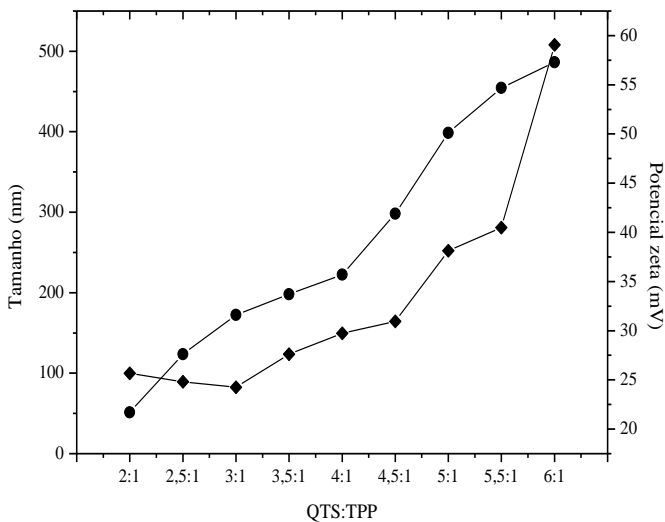
Na Tabela 11 são apresentados o tamanho médio das nanopartículas, PDI e potencial zeta para as diferentes razões de QTS:TPP e a Figura 7 contém o gráfico com a distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta nas diferentes proporções de quitosana e TPP.

Tabela 11- Tamanho das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta para as diferentes razões de QTS:TPP.

QTS:TPP	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
2:1	99,9 ± 0,5 ^a	0,39 ± 0,004	21,7 ± 0,4 ^a
2,5:1	89,2 ± 0,4 ^b	0,28 ± 0,002	27,6 ± 0,7 ^b
3:1	82,5 ± 0,3 ^b	0,28 ± 0,004	31,6 ± 0,7 ^c
3,5:1	123,6 ± 0,4 ^c	0,38 ± 0,001	33,7 ± 0,8 ^{cd}
4:1	149,4 ± 0,7 ^d	0,41 ± 0,003	35,7 ± 0,8 ^d
4,5:1	164,3 ± 0,3 ^e	0,42 ± 0,001	41,9 ± 0,4 ^e
5:1	252,0 ± 0,6 ^f	0,52 ± 0,004	50,1 ± 0,4 ^f
5,5:1	280,8 ± 1,4 ^g	0,51 ± 0,003	54,7 ± 0,5 ^g
6:1	508,1 ± 1,8 ^h	0,59 ± 0,004	57,3 ± 0,3 ^g

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, (p≥0,05).

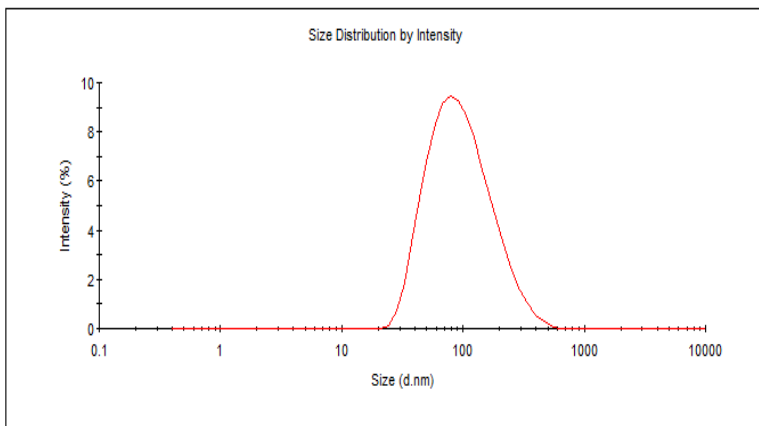
Figura 7 - Distribuição do (♦) tamanho (nm) e (●) potencial zeta das nanopartículas nas diferentes razões de QTS:TPP.



Através da Figura 7 pode-se observar que o potencial zeta das nanopartículas aumentou com o crescimento da concentração de quitosana. Este evento é esperado já que a formação das nanopartículas de quitosana ocorre através da interação entre os grupos -NH_3^+ protonados da quitosana e os fosfatos do TPP, portanto, quanto maior a concentração de quitosana, mais grupos -NH_3^+ estão disponível no meio e maior é o potencial zeta da amostra.

Em relação ao tamanho das nanopartículas obtidas com as diferentes concentrações de quitosana, nota-se que de todas as proporções de QTS:TPP testadas, a de 3:1 foi a que proporcionou, com um nível de significância de 5%, o menor tamanho médio de partículas, de 82,5 nm. Através do gráfico da distribuição do tamanho das nanopartículas pela intensidade (Figura 8), pode-se observar que a amostra apresentou um único pico em 78,7 nm, mostrando que as estruturas tinham, em sua maioria, tamanho homogêneo.

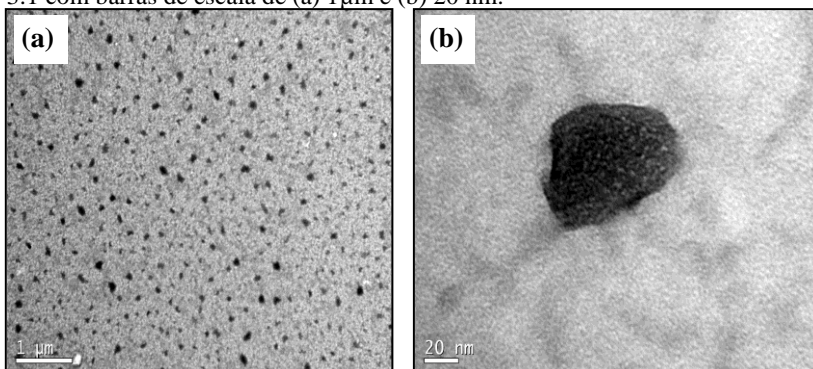
Figura 8 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 3:1.



A uniformidade no diâmetro da maior parte das nanopartículas também se confirma pelo baixo índice de polidispersão (0,28), pois de acordo com Zhang e Kosaraju (2007), dispersões com PDI abaixo de 0,3 indicam alta homogeneidade no tamanho das partículas presentes no meio.

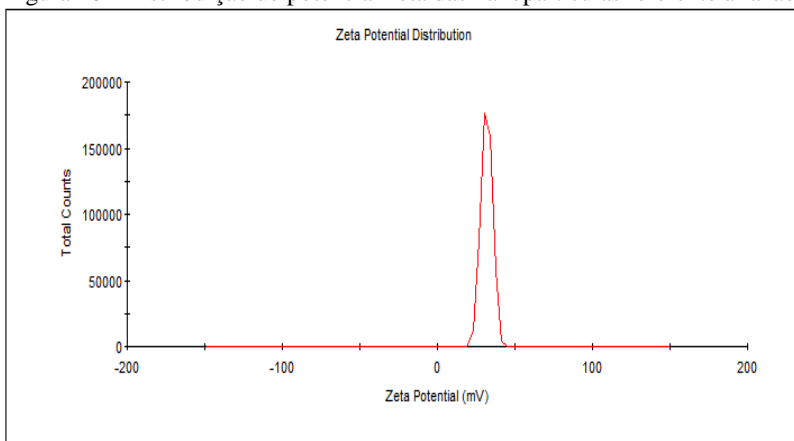
Através das imagens obtidas por MET, mostradas na Figura 9, pode-se observar que as nanopartículas de quitosana para a razão de 3:1 apresentaram tamanho uniforme e coerente com o obtido para este ensaio através de medidas do diâmetro hidrodinâmico, de em média 82,5 nm.

Figura 9 - Imagens de MET das nanopartículas de quitosana referente à razão de 3:1 com barras de escala de (a) 1 μm e (b) 20 nm.



Embora o diâmetro médio das nanopartículas alcançadas com a razão de 3:1 não ter diferido significativamente das partículas obtidas com a proporção de 2,5:1 (89,2 nm), o potencial zeta, de 31,6 mV (Figura 10), foi estatisticamente maior no ensaio com a razão de 3:1 do que no experimento com o menor teor de quitosana, no qual o potencial foi de 27,6 mV.

Figura 10 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão



Para a razão de 2:1, apesar do tamanho das partículas encontrarem-se abaixo de 100 nm, o potencial zeta foi muito baixo, de 21,7 mV. Segundo Müller et al. (2001), geralmente, um potencial zeta de 30 mV é requerido como o mínimo necessário para que uma nanosuspensão seja fisicamente estável e estabilizada por suas repulsões eletrostáticas.

Os tamanhos médios das nanopartículas diferiram significativamente entre a maioria dos ensaios, mostrando que a concentração de quitosana no meio influencia estatisticamente na distribuição do tamanho destas partículas.

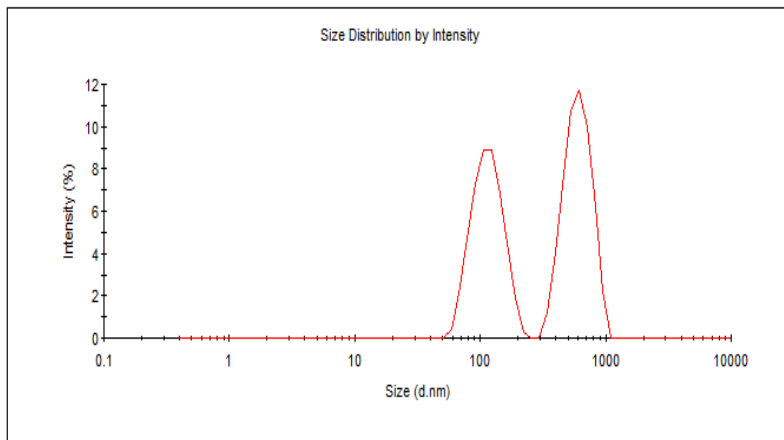
Para as razões de 3,5:1 até 6:1, a concentração de quitosana em excesso em relação a concentração de TPP levou à fragmentação do polímero em diferentes tamanhos, formando nanopartículas com dimensões grandes e heterogêneas. Isto pode ser observado na Tabela 11, pelo PDI, maior do que 0,3 em todos os casos, e também pelos gráficos, que apresentam mais de um pico com diferentes distribuições de tamanho.

Gan et al. (2005) em estudo semelhante a este, avaliaram o tamanho de partículas e potencial zeta de três quitosanas com diferentes pesos moleculares em razões de QTS:TPP variando de 3:1 a 7:1. Os autores mostraram que tanto o tamanho quanto o potencial zeta das partículas aumentaram linearmente com o acréscimo na concentração de quitosana.

Nas proporções de 5:1 até 6:1, durante a agitação para a formação das nanopartículas, as soluções apresentaram aspecto opalescente, que indica a formação de flocos devido a formação de grandes partículas.

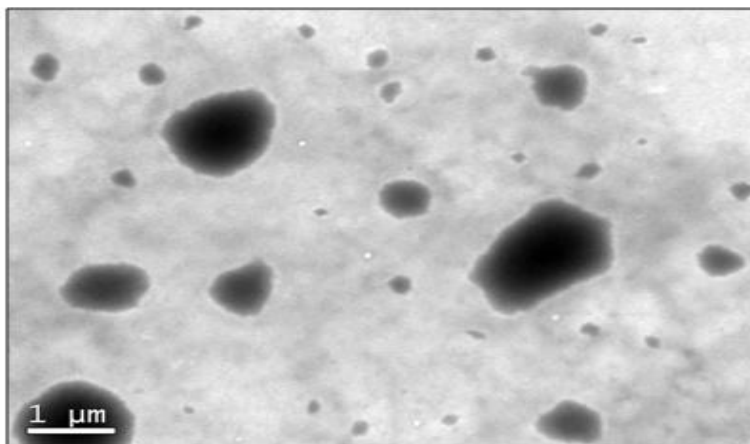
A Figura 11 representa o gráfico da distribuição do tamanho das partículas referente à razão de 6:1, mostrando dois picos distintos, com tamanhos médios de 117,2 e 609,7 nm. Os gráficos, tanto de tamanho quanto do potencial zeta, para as razões de 3,5:1 até 5,5:1 e também para as proporções de 2:1 e 2,5:1 encontram-se em Anexos, da Figura A1 até a Figura A14.

Figura 11 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 6:1.



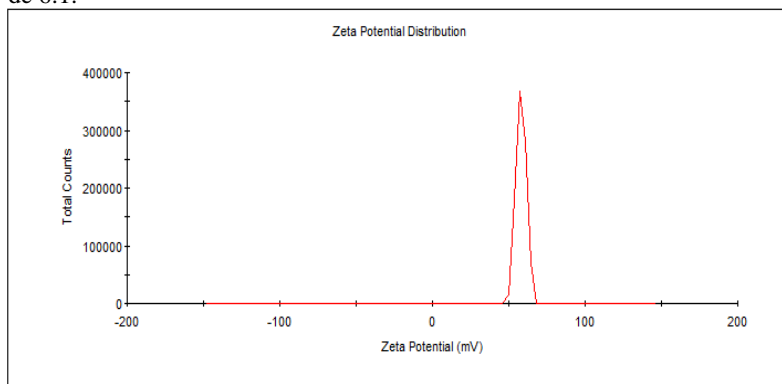
Na Figura 12 é apresentada a imagem obtida através da microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de quitosana produzidas com a razão de 6:1, mostrando desigualdade no diâmetro das partículas, que está de acordo com os dois picos distintos observados na Figura 11.

Figura 12 - Imagem de MET das nanopartículas de quitosana referente à razão de 6:1.



Grenha et al. (2005), também testaram diferentes razões de QTS:TPP para a formação de nanopartículas, variando de 3,6:1 até 6:1, e demonstraram que quanto maior a concentração de quitosana no meio, maior é o tamanho e o potencial zeta das partículas formadas. Com estas diferentes proporções, os autores obtiveram partículas com tamanho médio variando entre 300 e 390 nm e potencial zeta de 34 a 45 mV. Como pode ser observado na Figura 13, o ensaio com o maior teor de quitosana (6:1) apresentou o potencial zeta mais elevado, de 57,3 mV.

Figura 13 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 6:1.



Nas Figuras A11 e A13, localizadas em Anexos, referentes aos ensaios para as razões de 5:1 e 5,5:1, respectivamente, além dos dois picos distintos para a distribuição de tamanho, em ambos gráficos existem picos a ± 5.000 nm que representam a detecção de partículas muito grandes que podem ser um indicativo de aglomerados presentes no meio já que, segundo Medeiros (2011), as nanopartículas de quitosana tendem a se agregar novamente, devido aos grupamentos livres.

Através da análise das diferentes razões de QTS:TPP na formação de nanopartículas de quitosana, pode-se concluir que a melhor proporção, para a obtenção de partículas de menor diâmetro médio e potencial zeta superior a 30 mV, é de 3 partes de polímero para uma parte de TPP.

4.3 Avaliação da influência de diferentes parâmetros na formação de nanopartículas

Segundo Aouada (2009), controlando-se as condições de processo para a produção de nanopartículas de quitosana, é possível se obter partículas com carga superficial e tamanho desejados. Neste planejamento experimental, variou-se a concentração do ácido acético para a solubilização da quitosana, o pH da solução e a proporção entre quitosana e TPP.

A concentração de ácido acético foi investigada porque influencia na solubilização da quitosana e, conseqüentemente, na formação das nanopartículas. De acordo com Rinaudo (2006), a solubilidade deste polímero é geralmente testada em ácido acético, dissolvendo-o em soluções contendo 1% (mesmo que 0,17 M) ou 0,1 M deste ácido, portanto, estas duas concentrações foram avaliadas no planejamento.

Apesar da quitosana ser solúvel em ampla faixa de pH, para a formação de nanopartículas, é reportado na literatura valores como 4,4 (PAN et al., 2002), 4,5 (TSAI et al., 2011), 4,6 (KAVAZ et al.; 2008) e até 4,8 (QI et al., 2004). Por esta razão, neste planejamento fatorial avaliou-se o pH da solução em dois níveis, 4,4 e 4,6.

A razão entre quitosana e TPP controla a distribuição do tamanho das partículas formadas, sendo que, esta distribuição influencia na atividade biológica das nanopartículas (PAPADIMITRIOU et al., 2008). Por isso, a razão entre quitosana e TPP foi estudada em dois níveis (3:1 e 3:0,8) a fim de encontrar a proporção ótima para se obter nanopartículas com tamanho reduzido e potencial zeta elevado.

Na Tabela 12 são apresentados o potencial zeta e o tamanho das nanopartículas de quitosana obtidas através do planejamento fatorial 2^3 , onde os três parâmetros foram testados em dois níveis. O índice de polidispersão para as oito formulações avaliadas foi menor do que 0,3 (dados não mostrados).

Tabela 12 - Potencial zeta e tamanho das nanopartículas de quitosana obtidas através do planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	pH	QTS:TPP	[Ácido acético] (M)	Tamanho (nm)	Potencial zeta (mV)
1	(-) 4,4	(-) 3:0,8	(-) 0,1	76,2±0,5 ^{ad}	32,6±1,4 ^d
2	(+) 4,6	(-) 3:0,8	(-) 0,1	79,0±0,6 ^{ae}	31,8±1,1 ^{ab}
3	(-) 4,4	(+) 3:1	(-) 0,1	69,6±1,2 ^b	27,6±1,5 ^{abc}
4	(+) 4,6	(+) 3:1	(-) 0,1	70,9±0,8 ^b	26,5±0,8 ^{bc}
5	(-) 4,4	(-) 3:0,8	(+) 0,17	83,5±0,1 ^c	32,8±0,2 ^a
6	(+) 4,6	(-) 3:0,8	(+) 0,17	82,0±0,4 ^{ce}	31,8±0,8 ^{ab}
7	(-) 4,4	(+) 3:1	(+) 0,17	73,1±0,7 ^{bd}	25,7±0,4 ^c
8	(+) 4,6	(+) 3:1	(+) 0,17	75,2±0,7 ^{ad}	23,5±0,4 ^c

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Nas Figuras 14 e 15 são mostrados os digramas de pareto com os efeitos estimados das variáveis testadas em relação ao tamanho e potencial zeta das nanopartículas, respectivamente.

Figura 14 - Diagrama de pareto relacionado ao tamanho das nanopartículas.

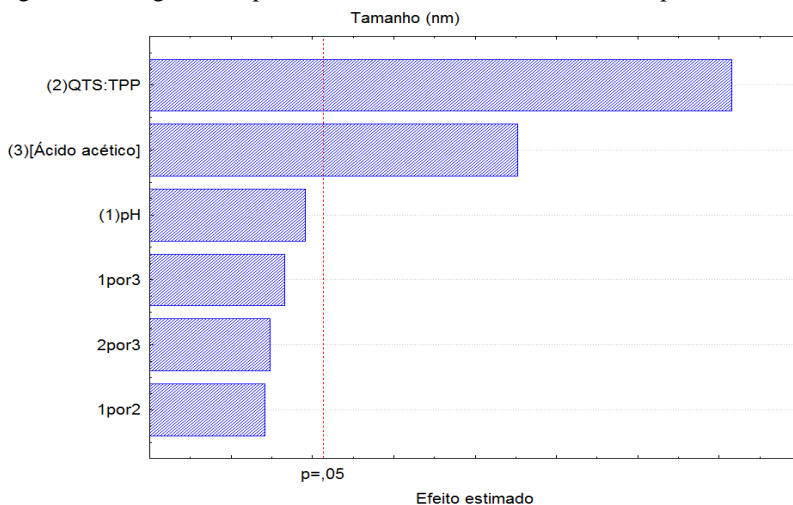
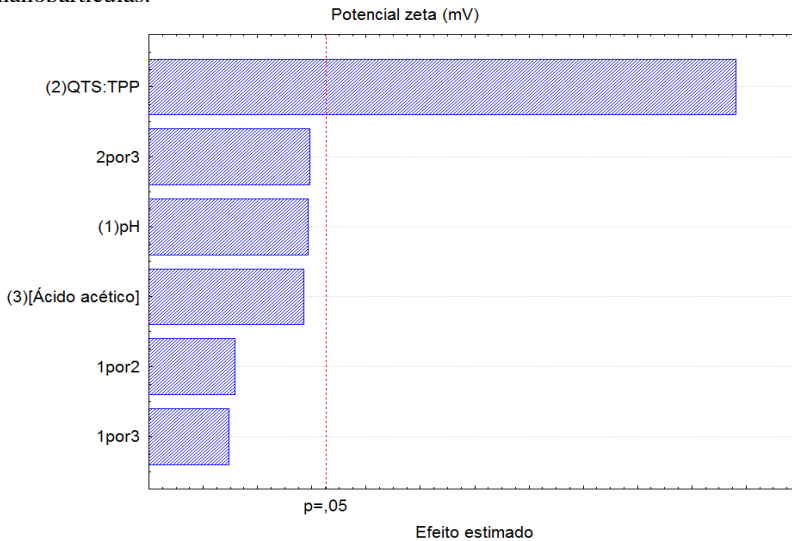


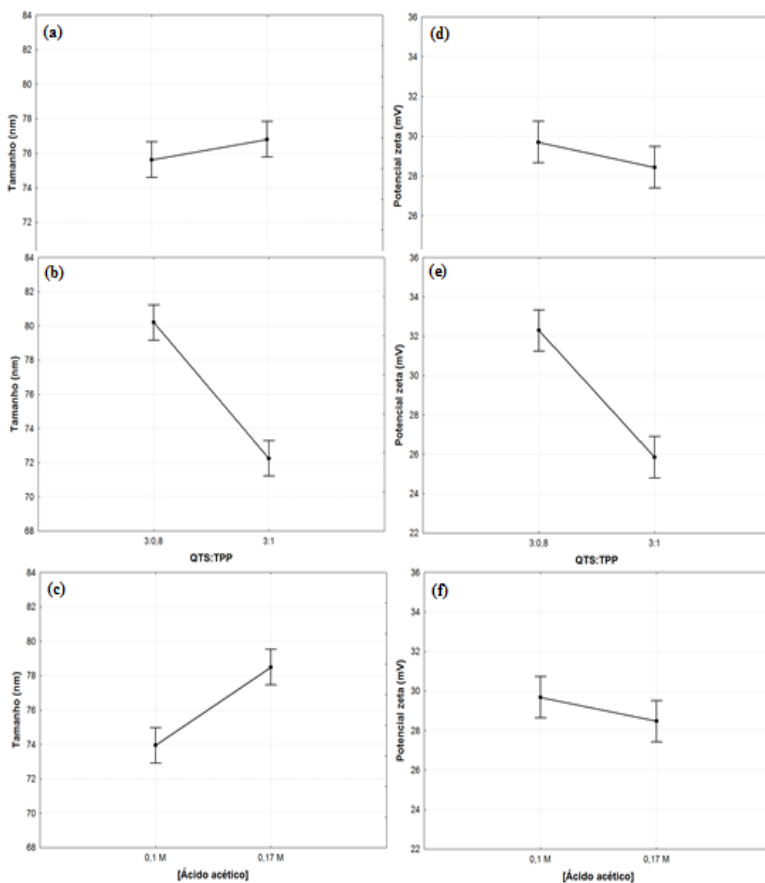
Figura 15 - Diagrama de pareto relacionado ao potencial zeta das nanopartículas.



Através da Figura 14, pode-se observar que, com um nível de significância de 5%, a razão de QTS:TPP e a concentração da solução de ácido acético influenciaram significativamente no diâmetro das nanopartículas. Já em relação ao potencial zeta (Figura 15), é possível afirmar que a razão de QTS:TPP foi a única variável que influenciou estatisticamente na carga superficial das partículas.

Os gráficos de análise de efeito, apresentados na Figura 16, permitem a melhor visualização dos níveis das variáveis, para que se possa observar qual a variável que teve efeito significativo na formação de nanopartículas.

Figura 16 - Gráficos da análise do efeito do (a) pH, (b) QTS:TPP e (c) [ácido acético] sobre o tamanho e efeito do (d) pH, (e) QTS:TPP e (f) [ácido acético] sobre o potencial zeta das nanopartículas de quitosana.



Apesar do pH não ter influenciado expressivamente no tamanho e potencial das partículas, no meio mais ácido houve maior protonação dos grupos $-NH_2$ da cadeia polimérica em $-NH_3^+$, levando a um potencial zeta ligeiramente mais elevado (Figura 16 (d)) e partículas um pouco menores (Figura 16 (a)), já que haviam mais grupamentos catiônicos livres para se ligar aos fosfatos do TPP.

Como o pH não influenciou significativamente no diâmetro e potencial das partículas, adotou-se o valor de 4,4 para experimentos

futuros, já que consome menos NaOH para elevar o pH da solução de quitosana que inicialmente era menor do que 4,0.

Na Figura 16, pode-se observar que a variável que mais influenciou significativamente no tamanho e no potencial zeta das partículas foi a razão de QTS:TPP, este efeito é esperado, já que os ânions do tripolifosfato de sódio se ligam à cadeia da quitosana formando as nanopartículas. Como mostrado na Figura 16 (b), com o maior teor de TPP (razão 3:1) houve mais ligações deste tipo, formando partículas com menor diâmetro hidrodinâmico.

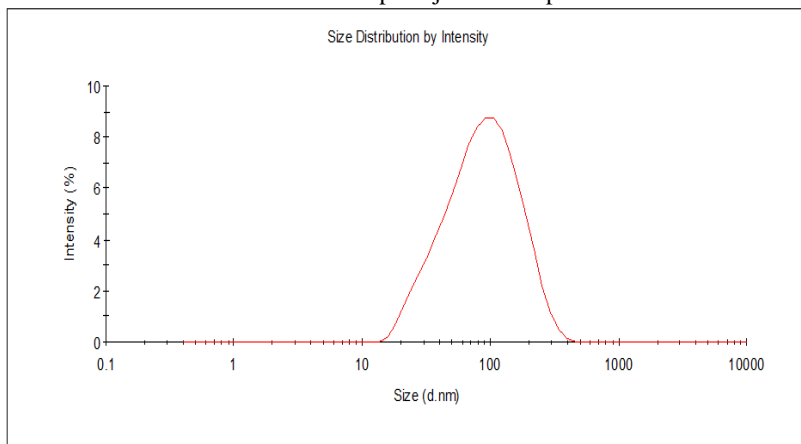
No entanto, nota-se na Figura 16 (e) que para a razão de 3:0,8, as nanopartículas apresentaram potencial zeta médio superior a 32 mV enquanto que para a proporção de 3:1 o potencial médio foi inferior a 26 mV. De acordo com Ing et al. (2012), nanopartículas com carga superficial superior a 30 mV se mostram mais estáveis e menos sujeitas a agregação, por isso, a razão de QTS:TPP de 3:0,8 é a melhor para a produção de nanopartículas de quitosana.

Kavaz et al. (2008) também avaliaram o efeito de diferentes razões de QTS:TPP (1:1; 2:1 e 3:1) no tamanho das nanopartículas de quitosana e obtiveram, para a razão mássica de 3:1, o menor tamanho médio de partícula, de ± 380 nm. Os autores encontraram tamanho médio de partículas muito superior aos obtidos no planejamento experimental deste trabalho, supostamente porque utilizaram o método que envolve a preparação de nanopartículas magnéticas de quitosana com Fe_3O_4 .

Em relação ao potencial zeta, os resultados demonstram que não há diferença significativa na utilização de 0,1 M ou 0,17 M de ácido acético para solubilizar a quitosana. Entretanto, partículas com menor raio hidrodinâmico foram obtidas com a concentração de ácido de 0,1 M.

Com base nestes resultados, os parâmetros foram fixados em pH 4,4, concentração de ácido acético de 0,1 M e proporção de QTS:TPP de 3:0,8 para a produção de nanopartículas para incorporação de zinco. Nestas condições, o tamanho médio das partículas obtidas foi de 76,2 nm como pode ser observado na Figura 17.

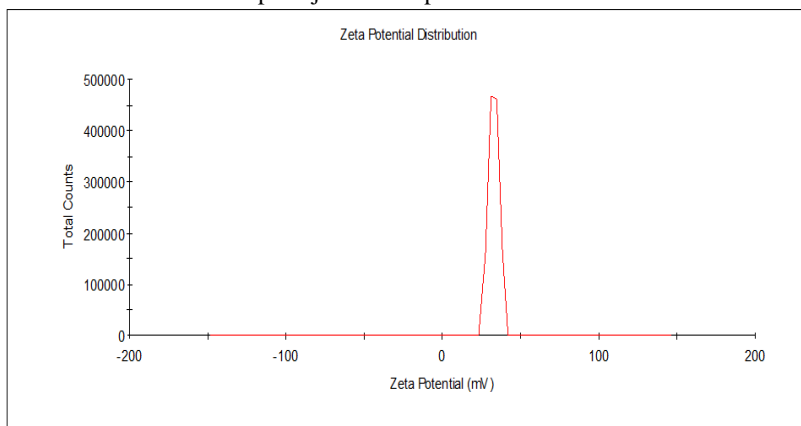
Figura 17 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 1 do planejamento experimental.



Douglas et al. (2006), através do método de gelificação iônica de quitosana com alginato, obtiveram nanopartículas com diâmetro médio (157 nm) maior do que as obtidas no Ensaio 1. No entanto, o potencial zeta de 32,2 mV obtido pelos autores foi bem próximo ao encontrado neste primeiro experimento, de 32,6 mV como pode ser reparado na Figura 18.

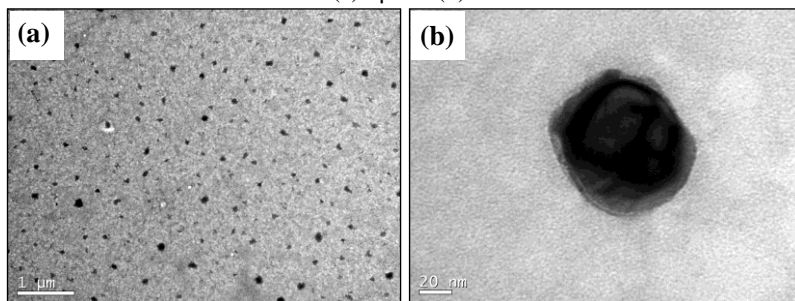
Os gráficos de distribuição de tamanho e potencial zeta dos demais ensaios do planejamento fatorial encontram-se em Anexos, da Figura A15 até a Figura A28.

Figura 18 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 1 do planejamento experimental.



Na Figura 19 são apresentadas imagens de MET das nanopartículas de quitosana obtidas com as condições do Ensaio 1. Como é possível observar, as nanopartículas apresentam uma distribuição homogênea de tamanho menor do que 100 nm, que está de acordo com a distribuição de tamanho para este ensaio no qual as partículas apresentaram diâmetro médio de 76,2 nm.

Figura 19 - Imagens de MET das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 1 com barras de escala de (a) 1 μm e (b) 20 nm.



4.4 Determinação da influência do tempo de agitação na formação de nanopartículas

Na literatura são encontrados diferentes tempos de agitação para a formação de nanopartículas de quitosana, que variam desde 20 min (REJINOLD et al., 2011) até 1,5 h (GUPTA e KARAR, 2011). Nos ensaios anteriores, nos quais se investigou as melhores condições para a formação de nanopartículas, o tempo de agitação adotado foi de 1 h. No entanto, como foi utilizada grande quantidade de nanopartículas nos experimentos posteriores, é importante avaliar qual o menor tempo de agitação aceitável para a formação de partículas com diâmetro e potencial zeta requeridos.

As nanopartículas de quitosana foram preparadas de acordo com a formulação que apresentou os melhores resultados no planejamento experimental, ou seja, a quitosana foi dissolvida em ácido acético 0,1 M, o pH foi mantido em 4,4 e a proporção de quitosana e tripolifosfato de sódio utilizada foi de 3:0,8. Em todos os ensaios apresentados na Tabela 13 utilizou-se a mesma formulação, mudando apenas o tempo de agitação durante a formação das partículas que variou de 5 até 60 min.

Tabela 13 - Tamanho das nanopartículas e potencial zeta para os diferentes tempos de agitação.

Tempo (min)	Tamanho (nm)	Potencial zeta (mV)
5	86,3 ± 0,6 ^a	33,8 ± 0,7 ^a
10	84,3 ± 0,6 ^{ab}	33,4 ± 0,5 ^a
20	82,5 ± 0,5 ^b	33,4 ± 0,4 ^a
30	73,7 ± 0,7 ^c	33,1 ± 0,4 ^a
40	72,3 ± 0,3 ^c	32,8 ± 0,4 ^a
50	72,0 ± 0,2 ^c	32,2 ± 0,2 ^a
60	71,6 ± 0,6 ^c	32,1 ± 0,3 ^a

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Apesar das nanopartículas de quitosana se formarem instantaneamente com a adição do tripolifosfato de sódio (CALVO et al., 1997), o tempo de agitação influenciou significativamente no diâmetro nas nanopartículas obtidas, como pode ser observado na Tabela 13. Já em relação ao potencial zeta, apesar da carga superficial ter decrescido com o aumento do tempo de agitação, as medidas não diferiram estatisticamente entre todos os períodos avaliados.

Embora não significativa, a diminuição no tamanho e potencial zeta das partículas pode ter ocorrido porque o aumento no tempo de agitação proporcionou que os grupos fosfatos do TPP ficassem mais tempo em contato com os grupos $-\text{NH}_3^+$ da quitosana, formando mais ligações e gerando nanopartículas com menor diâmetro hidrodinâmico.

Os menores diâmetros de partículas foram obtidos entre os tempos de 30 e 60 min de agitação, sendo que, com um nível de significância de 5%, os tamanhos das nanopartículas formadas nesses quatro diferentes períodos não diferiram estatisticamente entre si. Com isso, o tempo de 30 min de agitação foi selecionado para os experimentos futuros já que, demanda menos tempo e energia para a formação de nanopartículas com tamanho médio de 73,7 nm e potencial zeta de 33,1 mV, como pode ser visto na Figuras 20 e 21, respectivamente.

Os gráficos da distribuição de tamanho e potencial zeta para os demais tempos de agitação encontra-se em Anexos da Figura A29 até a Figura A40.

Figura 20 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 30 min de agitação.

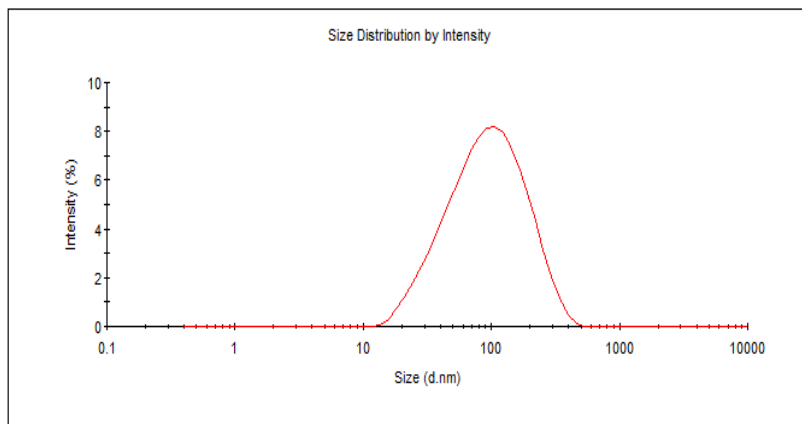
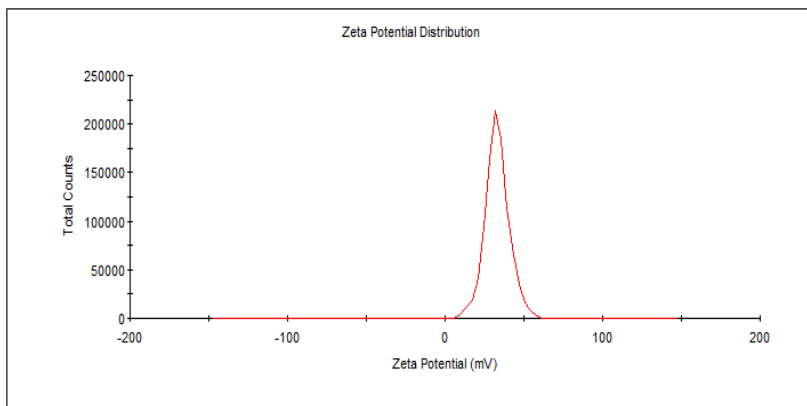


Figura 21 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 30 min de agitação.



4.5 Estudo sobre adsorção de zinco em nanopartículas de quitosana

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a adsorção de zinco em nanopartículas de quitosana (DU et al., 2009). A maior parte das pesquisas envolve a quelação de outros metais (SUN et al., 2011) ou óxido de zinco (BHADRA et al., 2011; KHAN et al., 2008) em nanopartículas, ou então, a utilização da quitosana na remoção de diversos íons metálicos (HAIDER e PARK, 2009; LAUS et al., 2010),

incluindo o zinco (JAYASREE et al., 2011; PATALE e PATRAVALE, 2011).

Devido ao menor número de pesquisas nesta área específica de quelação de Zn^{+2} em nanopartículas de quitosana, esta etapa do trabalho foi exploratória. Segundo Janegitz et al. (2007), a quitosana tem capacidade de adsorção superior a 1 mmol de cátion para cada grama de polímero, com isso, a quelação de zinco teoricamente é superior a $65,37 \text{ mg g}^{-1}$ quitosana. Como este dado é desconhecido para nanopartículas de quitosana, no primeiro planejamento fatorial, avaliou-se as concentrações de Zn^{+2} de 60 e 80 $\text{mg g}_{\text{nano}}^{-1}$.

Neste planejamento a temperatura de reação foi avaliada em dois níveis: temperatura ambiente e 50 °C. Em trabalhos sobre adsorção de metais em quitosana estes valores variam bastante, desde a temperatura ambiente (DU et al., 2009; KHAN et al., 2008, LIU e KIM, 2012), 37 °C (SUN et al., 2011) e até 70 °C (HON e TANG, 2000). Na Tabela 14 são apresentados os resultados do primeiro planejamento fatorial.

Tabela 14 - Porcentagens de adsorção de Zn^{+2} às nanopartículas de quitosana obtidas através do primeiro planejamento fatorial 2².

Ensaio	$[Zn^{+2}] \text{ (mg g}_{\text{nano}}^{-1})$	T (°C)	Adsorção (%)
1	(-) 60	(-) amb.	$41,4 \pm 2,1^a$
2	(+) 80	(-) amb.	$27,2 \pm 0,1^b$
3	(-) 60	(+) 50	$24,2 \pm 1,0^b$
4	(+) 80	(+) 50	$31,9 \pm 1,2^b$

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Como pode ser observado na Tabela 14, a adsorção de zinco pelas nanopartículas de quitosana foi significativamente maior no ensaio 1. Neste experimento, a concentração de Zn^{+2} que foi adicionada às partículas foi de 60 $\text{mg g}_{\text{nano}}^{-1}$ e a temperatura de reação era ambiente. Os demais resultados não diferiram estatisticamente entre si.

As Figuras 22 e 23 apresentam, respectivamente, o digrama de pareto e os gráficos de análise de efeito que permitem visualizar os efeitos das variáveis testadas em relação à porcentagem de adsorção de zinco pelas nanopartículas de quitosana.

Figura 22 - Diagrama de pareto relacionado à adsorção de Zn^{+2} para o primeiro planejamento fatorial 2^2 .

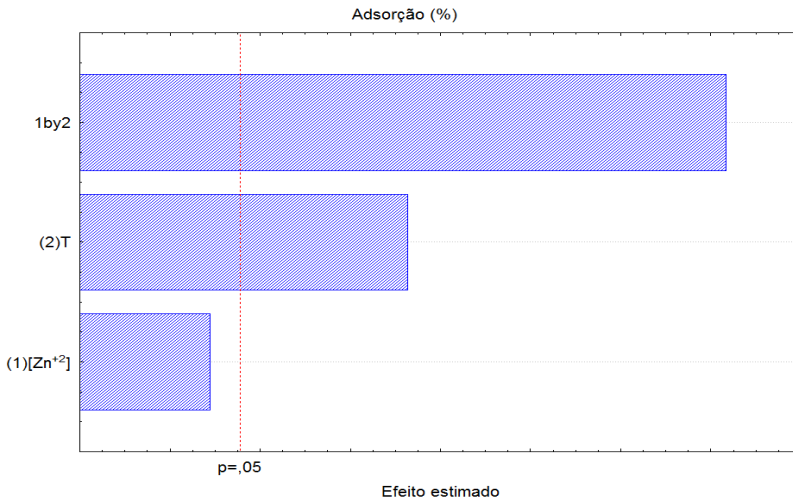
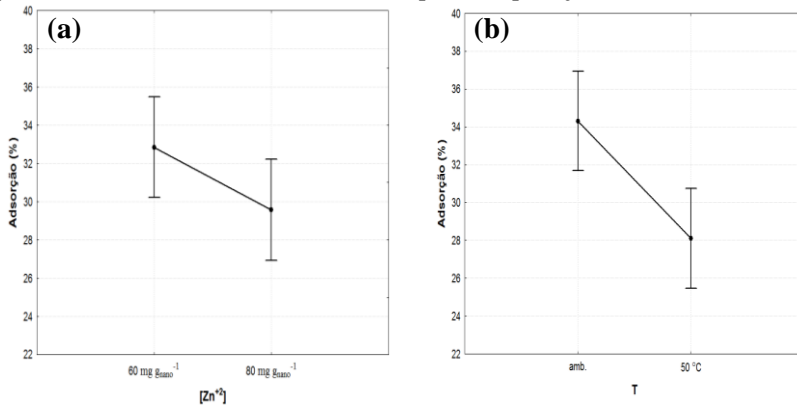


Figura 23 - Gráficos da análise do efeito do (a) $[Zn^{+2}]$ e (b) temperatura sobre a porcentagem de adsorção de zinco para o primeiro planejamento fatorial 2^2 .



No diagrama de pareto, apresentado na Figura 22, pode-se observar que a temperatura apresentou efeito significativo na adsorção do metal enquanto que a concentração de Zn^{+2} não contribuiu expressivamente para o aumento da quelação. No entanto, a interação entre os dois parâmetros apresentaram maior influência significativa na adsorção de zinco às nanopartículas de quitosana.

Como mostrado nos gráficos de análise de efeito, a adsorção foi maior para a concentração de 60 $mg\ g_{nano}^{-1}$ (Figura 23a) e em

temperatura ambiente (Figura 23b), nestas condições a quelação do metal foi de 41,4%.

Hong e Tang (2000) avaliaram o rendimento da adsorção de zinco em derivados de quitosana, com temperaturas de reação variando entre 30 e 70 °C. A temperatura ótima, encontrada pelos autores, foi de 50 °C, sendo que, acima deste valor ocorreu a dessorção dos íons.

No entanto, quando a quitosana é reticulada em nanopartículas, o estudo apresentado na Tabela 14, mostrou que a quelação de Zn^{+2} é maior quando a temperatura de reação é ambiente, sendo que, a adsorção também é dependente da concentração do metal no meio. Este resultado é economicamente favorável já que não há gastos com aquecimento quando se trabalha com temperatura ambiente.

Fixando a temperatura ambiente, foi realizado um segundo planejamento fatorial onde se variou novamente a concentração do metal (20 e 40 $mg\ g_{nano}^{-1}$). Como o planejamento foi exploratório, variou-se o tempo de reação também em dois níveis: 8 e 12 h. Na maioria dos trabalhos científicos sobre quelação de metais à quitosana e derivados, os autores utilizam tempos bem variáveis: 1-5 h (HON e TANG, 2000); 6 h (MILIOLI, 2011); 8 h (KHAN et al., 2008); 12 h (LIU e KIM, 2012; DU et al., 2009). Os resultados deste segundo planejamento são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Porcentagens de adsorção de Zn^{+2} às nanopartículas de quitosana obtidas através do segundo planejamento fatorial 2².

Ensaio	$[Zn^{+2}] (mg\ g_{nano}^{-1})$	t (h)	Adsorção (%)
1	(-) 20	(-) 8	$61,5 \pm 0,1^a$
2	(+) 40	(-) 8	$84,4 \pm 0,5^b$
3	(-) 20	(+) 12	$57,4 \pm 0,2^a$
4	(+) 40	(+) 12	$81,6 \pm 0,2^b$

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Através da Tabela 15 pode-se observar que apesar da porcentagem de adsorção de zinco ser maior no ensaio 2, este valor não diferiu significativamente do obtido no experimento 4. Isto indica que a concentração de metal no meio foi o fator que mais influenciou estatisticamente na porcentagem de adsorção. O mesmo pode se observado entre os ensaios 1 e 3, onde os tempos de agitação são distintos e a adsorção do metal não diferiu expressivamente.

Figura 24 – Diagrama de Pareto relacionado à adsorção de Zn^{+2} para o segundo planejamento fatorial 2^2 .

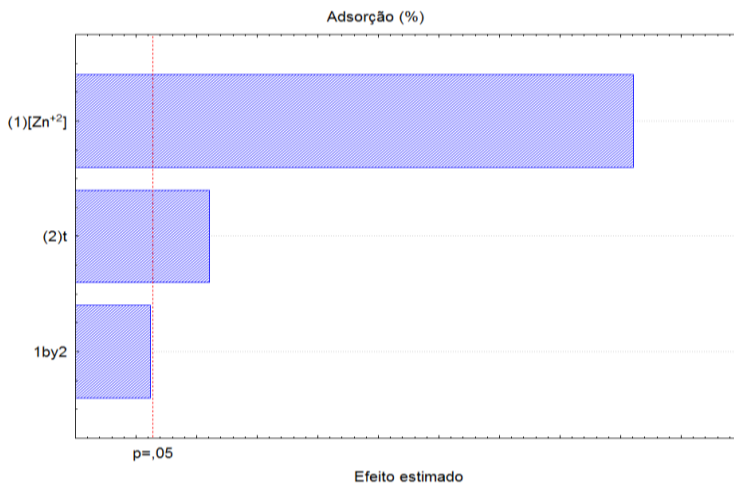
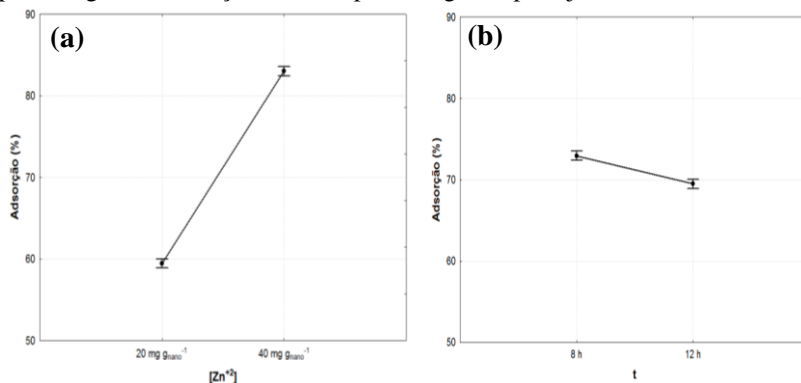


Figura 25 - Gráficos da análise do efeito do (a) $[Zn^{+2}]$ e (b) tempo sobre a porcentagem de adsorção de zinco para o segundo planejamento fatorial 2^2 .



Comparando os resultados entre os ensaios 1 e 2 e entre 3 e 4 (Tabela 15), que divergiram na concentração de zinco, pode-se averiguar que a adsorção diferiu estatisticamente entre estes ensaios, sendo que houve maior ligação deste metal à cadeia polimérica nos ensaios com concentração de zinco mais alta. Este evento pode ser também comprovado através da Figura 25a, onde a adsorção foi significativamente maior para a concentração de Zn^{+2} de $40 \text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$.

Na Figura 24 nota-se que, apesar de o tempo ter influenciado significativamente na quelação de zinco, o resultado não foi tão expressivo quanto o obtido com a concentração do metal. Conforme mostrado na Figura 25b, a maior porcentagem de adsorção foi obtida com o menor tempo de agitação, de 8 h.

Com estes resultados, a concentração de zinco de $40 \text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$, o tempo de 8 h de agitação e a temperatura ambiente de reação foram estabelecidos a produção de nanopartículas incorporadas com zinco para posteriores análises. Como nestas condições as nanopartículas incorporaram 84,4% do Zn^{+2} disponível na solução, pode-se admitir que as nanopartículas de quitosana têm capacidade de adsorver o teor de metal de $33,8 \text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$.

4.6 Caracterização das nanopartículas de quitosana

Após fixar os parâmetros de formação de nanopartículas e de adsorção de zinco, as partículas incorporadas com o metal foram produzidas em maior quantidade para a caracterização por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, espectroscopia na região de infravermelho e análise termogravimétrica.

4.6.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

A análise de energia dispersiva de raios-X é uma técnica não destrutiva, onde os raios emitidos pela amostra são convertidos em cargas elétricas para a identificação da energia dos raios-X e conseqüentemente dos respectivos elementos presentes na amostra (MILIOLI, 2011). Nas Figuras 26, 27 e 28 são apresentados os espectros de EDX para a quitosana *in natura*, para as nanopartículas de quitosana e nanopartículas adsorvidas de zinco, respectivamente.

Figura 26 - Espectro de EDX para quitosana.

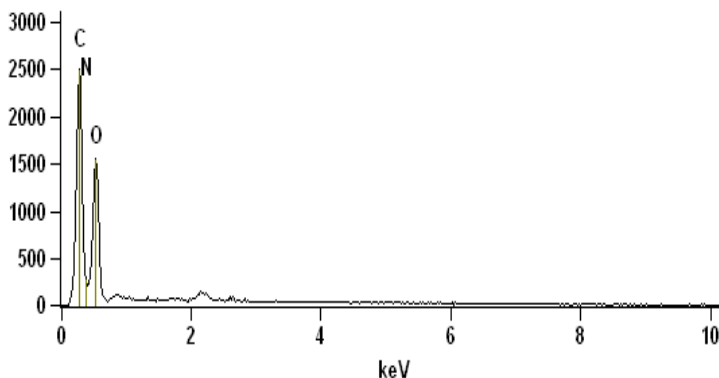


Figura 27 - Espectro de EDX para as nanopartículas de quitosana.

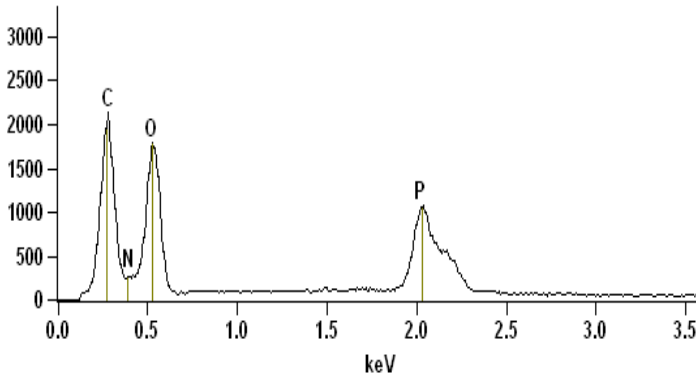
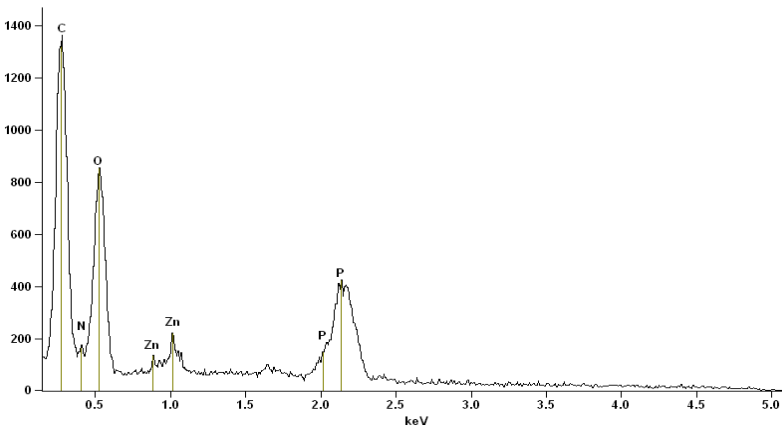


Figura 28 - Espectro de EDX para as nanopartículas incorporadas com zinco.



Através dos espectros pode-se observar que os três materiais apresentaram picos de carbono, nitrogênio e oxigênio, característicos deste biopolímero, os quais possuem intensidade de energia da camada $K\alpha$ de 0,277; 0,392 e 0,525 keV (KORTRIGHT e THOMPSON, 2001), respectivamente, como pode ser observado nas Figuras 26, 27 e 28.

O pequeno pico que aparece em $\sim 2,122$ keV no espectro da quitosana é referente ao ouro, elemento utilizado no recobrimento da amostra para análise. Nos espectros das nanopartículas e nanopartículas incorporadas com zinco, a intensidade dos picos de P pode ser acentuada devido à união deste pico ao do Au por apresentarem energias de camadas muito próximas.

Na análise de EDX das nanopartículas pode-se observar em sua composição além dos elementos característicos para amostra de quitosana, a presença de um pico em 2,012 keV relativo ao fósforo. Com isso, confirma-se a formação das nanopartículas devido à incorporação de P na matriz do biopolímero. No espectro das nanopartículas com zinco, a presença de P é detectada em dois picos, um referente à camada $K\alpha$ em 2,012 keV e outro devido a detecção da camada $K\beta$ em 2,139 keV.

A adsorção do zinco às nanopartículas é confirmada pela presença dos picos relacionados às camadas $K\alpha$ e $L\alpha$ deste metal, situados em 0,861 e 1,011 keV, respectivamente.

Para avaliar a análise elementar das amostras, foram realizadas medidas pontuais da superfície do biopolímero e das nanopartículas, as quais estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Análise elementar da quitosana, nanopartículas e nanopartículas adsorvidas de zinco.

Peso (%)	C	O	N	P	Zn
QTS	57,4±0,8	31,3±1,2	11,3±0,8	-	-
Nano	53,3±0,8	32,3±1,2	9,1±0,8	5,3±1,2	-
Nano+Zn	55,7±1,2	30,8±1,5	6,8±0,7	4,6±0,6	2,1±0,4

Apesar de estar reportado na literatura que esta técnica pode ser usada para qualificar e quantificar elementos (GOLDSTEIN et al., 2003), para a quitosana, não é possível se obter a concentração elementar exata já que este método não quantifica a porcentagem de hidrogênio na amostra. Na análise elementar, apresentada na Tabela 16, pode-se observar que a quitosana apresenta em sua composição, em média, 57,4% de carbono, 11,3% de nitrogênio e 31,3% de oxigênio. No entanto, de acordo com Roberts (1992), a quitosana totalmente desacetilada apresenta aproximadamente 8,7% de nitrogênio na sua constituição, valor bem inferior ao obtido por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X.

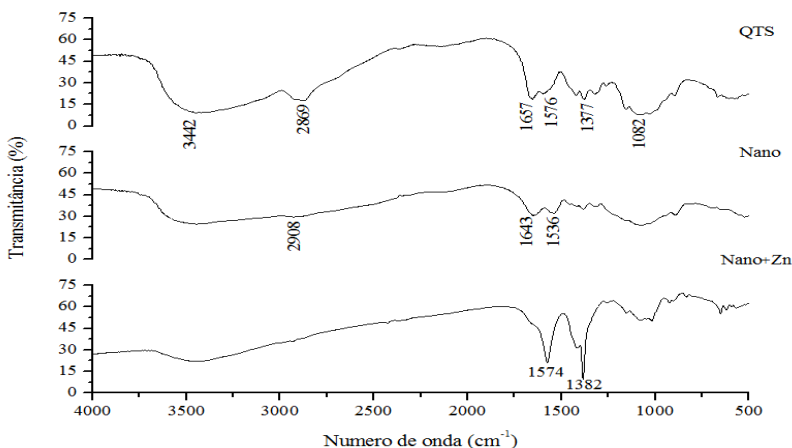
A análise elementar das nanopartículas indica que estas possuem em sua estrutura, em média, 5,3% de fósforo proveniente do TPP utilizado durante a gelificação iônica, comprovando que este elemento se ligou à cadeia polimérica formando as nanopartículas.

Pode-se observar ainda, que além dos elementos referentes à formação de nanopartículas, houve a incorporação de 2,1% de zinco às mesmas, mostrando que o processo de adsorção foi eficiente.

4.6.2 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo. Porém, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula (MILIOLI, 2011). Esta análise foi realizada a fim de se obter informações referentes à estrutura do biopolímero e também das nanopartículas obtidas através da gelificação iônica. Na Figura 29 são apresentados os espectros de infravermelho para a quitosana *in natura*, nanopartículas e nanopartículas incorporadas com zinco

Figura 29 – Espectros de infravermelho para a quitosana, nanopartículas e nanopartículas com zinco.



Nos espectros apresentados na Figura 29, pode-se notar a presença de bandas em 3442 cm^{-1} que correspondem ao estiramento axial OH das hidroxilas. Apesar do estiramento apresentar aproximadamente o mesmo comprimento de onda nos três espectros, sua intensidade é menor para as nanopartículas e nanopartículas adsorvidas com zinco já que estas amostras foram liofilizadas e a quantidade de grupos OH da água ligada aos polímeros é menor.

A banda em 2869 cm^{-1} no espectro da quitosana é atribuída à deformação axial C-H, para as nanopartículas, esta banda encontra-se com intensidade bem inferior em 2908 cm^{-1} . Já para as nanopartículas com zinco, a banda referente a esta deformação não é visível no espectro.

A formação das nanopartículas é confirmada pelo deslocamento das bandas a 1657 e 1576 cm^{-1} da quitosana para 1643 e 1536 cm^{-1} no espectro das nanopartículas, que representam os grupos CONH_2 e NH_2 , respectivamente. A mudança no comprimento de onda destas duas bandas bem como a maior intensidade da banda de NH_2 também foram observados por outros pesquisadores (HU et al., 2008; PAPANIMITRIOU et al., 2008; XU e DU, 2003), os quais sugerem que ocorreram ligações entre estes grupos com o fosfato da molécula de TPP, levando à formação das nanopartículas.

No espectro das nanopartículas com zinco, a banda referente ao grupo CONH_2 está bem retraída enquanto que a intensidade da banda de NH_2 está muito mais intensa do que nos espectros dos outros dois polímeros comprovando que houve ligações entre o Zn^{2+} e os grupos amino das nanopartículas.

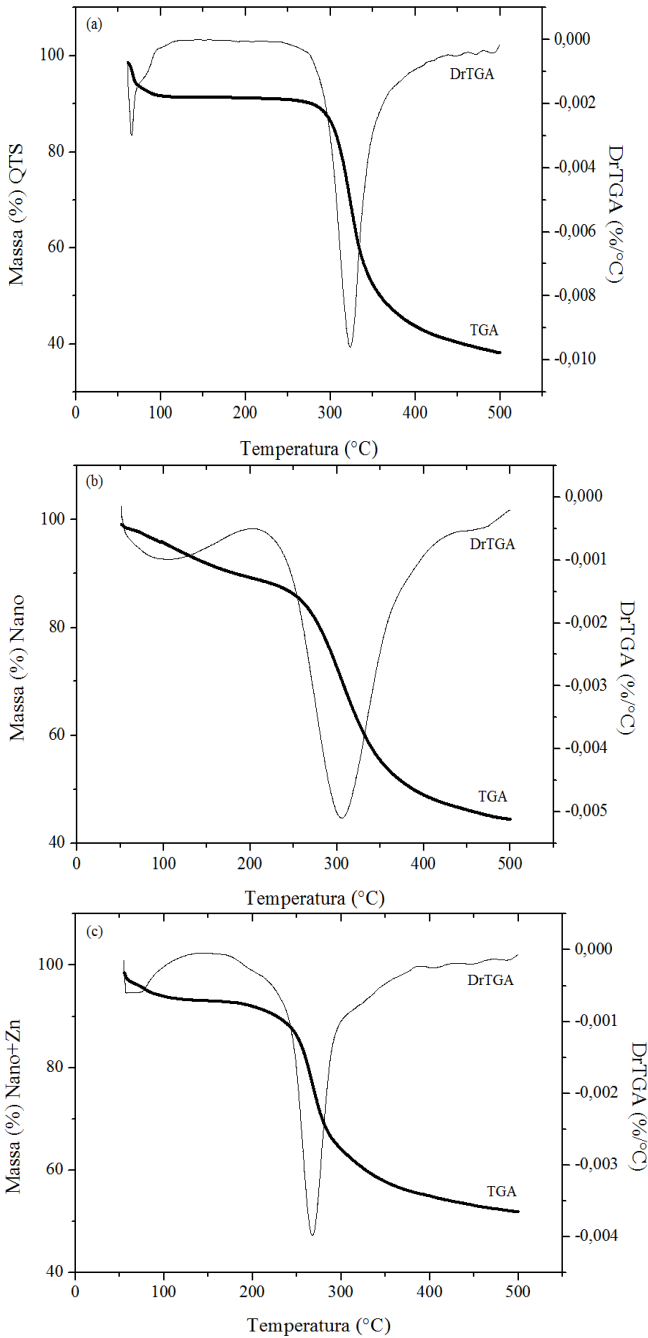
Nos espectros da quitosana e das nanopartículas, atribui-se as bandas em 1377 cm^{-1} à deformação assimétrica de C-H do grupo CH_3 referente ao grupo acetamido da cadeia polimérica, visto que a quitosana não está completamente desacetilada (LAUS et al., 2006). Para as nanopartículas com zinco, uma maior intensidade desta banda, em 1382 cm^{-1} , indica que também houve complexação do Zn^{2+} com os grupos CH_3 ainda presentes nas nanopartículas.

Nos três espectros ainda é possível observar bandas em aproximadamente 1082 cm^{-1} relacionadas ao estiramento vibracional C-O do álcool primário dos biopolímeros (LAUS et al., 2010).

4.6.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Neste trabalho foi avaliado o comportamento térmico da quitosana, nanopartículas e nanopartículas incorporadas com zinco, conforme mostrado nos termogramas da Figura 30.

Figura 30 - Termogramas de TGA da QTS (a), Nano (b) e Nano+Zn (c).



Pode-se verificar que para a quitosana (Figura 30a), a perda de massa ocorreu em dois estágios. O primeiro estágio revela a perda de água que estava contida na amostra, equivalente a 7,1% e o segundo estágio está relacionado à perda de massa da quitosana devido à decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do biopolímero (PAULINO et al., 2006), que correspondeu a 53,1%. A temperatura de decomposição do biopolímero foi de 323,8 °C sendo este valor muito próximo aos encontrados por outros autores para quitosanas comerciais (LAUS et al., 2010; MILIOLI, 2011).

No termograma referente às nanopartículas (Figura 30b) pode-se observar que a perda de massa também ocorreu em dois estágios, no primeiro ocorreu a desidratação das nanopartículas (9,7%) e no segundo a deterioração da amostra. A perda de massa no segundo estágio foi de 44,6% sendo que a temperatura de decomposição das nanopartículas foi de 304,6 °C.

As nanopartículas incorporadas com zinco apresentaram comportamento térmico (Figura 30c) com perfil semelhante ao das nanopartículas. No primeiro estágio a perda de água foi de 5,1% e no segundo estágio a perda devido à degradação do polímero foi de 41,1%. No entanto, houve uma diminuição na temperatura máxima de degradação, para 267,6 °C, em relação às nanopartículas.

Ao comparar a temperatura de decomposição da quitosana com a das nanopartículas e nanopartículas incorporadas com zinco, constata-se uma diminuição da estabilidade térmica dos novos materiais, devido à introdução dos grupos fosfatos na cadeia polimérica, os quais reticularam o polímero diminuindo assim, sua estabilidade em alta temperatura. Laus et al. (2006) realizaram análises de TGA da quitosana e de nanoesferas de QTS-TPP e também observaram uma diminuição na estabilidade térmica das esferas atribuída à redução da cristalinidade da quitosana e introdução dos grupos fosfatos.

Os valores de temperatura representam os pontos de máxima perda de massa dos materiais poliméricos e foram obtidos através das curvas de DrTGA.

4.7 Análise da atividade antimicrobiana das nanopartículas

A quitosana e seus derivados vêm sendo muito utilizados na área biomédica por seus benefícios biológicos como atividade antimicrobiana e capacidade de estimular a cicatrização (MURAKAMI et al., 2010). Devido a estas propriedades, a atividade antimicrobiana da quitosana *in natura* bem como das suas nanopartículas, com e sem

incorporação de zinco, foi avaliada em relação a uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e outra Gram-negativa (*Escherichia coli*), através dos testes de difusão em ágar, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

4.7.1 Difusão em ágar

O método de difusão em ágar geralmente é utilizado para microrganismos de crescimento rápido. A Tabela 17 apresenta os resultados dos diâmetros médios dos halos de inibição de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* em meio contendo solução controle de ácido 0,17 M (CAA), controle de quitosana *in natura* (CQTS), nanopartículas de quitosana (Nano) e nanopartículas incorporadas com zinco (Nano+Zn).

Tabela 17 - Diâmetro médio dos halos formados para diferentes amostras em relação à *S. aureus*.

Amostra	Halo (cm)
CAA	1,32±0,03 ^a
CQTS	0
Nano	2,39±0,03 ^b
Nano+Zn	1,67±0,06 ^c

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Na Tabela 17 são apresentados apenas os resultados do teste de difusão em ágar realizados com a bactéria *S. aureus* já que, nos ensaios com *E. coli*, não foi observada a formação de halo de inibição para nenhuma das quatro amostras.

O mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana é distinto para os dois tipos de bactérias. No caso das Gram-positivas (*S. aureus*), a quitosana de alta massa molecular apresenta maior atividade antimicrobiana porque forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes. Já para bactérias Gram-negativas (*E. coli*), a quitosana de baixa massa molecular desenvolve maior atividade antimicrobiana porque penetra mais facilmente na membrana causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (ZHENG e ZHU, 2003).

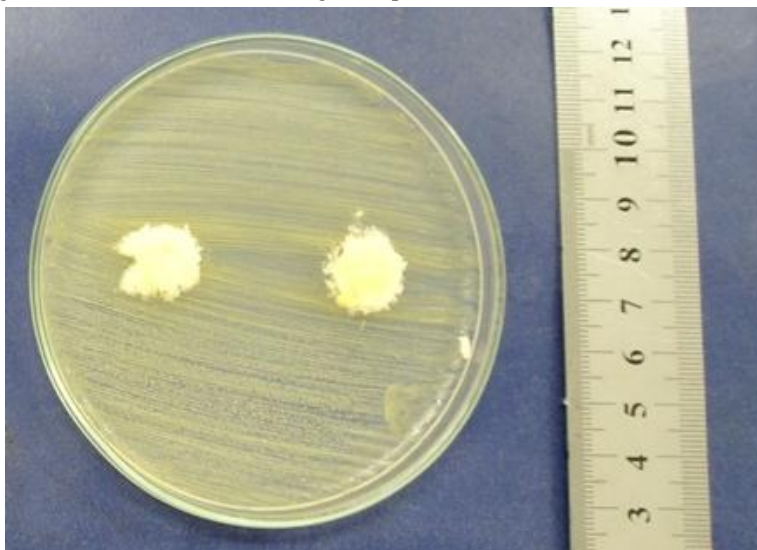
Como as amostras se encontravam em forma de pó, a inibição de crescimento foi observada apenas para *S. aureus* possivelmente porque as nanopartículas formaram película ao redor desta bactéria. Entretanto, a inibição da *E. coli* foi prejudicada porque as nanopartículas

não puderam penetrar a membrana já que estavam aglomeradas devido a liofilização.

O teste de difusão em ágar também foi realizado para as Nano e Nano+Zn na forma de gel, no entanto, como o diâmetro do halo de inibição é proporcional à quantidade de agente antimicrobiano presente no disco e ambos os materiais apresentavam cerca de 0,5% de nanopartículas, esta pequena quantidade presente nos géis não foi suficiente para desenvolver atividade antimicrobiana frente às duas bactérias testadas.

A atividade antimicrobiana da quitosana está relacionada à sua carga superficial. Já que a amostra *in natura* foi testada em pó, não houve protonação dos seus grupos amínicos e por isso, não houve formação de halo de inibição nem mesmo no disco contendo colônias de *S. aureus*, como pode ser observado na Figura 31.

Figura 31 - Teste de difusão em ágar da quitosana *in natura* contra *S. aureus*.



A ação antimicrobiana das Nano e Nano+Zn pode ser observada nas Figuras 32 e 33, respectivamente, através da formação do halo de inibição na zona envolvente à amostra. Na placa contendo as nanopartículas, o halo inibição médio foi de 2,39 cm enquanto que para as nanopartículas incorporadas com zinco, a inibição do crescimento foi significativamente menor, com halo de 1,67 cm.

Figura 32 - Teste de difusão em ágar das nanopartículas de quitosana contra *S. aureus*.

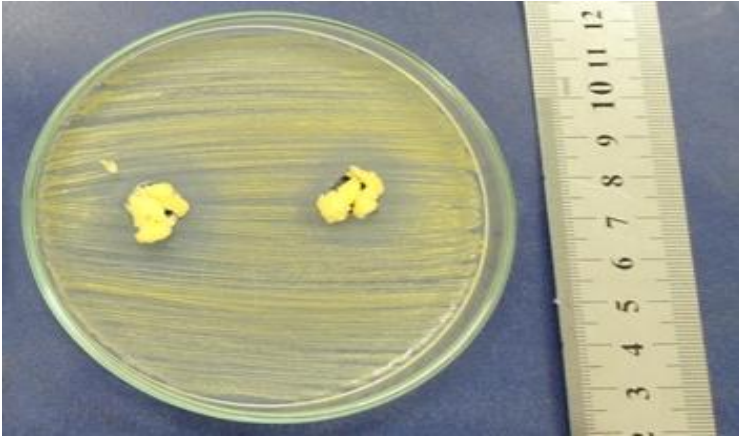
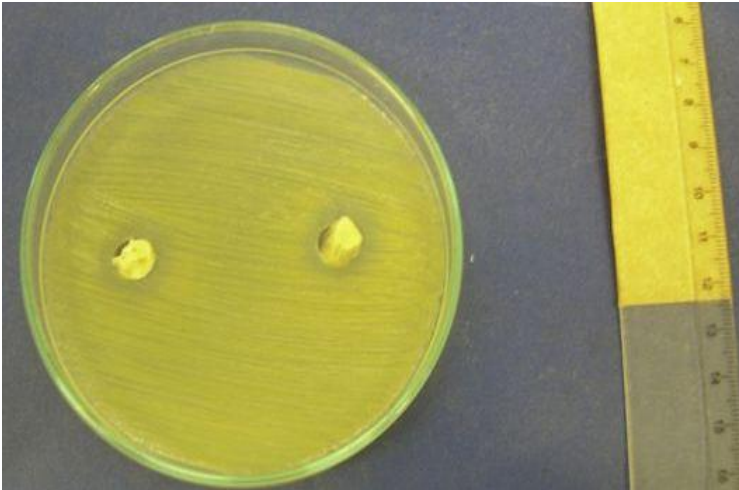


Figura 33 - Teste de difusão em ágar das nanopartículas incorporadas com Zn^{+2} contra *S. aureus*.

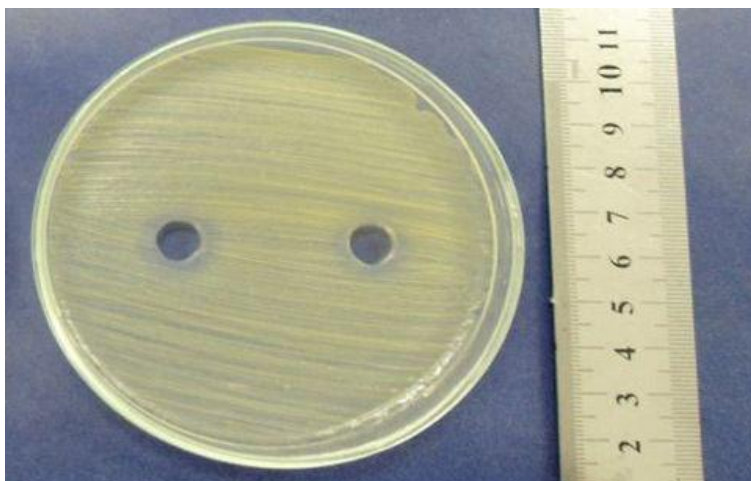


Apesar de ser reportado na literatura que o zinco é capaz de inibir o desenvolvimento de diferentes espécies de bactérias (LANSDOWN et al., 2007), os resultados apresentados na Tabela 17 demonstram que a pequena quantidade de metal que foi incorporada às nanopartículas ($33,8 \text{ mg g}_{\text{nano}}^{-1}$) pode ter agido como oligoelemento para

a bactéria e por isso, o halo de inibição das Nano+Zn foi estatisticamente menor do que das Nano.

A solução de ácido acético 0,17 M também apresentou atividade antimicrobiana, com halo de inibição médio de 1,32 cm, como pode ser observado na Figura 34. Na literatura são encontrados trabalhos que comprovam a ação antimicrobiana deste ácido frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SILVA, 2007; UTYAMA et al., 2007).

Figura 34 - Teste de difusão em ágar do ácido acético 0,17 M contra *S. aureus*.



4.7.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Geralmente, o método de concentração mínima é utilizado para se quantificar o teor necessário de um composto para inibir ou matar um microrganismo. Considera-se CIM a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento microbiano e CBM a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9% (CLSI, 2008).

A Tabela 18 apresenta os resultados CIM e CBM das amostras em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela 18 – CIM e CBM (mg mL^{-1}) da quitosana (QTS), Nano e Nano+Zn em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Amostra	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
QTS	-	-	-	-
Nano	26	26	5	5
Nano+Zn	26	26	8,66	8,66

Albuquerque et al. (2009), correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólitos, uma vez que seus grupos amínicos protonados se ligam seletivamente à superfície negativamente carregada dos microrganismos, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares com consequente inibição microbiana.

Assim como observado no teste de halo, a quitosana *in natura* não apresentou atividade antimicrobiana e bactericida contra as duas bactérias testadas. Isto ocorreu, provavelmente, porque os meios utilizados nestes testes têm pH próximo a neutralidade e por isso não houve protonação dos grupos amínicos do polímero, não havendo assim, interação deste material com os microrganismos.

Já as nanopartículas de quitosana apresentaram ação inibitória e bactericida contra as duas bactérias testadas, assim como observado por Xing et al. (2009). Isto ocorreu devido à maior área superficial das nanopartículas e maior afinidade com células bacterianas (QI et al., 2004; KONG et al., 2010).

Como pode-se observar na Tabela 18, nos ensaios realizados com Nano e Nano+Zn, não houve diferença entre os valores obtidos de CIM e CBM. Isto significa que em cada ensaio, foi necessária a mesma quantidade de amostra tanto para inibir o crescimento do microrganismo quanto para reduzir a contagem bacteriana em 99,9%.

A atividade antimicrobiana da quitosana é um processo complexo que difere entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido às diferentes características de cada superfície celular (CRUZ-ROMERO et al., 2013). Tanto para as Nano quanto para as Nano+Zn, a ação inibitória e bactericida foi distinta para as duas bactérias, sendo que, *S. aureus* mostrou-se menos resistente do que a *E. coli*. No caso das Nano, a concentração de 5 mg mL^{-1} foi capaz de inibir e matar a *S. aureus*, enquanto que as concentrações da CIM e CBM contra a *E. coli* foram maiores, de 26 mg mL^{-1} .

Apesar de o espectro de ação da quitosana abranger fungos filamentosos, leveduras e bactérias, este polímero mostra-se mais eficaz

contra bactérias Gram-positivas (TAVARIA et al.; 2013). Outros autores também demonstraram em seus experimentos que este biopolímero e seus derivados apresentam maior eficiência para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus* (FU et al., 2011; NO et al., 2002; TSAI et al., 2002).

De acordo com Lansdown et al. (2007), o zinco inibe o crescimento de diversas espécies de bactérias, entretanto, os organismos Gram-positivos parecem ser mais sensíveis à este metal do que os Gram-negativos. No entanto, na Tabela 18, pode-se observar que o zinco não influenciou na ação inibitória e bactericida das nanopartículas já que, para *E. coli*, tanto a CIM quanto a CBM não diferiram entre as Nano e Nano+Zn, que apresentaram concentrações mínimas iguais, de 26 mg mL⁻¹.

Os resultados com *S. aureus* mostram, ainda, que foi necessária uma concentração menor de Nano (5 mg mL⁻¹) do que de Nano+Zn (8,66 mg mL⁻¹) tanto para inibir o crescimento quanto para matar esta bactéria. Isto pode ter ocorrido porque a pequena quantidade de metal incorporado pode ter agido como elemento traço, pois, de acordo com Molinaro et al. (2009), o zinco é um oligoelemento necessário para o crescimento bacteriano.

4.8 Avaliação da atividade cicatrizante das nanopartículas de quitosana *in vivo*

Os custos dos tratamentos de patologias relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). Visto que a quitosana é um biomaterial de baixo custo, biodegradável e de fonte renovável, neste trabalho é proposto um método simples para obtenção de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco para aplicação como agente cicatrizante.

Neste trabalho, assegurou-se que as doses de nanopartículas de quitosana aplicadas nos animais, de 25 mg Kg⁻¹, não apresentassem toxicidade. De acordo com Ueno et al. (2001), este biopolímero apresenta toxicidade aguda em dosagens, ministradas em camundongos via intraperitoneal, acima de 5,2 g Kg⁻¹.

Os animais tratados com nanopartículas incorporadas com zinco receberam, a cada três dias, doses de metal de 0,8 mg Kg⁻¹. Esta dosagem é segura já que, Keefer et al. (1998) aplicaram a quantidade de

zinco de $431 \text{ mg Kg}^{-1}_{\text{rato}}$ e não relataram nenhuma toxicidade ou morte dos animais.

Na Tabela 19 são apresentadas as porcentagens médias das reduções das áreas das feridas dos camundongos dos grupos: controle negativo (CN), que não receberam tratamento, controle positivo tratado com solução de ácido acético (CPAA), controle positivo que recebeu solução de zinco (CPZn), tratado com gel de nanopartículas de quitosana (Nano) e que recebeu aplicação tópica de gel de nanopartículas incorporadas com zinco (Nano+Zn).

Tabela 19 - Porcentagens de reduções das lesões dos camundongos do grupo CN, CPAA, CPZn, Nano e Nano+Zn.

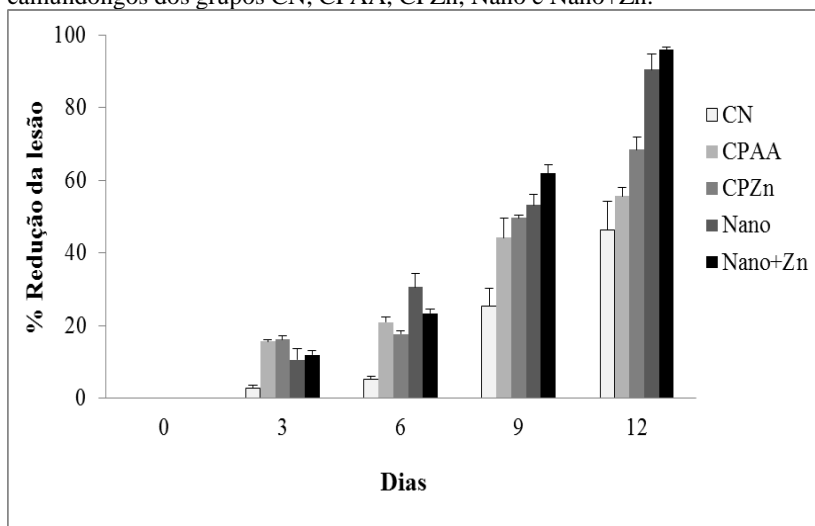
Dias	CN	CPAA	CPZn	Nano	Nano+Zn
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	2,7±0,8 ^{ab}	15,7±0,4 ^{cd}	16,2±1,0 ^{cd}	10,7±3,0 ^{bce}	12,0±1,2 ^{ce}
6	5,2±0,8 ^{ae}	21,0±1,4 ^{cf}	17,7±1,1 ^{cf}	30,7±3,6 ^g	23,5±1,1 ^{df}
9	25,5±4,8 ^{fg}	44,3±5,4 ^h	49,7±0,8 ^{hi}	53,3±2,8 ^{il}	62,0±2,4 ^{jk}
12	46,5±7,9 ^l	55,7±2,4 ^{ij}	68,5±3,5 ^k	90,5±4,3 ^m	96,1±0,7 ^m

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Como pode ser visualizado na Tabela 19, no último dia de tratamento, ambos os géis contendo nanopartículas de quitosana causaram uma importante contração nas lesões dos camundongos, apresentando diferença significativa, a um nível de significância de 5%, quando comparado ao grupos controle (CN, CPAA e CPZn) os quais não continham nanopartículas poliméricas.

Para melhor visualização dos resultados, na Figura 35 é apresentada a representação gráfica da média das áreas das feridas de todos os grupos experimentais.

Figura 35 - Representação gráfica da média das áreas das feridas dos camundongos dos grupos CN, CPAA, CPZn, Nano e Nano+Zn.



Ao exame macroscópico, no terceiro dia de tratamento, as feridas dos animais tratados tanto com gel de nanopartículas quanto com nanopartículas incorporadas com zinco, apresentaram uma crosta de coloração vermelho escuro uniforme. Neste período, a redução média da lesão para o grupo Nano foi de 10,7% e para o grupo Nano+Zn foi de 12%. Não houve diferença significativa nas reduções observadas entre estes dois grupos. Segundo Eurides (1995/1996), inicialmente, uma ferida é preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato formando uma crosta que a isola do meio ambiente, portanto, esta formação é benéfica durante a regeneração do tecido.

Neste mesmo período, as lesões dos animais que não receberam tratamento tiveram uma redução de apenas 2,7% enquanto que os grupos CPAA e CPZn apresentaram reduções de 15,7 e 16,2%, respectivamente. Embora os tamanhos das lesões dos grupos controles positivos não terem diferido estatisticamente dos grupos Nano e Nano+Zn, as reduções foram um pouco maiores, pois, tanto o ácido acético quanto o zinco atuaram como agentes antimicrobianos.

No sexto dia as feridas dos dois grupos tratados com gel apresentaram aspecto semelhante ao observado no terceiro dia, mas as bordas mostraram-se irregulares. Neste período, a redução média nas lesões do grupo Nano foi de 30,7%, valor este, estatisticamente maior do que os observados para os demais grupos.

No nono dia, pôde-se observar que nos grupos Nano e Nano+Zn, as células da epiderme migraram mais facilmente através da ferida úmida do que sob as feridas secas referentes ao CN. Nesta etapa, a redução no tamanho das feridas dos animais tratados com gel contendo zinco se destacou (62%) e foi significativamente maior do que a contração observada para os outros grupos. De acordo com Khodja et al. (2013), as células da epiderme podem migrar a uma velocidade de 0,5 mm dia⁻¹ na superfície de uma ferida úmida, enquanto que sob a crosta de uma ferida seca, esta migração é duas vezes mais lenta.

No último dia de tratamento, a reepitelização das feridas dos grupos Nano e Nano+Zn não diferiram significativamente entre si, as reduções foram de 90,5 e 96,1%, respectivamente. Apesar de o zinco ter atuado como agente antimicrobiano, auxiliando no combate de microrganismos contidos nas lesões, a pequena quantidade de metal que foi incorporada às nanopartículas não contribuiu expressivamente na cicatrização das feridas. Todos os grupos controle apresentaram porcentagens de redução de lesão estatisticamente inferiores aos grupos que receberam aplicação de gel.

Os géis contendo nanopartículas mostraram-se mais eficientes no tratamento de lesões cutâneas, do que outros produtos à base de quitosana encontrados na literatura. Mi et al. (2001) avaliaram a atividade cicatrizante de membranas de quitosana em ratos e obtiveram apenas 71% de redução de lesão após 21 dias de tratamento.

Khodja et al. (2013) testaram a ação cicatrizante de hidrogéis, a base de PVA/quitosana, em queimaduras de segundo grau feitas em ratos, e observaram que após o 12º dia de tratamento, as lesões dos animais tratados com o gel reduziram 88% enquanto que as queimaduras dos ratos do grupo controle, cobertas com gaze de algodão, sofreram redução de 71%.




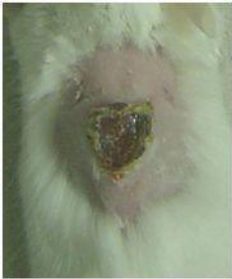


Garcia (2011) desenvolveu um gel contendo 2% de quitosana em solução aquosa de ácido láctico adicionado de álcool. O efeito cicatrizante deste gel foi avaliado no tratamento de lesões cutâneas de camundongos as quais foram totalmente regeneradas após 12 dias. Apesar de o tratamento com nanopartículas de quitosana ter alcançado redução de lesão ligeiramente menor do que a observada por este autor, o gel de nanopartículas contém quantidade de polímero quatro vezes menor (0,5%) do que o produto contendo álcool em sua composição.

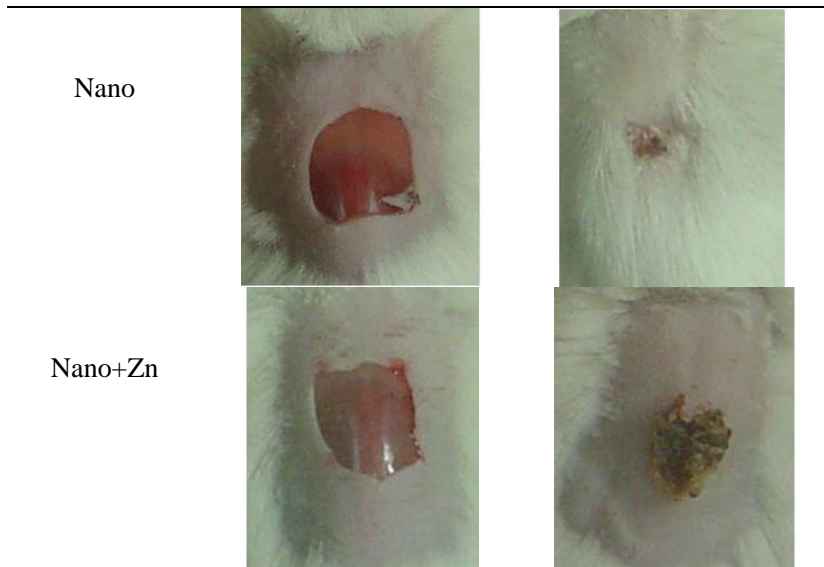
Mizuno et al. (2003) utilizaram filmes a base de quitosana na cicatrização de feridas de camundongos diabéticos e observaram a contração total dos ferimentos após 20 dias de tratamento. Pacientes com úlceras crônicas, como os diabéticos, têm baixos níveis de zinco no

soro sanguíneo, portanto, para o tratamento de lesões destes pacientes, a utilização do gel a base de nanopartículas incorporadas com zinco é muito interessante.

A Tabela 20 apresenta imagens de lesões de um animal de cada grupo experimental no primeiro e último dia de tratamento.

Tabela 20 – Imagem das lesões no primeiro e último dia de tratamento dos grupos experimentais.

Grupo experimental	Dia 0	Dia 12
CN		
CPAA		
CPZn		



Na maior parte dos animais tratados com o gel de nanopartículas, no 12º dia de tratamento, ficou claro o crescimento de pelos no local da lesão indicando que as nanopartículas não afetaram o desenvolvimento das células progenitoras que formam o folículo piloso, como mostrado na Tabela 20.

Pode-se notar que a lesão referente ao grupo Nano foi quase que totalmente curada até o 12º dia. Para o grupo Nano+Zn esta visualização não é possível já que a casquinha da ferida não foi removida antes da imagem ser obtida. No entanto, a medida da área da lesão não diferiu estatisticamente da obtida para o grupo Nano como mostrado na Tabela 19.

A rápida redução das lesões tratadas com os géis pode ser atribuída à rápida migração da epiderme devido ao ambiente hidratado já que os géis a base de nanopartículas de quitosana são constituídos por aproximadamente 99,5% de água. Alemdaroglu et al. (2006) investigaram a utilização de gel de quitosana na cicatrização de queimadura em ratos e também observaram que o gel proporcionou uma rápida e melhor epiteliação do que os animais do grupo controle, os quais não receberam tratamento.

Os resultados apresentados demonstram o potencial uso de nanopartículas de quitosana como agente cicatrizante, já que, o gel diminui potencialmente os riscos de infecção local pela exposição do

ferimento, pois evita que corpos estranhos sejam introduzidos na lesão. A quitosana, por sua vez, induziu a migração celular, ativando as funções dos leucócitos, fibroblastos e também dos macrófagos, os quais são células que intervêm em defesa do organismo contra infecções (WANG et al., 2008), acelerando a regeneração epitelial. A sinergia destas propriedades juntamente aos ambientes úmidos mantidos pelos géis promoveu condições ótimas para um processo de cura rápido.

5 CONCLUSÕES

O estudo apresentado neste trabalho permite concluir que foi possível produzir nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica, com tamanho e potencial zeta desejados, sendo que, o gel composto por essas partículas apresentou importante ação cicatrizante.

Os resultados também permitem concluir que:

- A quitosana *in natura* da marca Purifarma apresenta grau de desacetilação de 81,9% e massa molar de 111,01 kDa;

- Em relação à análise de diferentes razões de QTS:TPP na formação das nanopartículas, a melhor proporção foi de 3:1, onde as partículas apresentaram potencial zeta de 31,6 mV e tamanho médio de 82,5 nm. A imagem de MET destas partículas mostrou tamanho uniforme e coerente com o encontrado por espalhamento de luz dinâmico;

- Os melhores parâmetros para a produção de nanopartículas de quitosana são pH 4,4, concentração de ácido acético de 0,1 M e proporção de QTS:TPP de 3:0,8. Nestas condições, o tamanho médio das partículas obtidas foi de 76,2 nm e potencial zeta de 32,6 mV;

- O estudo da influência do tempo de agitação na formação de nanopartículas mostrou que o período de 30 min foi suficiente para a formação de nanopartículas com tamanho médio de 73,7 nm e potencial zeta de 33,1 mV;

- As melhores condições para promover a adsorção de zinco às nanopartículas de quitosana foram: temperatura ambiente; 8 h de agitação magnética e concentração da solução de Zn^{+2} de 40 mg g_{nano}^{-1} . O teste de espectroscopia de absorção atômica em chama revelou que, nestas condições, as nanopartículas incorporaram 84,4% de Zn^{+2} ou 33,8 mg g_{nano}^{-1} ;

- A análise elementar das nanopartículas incorporadas com zinco mostrou que estas possuem em sua composição, em média, 55,7% de carbono, 6,8% de nitrogênio, 30,8% de oxigênio, 4,6% de fósforo proveniente do TPP e 2,1% de zinco, mostrando que o metal foi adsorvido pela cadeia polimérica;

- O espectro de FTIR das nanopartículas apresentou deslocamentos das bandas referentes aos principais grupos funcionais da quitosana $CONH_2$ e NH_2 , mostrando que houve interação destes com o TPP, comprovando a formação das nanopartículas. Devido ao aumento nas intensidades das bandas relativas aos grupos NH_2 e CH_3 das

nanopartículas adsorvidas de zinco, constata-se que a complexação do metal às nanopartículas foi obtida com sucesso;

- Através das análises termogravimétricas, também é possível comprovar a formação das nanopartículas já que a temperatura de decomposição do biopolímero foi de 323,8 °C e a das Nano e Nano+Zn diminuíram para 304,6 °C e 267,6 °C, respectivamente;

- Em relação ao teste de halo, não foi observada a formação de halo de inibição para nenhuma das amostras, nos ensaios com *E. coli*. Já com a bactéria *S. aureus*, com a quitosana *in natura* não houve formação de halo, mas para as nanopartículas e nanopartículas incorporadas com zinco, foram obtidos halos de 2,39 e 1,67 cm, respectivamente;

- Os testes de CIM e CBM mostraram que a quitosana *in natura* não apresentou atividade antimicrobiana e bactericida contra as duas bactérias testadas. Em relação a *E. coli*, todas as concentrações inibitórias para as nanopartículas puras e incorporadas com zinco não diferiram entre si (26 mg mL⁻¹). A concentração de 5 mg mL⁻¹ de nanopartículas foi capaz de inibir e matar a *S. aureus*, enquanto que o teor de nanopartículas incorporadas com zinco necessária foi maior, de 8,66 mg mL⁻¹;

- O gel composto por nanopartículas de quitosana apresentou ação cicatrizante significativa após 12 dias de tratamento em camundongos, chegando a 90,5% de cicatrização enquanto que, com o grupo não tratado foi alcançada uma redução de lesão estatisticamente menor, de 46,5%;

- A pequena quantidade de zinco que foi incorporada às nanopartículas não contribuiu expressivamente na cicatrização das feridas quando comparado às nanopartículas sem o metal adsorvido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 1, p. 5-28, 2004.

AGREN, M. S.; OSTENFELD, U.; KALLEHAVE, F.; GONG, Y.; RAFFN, K.; CRAWFORD, M. E.; KISS, K.; FRIIS-MØLLER, A.; GLUUD, C.; JORGENSEN, L. N. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial evaluating topical zinc oxide for acute open wounds following pilonidal disease excision. **Wound Repair Regen**, n. 14, v. 5, p. 526-535, 2006.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n.4, p. 566-574, 2009.

ALBUQUERQUE, R. B.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de listeria monocytogenes em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 10, n. 5, p. 260-274, 2009.

ALEMDAROGLU, C.; DEGIM, Z.; ÇELEBI, N.; ZOR, F.; OZTÜRK, S.; ERDOGAN, D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v. 32, n. 3, p. 319-327, 2006.

ALLAN, C. R.; HADWIGER, L. A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell composition. **Experimental Mycology**, v.3, n. 1, p.285-287, 1979.

ALMEIDA, T. L. **Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo - SP, 2009.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2007.

ANTONOV, S. F.; KRYZHANOVYSKAYA, E. V.; FILIPPOV, Y. I.; SHINKAREV, S. M.; FROLOVA, M. A. Study of wound-healing properties of chitosan. **Russian Agricultural Sciences**, v. 34, n. 6, p. 426-427, 2008.

AOUADA, M. R. M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2009.

ARRUDA, E. J. **Concentração e purificação de β -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 1999.

AZEVEDO, J. R.; SIZILIO, R. H.; BRITO, M. B.; COSTA, A. M. B.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS, M. R. V.; LIRA, A. A. M.; NUNES, R. S. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-tpg contendo insulina. **VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimétrica** - São Pedro – SP, 2010.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BEPPU, M. M. **Estudo da calcificação “in vitro” de quitosana**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 1999.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BHADRA, P.; MITRA, M. K.; DAS G. C.; DEY, R.; MUKHERJEE, S. Interaction of chitosan capped ZnO nanorods with *Escherichia coli*. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 5, p. 929-937, 2011.

BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2011.

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

BODMEIER, R.; OH, K. H.; PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. **Drug Development & Industrial Pharmacy**, v. 15, n. 9, p. 1475-1494, 1989.

BORIWANWATTANARAK, P.; INGKANINAN, K.; KHORANA, N.; VIYUCH, J. Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as controlled-release matrix. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 3, p. 205-218, 2008.

BOWMAN, K.; LEONG, K. W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 117-128, 2006.

BUITRAGO, S.; MARTIN, T. E.; TETENS-WOODRING, J.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; WILDING, G. E. Safety and Efficacy of Various Combinations of Injectable Anesthetics in BALB/c Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 11-17, 2008.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.

CAMPOS, M.; CORDI, L.; DURÁN, N.; MEI, L. Antibacterial activity of chitosan solutions for wound dressing. **Macromolecular Symposia**, v. 245-246, n. 1, p. 515-518, 2006.

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação**

controlada de fármacos. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2007.

CANELLA, M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CASTRO, C. M. M. B.; AGUIAR, J. L. A.; MELO, F. A. D.; SILVA, W. T. F.; MARQUES, E.; SILVA, D. B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 2, p. 119-123, 2004.

CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOATI, S. F.; DE RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, cap. 3, p. 51-80, 2005.

CHEN, L. Y.; SUBIRADE, M. Chitosan/beta-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 6041-6053, 2005.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement.** CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

CRUZ-ROMERO, M. C.; MURPHY, T.; MORRIS, E.; KERRY, J. P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 393-397, 2013.

CUI, Z.; MUMPER, R. J. Chitosan - based nanoparticles for topical genetic immunization. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 409-419, 2001.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DARMADJI P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.

DOUGLAS, K. L.; PICCIRILLO, C. A.; TABRIZIAN, M. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, n. 115, v. 3, p. 354-361, 2006.

DU, W-L.; NIU, S-S.; XU, Y-L.; XU, Z-R.; FAN, C-L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 385-389, 2009.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Gene therapy and wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 79-92, 2007.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BALLETI, M. E.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTES, M. C. S.; NETO, N. S. T.; CAMPOS, V. A.; LEMOS, R. C.; JUNIOR, P. L. S. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius). **Revista da FZVA**, v. 2/3, n. 1, p. 30-40, 1995/1996.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21-27, 2012.

FAURE, H.; PEYRIN, J. C.; RICHARD, M. J.; FAVIER, A. Parenteral supplementation with zinc in surgical patients corrects postoperative serum-zinc drop. **Biological Trace Element Research**, v. 30, n. 1, p. 37-45, 1991.

FU, X.; SHEN, Y.; JIANG, X.; HUANG, D.; YAN, Y. Chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups for antimicrobial finishing of cotton fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 221-227, 2011.

GALEMBECK, F.; RIPPEL, M. M. Nanocompósitos poliméricos e nanofármacos: fatos, oportunidades e estratégias. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 9-21, 2004.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; McCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2-3, p.65-73, 2005.

GARCIA, R. B.; SILVA, D. L. P.; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. S. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 486-492, 2008.

GARCIA, S. J. F. **Avaliação do efeito cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2011.

GLEITER, H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. **Acta Materialia**, v. 48, n. 1, p. 1-29, 2000.

GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; LYMAN, C. E.; LIFSHIN, E.; SAWYER, L.; MICHAEL, J. R. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalyses**, 3a ed., Springer Science - Business Media, LLC, 2003.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2007.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 4-5, p. 427-437, 2005.

GUIBAL, E.; SWEENEY, N. V. O.; VINCENT, T.; TOBIN, J. M. Sulfur derivatives of chitosan for palladium sorption. **Reactive & Functional Polymers**, v. 50, n. 2, p. 149-163, 2002.

GUPTA, V. K.; KARAR, P. K. Optimization of process variables for the preparation of chitosan-alginate nanoparticles. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 78-80, 2011.

HAIDER, S.; PARK, S. Preparation of the electrospun chitosan nanofibers and their applications to the adsorption of Cu(II) and Pb(II) ions from an aqueous solution. **Journal of Membranes Science**, v. 328, n. 1-2, p. 90-96, 2009.

HEYLAND, D. K.; JONES, N.; CVIJANOVICH, N. Z.; WONG, H. Zinc supplementation in critically ill patients: a key pharmaconutrient?. **Journal of Parenteral & Enteral Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 509-519, 2008.

HIGUCHI, C. I. **Chitosan-xantan hydrogel: a matrix of inclusion and the delivery os drugs**. Université de Sherbrooke, Québec, 2002.

HON, D. N-S.; TANG, L-G. Chelation of Chitosan Derivatives with Zinc Ions. I. *O,N*-Carboxymethyl Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 77, n. 10, p. 2246-2253, 2000.

HU, B.; PAN, C.; SUN, Y.; HOU, Z.; YE, H.; HU, B.; ZENG, X. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7451-7458, 2008.

ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, n. 1, p. 1-9, 2012.

ISHIHARA, M.; NAKANISHI, K.; ONO, K.; SATO, M.; KIKUCHI, M.; SAITO, Y.; YURA, H.; MATSUI, T.; HATTORI, H.; UENOYAMA, M.; KURITA, A. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 833-840, 2002.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879-884, 2007.

JAYASREE, A.; SASIDHARAN, S.; KOYAKUTTY, M.; NAIR, S.; MENON, D. Mannosylated chitosan-zinc sulphide nanocrystals as fluorescent bioprobes for targeted cancer imaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 37-43, 2011.

JIN, H.; XU, Y.; SHEN, J.; PING, Q.; SU, Z.; YOU, W. Chitosan-glutathione conjugate-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Promising carriers for oral thymopentin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 51-57, 2011.

JUNG, B. O.; KIM, C. O.; CHOI, K. K.; LEE, Y. M.; KIM, J. J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 72, n. 13, p. 1713-1719, 1999.

KAFSHGARI, M. H.; KHORRAM, M.; MANSOURI, M.; SAMIMI, A.; OSFOURI, S. Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system. **Iranian Polymer Journal**, v. 21, n. 2, p. 99-107, 2012.

KAVAZ, D.; ÇIRAK, T.; ÖZTÜRK, E.; BAYRAM, C.; DENKBA, E. B. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles for diverse biomedical applications. **Functionalized Nanoscale Materials, Devices and Systems**, v. 2, n. 1, p. 313-320, 2008.

KEEFER, K. A.; IOCONO, J. A.; EHRLICH, H. P. Zinc-containing wound dressings encourage autolytic debridement of dermal burns. **Wounds**, v. 10, n. 2, p. 54-58, 1998.

KHAN, R.; KAUSHIK, A.; SOLANKI, P. R.; ANSARI, A. A.; PANDEY, M. K.; MALHOTRA, B. D. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, n. 2, p. 207-213, 2008.

KHODJA, A. N.; MAHLOUS, M.; TAHTAT, D.; BENAMER, S.; YOUCEF, S. L.; CHADER, H.; MOUHOUB, L.; SEDGELMACI, M.; AMMI, N.; MANSOURI, M. B.; MAMERI, S. Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: Pharmacological and toxicological tests. **Burns**, v. 39, n. 1, p. 98-104, 2013.

KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 313-317, 2002.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-66, 2010.

KORTRIGHT, J. B.; THOMPSON, A. C. **X-ray data booklet, Section x-ray emission energies**, Second edition, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, Berkeley, California, 2001.

KUCHARZEWSKI, M.; BRAZIEWICZ, J.; MAJEWSKA, U.; GÓZDZ', S. Copper, zinc, and selenium in whole blood and thyroid tissue of people with various thyroid diseases. **Biological Trace Element Research**, v. 93, n. 1-3, p. 9-18, 2003.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 117-120, 1998.

LANSDOWN, A. B. G.; PATH, F. R. C.; MIRASTSCHUJSKI, U.; STUBBS, N.; SCANLON, E.; AGREN, M. S. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 1, p. 2-16, 2007.

LAUS, R.; COSTA, T. G.; SZPOGANICZ, B.; FAVERE, V. T. Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1-3, p. 233-241, 2010.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.

LEE, S. T.; MI, F. L.; SHEN, Y. J.; SHYU, S. S. Equilibrium and kinetic studies of copper ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. **Polymer**, v. 42, n. 5, p. 1879-1892, 2001.

LI, H., e YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 2, p. 269-274, 2001.

LIMA, P. S. **Estudos calorimétricos da adsorção e liberação da pirimetamina e sulfadiazina em matriz de quitosana quimicamente modificada**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão - SE, 2009.

LIU, C-G.; DESAI, K. G. H.; CHEN, X-G.; PARK, H-J. Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1728-1733, 2005.

LIU, Y.; KIM, H-I. Characterization and antibacterial properties of genipin-crosslinked chitosan/poly(ethylene glycol)/ZnO/Ag nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 111-116, 2012.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4833-4841, 2003.

MACHOVÁ, E.; KVAPILOVÁ, K.; KOGAN, G.; ANDULA, J. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin-glucan complex from *Aspergillus niger*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 5, n. 4, p. 169-172, 1999.

MAO, H-Q; ROY, K.; TROUNG-LE, V. L.; JANES, A.; LIN, K. Y.; WANG, Y.; AUGUST, T.; LEONG, K. W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 3, p. 399-421, 2001.

MATHUR, N.K.; NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.

MEDEIROS, K. A. **Desenvolvimento e testes *in vitro* de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2011.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

METHACANON, P.; PRASITSILP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 2, p. 119-123, 2003.

MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental.** Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

MI, F-L.; SHYU, S-S-; WU, Y-B.; LEE, S-T.; SHYONG, J-Y.; HUANG, R-N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, n. 2, p. 165-173, 2001.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2011.

MIZUNO, K.; YAMAMURA, K.; YANO, K.; OSADA, T.; SAEKI, S.; TAKIMOTO, N.; SAKURAI, T.; NIMURA, Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 64A, n. 1, p. 177-181, 2003.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Vol. 1, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 496, 2009.

MOURA, C. M. **Avaliação da reação de desacetilação da quitina e estudo da secagem de *pellets* de quitosana para aplicação em filmes**

poliméricos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2008.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3-19, 2001.

MURAKAMI, K.; AOKI, H.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, S-I.; TAKIKAWA, M.; HANZAWA, M.; KISHIMOTO, S.; HATTORI, H.; TANAKA, Y.; KIYOSAWA, T.; SATO, Y.; ISHIHARA, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2012.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.

NACZK, M.; WILLIAMS, J.; BRENNAN, K.; LIYANAPATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*). **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 429-434, 2004.

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

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NASTI, A.; ZAKI, N. M.; DE LEONARDIS, P.; UNGPHAIBOON, S.; SANSONGSAK, P.; RIMOLI, M. G.; TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1918-1930, 2009.

NGUYEN, S.; WINNIK, F. M.; BUSCHMANN, M. D. Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 528-533, 2009.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249-252, 2002.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. **Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2006.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; MANFRON, M. P. Formulações de Confrey (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7/8, n. 1, p. 65-74, 2000/2001.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 139-147, 2002.

PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 44-54, 2008.

PARIZE, A. L. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2009.

PATALE, R. L.; PATRAVALE, V. B. O,N-carboxymethyl chitosan-zinc complex: A novel chitosan complex with enhanced antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 105-110, 2011.

PAULINO, A. T.; SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; NOZAKI. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 98-103, 2006.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa***

spp). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2010.

PETER, M. G. **Chitin and chitosan from animal sources.** In: Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes, (A. Steinbüchel series ed.; E. J. Vandamme, S. De Baets and A. Steinbüchel volume eds), Vol. VI, Weinheim: Wiley-VCH, p. 481-574, 2002.

PETER, M. G.; DOMARD, A.; MUZZARELLI, R. A. A. (Eds.), “**Advances in Chitin Chemistry**”, Vol. IV, University of Potsdam, Potsdam - Germany, 2000.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p. 2693-2700, 2004.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules - American Chemical Society**, v. 4, n. 6, p.1457-1465, 2003.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, P. A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded Polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

REJINOLD, N. S.; MUTHUNARAYANAN, M.; MUTHUCHELIAN, K.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 407-416, 2011.

RESENDE, J. M. **Revestimentos biodegradáveis para conservação do coco ‘Anão Verde’.** Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2007.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 80-86, 2000.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281-285, 1993.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029-7032, 1999.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. The Macmillan Press Ltd: London, p. 349, 1992.

ROSA, S. **Adsorção de corantes reativos utilizando sal quaternário de quitosana como adsorvente**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2009.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SATO, T.; ISHII, T.; OKAHATA, Y. *In vitro* gene delivery mediated by chitosan: effect of pH, serum and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. **Biomaterials**, v.22, n. 15, p.2075-2080, 2001.

SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2440-2449, 2006.

SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of desacetylation in chitin. **Biological Macromolecules**, v. 18, n. 3, p. 237-242, 1996.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.

SILVA, C. B. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do ácido acético em diferentes concentrações contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo - SP, 2007.

SILVA, S. S.; LUNA, S. M.; GOMES, M. E.; BENESH, J.; PASHKULEVA, I.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 6, p. 568-576, 2008.

SIMPSON, B. K.; GAGNÉ, N.; ASHIE, I. N. A.; NOROOZI, E. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). **Food Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25-44, 1997.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.

SOARES, N. M.; MOURA, C.; VASCONCELOS, S.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Obtenção e purificação de quitosana a partir de resíduos de camarão em escala piloto. **Revista Univap**, v. 10, n. 18, p. 88-92, 2003.

SORLIER, P.; ROCHAS, C.; MORFIN, I.; VITON, C.; DOMARD, A. Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degree of acetylation. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 4, p. 1034-1040, 2003.

SUDHARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v.6, n. 1, p. 257-272, 1992.

SUN, J.; RAO, S.; SU, Y.; XU, R.; YANG, Y. Magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles with immobilized metal ions for lysozyme adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 389, n. 1-3, p. 97-103, 2011.

TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M. F.; PINTADO, M. M. A quitosana como biomaterial odontológico: estado

da arte. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013.

TSAI, G. J.; SU, W. H.; CHEN, H. C.; PAN, C. L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, v. 68, n. 1, p. 170-177, 2002.

TSAI, M-L.; CHEN, R-H.; BAI, SHI-WEI.; CHEN, W-Y. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 2, p. 756-761, 2011.

TUBEK, S.; GRZANKA, P.; TUBEK I. Role of zinc in hemostasis: A review. *Biological Trace Element Research*, v. 121, n. 1, p. 1-8, 2008.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, n. 2, p. 105-115, 2001.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, T.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, v. 20, n. 15, p. 1407-1414, 1999.

UTYAMA, I. K. A.; ANDRADE, D.; WATANABE, E.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 4, n. 2, p. 202-207, 2007.

VIEIRA, R. S. **Adsorção competitiva dos íons cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2008.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; JANES, K.; BEHRENS, I.; KISSEL, T.; JATO, J. L. V.; ALONSO, M. J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics as Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 123-131, 2004.

WANG, C.; FU, X.; YANG, L. Water-soluble chitosan nanoparticles as a novel carrier system for protein delivery. **Chinese Science Bulletin**, v. 52, n. 7, p. 883-889, 2007.

WANG, G. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 11, p. 916-919, 1992.

WANG, W.; LIN, S.; XIAO, Y.; HUANG, Y.; TAN, Y.; CAI, L.; LI, X. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. **Life Sciences**, v. 82, n. 3-4, p. 190-204, 2008.

WANG, X.; DU, Y.; LIU, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 2004.

WILSON, B.; SAMANTA, M. K.; SANTHI, K.; KUMAR, K. P.; RAMASAMY, M.; SURESH, B. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 144-152, 2010.

XING, K.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits Escherichia coli and Staphylococcus aureus by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2-3, p. 127-133, 2009.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215-226, 2003.

YANG, L.; HSIAO, W. W.; CHEN, P. Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purifications of biopolymers and immunoadsorption. **Journal of Membrane Science**, v. 197, n. 1, p. 185-197, 2002.

YANG, X.; YANG, K.; WUA, S.; CHEN, X.; YU, F.; LI, J.; MAA, M.; ZHU, Z. Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze-

thawing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, n. 5, p. 606-611, 2010.

YEH, L. K.; CHEN, Y. H.; CHIU, C. S.; HU, F. R.; YOUNG, T. H.; WANG, I. J. The phenotype of bovine corneal epithelial cells on chitosan membrane. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 90A, n. 1, p. 18-26, 2009.

YONEKURA, L.; TAMURA, H.; SUZUKI, H. Chitosan and resistant starch restore zinc bioavailability, suppressed by dietary phytate, through different mechanisms in marginally zinc-deficient rats. **Nutrition Research**, v. 23, n. 7, 933-944, 2003.

ZENG, D.; WU, J.; KENNEDY, J. Application of a chitosan flocculant to water treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 135-139, 2008.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, n. 43, v. 7, p. 2956-2966, 2007.

ZHAO, L-M.; SHI, L-E.; ZHANG, Z-L.; CHEN, J-M.; SHI, D-D.; YANG, J.; TANG, Z-X. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 353-362, 2011.

ZHENG, L.Y; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

ANEXOS

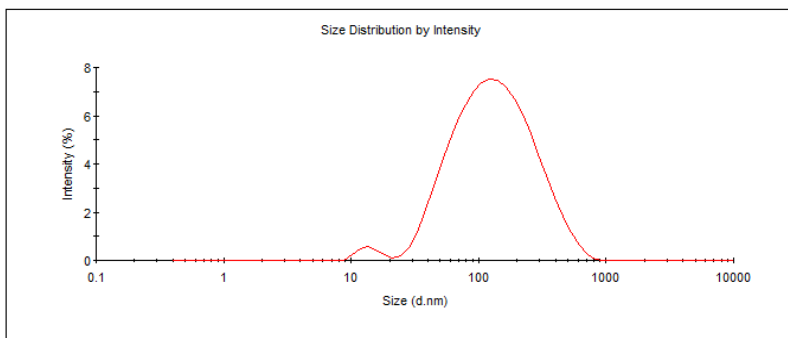


Figura A1 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 2:1.

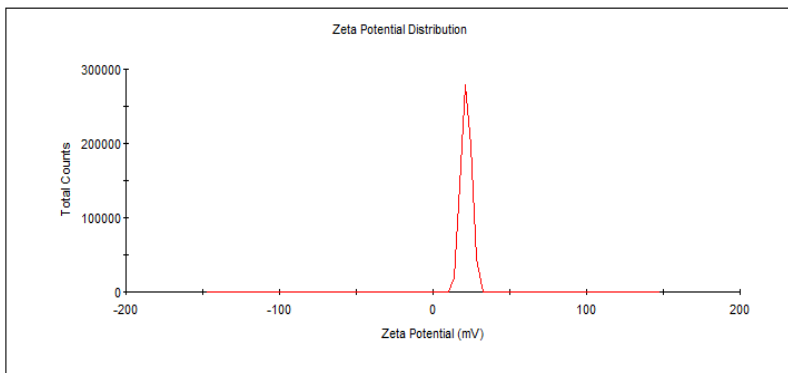


Figura A2- Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente à razão de 2:1.

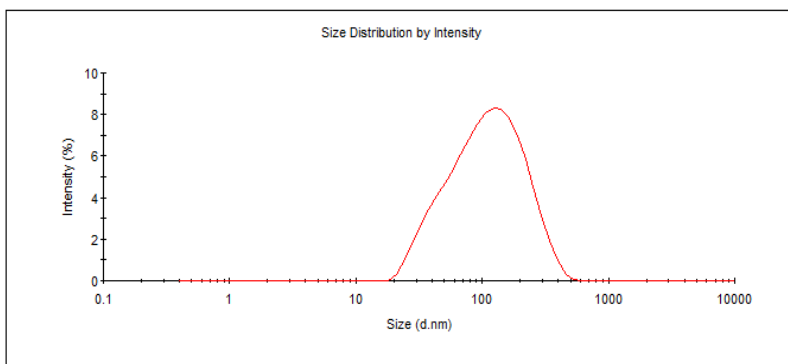


Figura A3 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 2,5:1.

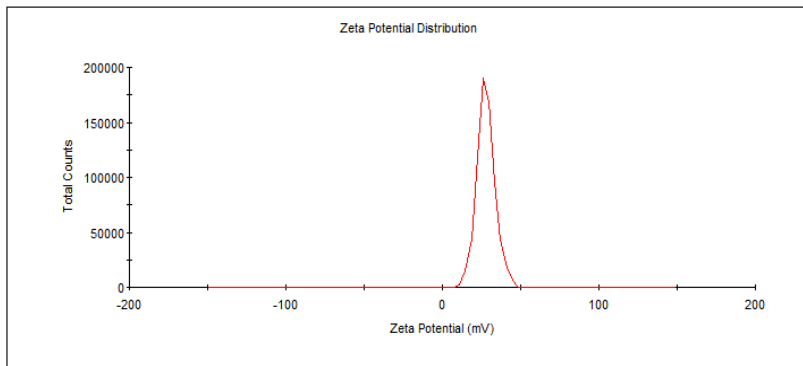


Figura A4 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 2,5:1.

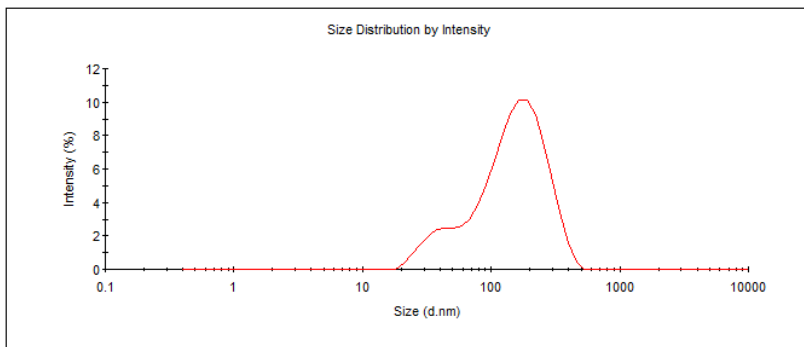


Figura A5 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 3,5:1.

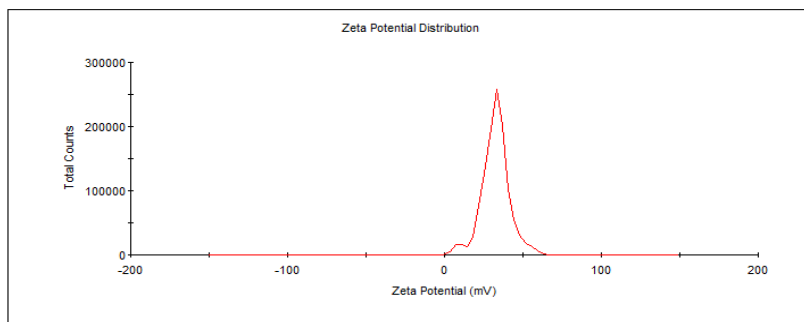


Figura A6 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 3,5:1.

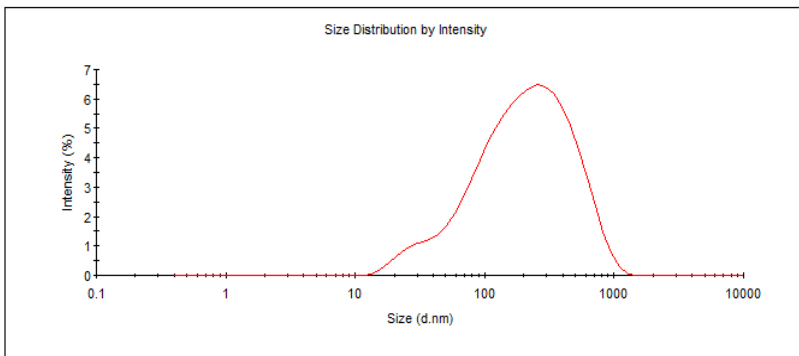


Figura A7 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 4:1.

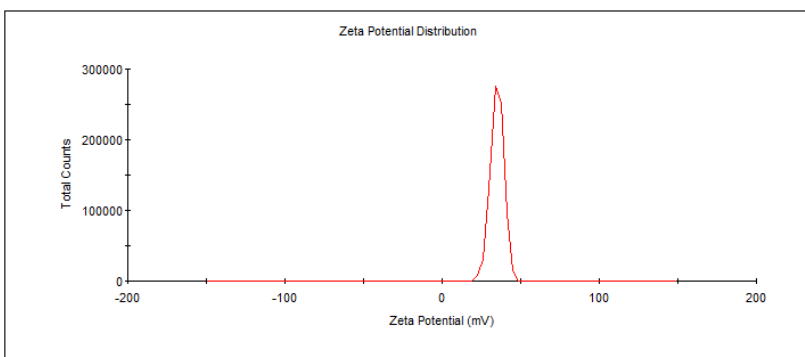


Figura A8 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 4:1.

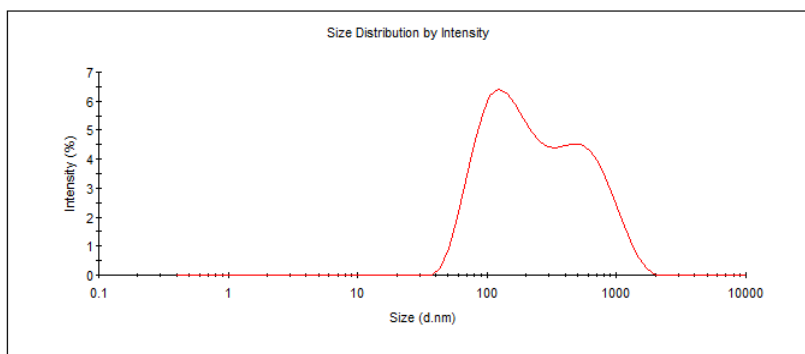


Figura A9 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 4,5:1.

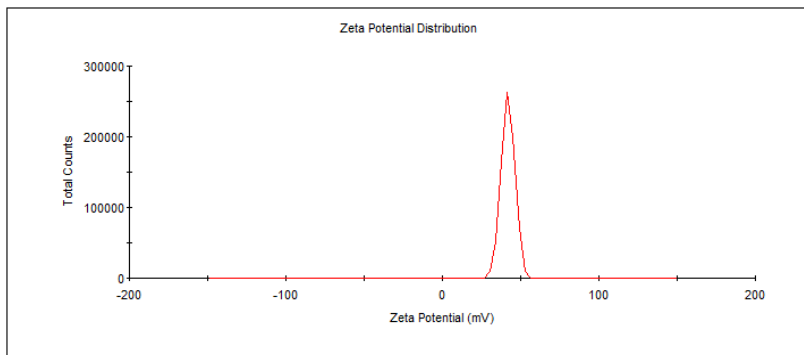


Figura A10 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 4,5:1.

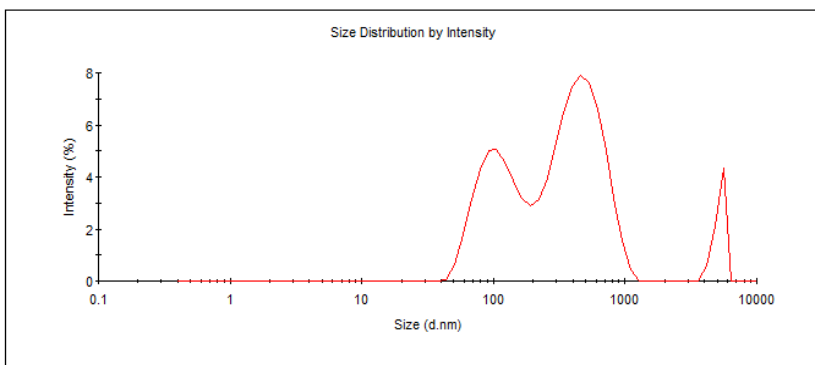


Figura A11 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 5:1.

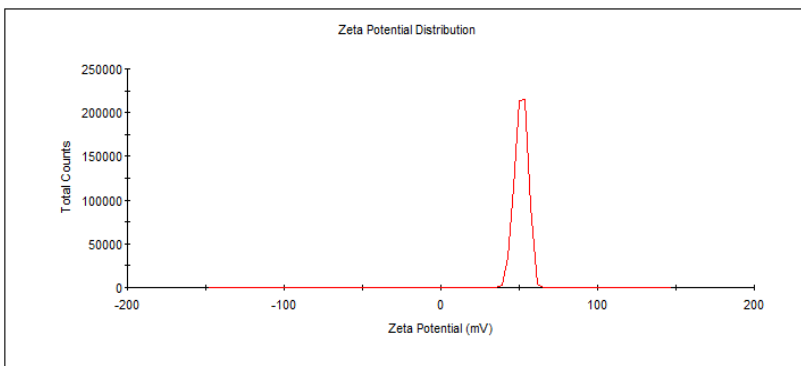


Figura A12 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 5:1.

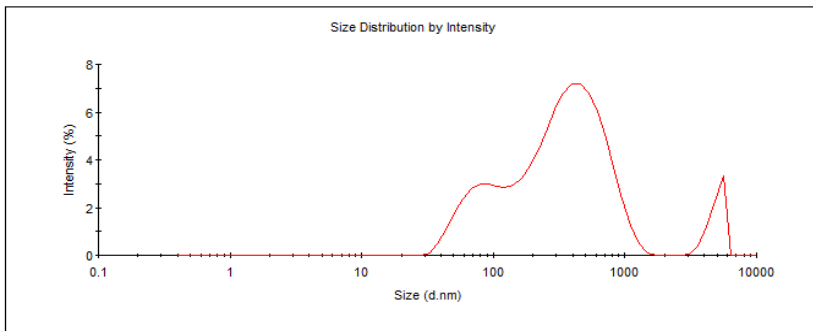


Figura A13 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de 5,5:1.

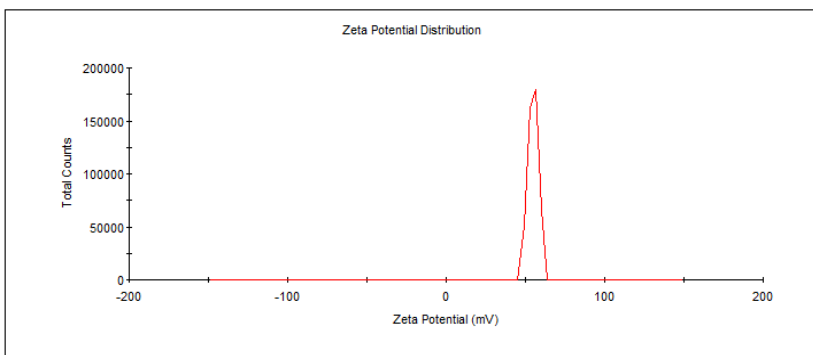


Figura A14 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de 5,5:1.

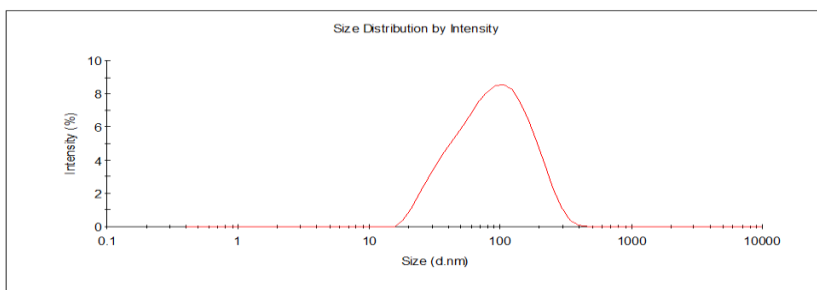


Figura A15 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 2 do planejamento experimental.

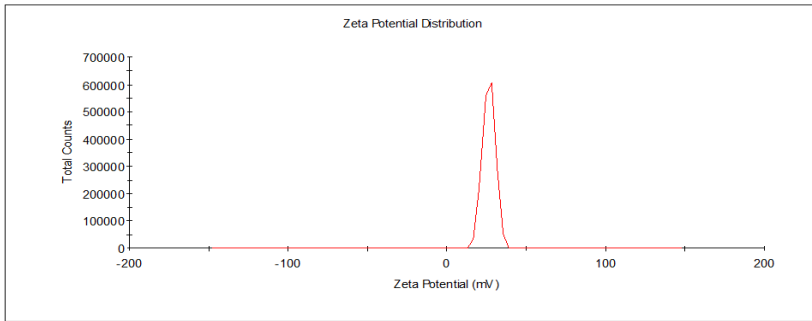


Figura A16 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 2 do planejamento experimental.

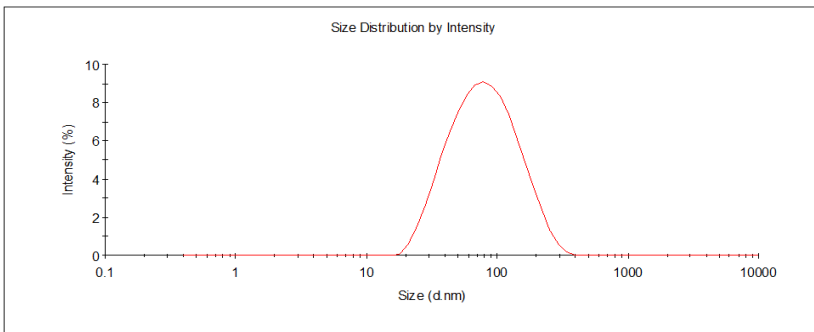


Figura A17 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 3 do planejamento experimental.

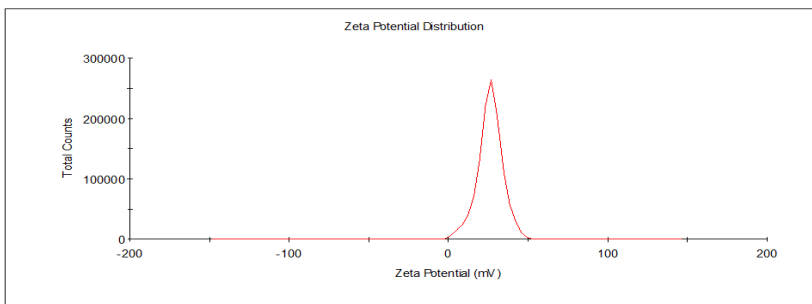


Figura A18 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 3 do planejamento experimental.

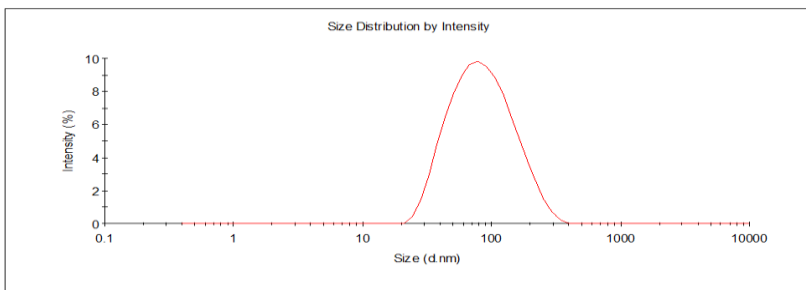


Figura A19 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 4 do planejamento experimental.

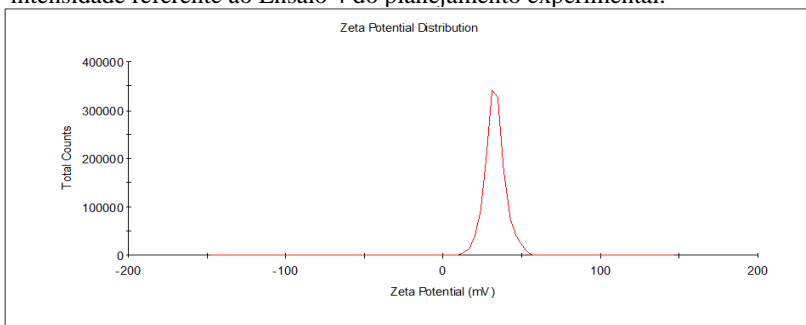


Figura A20 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 4 do planejamento experimental

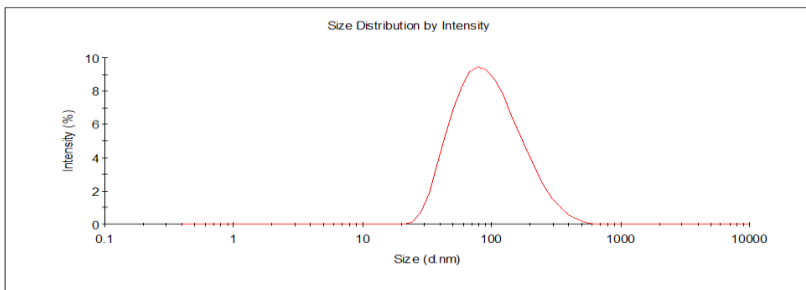


Figura A21 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 5 do planejamento experimental.

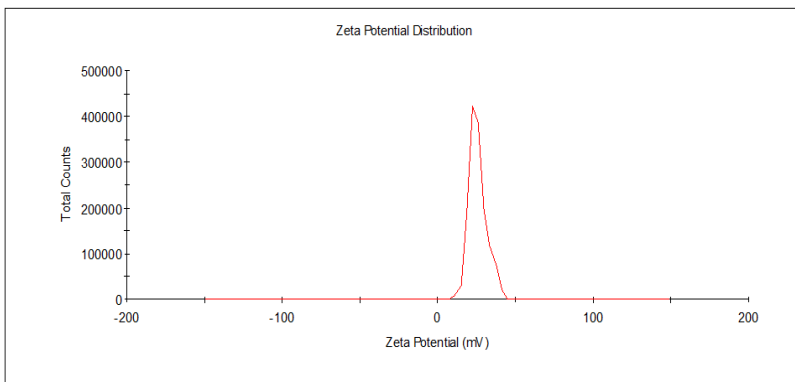


Figura A22 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 5 do planejamento experimental.

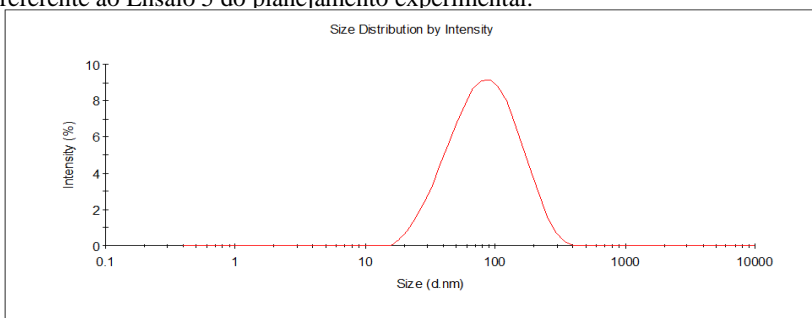


Figura A23 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 6 do planejamento experimental.

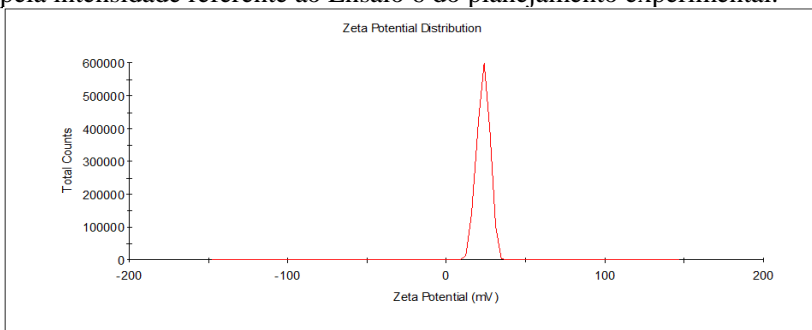


Figura A24 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 6 do planejamento experimental.

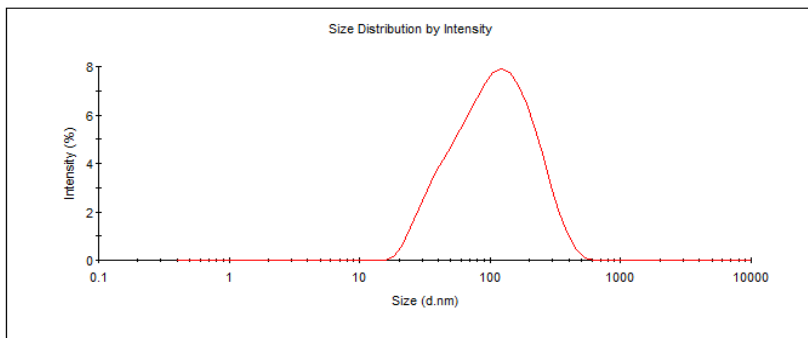


Figura A25 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 7 do planejamento experimental.

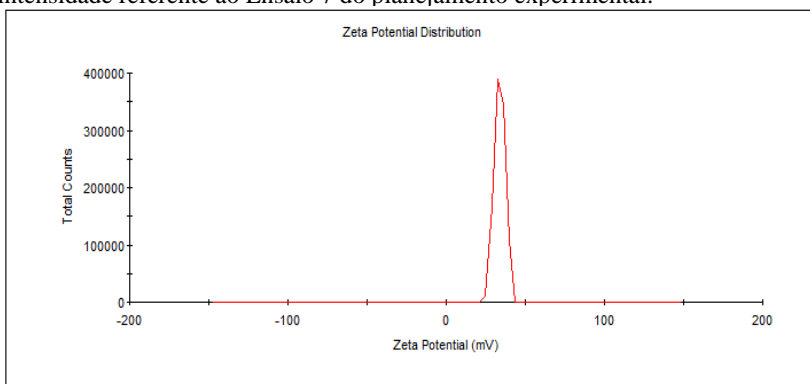


Figura A26 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 7 do planejamento experimental.

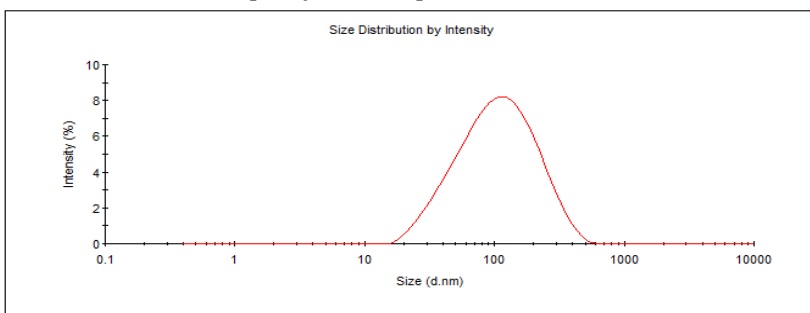


Figura A27 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana pela intensidade referente ao Ensaio 8 do planejamento experimental.

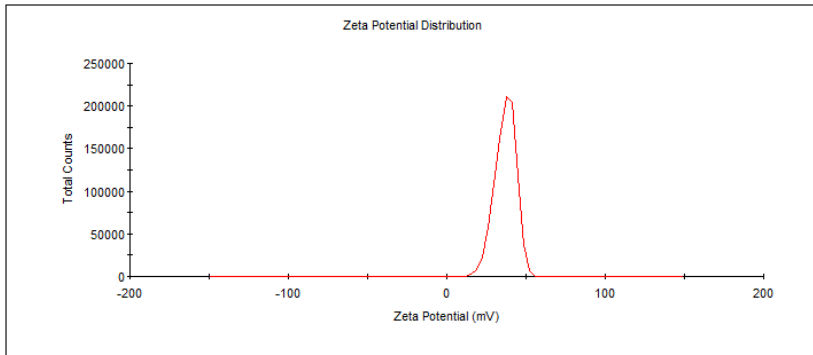


Figura A28 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de quitosana referente ao Ensaio 8 do planejamento experimental.

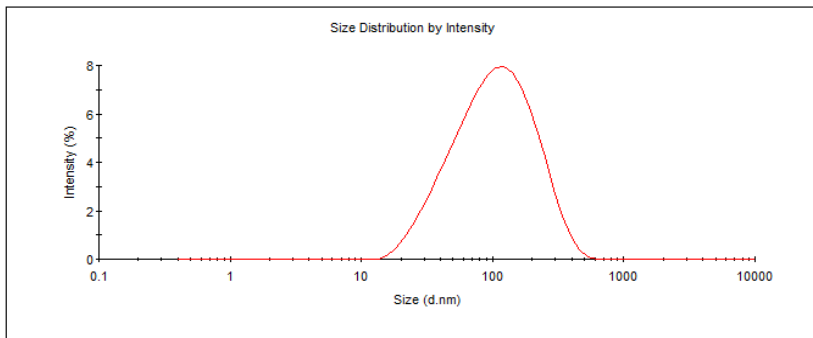


Figura A29 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 5 min de agitação.

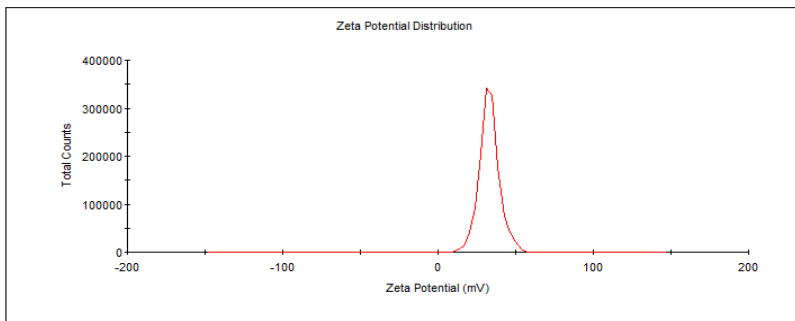


Figura A30 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 5 min de agitação.

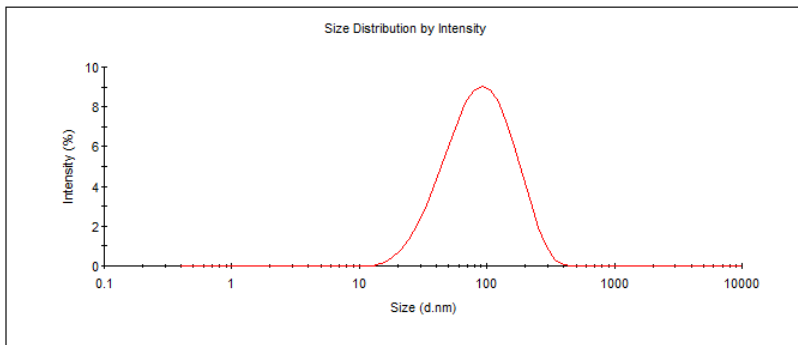


Figura A31 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 10 min de agitação.

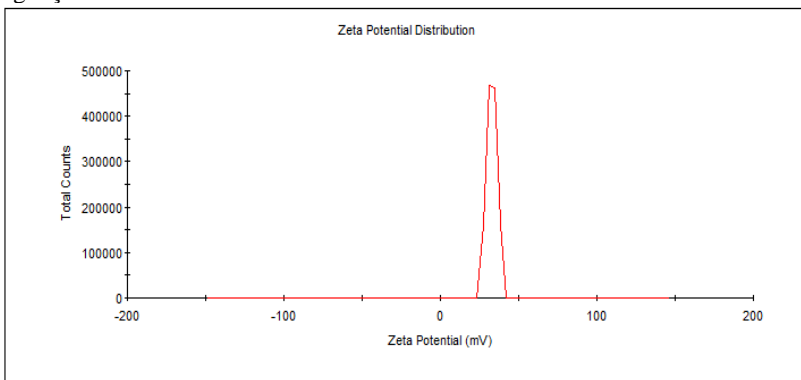


Figura A32 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 10 min de agitação.

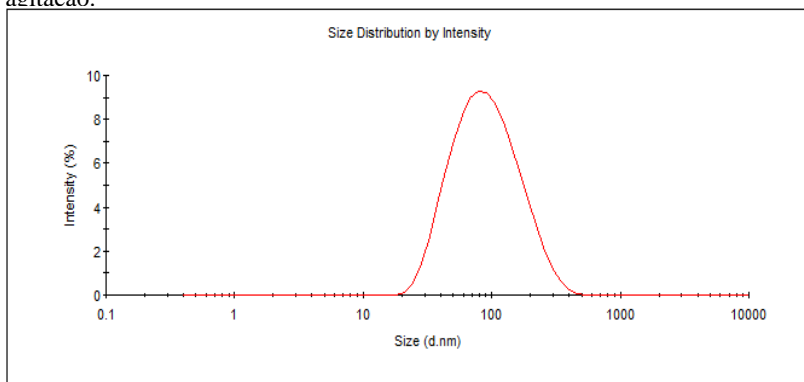


Figura A33 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 20 min de agitação.

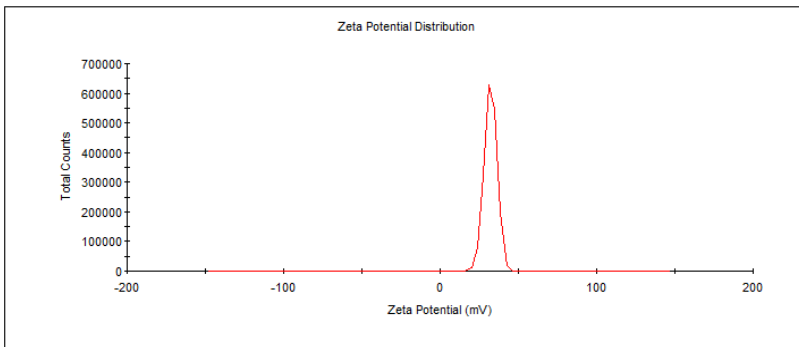


Figura A34 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 20 min de agitação.

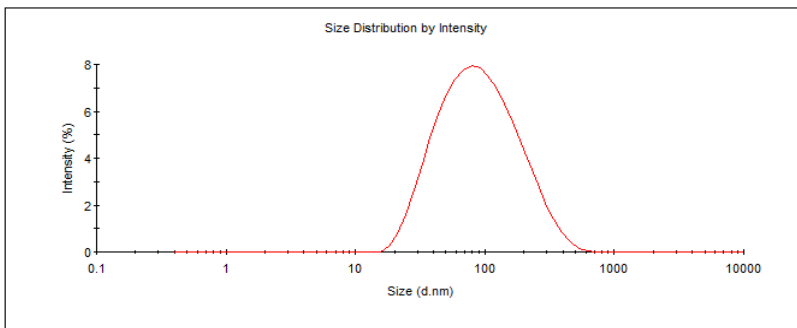


Figura A35 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 40 min de agitação.

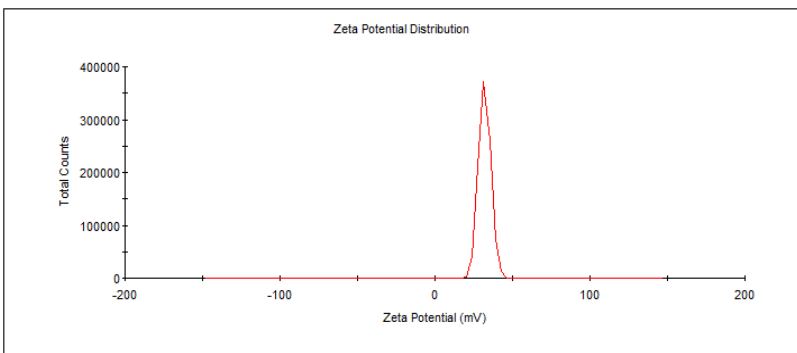


Figura A36 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 40 min de agitação.

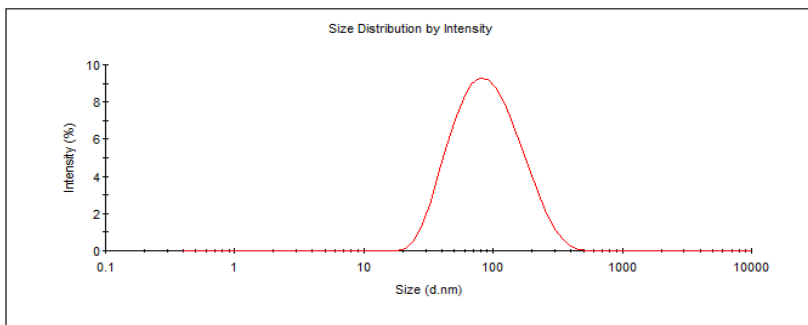


Figura A37 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 50 min de agitação.

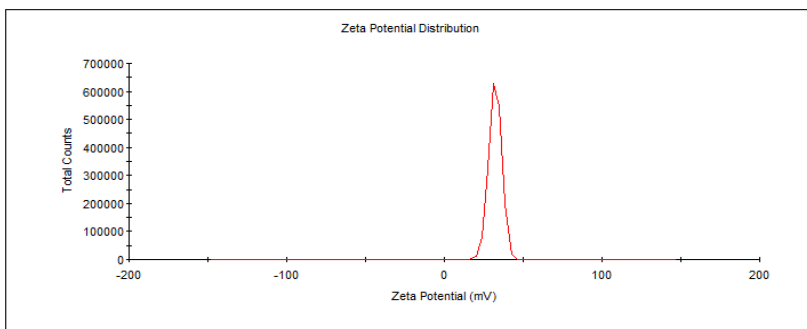


Figura A38 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 50 min de agitação.

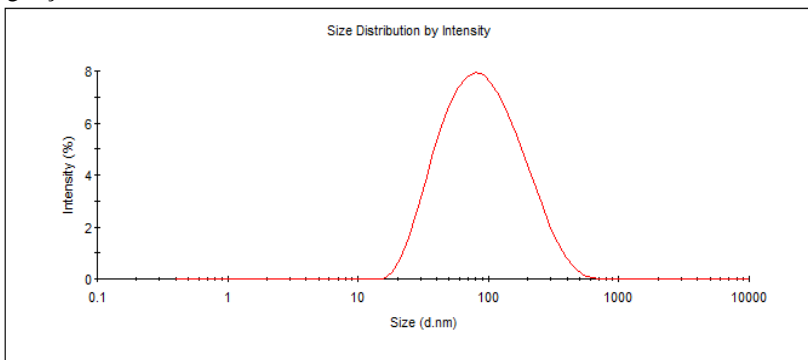


Figura A39 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em 60 min de agitação.

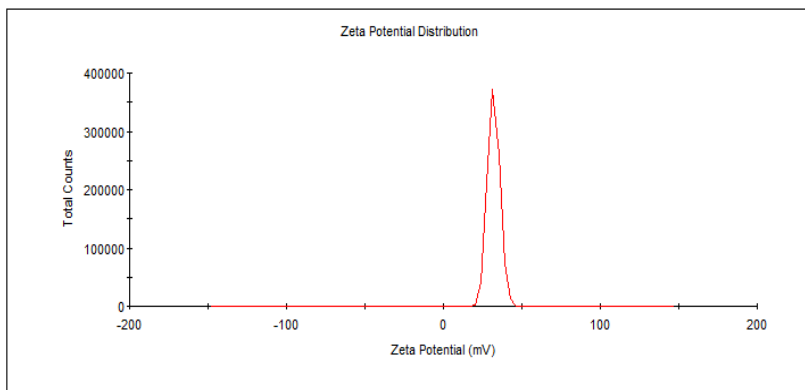
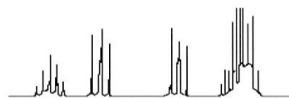


Figura A40 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas em 60 min de agitação.



**Central
de
Análises**



Universidade Federal de Santa Catarina - CFM - Departamento de Química

Resultado nº 198/12

Amostra: Ensaio Planejamento Experimental 1, 2 3, 4 e Solução inicial.

Interessado: Andréia Lange de Pinho Neves,

Responsável pelo pedido: a mesma.

RESULTADO

Amostras	Parâmetros	Zinco (mg/L)
Ensaio Planejamento Experimental 1		12,50
		13,45
Ensaio Planejamento Experimental 2		16,10
		16,15
Ensaio Planejamento Experimental 3		16,55
		17,00
Ensaio Planejamento Experimental 4		14,80
		15,35
Solução Inicial		22,05
		22,25

Obs.: 1 - Os procedimentos de amostragem foram realizados pelo cliente.

Florianópolis, 21 de setembro de 2012.

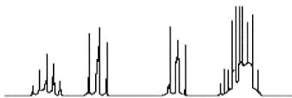
Química Jucélia Beatriz Dario
CRQ/XIII 13100014

Campus Universitário – Trindade – Florianópolis – SC - Fone (048) 3721-6826 / 6827 – Fax (048)3721-6888
CEP 88040-900 – email: centrala@qmc.ufsc.br

Figura A41 – Laudo de absorção atômica do primeiro planejamento experimental.



Central de Análises



Universidade Federal de Santa Catarina - CFM - Departamento de Química

Resultado nº 205/12

Amostra: Ensaio 2º Planejamento Experimental 1, 2, 3, e 4 e Solução Inicial.

Interessado: Andréia Lange de Pinho Neves,

Responsável pelo pedido: a mesma.

RESULTADO

Parâmetros Amostras	Zinco (mg/L)
Ensaio 2º Planejamento Experimental 1	7,30 7,35
Ensaio 2º Planejamento Experimental 2	3,06 2,88
Ensaio 2º Planejamento Experimental 3	8,07 8,15
Ensaio 2º Planejamento Experimental 4	3,54 3,46
Solução Inicial	18,80 19,25

Obs.: 1 - Os procedimentos de amostragem foram realizados pelo cliente.

Florianópolis, 18 de outubro de 2012.

J. Beatriz Dario

Química Jucélia Beatriz Dario

CRQ/XIII 13100014

Figura A41 – Laudo de absorção atômica do segundo planejamento experimental.