



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

AINOÃ HAPUQUE NUNES DA SILVA

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTITUTOS
DERMOEPIDÉRMICOS BIOMIMÉTICOS A PARTIR DE BETAGLUCANA,
AGAROSE E NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Recife
2023

AINOÃ HAPUQUE NUNES DA SILVA

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTITUTOS
DERMOEPIDÉRMICOS BIOMIMÉTICOS A PARTIR DE BETAGLUCANA,
AGAROSE E NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Engenharia.

Área de concentração: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima.

Recife

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Sandra Maria Neri Santiago, CRB-4 / 1267

S586e Silva, Ainoã Hapuque Nunes da.
Elaboração e caracterização de substitutos dermoepidérmicos biomiméticos a partir de betaglucana, agarose e nanopartículas de prata / Ainoã Hapuque Nunes da Silva. – 2023.
72 f.: il., fig. e tab.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.
Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Recife, 2023.
Inclui referências e apêndice.

1. Engenharia biomédica. 2. Engenharia de tecidos. 3. Cicatrização.
4. Mimetismo biológico. I. Yara, Ricardo (Orientador). II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2024-29

AINOÃ HAPUQUE NUNES DA SILVA

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTITUTOS
DERMOEPIDÉRMICOS BIOMIMÉTICOS A PARTIR DE BETAGLUCANA,
AGAROSE E NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Engenharia. Área de concentração: Bioengenharia.

Aprovada em: 27/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Yara (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wellington Pinheiro dos Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos (Examinadora Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Àquele que me sustenta todos os dias, guiando meus passos, acalmando meu coração e me livrando do mal: obrigada Deus por não me deixar só e não desistir de mim.

Mainha, obrigada por me levar todos os dias no seu coração e em seus joelhos, por sempre dizer que as coisas darão certo e me abençoar todos os dias.

Quéren, minha inspiração: obrigada por sempre acreditar em mim. Eu sou sua maior fã. Asaphe, obrigada por tudo, meu irmão. Obrigada por acreditar em mim, Painho.

Professor Ricardo, obrigada por tanta paciência. Por entender sempre a delicadeza da minha situação e a vulnerabilidade de quem passa noites de plantão sem dormir e por ter tido tanto cuidado em me explicar cada assunto de forma didática. Obrigada por não ter desistido de mim. Professora Cláudia, obrigada por todo apoio e atenção. Obrigada por ter me dito um dia que Deus dá a gente o frio conforme nosso cobertor, em um dos momentos mais tensos da minha vida, serviu e serve de inspiração pra mim todos os dias.

Beatriz, minha querida, você foi e é benção de Deus na minha vida. Obrigada por cada ajuda. Por não desistir de mim em estatística e se empenhar em me ajudar a passar. Por cada dia, tarde e noite no laboratório. Pelas risadas. Por cada partilha. Obrigada por ter rodado meus experimentos e estar sempre a disposição pra me ajudar. Obrigada por me dizer que daria certo. E deu.

Bruna, por todas as idas e vindas no Rio Doce CDU, os cochilos, os surtos. Obrigada por sua disposição em me ajudar. Pela companhia nas madrugadas do laboratório e no desabafo da sorveteria na parada do ônibus: obrigada.

Priscylla, obrigada por todo carinho durante esse período tão difícil. Seu apoio foi crucial nos meus momentos de crises. Obrigada por estar sempre comigo nos momentos mais desafiadores.

A todos os amigos do Laboratório de Biofísica Química, que me ajudaram desde o começo e não soltaram minhas mãos.

À banca, pela disponibilidade em avaliar e me ajudar a aprimorar na produção científica. E, por fim, a Capes pelo financiamento e suporte à pesquisa.

RESUMO

Os substitutos de pele, nos seus variados tipos, surgem como opção plausível no tratamento de feridas cutâneas. Se faz necessário que tais dispositivos tragam consigo propriedades ideais comparáveis à pele humana. Os de dupla camada apresentam vantagem por sua capacidade de mimetização da derme e epiderme. Os biomateriais desempenham papel importante no desenvolvimento dos dispositivos, sendo a agarose, um biomaterial de grande valia por suas características de resistência e plasticidade. As nanopartículas de prata (NPsAg), são eficazes contra as bactérias. As betaglucanas são materiais bioativos que modulam o sistema imunológico e a reparação tecidual. O objetivo da pesquisa foi elaborar substitutos dermoepidérmicos biomiméticos a partir da betaglucana, agarose e nanopartículas de prata, com posterior caracterização dos dispositivos. Neste sentido, foram realizados de forma paralela os dispositivos únicos, sendo o epidérmico baseado em agarose e com NPsAg e os dérmicos baseados em betaglucana. Em seguida foi elaborado o dispositivo de dupla camada, que consistiu na junção de ambos. Após o processo, foram realizadas as caracterizações nos filmes em relação a espessura, teor de umidade e grau de intumescimento, além de analisar quanto a espectroscopia Ultravioleta (UV-Vis) e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Em relação às caracterizações em espessura, foram observadas significativas diferenças entre cada dispositivo. Do ponto de vista de retenção de água e do grau de intumescimento, foi constatado que os dispositivos dérmicos e dermoepidérmicos apresentaram um grau elevado de absorção e retenção de água comportando-se como um gel superabsorvente, podendo reter mais de 400 vezes o valor de peso em água. A espectroscopia UV Vis foi utilizada para a caracterização da distribuição as NPsAg no filme epidérmico e dermoepidérmico, a partir dos dados de absorbância pode-se observar que, ainda que as características organolépticas indicassem uma uniformidade, as NPsAg não distribuíram uniformemente no filme, como pode ser averiguado em análises de histogramas e mapas de calor. Foram realizados ensaios de FTIR com módulo ATR associadas a Análise de Componentes Principais (PCA) neste estudo observou-se que a componente principal PC1 continha 96,9% da variação observada. Em relação a formação de agrupamentos, tanto em gráficos de dispersão PC1 xPC2, agrupamentos hierárquicos e FreeViz, indicaram que a técnica pode discriminar

filmes que continham agarose, filmes dérmicos e filmes dermoepidérmicos, sendo possível neste último caso distinguir qual a face do filme foi analisada pelo aparelho de FTIR ATR.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; cicatrização; mimetismo biológico.

ABSTRACT

Skin substitutes, in their various types, appear as a plausible option in the treatment of skin wounds. It is important that the appropriate devices have ideal Properties comparable to human skin. Double layer skin substitutes are advantaged by their ability to mimic the dermis and epidermis. Biomaterials play an important role in the development of skin substitutes, with agarose being a valuable biomaterial due to its resistance and plasticity characteristics. Silver nanoparticles (NPsAg) are effective in treating bacteria. Betaglcans are bioactive materials that modulate the immune system and tissue repair. The objective of the research was to elaborate biomimetic dermoepidermal substitutes from betaglcans, agarose and silver nanoparticles, with subsequent characterization of the material produced. Thus, the unique substitutes were performed in parallel, the epidermal based on agarose and with NPsAg and the dermal based on betaglcans. Next, the double layer skin substitute was elaborated, which consisted of overlapping both layers. After the process, characterizations were performed on the films in relation to thickness, moisture content and degree of swelling, in addition to analyzing for Ultraviolet (UV-Vis) and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Regarding thickness characterizations, significant differences were observed between each device. Regarding water retention and the degree of swelling, it was found that the dermal and dermoepidermal skin substitutes showed a high degree of absorption and water retention, behaving like a superabsorbent gel, being able to retain more than 400 times the weight value. in water. UV Vis spectroscopy was used to characterize the distribution of NPsAg in the epidermal and dermoepidermal film, from the absorbance data it can be observed that, although the organoleptic characteristics indicated uniformity, the NPsAg did not distribute uniformly in the film, as can be seen observed in histograms and heat map analyses. FTIR tests were performed with ATR module associated with Principal Component Analysis (PCA). In this study, it was observed that the principal component PC1 contained 96.9% of the observed variation. Regarding the formation of clusters, both in PC1 xPC2 scatter plots, hierarchical clusters and FreeViz, indicated that the technique can discriminate films containing agarose, dermal films and dermoepidermal films, being possible in the latter case to distinguish which face of the film was analyzed by the ATR FTIR device.

Keywords: tissue engineering; healing; biological mimicry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da pele saudável com suas camadas, estratos e apêndices.....	18
Figura 2 - Estrutura molecular da agarose	25
Figura 3 - Estrutura da beta-glucana obtida a partir do complexo microbiano (BIONAT 1),.....	26
Figura 4 - Fluxograma dos experimentos desenvolvidos neste trabalho.....	28
Figura 5 - Esquema de síntese de NPsAg	30
Figura 6 - Produção de filmes de EP.....	31
Figura 7 - Esquema de produção do consórcio BIONAT-1	32
Figura 8 - Esquema de extração de beta-glucana.....	33
Figura 9 - Esquema de produção de filmes DE.....	35
Figura 10 - Esquema de produção de filmes DP	35
Figura 11 - Esquema experimental realizado para a análise de espessura dos filmes	36
Figura 12 - Gabarito produzido para delimitar setores de filmes para análise por UV Vis	38
Figura 13 - (A)- Suspensões de NPsAg em diferentes sínteses, algumas apresentando precipitados. (B) Síntese 3 de NPsAg com coloração específica para nanopartículas.....	40
Figura 14 - Espectros de absorção na região UV-Vis das NpsAg sintetizadas a partir de diferentes concentrações de AgNO ₃	40
Figura 15 - A) Filme de agarose sem NPsAg. (B) Filme com incorporação de NPsAg síntese 1, com coloração específica. (C) Filme com NPsAg síntese 2 (D) Filme com NPsAg síntese 3.	41
Figura 16 - Cultura do consórcio microbiano BIONAT-1	42
Figura 17 - Resultado da extração da betaglucana do Consórcio BIONAT-1. (A) Baseada no protocolo sugerido por Berenguer (2018) (B) Betaglucana obtida após pré-tratamento por hipoclorito de cálcio.....	43
Figura 18 - FTIR das betaglucanas em diferentes protocolos produzidas neste trabalho, sendo tratamento com hipoclorito (azul), água da torneira-lavada (amarelo) e betaglucana padrão (laranja).	43
Figura 19 - Filmes de beta glucana realizados em diferentes momentos: (A)Filmes com grande quantidade de cristais de sal e sem maleabilidade. (B)	

Realizado em concentração menor. (3) Filme maleável e com boa aderência.....	44
Figura 20 - Filmes de dupla camada dermoepidérmico (DP)	45
Figura 21 - Teste post-hoc de Tukey, os resultados obtidos estão representados em gráfico de barras, letras diferentes = significativo a 0,001.....	47
Figura 22 - Médias de lotes (=Filmes) analisados por espessura (mm)	48
Figura 23 - Quadro de comparação de médias por lote dentro de tipo de filme, todos os valores de medida estão em mm. Os valores acima do Δ calculado (0,013923) são em destaque em vermelho.	48
Figura 24 - Secagem de filmes DE, EP e EP a 105°C	50
Figura 25 - Absorção de água dos dispositivos DE, EP e DP	51
Figura 26 - Grau de intumescimento dos filmes DE, EP e DP	52
Figura 27 - Perfil UV Vis dos filmes A, EP, DP, DE e A+DE	53
Figura 28 - Histograma gerados a partir dos dados de absorbância dos dispositivos EP e DP.....	54
Figura 29 - Mapas de calor obtido a partir de leituras de absorbância 410 nm de dispositivos EP, cada filme circular é representado por um conjunto contínuo, as cores mais escuras são absorbâncias maiores e claras as menores	56
Figura 30 - Mapas de calor obtido a partir de leituras de absorbância 410 nm de dispositivos DP, cada filme circular é representado por um conjunto contínuo, as cores mais escuras são absorbâncias maiores e claras as menores. ND significa não mensuradas.....	57
Figura 31 - Figura 30 Perfis FTIR médio dos filmes A, EP, DE, DP-FE e DP-FD.	59
Figura 32 - Média e Variâncias gerais englobando todos os filmes analisados por FTIR. Em verde áreas excluídas da análise	60
Figura 33 - Aspecto final após pré-tratamentos dos espectros FTIR	61
Figura 34 - HCA gerado a partir dos dados pré-tratados.....	62
Figura 35 - Gráfico do FreeViz considerando 4 PCs e utilizando a ferramenta para otimização de dados	63
Figura 36 - Gráfico Free Viz com quatro PCs gerados a partir da regra empírica proposta por Corina (2022)	64
Figura 37 - Efeitos da adição de componentes principais nos gráficos otimizados gerados pelo programa FreeViz.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratos que compõem a camada dérmica e suas respectivas estruturas e funções.....	19
Tabela 2 - ANOVA hierárquica, analisando a espessura de 3 lotes dos filmes DE, EP, DP e A, experimento com 5 repetições/lote. Sendo: g.l. graus de liberdade.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1.	OBJETIVO GERAL.....	16
1.1.1	Objetivos Específicos	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	COMPOSIÇÃO	17
3	EPIDERME.....	19
3.1	DERME	20
3.2	HIPODERME.....	21
3.3	FERIDAS CUTÂNEAS	21
3.4	CICATRIZAÇÃO.....	21
3.5	FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	22
3.5.1	Fase Proliferativa.....	22
3.5.2	Fase de Remodelação e Reparação.....	22
3.6	FATORES QUE INTEFEREM NA CICATRIZAÇÃO.....	23
3.7	SUBSTITUTOS DE PELE	24
3.8	BIOMATERIAIS E BIOCOMPATIBILIDADE	24
3.9	AGAROSE.....	25
3.10	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	25
3.11	BETAS-GLUCANAS	26
4	METODOLOGIA	28
4.1	SUBSTITUTO EPIDÉRMICO	29
4.2	PRODUÇÃO DOS FILMES DE AGAROSE + NPASAG (SUBSTITUTOS EP)	30
4.3	SUBSTITUTO DÉRMICO (DE).....	31
4.4	EXTRAÇÃO BETAGLUCANA	32
4.5	PRODUÇÃO DOS FILMES DE BETAGLUCANA (SUBSTITUTOS DE)	34
4.6	PRODUÇÃO DOS FILMES DE DUPLA CAMADA	35
4.7	CARACTERIZAÇÕES DOS DISPOSITIVOS	36
4.8	ESPESSURA.....	36
4.9	TEOR DE UMIDADE	36
4.10	GRAU DE INSTUMESCIMENTO	37
4.11	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NO UV VIS	38

4.12	ESPECTROSCOPIA NO FTIR.....	39
4.13	ANÁLISE COMPUTACIONAIS COMPARATIVAS DOS FILMES POR FTIR ASSOCIADA A PCA.....	39
5	ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS.....	40
5.1.	PRODUÇÃO DE FILMES DE AGAROSE + NPSAG.....	41
5.2	SUBSTITUTO DÉRMICO.....	42
5.2.1	Extração e Caracterização da Betaglucana.....	42
5.3	PRODUÇÃO DE FILMES DE BETAGLUCANA.....	44
5.4	SUBSTITUTO DERMOEPIDÉRMICO.....	45
5.5	CARACTERIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS.....	46
5.6	TEOR DE UMIDADE.....	49
5.7	ESPECTROSCOPIA UV VIS.....	53
5.8	FTIR.....	58
5.9	ANÁLISE DOS ESPECTROS FTIR DOS DISPOSITIVOS.....	58
5.10	ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	59
5.11	PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS.....	60
5.12	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS – PCA.....	61
5.13	ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER – HCA.....	61
5.14	FERRAMENTA FREEVIZ.....	63
6	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A – PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTOS E SUAVIZAÇÃO DE DADOS, UTILIZANDO SOFTWARE ORANGE.....	71

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo distribuída por toda a superfície corporal. É dividida em três distintas camadas: a epiderme, camada externa, a derme, que se estende da epiderme à hipoderme, onde se encontra o tecido subcutâneo, constituindo assim a camada interna da pele (BLANES, 2004). É a primeira linha de defesa do organismo, sendo responsável pela proteção contra traumas químicos, físicos, toxinas, micro-organismos patógenos, perda excessiva de água e proteínas, além de ter a função de termorregulação corpórea e excreção de eletrólitos (ONOFRE, 2014).

Portanto, uma interrupção da continuidade da pele leva a um desequilíbrio funcional dessa barreira de proteção (FERREIRA, 2011). A eficácia do processo de reparação varia de acordo com a complexidade da ferida, sendo necessária uma rápida intervenção, com o objetivo de garantir essa reparação tecidual (BLANES, 2004).

Dentre as alternativas para a regeneração de feridas mais complexas, estão os substitutos de pele. Estes dispositivos precisam garantir a regeneração adequada do tecido, tanto estrutural quanto funcional e mimetizar uma variedade de propriedades da pele: físicas, morfológicas, mecânicas, permeabilidade adequada, biocompatibilidade, não toxicidade, entre outras, em diferentes camadas (SAVOJI, 2018; HALDAR, 2019)

Desde que o primeiro substituto de pele foi criado, muitas pesquisas avançaram na busca pelo dispositivo ideal. Porém, mesmo diante do grande crescimento de pesquisas nesta área, a procura do substituto que carregue consigo a possibilidade de aperfeiçoamento no que diz respeito à melhor cobertura da lesão e à veracidade das funções de ambas camadas ainda é carente de novas descobertas (FERREIRA, 2011).

Os substitutos dermoepidérmicos compõem uma das classes desses materiais. São materiais que substituem a camada dérmica e epidérmica da pele (VENUGOPAL, 2012). Mediante a profundidade e complexidade das lesões, se torna preferível que a pele artificial possua uma estrutura de duas camadas que biomimetize a pele natural, em que a camada superior funcione como uma epiderme

permeável à umidade e não à água e uma camada inferior que atue como um modelo de regeneração da pele. (PRYA, 2008).

A composição desses substitutos é de vital importância. Os biomateriais quando possuem características de biodegradação, não toxicidade, reparação, não inflamatórios e com baixo risco de transmissão de doenças, se torna um material adequado para a formação desses dispositivos (VIG, 2017).

Dentre os biomateriais, a agarose vem se mostrando muito promissora neste campo. Trata um polímero de polissacarídeo natural com características únicas que dão motivos para considerá-lo um bom constituinte no processo de reparação (ZARRINTAJ, 2018). A prata, mais especificamente as nanopartículas carregam consigo múltiplas funções e entre elas, uma crucial no processo de cicatrização: a ação antimicrobiana (ABBASI, 2014). Onofre-Cordeiro et al. (2018) combina estas características em um único dispositivo que apresentou boa resistência mecânica e antimicrobiana.

Os grãos de kefir são compostos por exopolissacarídeos (EPS) microbianos, possuindo propriedades importantes, como estimulante do sistema imunológico e atividade antimutagênica (CORDEIRO, 2018). Constituem assim uma opção plausível como biomaterial. Neste sentido, Cordeiro (2018) caracterizou um dos EPS de consórcio microbiano derivado de kefir (BIONAT 1) como sendo uma beta-glucana, Berenguer (2018) demonstra a potencialidade de tal polímero como substituto de pele pois o mesmo acelerou o processo de cicatrização quando comparado ao padrão de mercado.

Os crescentes avanços em busca do aperfeiçoamento de técnicas para otimização dos produtos já existentes e formulação de novos dispositivos, proporcionam a obtenção de variados volumes de resultados, sendo assim necessário a inclusão de técnicas de tratamento desses resultados, dando espaço a análise multivariada de dados (Panero 2009).

As análises multivariadas consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo assim a obtenção de informações complementares que as análises univariadas não conseguem identificar. Um dos objetivos principais na utilização desse tipo de análise é reduzir a representação dimensional dos dados de forma a organizá-los em estrutura tal que facilite a visualização de todo o conjunto de dados (MORAIS 2018).

A análise de Componentes Principais (PCA) e o Agrupamento Hierárquico (HCA) são duas técnicas de análise multivariada mais conhecidas e consistem em metodologias exploratórias que propõem evidenciar semelhanças ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados (MORAIS 2018).

Desta forma, este trabalho propôs a elaboração de um substituto dermoepidérmico que combinem as propriedades mecânicas e antimicrobianas de filmes de agarose e nanopartículas de prata e bioatividade de filmes de beta-glucana e que possa mimetizar de forma similar à ambas camadas da pele, caracterizando-as por meio de espectroscopias e análises multivariadas, contribuindo assim para o arsenal terapêutico existente.

1.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar e caracterizar substitutos de pele na forma de filmes de dupla camada sendo a primeira de agarose e NPsAg e a segunda constituída de beta-glucana extraído do consórcio BIONAT 1, além de desenvolver ferramentas para caracterização e controle de qualidade dos substitutos de pele.

1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver e caracterizar a mono camada epidérmica baseada em agarose e AgNPs;
- b) Desenvolver e caracterizar a mono camada dérmica baseada em beta-glucana;
- c) Estruturar o dispositivo de dupla camada com posterior caracterização morfológica, física e espectrofotométrica
- d) Desenvolver e analisar ferramentas analíticas para a avaliação dos dispositivos elaborados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Manto de todo o organismo, isolante dos componentes exteriores e indispensável à vida, a pele é uma complexa estrutura de tecidos de naturezas diversas, apta à adequar-se e adaptar-se de forma orquestrada as suas funções. (SAMPAIO 2008). Representa o mais extenso órgão do corpo humano (DE ANGELIS et al. 2019, SAMPAIO 2008), cobrindo cerca de 1,9m² com o peso de cerca de 1/6 de todo o corpo . Serve como interface entre o corpo e o ambiente ao redor. (DE ANGELIS et al., 2019).

A importância desse órgão ao corpo é proporcional ao seu tamanho. Exerce várias funções no geral: protege contra impactos mecânicos ou físicos, contra micróbios e outros patógenos externos, perda de fluidos corporais (SAMPAIO 2008; DE ANGELIS et al., 2019 ; JAMES e LUCAS, 2017) além de proteger contra os xenobióticos, de origem microbiana ou química, que resultam da atividade humana (MENON 2009)

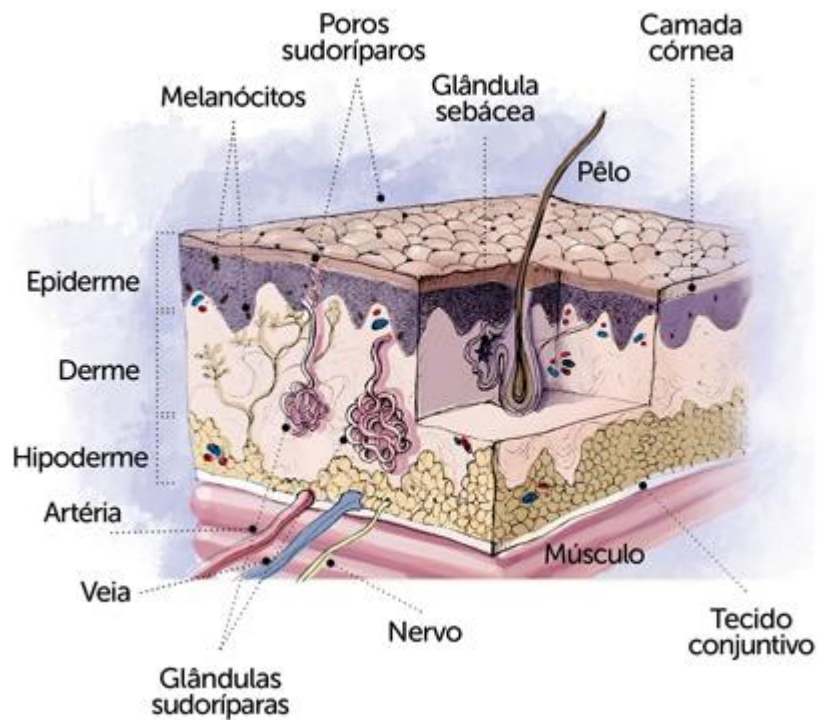
2.1 COMPOSIÇÃO

É composta por três camadas distintas, epiderme, derme e hipoderme (Figura 1) (SAMPAIO 2008; MENON 2009; JAMES 2017; SAVOJI 2018), sendo esta última tema de discussão entre autores, em posicioná-la ou não como membro da pele, já que alguns a consideram apenas um meio de união aos órgãos subjacentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2013;). Opta-se neste referencial mantê-la participante deste órgão. Unhas, pêlos, glândulas sebáceas, folículos pilosebáceos, glândulas apócrinas e écrinas, nervos, vasos e músculos também compõem a pele (SAMPAIO 2008).

Embriologicamente, a pele começa a se desenvolver após a gastrulação, que compreende um dos primeiros estágios do desenvolvimento do embrião por volta da terceira semana após a fertilização. Nesse estágio, há invaginação do epiblasto ao longo da faixa primitiva, ocorrendo a proliferação das células epiblastas para baixo. O resultado da gastrulação é a formação de três camadas germinativas com distintas linhagens celulares, que são o ectoderma, mesoderma e endoderme (HU, et al 2018).

As estruturas epiteliais - epiderme, folículos pilossebáceos, glândulas apócrinas e écrinas e unhas derivam do ectoderma. Os nervos, do neuroectoderma. Os músculos, tecido adiposo, vasos, fibras colágenas e elásticas advêm do mesoderma (SAMPAIO 2008).

Figura 1 - Estrutura da pele saudável com suas camadas, estratos e apêndices



Fonte: randall *et al.* (2018)

3 EPIDERME

A epiderme, camada mais superficial da pele, tem como principais componentes celulares os queratinócitos, células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos (ROBIN e PRESTON 2014). Pode ser subdividida em estrato córneo, estrato lúcido (em apenas algumas partes), estrato granuloso, estrato espinoso e estrato germinativo (PRESTON 2014; VANPUTTE 2016; SAVOJI 2018). Suas respectivas características e funções estão resumidas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Estratos que compõem a camada dérmica e suas respectivas estruturas e funções.

Estrato	Estrutura	Função
Córneo	Cerca de 25 camadas de células escamosas mortas	Resistência estrutural favorecida pela presença de queratina presente nas células, previne perda de água, por conta dos lipídeos e a descamação das células resistem aos atritos.
Lúcido	3 a 5 camadas de células mortas. Translúcida. Presente em apenas algumas regiões.	Dispersa querato-hialina ao redor das fibras de queratina
Granuloso	2 a 5 camadas de células poligonais achatadas	Produz grânulos de querato-hialina, corpos lamelares liberam lipídeos nas células.
Espinoso	8 a 10 camadas de células multifacetadas	Produz fibras de queratina, corpos lamelares se formam dentro dos queratinócitos.
Basal	Mais profundo da epiderme, única camada de células cuboídes ou colunares.	Protege a pele contra radiação UV. Produzem e fornecem melanina, produz as células da maioria dos estratos superficiais.

Fonte: A Autora (2023)

No geral, a epiderme atua como barreira de proteção em quatro principais aspectos: proteção física, fotoproteção, resistência à água e proteção antimicrobiana, sendo esta última fornecida pelas camadas superficiais queratinizadas, que criam uma barreira física contra os micróbios. Se porventura essa barreira for quebrada, os componentes do sistema imune junto com as células de Langerhans promovem uma resposta rápida à invasão, evitando a infecção

(PRESTON 2014). A epiderme está conectada à uma camada adjacente, a derme. (SAVOJI 2018)

3.1 DERME

A derme possui cerca de 1-2mm de espessura. Não funciona de forma direta como barreira, semelhante à epiderme, porém é atribuída à derme força e elasticidade. Contém células do sistema imunológico que reagem a micróbios que possam ter passado pela barreira através de alguma lesão (PRESTON 2016; SAVOJI 2018). Do ponto de vista estrutural, a derme é formada por uma malha de tecido conectivo. Fibras de colágeno tipo I são responsáveis pelo suporte estrutural, e as fibras de elastina, pela elasticidade. Possuem raízes nervosas, receptores, vasos e outras células especializadas da pele.

Dentre os componentes principais da derme estão os mastócitos, que estão envolvidos nas respostas imunológicas e inflamatórias, liberando prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, macrófagos, células dendríticas dérmicas e os fibroblastos (PRESTON 2014).

Estes agentes atuam no aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar. Além dos mastócitos, os macrófagos e as células dendríticas dérmicas também estão presentes, sendo os macrófagos responsáveis pela fagocitose e por auxiliarem na resposta imunológica. Já as células dendríticas dérmicas são as apresentadoras de antígeno, que desempenham papel semelhante às células de Langerhans na epiderme. Os fibroblastos atuam na síntese e degradação das proteínas fibrosas e não fibrosas do tecido. Tem grande importância na cicatrização das feridas. (PRESTON 2014)

A derme possui duas camadas: a papilar se encontra em contato com a epiderme, aproximando os vasos sanguíneos à ela. As papilas dérmicas formam as impressões digitais e as pegadas. A camada reticular possui uma rede de fibras elásticas e colágenas, sendo a principal camada fibrosa da derme, resistente em várias direções (VANPUTTE 2017).

3.2 HIPODERME

A hipoderme está localizada logo abaixo da derme (SAVOJI 2018). É a subcamada final e atua como reserva de energia e termorregulação (KABASHIMA 2019). É composto principalmente por fibroblastos e adipócitos. As adipócitos são separadas entre si por paredes semelhantes às de fibras dos vasos sanguíneos e colágeno. Além dessas funções, a hipoderme atua também como barreira de amortecimento dentre os ossos e o ambiente externo e auxilia na ancoragem e ossos, músculos e tendões. (JOURIA 2018)

A pele, suas camadas e apêndices estão ilustrados abaixo.

Como maior órgão do corpo, a pele também é a linha de frente de proteção contra danos de mecanismos diversos, sejam microorganismos, radiação, produtos químicos. (KIN 2018).

3.3 FERIDAS CUTÂNEAS

A lesão ou trauma existe quando ocorre a descontinuidade da integridade da pele, (FERREIRA 2011) causadas por procedimentos cirúrgicos, irregularidades genéticas e traumas físicos e químicos (SAVOJI 2018). A palavra "trauma" deriva do grego e significa "buraco", dando sentido a extensa perda de elementos sólidos ou líquidos, de temperaturas e propício à infecções (STURLA 2018).

Essas lesões, ou feridas, podem ser divididas por categorias de acordo com a profundidade do dano: lesões a nível epidermal, as de espessura parcial, espessura parcial profunda e espessura total. As epidermais e as de espessura parcial normalmente se solucionam através de suas próprias funções regenerativas. (SAVOJI 2018)

3.4 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de feridas é definida como uma cadência de eventos fisiológicos e naturais que compreendem quatro etapas sucessivas e orquestradas: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação ou remodelamento (DE ANGELIS 2018; MOHAMADINEJAD 2020). É um processo biológico que ocorre no tecido cutâneo após lesão, seja trauma, queimadura ou ulcerações. (Yang 2021) Pode se

considerar complexo, estágio por estágio, incluindo a interação de uma variedade de células, proteínas, citocinas, fatores de crescimento e angiogênese. (MAAROF 2016) Apenas haverá uma cicatrização satisfatória, se essas etapas ocorrerem na ordem exata e em tempo apropriado (MOHAMADINEJAD 2020).

3.5 FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Na hemostasia, primeira fase da cicatrização, o sangramento é minimizado por vasoconstrição através do sistema simpático e pela coagulação intrínseca do sangue, pelo acúmulo de plaquetas (ZOMER 2017). O tecido libera sinais de alarme como os padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), quimiocinas, fatores de crescimento e derivados de plaquetas. Esses sinais de alarme recrutam uma grande variação de células imunes da circulação, resultando em acúmulo de neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T entre outras, o que consiste na fase de inflamação (PHILLIPSON 2019).

3.5.1 Fase Proliferativa

Na fase de proliferação, tem a formação do tecido de granulação, vasos sanguíneos recém formados, e a presença dos fibroblastos que permitem a migração de células da epiderme na superfície apical do tecido para que haja a reepitelização da ferida (GURTNER 2008; PHILLIPSON 2019).

3.5.2 Fase de Remodelação e Reparação

Na fase de remodelação, há uma reparação e fortalecimento da lesão. Os fibroblastos depositam na derme e a epiderme novas proteínas da matriz extracelular, depositando principalmente colágeno formando assim o tecido cicatricial (PHILLIPSON 2019).

3.6 FATORES QUE INTEFEREM NA CICATRIZAÇÃO

Quando esse trauma é pequeno, o processo de auto reparação da pele é suficiente nas pessoas saudáveis (MAAROF 2016) pois a contração da ferida e o crescimento das células resultam no fechamento da lesão (NYAME 2015). Porém, quando as lesões são mais severas, os mecanismos de autodefesa de pele por si só não são suficientes causando tempos de cicatrização prolongados, complicação por infecções ou até mesmo a não cicatrização (NYAME 2015; MAAROF 2016, DE ANGELIS 2019; MEULI 2019), colocando em risco a vida do paciente (STURLA 2018).

A perda total ou parcial da derme é uma característica comum das feridas crônicas, como úlceras por pressão ou diabéticas e das queimaduras profundas (KOTLER 2017) Essas feridas são muito comuns, e acarretam grande e pesado fardo ao acometido, à sociedade e à saúde em geral. (WENG 2020). São lesões devastadoras e precisam de intervenção mais rápida possível (KOTLER 2017)

Entre as lesões traumáticas, as queimaduras são o principal fator de mortalidade que causa deficiências tanto estruturais como funcionais, em vários órgãos. (SHARIATI 2020). A OMS define queimaduras como lesões na pele ou outros tecidos orgânicos causadas principalmente pelo calor ou devido a radiação, radioatividade, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos. A organização ainda estima cerca de 265.000 mortes por ano apenas por incêndios, fora os dados das queimaduras de etiologias diferentes quais não existem dados globais disponíveis no momento (OMS 2019).

As queimaduras são um grave problema de saúde pública de forma global. Cerca de 96% das mortes causadas por queimaduras ocorrem em países de baixa e média renda. As que não são fatais, causam hospitalização prolongada, desfiguração e incapacidade, estigma e rejeição. (JUNIOR 2020). Além disso, 60% das mortes são causadas por conta de infecções (SHIARATI 2020). Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras- SBQ- ocorrem no Brasil cerca de 1.000.000 queimaduras.

3.7 SUBSTITUTOS DE PELE

No caso dessas feridas de maior extensão e profundidade, o tratamento mais comum é o uso dos enxertos de pele. Os enxertos de epitélio autólogo são bastante utilizados nas feridas graves por queimadura. Esse tipo de enxerto consiste no transplante de uma área de pele melhor adequada para a área receptora do mesmo indivíduo. Os autoenxertos podem ser de espessura total, onde uma seção da derme e epiderme é transplantada ou de espessura dividida, onde se usa apenas a camada da derme. (VARKEY 2015)

Porém, existe uma certa dificuldade neste tipo de tratamento, como por exemplo a disponibilidade limitada de locais doadores, dor, além do aumento da morbidade a longo prazo. Além do autoenxerto, outros procedimentos são inclusos: os enxertos singênicos, alogênicos e xenogênicos. (FERREIRA 2011). O enxerto singênico é realizado entre indivíduos idênticos geneticamente, como os gêmeos monozigotos. Os alogênicos são transplantes de pele entre indivíduos da mesma espécie não idênticos geneticamente ou de pele cadáver. Já os xenoenxertos envolve o transplante da pele entre espécies (FERREIRA, 2011; VARKEY 2015).

Apesar da importância desses enxertos e da grande utilização dos mesmos, existem muitas limitações associadas ao uso dos diferentes tipos de enxertos, sendo um dos vieses, a rejeição. Por isso, grande necessidade de desenvolver opções terapêuticas alternativas surgiram, o que resulta no constante melhoramento dos substitutos de pele. (VARKEY 2015).

3.8 BIOMATERIAIS E BIOCOMPATIBILIDADE

Os biomateriais desempenham papel crucial na elaboração dos substitutos de pele. O material deve ser capaz de manter sua estrutura e integridade por períodos pré-determinados de duração para garantir a formação e maturação de novos tecidos, mesmo em meio a circunstâncias adversas. (CHEN, 2016).

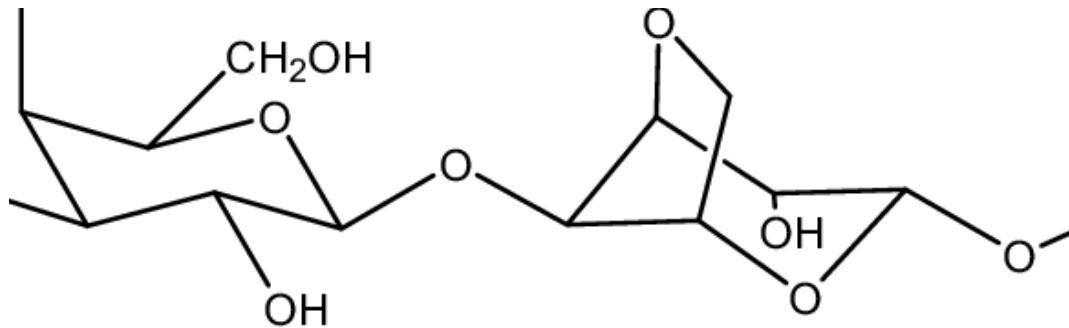
O substituto biológico dito ideal necessita suprir algumas necessidades, como mimetizar a função da pele, ser econômico, ser amplamente disponível e possuir certa facilidade em sua aplicação (GORDON, 2019).

Materiais naturais têm sido amplamente estudados na engenharia de tecidos da pele e os substitutos biológicos da pele têm sido de particular interesse por seu potencial de cicatrização de feridas.

3.9 AGAROSE

Como biomaterial, a agarose vem sendo utilizada de forma extensa, como na produção de gel para eletroforese, gel para colunas cromatográficas e como meio de cultura para o crescimento de micro-organismos. É um polissacarídeo termossensível que não possui citotoxicidade, biopolímero linear extraído de algas vermelhas, constituídos por alterações repetitivas de unidades de 1,3-d-galactose e 3,6-anidro-1-galactose (Figura 2), e pelas características mecânicas dos filmes, que possuem resistência à tração e plasticidade, é um bom candidato a substituto de epiderme. (SANTANA, 2015)

Figura 2 - Estrutura molecular da agarose



Fonte Ichinose (2020)

3.10 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

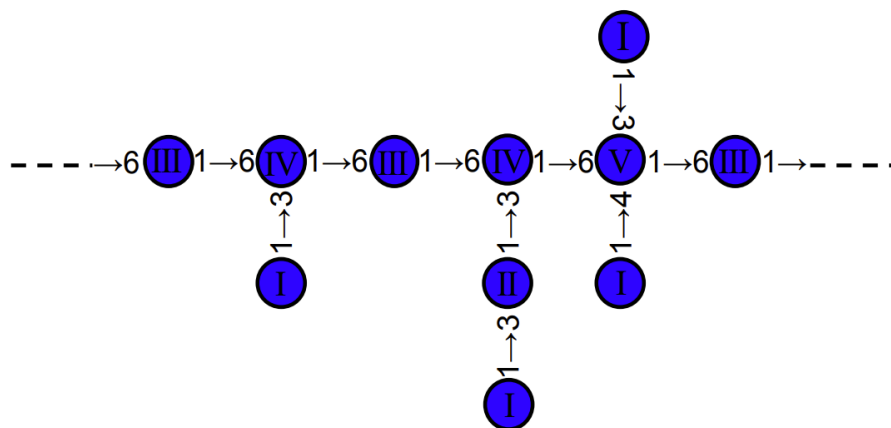
As nanopartículas metálicas são materiais eficazes no combate às bactérias. Dentre as nanopartículas com função bactericida podem ser citadas as NPsAg, que consistem em nano estruturas formadas a partir de íons de prata. A prata é conhecida por sua propriedade antimicrobiana potente, sendo assim um

componente importante na engenharia de tecidos já que uma das características fundamentais de um adequado substituto de pele é a sua atividade antimicrobiana. Desde o século 18 que se tem registros da aplicação da prata para tratamento de feridas (TELLES, 2017). Nanomateriais encontram-se na escala de 1 a 100 nm (1 nm = 10^{-9} m) e podem variar quanto ao seu tamanho, forma, área superficial e composição química.

3.11 BETAS-GLUCANAS

Os grãos do consórcio microbiano BIONAT-1 são constituídos principalmente por beta-glucanas microbianas (Figura 3) e tem sido cada vez mais utilizados na indústria de alimentos, sendo pouco solúvel na água em temperatura ambiente. Este polissacarídeo possui propriedades importantes, como estimulante do sistema imunológico e atividade antimutagênica (SILVA, 2015). Algumas frações das beta-glucanas de kefir têm comportamento de gel superabsorvente, característica semelhante a alguns biopolímeros da derme.

Figura 3 - Estrutura da beta-glucana obtida a partir do complexo microbiano (BIONAT 1),



Fonte: Picasso (2017)

Legenda: (I) trata-se de uma molécula de glicose com ramificação no carbono (C) 1; (II) trata-se de uma molécula de glicose com ramificação nos C 1 e 3; (III) trata-se uma molécula de glicose com ramificação nos C 6 e 1; (IV) trata-se de uma

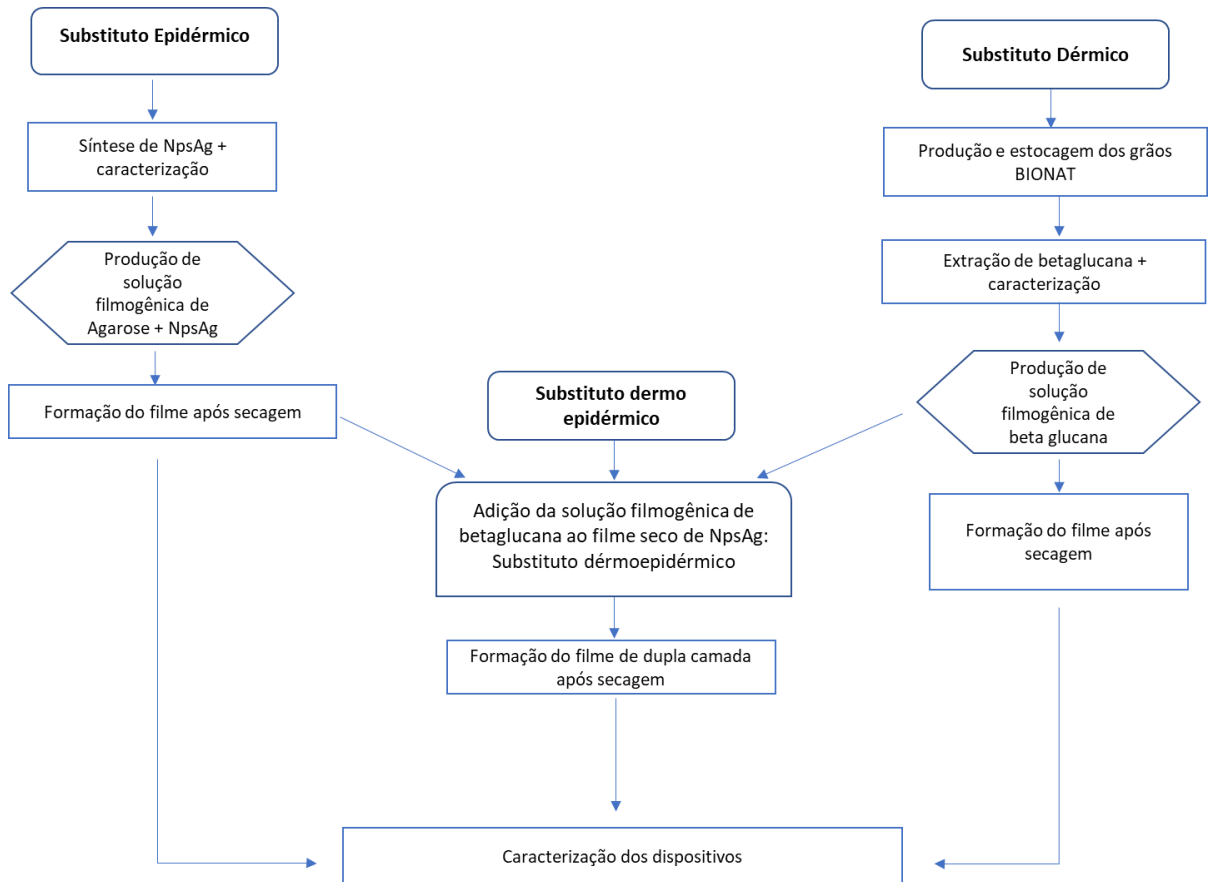
molécula de glicose com ramificação nos C 1,4 e 6; (V) trata-se de uma molécula de glicose com ramificação nos C 1, 3, 4 e 6.

Os substitutos compostos por camadas duplas ou bicamadas são utilizados para feridas de espessura e amplitudes variadas, queimaduras e úlceras crônicas (NATHOO, 2014). A camada de substituição epidérmica, dentre tantas funções, serve para controle de perda de umidade da ferida e fornecer proteção contra infecção. A camada de substituição dérmica atua como estimulador do processo de cicatrização (LÍMOVÁ, 2010). Ainda que alguns trabalhos venham sendo desenvolvidos em busca de substitutos de pele ideais, a pesquisa ainda é escassa e se faz necessário novos estudos acerca do tema.

4 METODOLOGIA

A partir da produção, síntese e estoque das matérias primas principais, foram realizados os dispositivos epidérmicos (EP), dérmicos (DE) e dermoepidérmicos (DP), com posterior caracterização das matérias e dos produtos finais, como ilustra o fluxograma abaixo (Figura 4):

Figura 4 - Fluxograma dos experimentos desenvolvidos neste trabalho



Fonte: A Autora (2023)

4.1 SUBSTITUTO EPIDÉRMICO

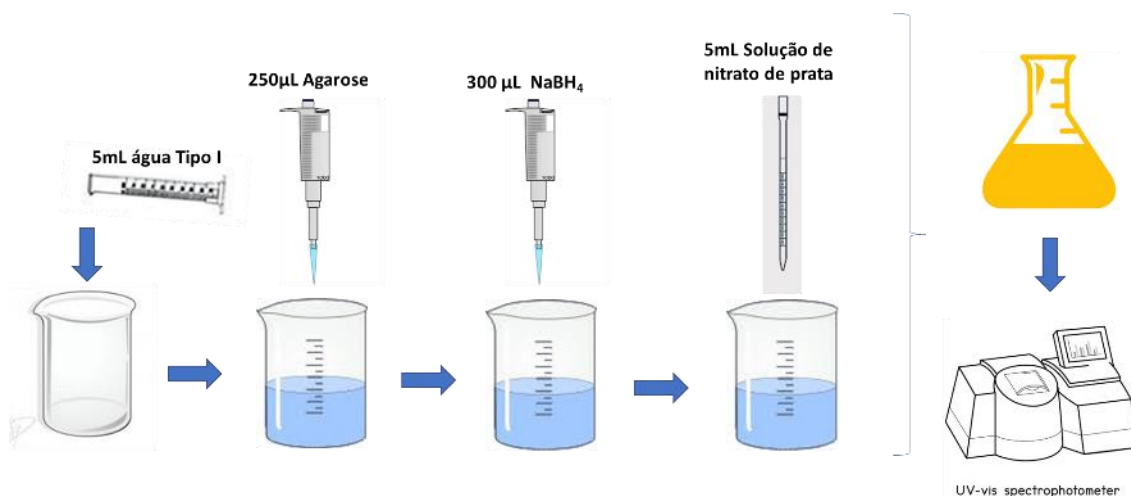
As nanopartículas de prata- NPsAg, foram sintetizadas quimicamente seguindo o protocolo de Onofre (2014) e Ferreira (2018), através da redução de íons de prata, utilizando Nitrato de Prata P.A. –A.C.S AgNO₃ (Alphatec) como agente precursor, Borohidreto de sódio P.S. –NaBH₄ (Vetec) como agente redutor e Agarose (L W Biotec) como agente estabilizante (Figura 5).

Foram realizadas previamente soluções do agente precursor, agente redutor e de agarose para a síntese. Foram realizadas três soluções em concentrações diferentes de AgNO₃, sendo a primeira (Síntese 1) na concentração de 0,0050 mol.L⁻¹, a segunda (Síntese 2) 0,0010 mol.L⁻¹ e a terceira (Síntese 3), 0,00025 mol.L⁻¹, diluindo-as em água MilliQ e mantendo-as em frascos de vidro âmbar para fotoproteção. A solução do agente redutor, NaBH₄ foi realizada à 0,01 mol.L⁻¹ e a de agarose, à 0,05 mol.L⁻¹.

A síntese química das NPsAg consistiu inicialmente na adição de 250 µL da solução de agarose em 5mL de água Tipo I. Logo em seguida, 300 µL da solução aquosa de NaBH₄ foi adicionada. Finalizando a síntese, introduziu-se lentamente e sob suave agitação manual, 5mL de solução aquosa de AgNO₃. O sistema reacional foi deixado em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz em frascos de vidro de penicilina envoltos em folhas de alumínio.

Após a síntese, as nanopartículas foram analisadas sob absorção eletrônica na região do UV-Visível, avaliadas através de curvas analíticas de Absorbância versus concentração da suspensão de NpsAg. Foi utilizado o espectrofotômetro de absorção UV-Vis modelo UV 1800 (SHIMADZU- Japão) operado pelo software UV Probe. As amostras foram submetidas no processo de rotação na centrífuga Eppendorf MiniSpin e logo após foram inseridas em cubetas específicas para inserção no equipamento.

Figura 5 - Esquema de síntese de NPsAg

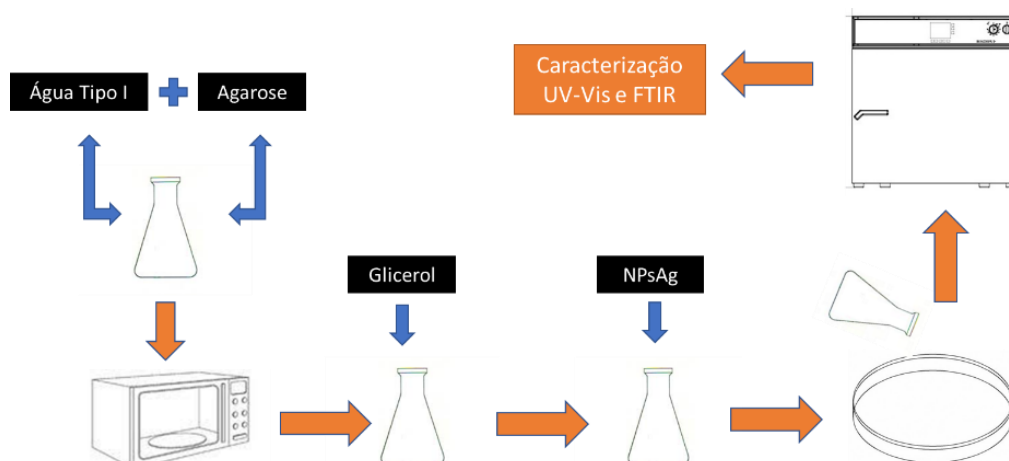


Fonte: A Autora (2023)

4.2 PRODUÇÃO DOS FILMES DE AGAROSE + NPASAG (SUBSTITUTOS EP)

Os filmes foram elaborados a partir de uma solução de agarose dissolvida em água destilada e aquecida em micro-ondas até completa solubilização, por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, acrescentou-se glicerol P.A.- A.C.S. (Alphatec) como agente plastificante. Foram utilizados 0,006 g.cm⁻² de agarose, 0,006 g.cm⁻² de glicerol e 0,500 mL.cm⁻² de água destilada. Foi adicionado 0,320 mL.cm⁻² da suspensão de NPsAg previamente sintetizadas e posto à secagem em estufa de circulação e renovação de ar modelo TE-394/3 (TECNAL- Brasil) à 45 °C (Figura 6). Foi realizada a produção de um filme de agarose (Filme A) sem a adição das NPsAg para posterior comparação em análises.

Figura 6 - Produção de filmes de EP



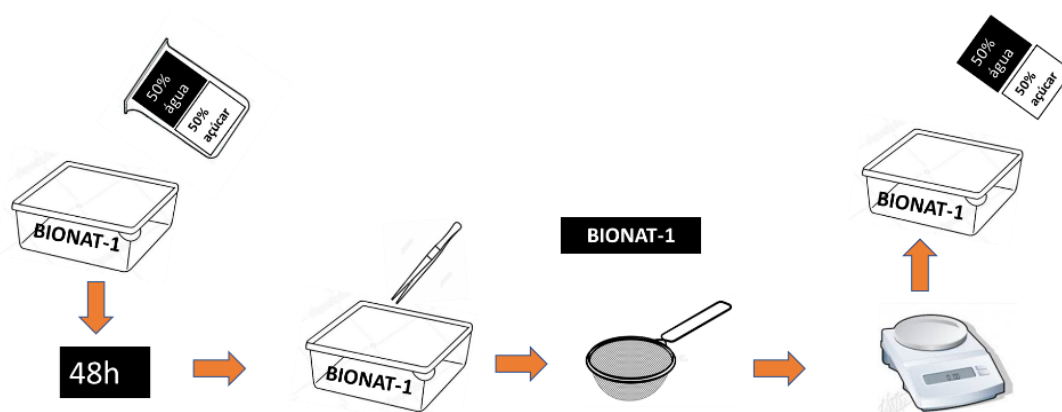
Fonte: A Autora (2023)

4.3 SUBSTITUTO DÉRMICO (DE)

O consórcio microbiano derivado do kefir utilizado na pesquisa foi BIONAT-1 desenvolvido no Laboratório de Biofísica Química da UFPE (Figura 7). Este o consórcio foi cultivado em uma solução de açúcar mascavo a 50% (m/v), sendo sua massa mensurada a cada 48 horas. O peso úmido da massa microbiana foi considerado para determinar o volume de solução de açúcar. Neste mesmo período, foram realizadas repicagens, com troca de solução e retirada de excesso de metabólitos suspensos no cultivo.

Após crescimento desejado, a massa passou por um processo de clareamento que consistiu na imersão em água destilada na proporção de 1:6 (m/v) até atingir a coloração desejável, indício da diminuição significativa de impurezas, tal protocolo foi baseado em estudos previamente elaborados no distinto laboratório. Um processo paralelo visando aceleração do processo do clareamento foi realizado utilizando hipoclorito de cálcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ na concentração de 1%. Os grãos clareados foram pesados estocados em embalagens específicas no freezer para manutenção da integridade do produto, sendo retirada apenas a quantidade suficiente da extração do momento.

Figura 7 - Esquema de produção do consórcio BIONAT-1



Fonte: A Autora (2023)

4.4 EXTRAÇÃO BETAGLUCANA

O método de extração do exopolissacarídeo do consórcio Bionat-1 seguiu o protocolo descrito por Picasso (2017), onde a massa já clareada foi triturada com água MilliQ em um miniprocessador Philips Wallita modelo RI7761/00, até atingir consistência gelatinosa (Figura 6).

Alternativamente amostras da biomassa do consórcio Bionat-1 foram clareadas com solução de hipoclorito de cálcio a 1% por 2h utilizando água potável da rede pública.

O material resultante foi posto em um béquer de vidro 1000 mL e adicionada uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 1,0 mol.L⁻¹ previamente preparada.

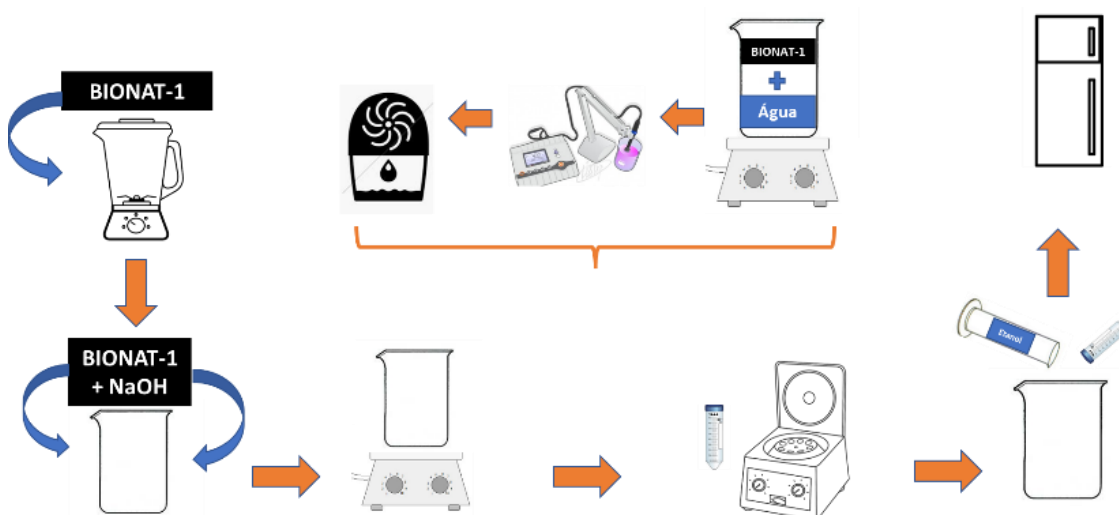
A solução da massa com o solvente foi posta sob agitação magnética à 80°C até atingir a homogenia. Após este processo, todo o material foi posto na centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Universal 320R sob 7500 este valor mesmo? rpm, em temperatura ambiente (25°C) por 5 minutos. As impurezas precipitadas foram descartadas e o sobrenadante foi posto em um béquer de aproximadamente 3000 mL e imergido em etanol absoluto. Adiante, esta solução foi colocada em Temperatura de 4-10 oC por 24 horas.

Passado o período, o álcool sobrenadante foi separado e posto ao devido descarte e as etapas de adição de NaOH, agitação, centrifugação e imersão de álcool se repetiram por mais duas vezes sob a massa precipitada. Findando as

repetições, deu-se início a um processo de neutralização do pH da solução resultante, utilizando ácido clorídrico (HCl) a 1,0 mol.L⁻¹. O processo foi realizado com auxílio do pHmetro de bancada PHS3BW Bel Engineering até atingir a faixa de 7,0 a 7,2.

A solução final foi posta no desumidificador Arsec modelo 160 por 48 horas e, após completa secagem, foi triturada, adquirindo assim, o EPS do kefir. Notou-se a presença abundante de cristais de sal após secagem, optando assim por incluir mais uma etapa após a neutralização, onde foi adicionado 400ml de água destilada na massa e mantida sob agitação magnética à 80°C até completa solubilização, colocando no desumidificador para a etapa de secagem.

Figura 8 - Esquema de extração de beta-glucana



Fonte: A Autora (2023)

Ao término do processo de secagem, a betaglucana foi avaliada por espectroscopia de absorção vibracional no infravermelho - FTIR, no equipamento Spectrum 400 FT-IR/ FT- NIR Spectrometer. Adicionalmente análise de FTIR também foi realizada para a betaglucana branqueada em hipoclorito de cálcio e aquela branqueada com água potável.

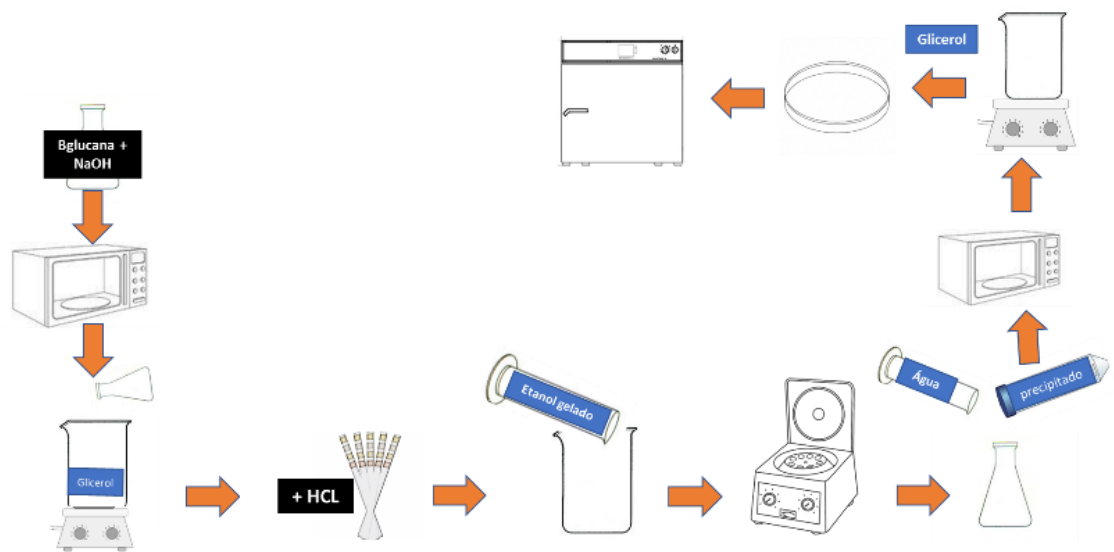
4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES DE BETAGLUCANA (SUBSTITUTOS DE)

Os filmes de betaglucana foram realizados com base no protocolo de Berenguer (2018), adaptado à circunferência da placa de Petri utilizada, 60 x 10 mm. Inicialmente, 0,260 g de polissacarídeo em 16,6 mL de NaOH à 0,2 mol.L⁻¹) foram postos à aquecimento no micro-ondas em um Erlenmeyer até dissolução do polissacarídeo (Figura 7). Em seguida, foi adicionado o conteúdo dissolvido à um béquer com 1 g de glicerol previamente pesado e posto em agitação no (modelo) por 2 minutos até homogeneização da solução.

Com auxílio do pHmetro de bancada realizou-se a neutralização da solução com a administração da solução de HCl à 1 mol.L⁻¹ até atingir a faixa de 7,0 a 7,2. pH. Findando esta etapa, quantificou o total da solução e adicionou à ela o dobro da quantidade de álcool etílico gelado. O resultante foi levado à centrífuga em tubos plásticos de 15 mL (Falcon) sob 9000 rpm, à 25°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi recolhido, posto em um Erlenmeyer, hidratado com água destilada e posto em micro-ondas por 3 minutos. Para concluir a dissolução, a solução hidratada foi posta sobre agitador magnético à 80 °C aproximadamente, até dissolver completamente.

O béquer utilizado nesta etapa foi coberto com plástico PVC para que não houvesse grande perda de material no processo de evaporação. Dissolvido, acrescentou-se mais 0,042 g de glicerol sob lenta agitação com intuito de homogeneizar a solução final. Finalizando a produção do filme, a solução foi vertida em placa de Petri e posta na estufa de circulação forçada à 45 °C para completo “casting”.

Figura 9 - Esquema de produção de filmes DE

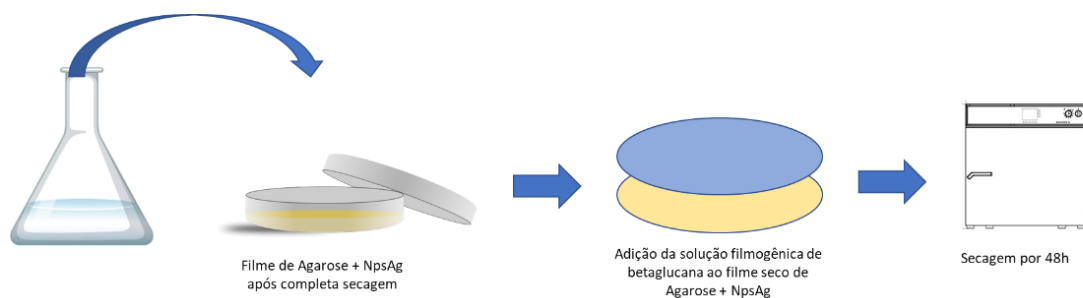


Fonte: A Autora (2023)

4.6 PRODUÇÃO DOS FILMES DE DUPLA CAMADA

Após a produção de filmes de betaglucana e posterior secagem em estufa de circulação forçada à 45°C por 48h, os filmes foram retirados e mantidos em temperatura ambiente. Paralelamente a este processo, foi elaborado solução filmogênica de agarose com NPsAg sendo temperatura da solução reduzida até 40° graus (Figura 8). Após temperatura desejada, a solução foi vertida em placa de Petri contendo o filme de betaglucana já em completo casting. As placas de Petri contendo o filme de betaglucana em secagem completa submergido em solução filmogênica de agarose e NPsAg retornaram à estufa de circulação forçada para novo processo de secagem, por mais 48h.

Figura 10 - Esquema de produção de filmes DP



Fonte: A Autora (2023)

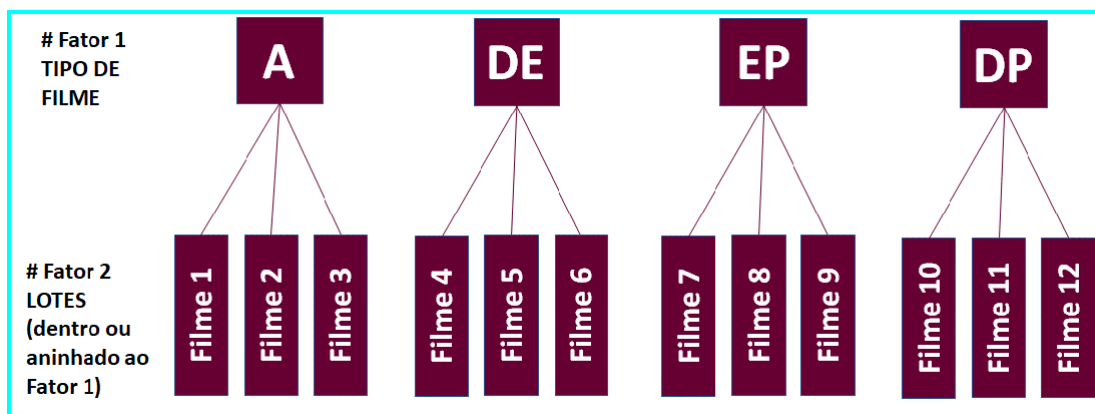
4.7 CARACTERIZAÇÕES DOS DISPOSITIVOS

Os substitutos dérmicos (DE), epidérmicos (EP), dermoepidérmicos (DP) e de agarose (A), este último como controle quando necessário, foram caracterizados e analisados em espessura, grau de intumescimento, absorção de água e espectroscopia no UV Vis e FTIR.

4.8 ESPESSURA

A espessura dos filmes DE, EP, DP e A foi obtida com auxílio de um micrômetro (Great Wall, modelo 428840), de precisão 0,01 mm. O delineamento experimental foi em estrutura hierárquica (ou aninhada). Foram realizadas medidas de cada tratamento, em quintuplicata, utilizando 3 filmes para cada tratamento, totalizando 15 medidas de cada tratamento (Figura 9). A análise estatística de variância (ANOVA) hierárquica foi aplicada utilizando o aplicativo Statistics Kingdom.

Figura 11 - Esquema experimental realizado para a análise de espessura dos filmes



Fonte: A Autora (2023)

Nota: Elaborado no endereço (<https://www.statskingdom.com/two-way-anova-calculator.html> em 19 fev 2023).

4.9 TEOR DE UMIDADE

Para determinar o teor de umidade dos filmes, foram realizadas pesagens iniciais das amostras dos filmes de cada tratamento e logo após postas em estufa de

secagem a 105°C. Em intervalos pré-definidos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15h) amostras foram retiradas da estufa, inseridas em dessecador sob repouso até temperatura ambiente. Após temperatura desejada, novas pesagens foram realizadas, repetindo tal processo até o alcance de peso constante. As determinações foram feitas em triplicata e o teor de umidade de cada amostra no tempo foi calculada pela seguinte Equação 1.

$$U\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

%U = Teor de Umidade M_i = Massa inicial

M_f = Massa final

Os dados foram analisados por ANOVA utilizando o software JAMOV.

4.10 GRAU DE INTUMESCIMENTO

A análise de absorção de água foi realizada para os filmes DE, EP, DP, através da avaliação do grau de intumescimento (%GI), conforme descrito por Lima, Andreani e Soldi (2007). Para tanto, amostras de cada tratamento dos filmes foram inicialmente pesadas em balança analítica de quatro casas decimais a fim de se obter a massa inicial (M_i). As amostras de massa conhecida foram imersas em 5 mL de água deionizada a temperatura ambiente, sob agitação controlada em mesa agitadora orbital (GyroMini, Nutating Mixer, Labnet). Em tempos pré-determinados, os filmes foram retirados da água, o excesso de água foi removido superficialmente com auxílio de papel filtro e a massa final foi novamente mensurada. O processo foi repetido até peso constante. A %GI foi determinada a partir da Equação 2.

$$\%GI = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

%GI= Grau de Intumescimento

M_t = Massa da amostra intumescida

M_0 = Massa da amostra seca

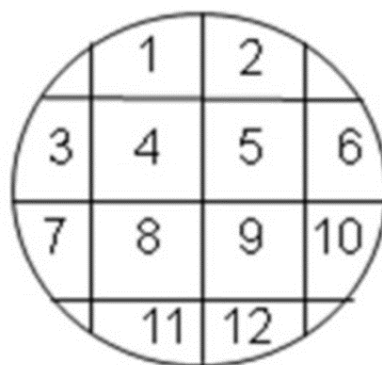
4.11 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NO UV VIS

As análises de espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis dos filmes produzidos na faixa de comprimento de onda $\lambda = 300$ a 700 nm, foram realizadas para avaliação da presença de NPsAg. Os filmes analisados por UV-vis foram DE, EP, DP, além do filme controle de agarose (A).

Análise da uniformidade de distribuição das NpsAg nos filmes.

Para a análise da distribuição das NpsAg nos filmes EP e DP foram produzidos filmes de 6 cm de diâmetro em sistema de casting. As placas foram divididas em setores devidamente registrados conforme a ilustração abaixo (Figura 11). Para cada setor foram realizadas uma leitura por espectroscopia UVVis no comprimento de onda de 410 nm típicas para detecção das NpsAg.

Figura 12 - Gabarito produzido para delimitar setores de filmes para análise por UV Vis



Fonte: A Autora (2023)

Foram realizadas duas abordagens, a primeira foi produzida histogramas, este formato de representação é utilizado nos controles estatísticos de qualidade para verificar alguma forma de anomalia nos processos produtivos, sendo, portanto, uma ferramenta que auxilia na detecção e análise de problemas (Rocha, 2019). A segunda ferramenta foi realizada a partir do referenciamento espacial das amostras

e dos valores de absorbâncias a partir destes dados foram elaborados mapas de calor utilizando o software Excel®.

4.12 ESPECTROSCOPIA NO FTIR

As amostras foram analisadas por espectroscopia FTIR, utilizando o dispositivo Agilent Technologies Cary 630FITR módulo ATR, utilizando um intervalo de número de onda de 4000-500 cm^{-1} , a fim de se identificar os grupos funcionais presentes nas amostras.

4.13 ANÁLISE COMPUTACIONAIS COMPARATIVAS DOS FILMES POR FTIR ASSOCIADA A PCA

As análises computacionais foram realizadas com os dados espectrais obtidos a partir dos dispositivos epidérmicos (EP), dérmicos (DE) e dermoepidérmicos (DP), e o filme controle de agarose (A), sendo as faces do dispositivo DP analisadas separadamente tendo a face dérmica (DP-FD) e face epidérmica (DP-FE).

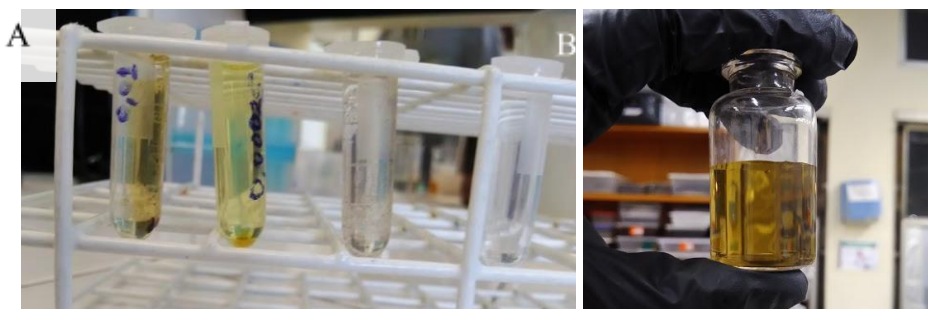
O método empregado para a análise foi aquele desenvolvido por Corina (2022). Inicialmente foram realizados em cada ponto do espectro de leitura uma avaliação do desvio padrão. Todos os pontos com desvio maiores que dez foram retirados da análise multivariada para fins de comparação. Além deste tratamento foram aplicados pré-processamento dos dados a fim de padronizar e reduzir ruídos, permitindo que a informação espectral pudesse ser submetida a análises multivariadas.

Foram aplicados, filtro de Savitzky-Golay, remoção das regiões espectrais com desvios maiores de dez, Gaussin Smoothing e correção da linha de base. Em seguida, os dados processados foram analisados por Análise dos Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquicas de Cluster (HCA) e pela ferramenta Freeviz. A determinação dos desvios foi auxiliada pelo software Excel Microsoft e as demais análises exploratórias de dados e o pré-processamento, foram desenvolvidas utilizando a ferramenta Orange Data Mining.

5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS

Os produtos de síntese das NPsAg da síntese 3 ($0,00025 \text{ mol.L}^{-1} \text{ AgNO}_3$) apresentaram coloração amarelada clara típica de NPsAg descritas pela literatura (Figura 3B) (ONOFRE et al 2018 ACCIOLY, 2018), as demais reações apresentaram-se de tonalidades amarronzadas (Figura 3A).

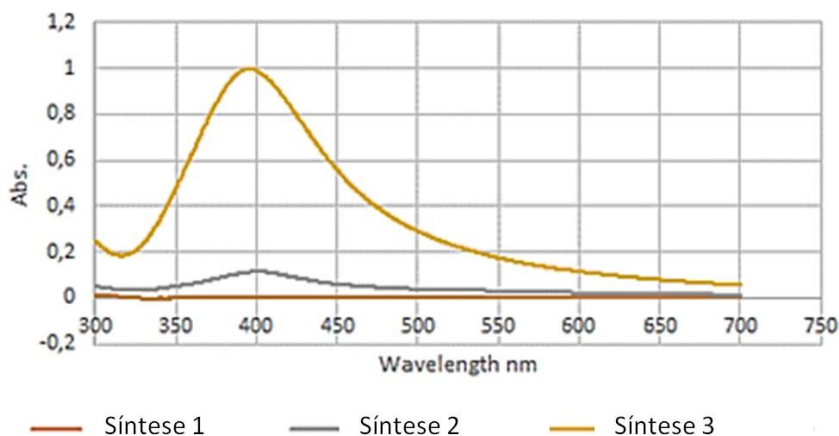
Figura 13 - (A)- Suspensões de NPsAg em diferentes sínteses, algumas apresentando precipitados. (B) Síntese 3 de NPsAg com coloração específica para nanopartículas.



Fonte: A Autora (2023)

Em análise por espectroscopia UV-Vis, a Síntese 3 com menor concentração de nitrato de prata apresentou maior produção de nanopartículas como observado no ensaio de absorbância UV-Vis (Figura 4). A menor eficiência das Sínteses 1 e 2 aparentemente está associada a formação de agregados de tamanho micrométricos, esta percepção é corroborada pela coloração amarronzada das sínteses.

Figura 14 - Espectros de absorção na região UV-Vis das NpsAg sintetizadas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3

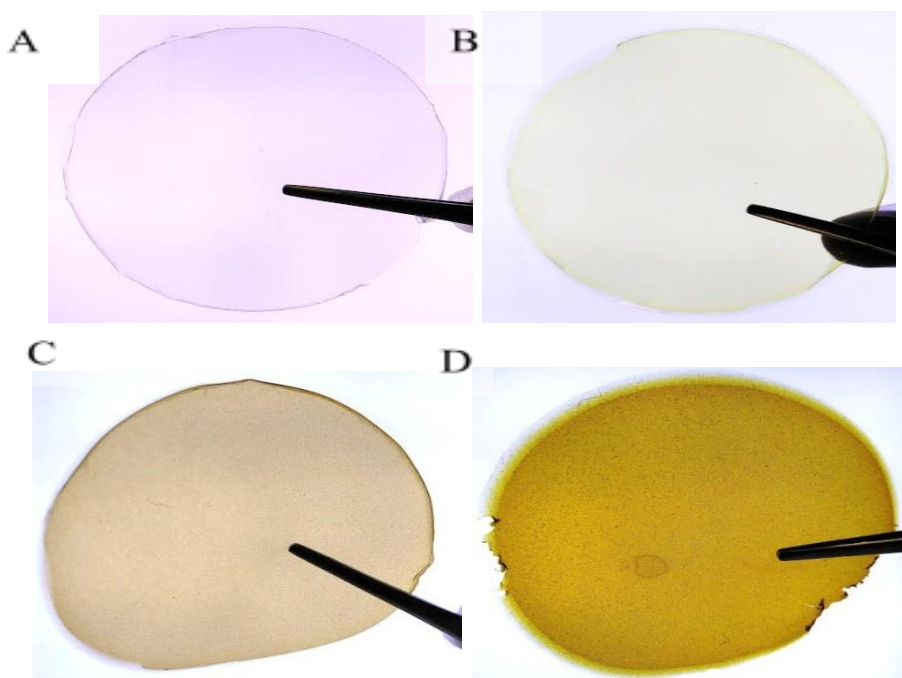


Fonte: A Autora (2023)

5.1 Produção de filmes de Agarose + NPSAG

As propriedades organolépticas dos filmes com incorporação de NPsAg apresentou flexibilidade com boa aderência, apresentando tonalidades de amarelo indicando a presença de nanopartículas de prata, todavia, os tratamentos com maiores concentrações apresentaram precipitados visíveis sem o auxílio de lentes ou instrumentos ópticos, indicando formação de partículas maiores que as desejáveis ao estudo (Figura 13).

Figura 15 - A) Filme de agarose sem NPsAg. (B) Filme com incorporação de NPsAg síntese 1, com coloração específica. (C) Filme com NPsAg síntese 2 (D) Filme com NPsAg síntese 3.



Fonte: A Autora (2023)

Para a continuidade do projeto optou-se pela utilização de filmes com NPsAg da Síntese 3, por comparação a artigos anteriores e por se aproximar do resultado das nanopartículas de tamanho desejável ao trabalho e este foi denominado substituto epidérmico EP.

5.2 SUBSTITUTO DÉRMICO

A produção de biomassa do consórcio BIONAT-1 (Figura 14) ocorreu de acordo com os padrões estabelecidos por Onofre-Carneiro et al. (2018) e transcorreu em um período de 12 meses tendo se obtido uma biomassa úmida total de cerca de 3 kg de consórcio.

Figura 16 - Cultura do consórcio microbiano BIONAT-1



Fonte: A Autora (2023)

5.2.1 Extração e Caracterização da Betaglcucana

O processo de extração de beta glucana (Figura 15A) ocorreu de acordo com os padrões estabelecidos por Berenguer (2018). Adicionalmente, foram realizados procedimentos de extração de beta glucana com clareamento acelerado utilizando hipoclorito de cálcio à 1%. (Figura 15 B). Além desses, foi procedido o tratamento e clareamento da betaglcucana com água potável, clorada sem purificação.

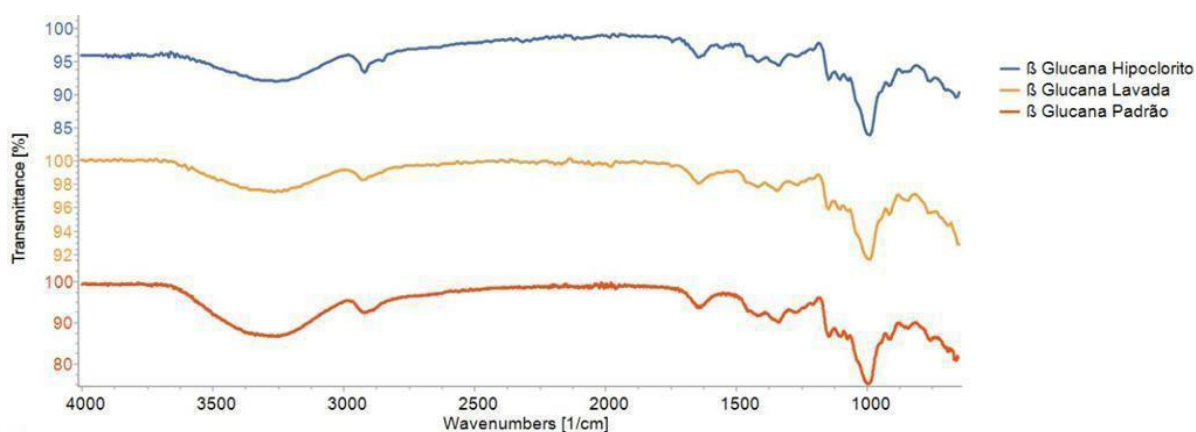
Figura 17 - Resultado da extração da betaglucana do Consórcio BIONAT-1. (A) Baseada no protocolo sugerido por Berenguer (2018) (B) Betaglucana obtida após pré-tratamento por hipoclorito de cálcio



Fonte: A Autora (2023)

A análise indicou que, tanto a betaglucana extraída pelo protocolo tradicional como a extraída com hipoclorito de cálcio e com água potável não apresentaram diferenças por espectroscopia vibracional FTIR significativas (Figura 16). Entretanto, optou-se utilizar beta glucanas branqueadas no protocolo desenvolvido por Berenguer (2018).

Figura 18 - FTIR das betaglucanas em diferentes protocolos produzidas neste trabalho, sendo tratamento com hipoclorito (azul), água da torneira- lavada (amarelo) e betaglucana padrão (laranja).



Fonte: A Autora (2023)

O espectro de infravermelho das betas-glucanas (Figura 17) apresentou uma banda larga e arredondada entre 3500 e 3000 cm^{-1} para todos os filmes, indicativo de grupos hidroxila com pontes de hidrogênio, característica comum em associações

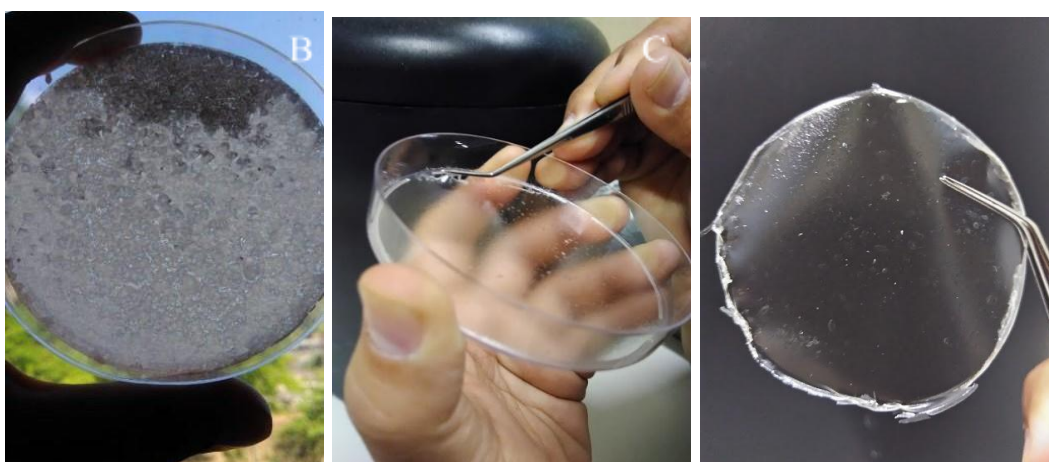
poliméricas de carboidratos. As bandas de frequência entre 3000 e 2800 cm^{-1} são correspondentes a ligações C-H comuns em grupos metilados. Bandas entre 1740 e 1720 cm^{-1} é característico de aldeído (C=O) (PAVIA et al, 2012).

Espectros próximos a 1450 cm^{-1} caracteriza deformação angular de ligações CO (BOTELHO, 2014). A região de impressão digital para carboidratos está na região entre 1200-900 cm^{-1} , que se associam aos anéis (cíclicos) e grupos laterais (C-O-C, COH e C-H). O estiramento a 1100 cm^{-1} é característico a todos os carboidratos (PICASSO, 2017). Os filmes DE e DP face dérmica apresentaram bandas entre 950-750 cm^{-1} , correspondentes a vibrações esqueléticas da glicose, característico das glucanas.

5.3 PRODUÇÃO DE FILMES DE BETAGLUCANA

A produção de filmes de beta glucana seguiu o protocolo descrito por Berenguer (2018), entretanto, foram necessários ajustes devido ao excesso de (Figura 17 A) e quantidade de beta glucana depositada por cm^2 da placa (Figura 17 B), ao final desse processo, foi verificada por avaliação organoléptica que os filmes se apresentavam uniformes e resistentes, porém com menor resistência comparado ao de agarose (Figura 17 C).

Figura 19 - Filmes de beta glucana realizados em diferentes momentos: (A) Filmes com grande quantidade de cristais de sal e sem maleabilidade. (B) Realizado em concentração menor. (3) Filme maleável e com boa aderência.



Fonte: A Autora (2023)

Após os ajustes e a escolha do processo de produção da matéria-prima dos filmes foi eleito um protocolo final para produção do filme denominado DE.

5.4 SUBSTITUTO DERMOEPIDÉRMICO

A produção de filmes de dupla camada foi realizada com a sobreposição dos filmes, sendo o primeiro já seco e o segundo em solução filmogênica. Inicialmente o dispositivo epidérmico foi construído, levado a secagem, sendo vertido posteriormente a solução filmogênica do filme dérmico, porém ocasionou grande aderência à placa de Petri após secagem final, sendo então revertido o processo: os dérmicos foram os primeiros a serem elaborados e, após secagem, foi vertida a solução dos filmes dérmicos. Finalizado o processo de secagem, os filmes de dupla camada se apresentaram íntegros, com boa soldura da placa, apresentando bordas levemente enrugadas, com boa plasticidade e aderência à pele (Figura 18).

Figura 20 - Filmes de dupla camada dermoepidérmico (DP)



Fonte: A Autora (2023)

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS

Os filmes desenvolvidos apresentaram variações de espessura entre 63,3 e 175 micrometros. Os filmes EP ($89 \mu\text{m} \pm 6,6 \mu\text{m}$) se mostraram mais espessos em relação aos DE ($63,3 \mu\text{m} \pm 15,66$) e semelhantes as mensurações do A ($84,7 \mu\text{m} \pm 6,4$). Cianca (2020) corrobora com os achados de menor espessura dos filmes de beta glucana quando comparados aos filmes de quitosana e xantana. Este comportamento se dá provavelmente pela diminuição dos números de ligações eletrostáticas entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxil da xantana, uma vez que os grupos pertencentes ao polímero xantana estão em menor proporção nas amostras que continham beta glucanas.

Além disso, Wan (2007) afirma que os biomateriais com aplicação como substitutos dérmicos precisam ser idealmente mais finos que a derme humana, onde a espessura varia entre 0,5 e 2 mm, dependendo da idade, sexo e região do corpo.

Já os filmes DP se apresentaram mais espessos que todos os outros ($0,1750 \text{ mm} \pm 0,01180$), fato este justificado pela sobreposição dos dois dispositivos, mantendo íntegra a ideia de incremento nos filmes sem perda de materiais durante o processo de unificação.

A análise da espessura de um biomaterial é de extrema importância principalmente quando o seu papel como curativo bioativo é posto em questão, pois atividades como absorção de soluções aquosas, capacidade de liberação e impregnação de fármacos e a capacidade de trocas gasosas pelas membranas - que são qualidades essenciais em um curativo ideal, são diretamente influenciáveis pela espessura do dispositivo (CIANCA 2020).

O teste estatístico hierárquico ou aninhado pode ser utilizado para controle de qualidade de matérias-primas analisando diversos lotes de diversos fornecedores. Deste modo, o teste pode analisar diferenças estatísticas entre fornecedores e se há variações significativas dentro dos lotes de cada fornecedor.

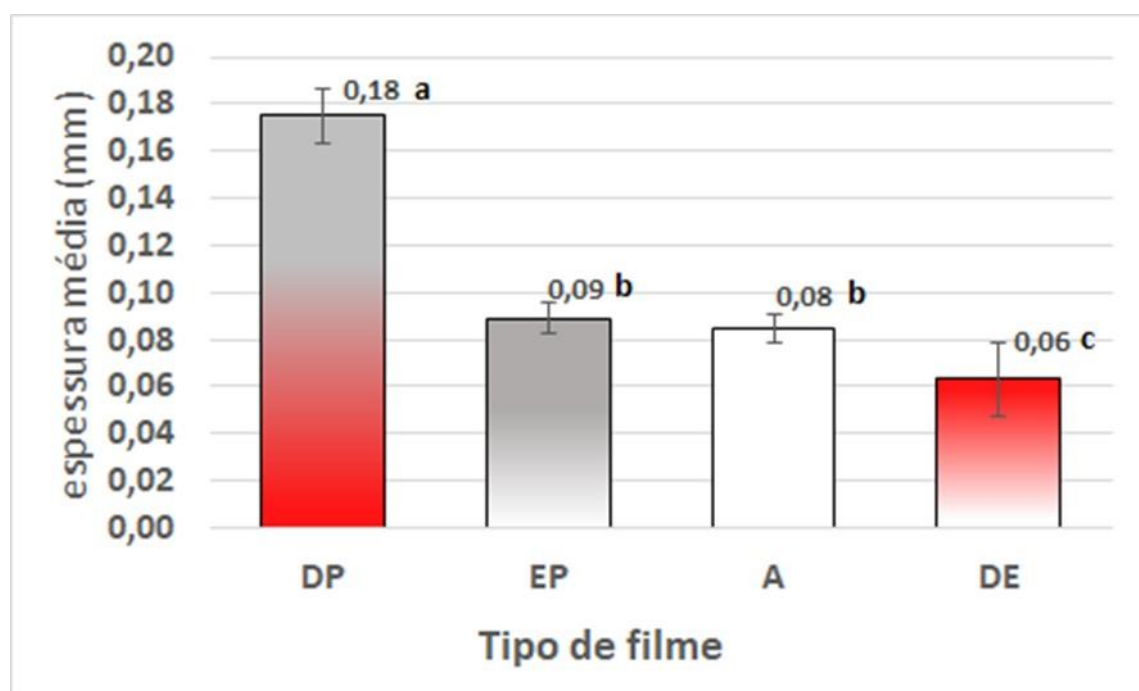
A Tabela 2, aponta um $p < 0,05$ ($p=1,955.10^{-13}$), entre os tipos do filme (DE, EP, DP e A), demonstrando que houveram diferenças significativas de espessura entre alguns tipos de dispositivos entre si. Para a determinação de quais tratamentos diferenciam entre si, foi realizado um teste post-hoc de Tukey, os resultados obtidos estão expressos em gráfico de barras (Figura 13).

Tabela 2 - ANOVA hierárquica, analisando a espessura de 3 lotes dos filmes DE, EP, DP e A, experimento com 5 repetições/lote. Sendo: g.l. graus de liberdade

Fonte	gl	Soma do Quadrado (SS)	Quadrado Médio (MS)	F	p
Entre tipo de filmes	19	0,1118			
Tipo de filme	3	0,1093	0,03645	234,8313	1,955.10⁻¹³
Resíduo	16	0,002483	0,0001552		
Dentro Tipos de filmes	40	0,004083			
Lote dentro de tipo de filme	2	0,0006825	0,0003413	4,288	0,02239
Interação tipo de filme*lote	6	0,0008542	0,0001424	1,7888	0,1329
Resíduo	32	0,002547	0,00007958		
Total	59	0,1159	0,001965		

Fonte: A Autora (2023)

Figura 21 - Teste post-hoc de Tukey, os resultados obtidos estão representados em gráfico de barras, letras diferentes = significativo a 0,001

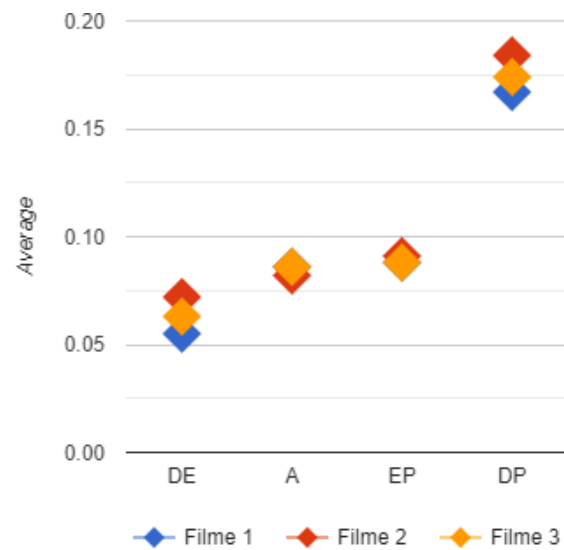


Fonte: A Autora (2023)

Legenda: DP- Dermoepidérmicos, EP- Epidérmicos, DE – Dérmicos.

No gráfico foi possível identificar que os filmes EP e A são equivalentes, não possuindo diferença estatística significativa. Por outro lado, os filmes DP diferiam significativamente dos demais sendo mais espessos, adicionalmente o dispositivo DE.

Figura 22 - Médias de lotes (=Filmes) analisados por espessura (mm)



Fonte: A Autora (2023)

Para confirmar esta constatação visual foi elaborado um novo teste post Hoc de Tukey, desta vez para analisar as diferenças entre lotes dentro dos tipos de dispositivos, estes dados foram dispostos em quadro seguinte (Figura 21). A análise post Hoc, indica que as diferenças dos filmes DE dos lotes 1 e 2 foram significativamente diferentes (0,01700) o mesmo ocorreu para os lotes 1 e 2 dos filmes DP (0,01700).

Figura 23 - Quadro de comparação de médias por lote dentro de tipo de filme, todos os valores de medida estão em mm. Os valores acima do Δ calculado (0,013923) são em destaque em vermelho.

$\Delta = 0,013923$

Média DE	lote	2	3	1
	2			
	3	0,00900		
	1	0,01700	0,00800	

Média DP	lote	2	3	1
	2			
	3	0,01000		
	1	0,01700	0,00700	

Média EP	lote	2	1	3
	2			
	1	0,00300		
	3	0,00300	0,00000	

Média A	lote	1	3	2
	1			
	3	0,00000		
	2	0,00400	0,00400	

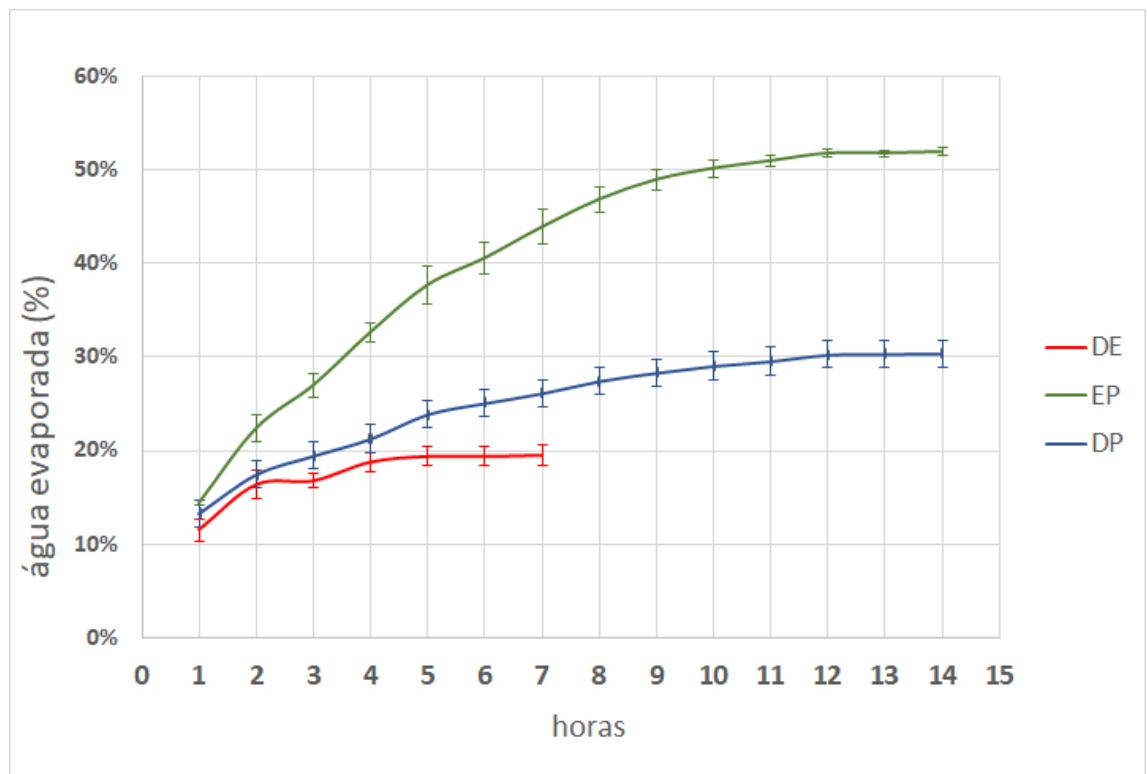
Fonte: A Autora (2023)

5.6 TEOR DE UMIDADE

Os filmes alcançaram estabilidade de massa seca em tempos diferentes durante o teste (Figura 22). O processo de secagem total dos filmes DE se deu de forma rápida, atingindo peso constante 7h após o início do processo, com cerca de 20% de evaporação de água do total da massa. O ensaio para esses filmes foi interrompido por alteração na consistência dos filmes que se apresentavam secos e quebradiços, que levava a perda de material por dificuldade de recolhimento da amostra.

Os filmes DP e EP apresentaram-se íntegros até finalização do processo, ambos atingindo massa constante após 14h de secagem, porém os EP apresentaram maiores propriedades de perda de umidade em relação a todos os tratamentos, atingindo 50% de evaporação, enquanto os DP chegaram a 30%, fato esse que pode ser justificado pela composição deste filme que possui betaglucana, que por sua vez possui menor teor de água inicial. Os resultados também indicam que filmes EP retém mais água após o processo de fabricação, o que pode em tese, viabilizar o desenvolvimento de microrganismos em sua superfície

Figura 24 - Secagem de filmes DE, EP e EP a 105°C

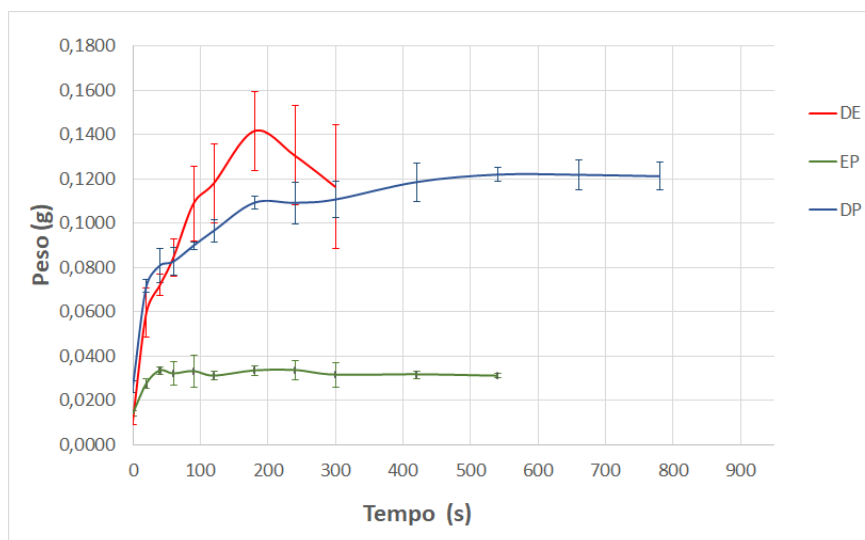


Fonte: A Autora (2023)

A análise de ANOVA levou em conta apenas os teores finais de umidade independente dos tempos necessários. O valor de $p < 0,001$ indicou que existem diferenças significativas entre os tratamentos DE, EP e DP. Para verificar quais as diferenças significativas entre os filmes foram elaborado um teste post Hoc representado em gráficos de barras (Figura 23).

No teste foi possível observar que os três dispositivos se diferenciaram entre si de forma significativa, por ordem de teor de umidade após sua confecção $EP > DP > DE$.

Figura 25 - Absorção de água dos dispositivos DE, EP e DP



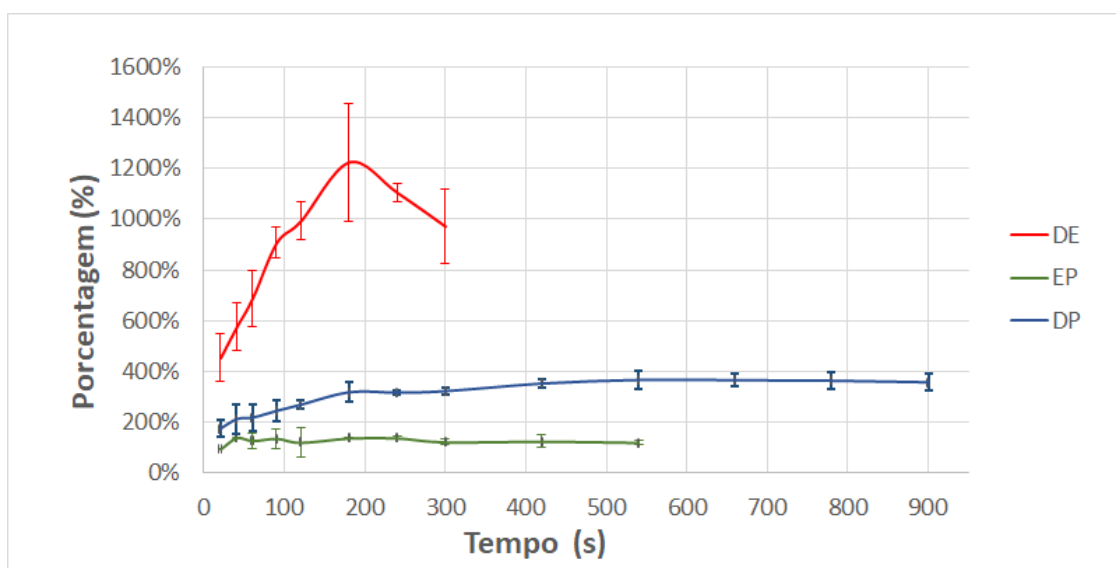
Fonte: A Autora (2023)

Dados de ONOFRE (2014) corroboram neste sentido, pois a autora relata que em seus ensaios de intumescimento de filmes de beta glucana, estes desintegraram nos primeiros minutos do teste, não sendo possível estimar a razão de intumescimento.

Cianca (2020) relata em seu experimento que a adição crescente da beta glucana interfere de maneira significativa nos resultados, pois são filmes mais finos, menos absorventes em relação a água e a solução salina, porém, segundo o autor, esse fato não impossibilita o uso da beta glucana como curativo dermoepidérmico, já que demonstrou adequada capacidade de drenagem e ótima absorção de fluido corpóreo simulado, além de características de baixa espessura e excelente alongamento quando úmidas. Não obstante, ressalta-se que as beta-glucanas são polímeros muito diversos no que tange suas propriedades físico-químicas e biológicas, podendo variar sua resposta de acordo com lote, grau de ramificação, tamanho de cadeia entre outros.

Constatou-se, em relação ao grau de intumescimento, curvas semelhantes às aquelas observadas na absorção de água, entretanto, se em termos de valores absolutos de absorção de água, os dispositivos DE e DP tinham desempenho semelhantes (Figura 24), em termos relativos (taxa de intumescimento) os dispositivos DP e EP passam a se assemelhar (Figura 25).

Figura 26 - Grau de intumescimento dos filmes DE, EP e DP



Fonte: A Autora (2023)

Em relação à menor absorção dos filmes EP, Jillani e colaboradores (2022) identificaram uma correlação inversa entre o grau de intumescimento e a concentração de agarose. Em seu estudo, quanto mais a porcentagem de agarose no filme se elevava, a absorção de água se tornava mais limitada. Tal resultado se justifica pela formação de uma matriz de filme mais compacta, de forma que o índice de expansão diminuiu de 340% para 90%.

Apesar da precoce desintegração dos filmes, os DE apresentaram-se mais intumescidos, com pico de intumescimento aos 180 s, ultrapassando 1200 % de seu peso inicial, podendo assim ser classificado como polímero super-absorvente segundo os critérios de Santos (2016)

Os filmes EP e DP apresentaram comportamento semelhante, com ascensão gradual e contínua até atingir peso constante, próximo aos 400s. Em relação aos dois tratamentos, a razão de intumescimento variou entre 100 a 350% (EP e DP, respectivamente). Em relação aos filmes DP, a característica de maior absorção e taxa de intumescimento pode ser explicada pelo fato do mesmo conter beta glucanas na composição na face dérmica.

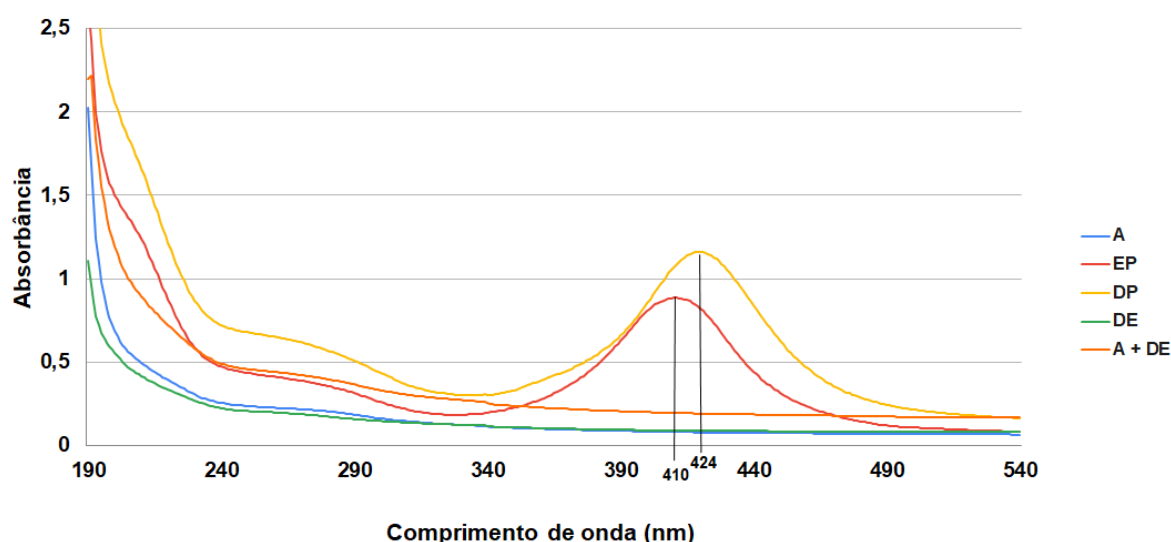
Observou-se ainda a manutenção da integridade dos filmes EP e DP, que pode ser observada pelos filmes de agarose servirem como estabilizadores e

aderentes da beta glucana, mantendo as interações entre cadeia mais firmes durante toda presença de água.

5.7 ESPECTROSCOPIA UV VIS

Ensaio preliminares com espectroscopia UV-Vis empregada em dispositivos contendo ou não NPsAg indicaram que os filmes que continham somente agarose, beta-glucana ou a combinação delas (A+ DE), não possuíam absorbância na faixa próxima a 400 nm (Figura 24). Nesta faixa pode-se constatar a presença destas nanopartículas utilizando-se esta técnica (Figura 12). Observou-se ainda, que os filmes EP e DP apresentaram máximos referentes a presença das NPsAg (Figura 24) mas com máximos diferentes (410 e 424 nm respectivamente).

Figura 27 - Perfil UV Vis dos filmes A, EP, DP, DE e A+DE



Fonte: A Autora (2023)

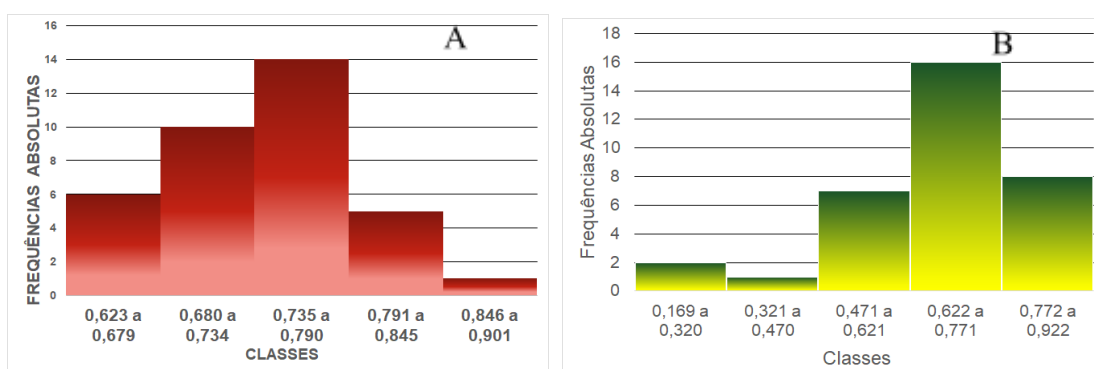
A inspeção organoléptica visual dos filmes EPs contendo NpsAg apontava que a distribuição das nanopartículas se mostrava uniforme ao longo do filme produzido. Tal inspeção foi de caráter qualitativo, buscou-se neste trabalho, desenvolver uma ferramenta de qualificação quantitativa dos filmes produzidos.

Para tanto, utilizou-se como parâmetro a absorbância por espectroscopia UVVis na faixa de 410 nm de filmes EP e DP, tal máximo é típico das NPsAg e possui correlação direta com a quantidade de NPsAg.

De acordo com os resultados obtidos no UV Vis a média dos valores de absorbância em 410 nm do filme EP foi de $0,740 \pm 0,061$ sendo realizadas 36 leituras com valor máximo de 0,901 e mínimo de 0,623, já para os filmes DP apresentaram média de $0,667 \pm 0,173$ de absorbância, tendo sido observadas 34 amostras com valor máximo de 0,922 e mínimo de 0,169.

Segundo Rocha (2019) o histograma é uma das ferramentas mais frequentes para a análise controle de qualidade de processos, através destes é possível inferir problemas na linha de produção e propor soluções e controles para eles. A partir dos dados descritos no parágrafo anterior foi possível elaborar dois histogramas de cinco classes, um referente ao dispositivo EP (Figura 18A) e outro para DP (Figura 18B).

Figura 28 - Histograma gerados a partir dos dados de absorbância dos dispositivos EP e DP



Fonte: A Autora (2023)

Rocha (2019) afirma que os histogramas de um processo de produção devem ser simétricos no formato de “sino” com o valor médio desejado localizado em seu centro, desta forma o processo produtivo estaria sob controle. O mesmo autor discute diversas apresentações gráficas atípicas de histogramas e quais seriam as possíveis causas para esta apresentação.

Dentro da perspectiva de Rocha (2019) os filmes obtidos de DP e EP apresentaram histogramas atípicos. No caso dos filmes EP a atipicidade presente seria do tipo truncada, Rocha (2019) atribui o truncamento (à esquerda ou à direita) a presença de fatores não estatísticos que “truncam” a distribuição normal. Por outro

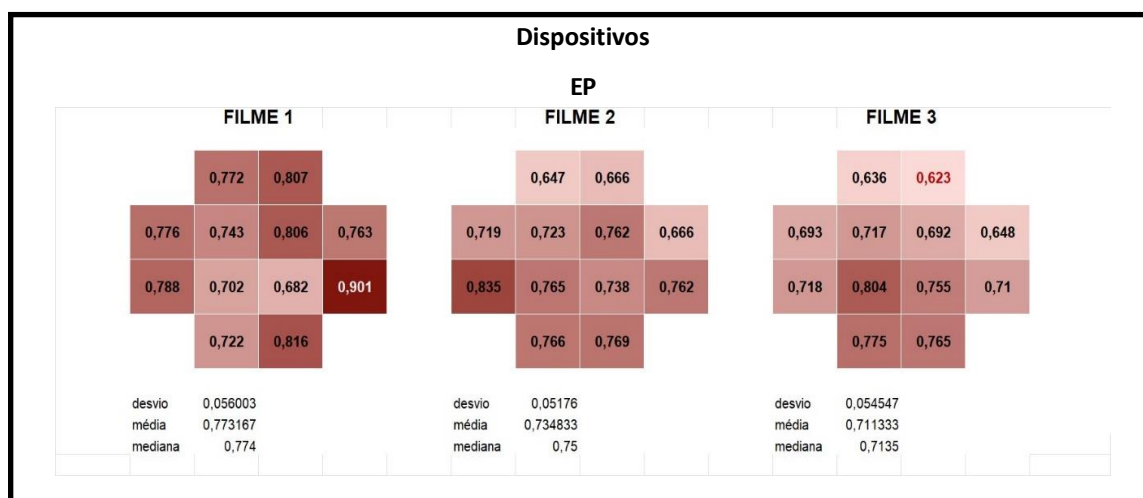
lado, Leite (2012), considera que histogramas do tipo truncados podem ser agregados ao de distribuição normal e serem classificados como processos padronizados, estáveis, em que a característica de qualidade é contínua e não apresenta nenhuma restrição teórica.

Os dispositivos DP foram analisados, e estariam representando histogramas assimétricos, onde o valor médio está localizado fora do centro, e a frequência diminui gradativamente de um dos lados e de forma abrupta do outro (Rocha, 2019). Ocorre quando a variável possui apenas um limite de especificação, segundo Leite (2012), histogramas assimétricos no controle de qualidade podem indicar a presença de um desvio em relação à distribuição normal dos dados, o que pode ser um sinal de problemas com o processo de produção ou de medição.

De acordo com Montgomery (2013), para identificar e corrigir os problemas de qualidade associados a um histograma assimétrico, é necessário investigar as possíveis causas raiz do desvio em relação à distribuição normal dos dados. Isso pode envolver a realização de análises estatísticas mais avançadas, como a análise de regressão ou a análise de correlação, bem como a inspeção do processo de produção e dos equipamentos de medição.

Adicionalmente aos histogramas, os dados dos filmes EP e DP foram organizados em mapas de calor (Figuras 28 e 29 respectivamente), sendo assim possível visualizar a heterogeneidade na distribuição de NPsAg nos filmes ao longo das placas.

Figura 29 - Mapas de calor obtido a partir de leituras de absorbância 410 nm de dispositivos EP, cada filme circular é representado por um conjunto contínuo, as cores mais escuras são absorbâncias maiores e claras as menores



Fonte: A Autora (2023)

Os mapas de calor elaborados foram do tipo espacial, não havendo nenhum reordenamento da posição dos elementos quantitativos. Ainda que do ponto organoléptico (visual) os filmes se apresentaram homogêneos, observou-se que nos dispositivos EP e DP houve distribuição desigual nos filmes e entre filmes.

Os dispositivos EP aparentemente apresentam distribuição heterogênea entre placas, o que pode indicar problemas de sedimentação ou homogeneização no momento de acréscimo das NPsAg na solução filmogênica (Figura 28).

Nos dispositivos EP por exemplo, o Filme 1 teve em média maior absorbância e consequentemente maior quantidade de nanopartículas que o Filme 3. O Filme 2 aparentemente apresentou quantidades intermediárias.

Apesar do conteúdo por placa aparentemente ser diferente a distribuição das NPsAg aparentemente foi uniforme, podendo ser inferido tanto pela visualização do mapa de calor, como pelos valores de desvio-padrão relativamente uniforme entre placas. Os mapas de calor são relatórios, com indicações em cores que podem ser usados para facilitar a visualização de determinado conjunto de dados e que auxilia na interpretação deles.

Figura 30 - Mapas de calor obtido a partir de leituras de absorvância 410 nm de dispositivos DP, cada filme circular é representado por um conjunto contínuo, as cores mais escuras são absorvâncias maiores e claras as menores. ND significa não mensuradas



Fonte: A Autora (2023)

Os mapas de calor observados para os dispositivos DP (Figura 29) indicam uma maior heterogeneidade de valores de absorvância, que pode indicar tanto uma má distribuição como um artefato de técnica, visto que no estudo de espessura foram detectadas maiores variações nas espessuras dos filmes com beta glucana. Além deste ponto, o fato de o filme DP ser duplo, este pode superestimar a absorvância pela alteração da linha de base, como pode ser observado no controle A+DE (Figura 26).

Observou-se ainda que, os dispositivos DP dos filmes 1 e 2 se mostraram mais desuniformes (desvio padrões maiores) e há maiores variações de cores para o Filme 1, por outro lado o Filme 3 foi mais uniforme (desvio padrão menor) apresentando cores mais uniformes.

Estes dados são indicativos que novas ferramentas de amostragem e novos desenhos experimentais devem ser desenvolvidos para gerenciar melhor a uniformidade de filmes produzidos. Paralelamente novas formas de produção devem ser desenvolvidas, como em trabalho realizado por Kishida et al., (1998), onde foi constatado que a forma de secagem e armazenagem do filme pode interferir na distribuição dos princípios ativos no filme.

5.8 FTIR

A análise vibracional no infravermelho com transformada de Fourier, é uma ferramenta poderosa pois gera rapidamente uma grande quantidade de dados que podem caracterizar fenômenos relevantes com vibrações moleculares específicas e mais recentemente determinar agrupamentos de interesses, neste trabalho foi realizado um esforço adicional para a caracterização de grupos a partir de dados de FTIR associados a estatística descritiva e análise de componentes principais PCA.

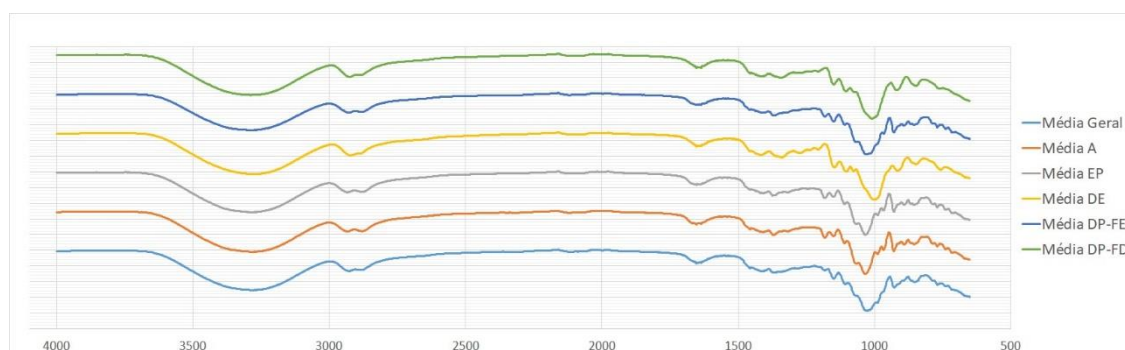
5.9 ANÁLISE DOS ESPECTROS FTIR DOS DISPOSITIVOS

A análise dos espectros de infravermelho dos dispositivos (Figura 30) ficou idêntica aos que foram observados para a matéria-prima beta-glucana, resumidamente: apresentou uma banda larga e arredondada entre 3500 e 3000 cm^{-1} para todos os filmes, indicativo de grupos hidroxila com pontes de hidrogênio, característica comum em associações poliméricas de carboidratos.

As bandas de frequência entre 3000 e 2800 cm^{-1} são correspondentes a ligações C-H comuns em grupos metilados. Bandas entre 1740 e 1720 cm^{-1} é característico de aldeído (C=O) (PAVIA et al, 2012). Espectros próximos a 1450 cm^{-1} caracteriza deformação angular de ligações CO (BOTELHO, 2014).

A região de impressão digital para carboidratos está na região entre 1200-900 cm^{-1} , que se associam aos anéis (cíclicos) e grupos laterais (C-O-C, COH e C-H). O estiramento a 1100 cm^{-1} é característico a todos os carboidratos (PICASSO, 2017). Os filmes DE e DP face dérmica apresentaram bandas entre 950-750 cm^{-1} , correspondentes a vibrações esqueléticas da glicose, característico das glucanas.

Figura 31 - Figura 30 Perfis FTIR médio dos filmes A, EP, DE, DP-FE e DP-FD.



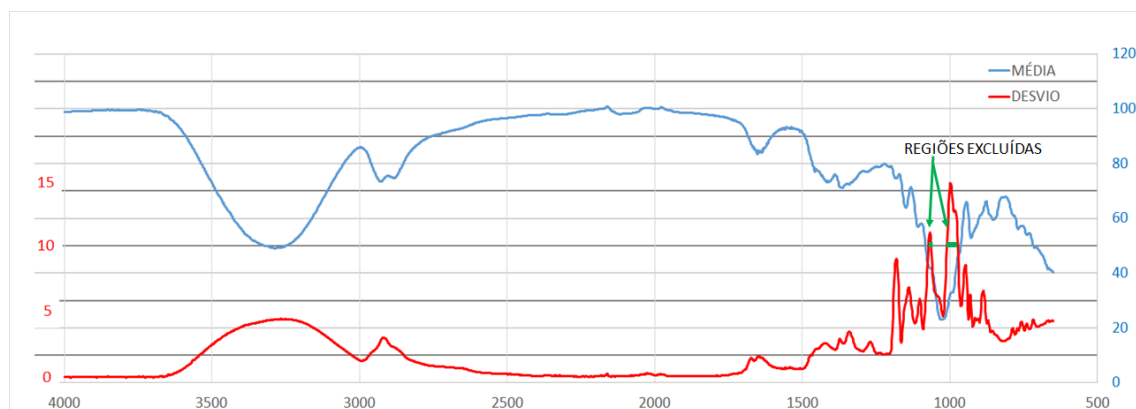
Fonte: A Autora (2023)

5.10 ANÁLISES COMPUTACIONAIS

Os ensaios computacionais utilizando análise multivariada, seguiu o roteiro proposto por Corina (2022) que consiste em analisar inicialmente por estatística descritiva 1798 agrupamentos de dados. Cada agrupamento consiste em um número de onda específico gerado pelo FTIR/ATR.

Neste experimento, estes agrupamentos são formados pelas amostras dos dispositivos EP, DE, A, DP FD e DP FE, cada dispositivo foi avaliado em três filmes diferentes e para cada filme foram tomadas três repetições, totalizando assim nove medidas por tipo de dispositivo. A partir destes dados foram calculados os desvios padrões e as médias de todos os agrupamentos gerados, em seguida estes dados foram plotados em um gráfico (Figura 20).

Figura 32 - Média e Variâncias gerais englobando todos os filmes analisados por FTIR. Em verde áreas excluídas da análise



Fonte: A Autora (2023)

Observa-se que os valores de média e desvio-padrão varia ao longo do número de ondas (eixo x). A partir de simulações e observações empíricas, Corina (2022) determinou que regiões com valores de desvio-padrão maiores que dez, prejudicavam a análise de PCA, seguindo esta regra empírica foram excluídos durante o processo de filtragem as regiões 974 a 1008 e 1064 a 1071.

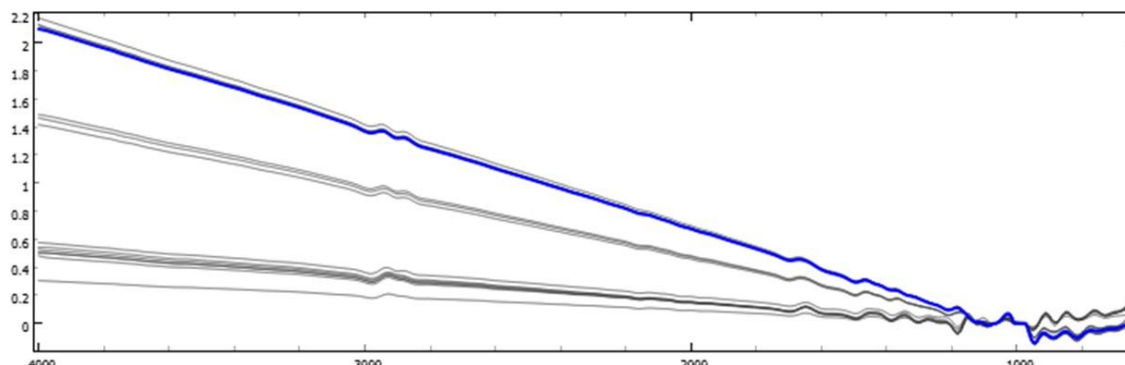
5.11 PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS

Após a delimitações de regiões excluídas da análise os dados foram tratados no software Orange, aplicando-se os seguintes filtros:

- Emprego do filtro Savitzky-Golay
- Remoção de dados de 974 a 1008
- Remoção de dados de 1064 a 1071
- Suavização Gaussiana
- Correção de linha de bases nas regiões 974 a 1008 e 1064 a 1071.

Cada aplicação de filtro foi documentada (Anexo 1), o aspecto final dos dados representado em gráfico, lembra linhas convergentes e diferem sensivelmente dos dados originais (Figura 32)

Figura 33 - Aspecto final após pré-tratamentos dos espectros FTIR



Fonte: A Autora (2023)

5.12 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS – PCA

Segundo Silva (2005) a análise de componentes principais (PCA) pode ser uma ferramenta quimiométrica importante, pois reduz o número de variáveis envolvidas no modelamento, de dados analisados. Neste sentido, os componentes principais possuem um papel importante pois idealmente tem o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados.

Neste trabalho a PC1 representa 96,90% da variação total dos dados no geral. Os demais componentes principais PC2 (1,70%), PC3 (0,80%), PC4 (0,30%), PC5 (0,10%), PC6 (0,10%) e PC7 (0,10%) não ultrapassam individualmente 2 % da variação global (Figura 22). Valores altos de PC1 indicam que a maior parte da variabilidade nos dados pode ser explicada por uma combinação linear de variáveis que está fortemente relacionada a essa componente principal. Isso pode indicar, por exemplo, a presença de um fator importante que influencia a composição química de uma amostra.

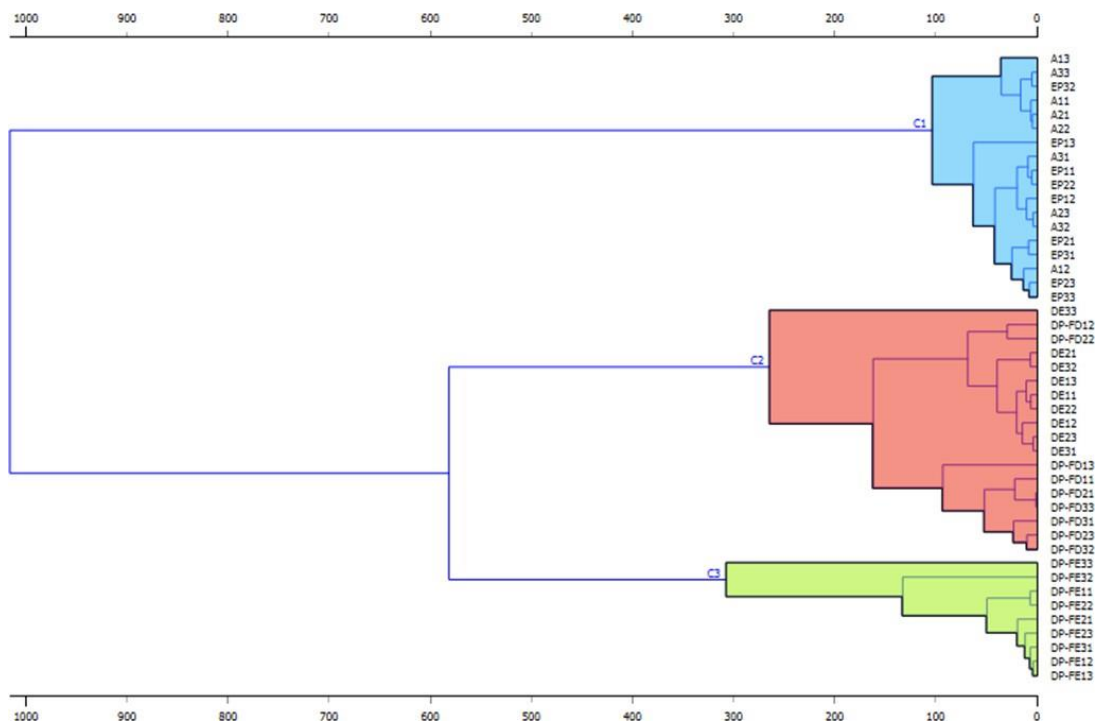
5.13 ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER – HCA

Segundo Santos (2005), a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) é uma técnica aglomerativa não supervisionada que examina as distâncias

interpontuais entre todas as amostras do conjunto de dados e representa essa informação na forma de um gráfico bidimensional chamado dendograma.

Essas representações agrupam amostras semelhantes e separa amostras mais dissimilares, neste trabalho observa-se três grandes grupos (Figura 33), o primeiro grupo consiste na junção dos dispositivos A e EP que são baseados em agarose e que se diferenciam essencialmente pela presença de NPsAg. Um segundo grupo é formado pelos dispositivos DE e DP FD, a principal característica deste grupo é a presença da beta glucana nas faces analisadas, e o terceiro grupo é formado basicamente pelos dispositivos DP FE onde a face analisada do filme de dupla camada é a face da agarose com NPsAg.

Figura 34 - HCA gerado a partir dos dados pré-tratados



Fonte: A Autora (2023)

Foi possível identificar por meio do gráfico de dispersão, certa predisposição a formação de agrupamentos entre classes similares, indicados por cores, que correspondem a amostras do mesmo tratamento, sendo A (azul), EP (amarelo), DE (vermelho), DP FD (verde) e DP FE (laranja).

Ademais a análise pelo gráfico de dispersão, indica que, assim como ocorreu na análise por HCA, os agrupamentos dos dispositivos A e EP não são distinguíveis,

esta constatação deve estar relacionada as limitações do FTIR/ATR em analisar ligações metálicas presentes nas NPsAg e que fundamentalmente distingue os grupos A e EP.

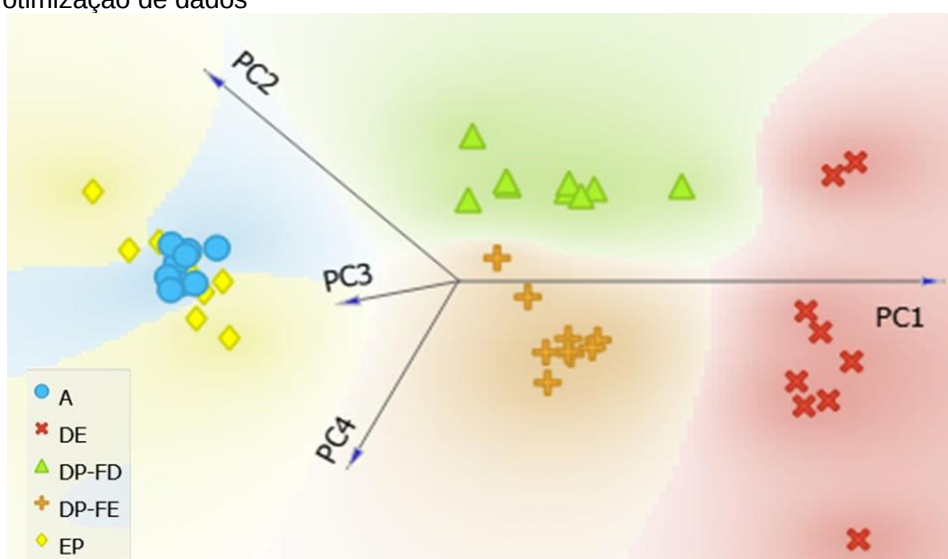
Análise de dispersão utilizando o Scatter Plot revela ainda que se pode observar 3 grupos distintos DE, DP-FD e FP-FE, possibilitando assim a separação de agrupamentos por face analisada de um único dispositivo de dupla camada. Entretanto as delimitações das bordas nos gráficos entre os dispositivos parecem difusas, podendo acarretar eventuais erros de classificação.

5.14 FERRAMENTA FREEVIZ

A ferramenta Scatter Plot possibilita somente a análise de dois componentes principais por vez, o que limita a ferramenta já que outros PCs poderiam contribuir de alguma forma na delimitação dos agrupamentos e das bordas.

Por conta dessas limitações foram realizadas também simulações no FreeViz ferramenta que possibilita a inserção de novos eixos de componentes principais na mesma representação gráfica e adicionalmente possui duas funcionalidades. A primeira otimiza os eixos selecionados (Figura 34) e a segunda permite a movimentação (angulação) e dimensionalidade deles (Figura 35).

Figura 35 - Gráfico do FreeViz considerando 4 PCs e utilizando a ferramenta para otimização de dados

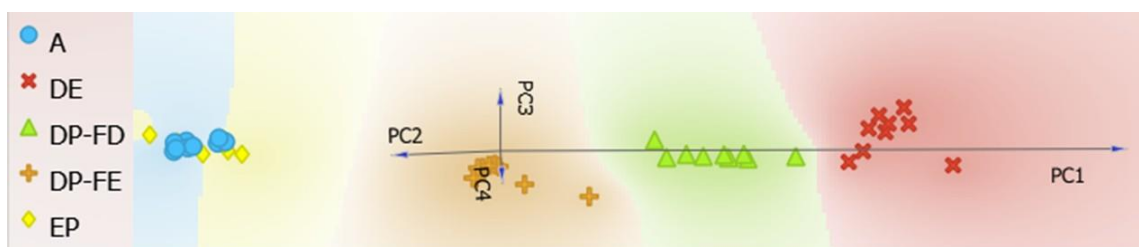


Fonte: A Autora (2023)

Observa-se que a utilização de Ferramenta FreeVis possibilitou a formação dos mesmos agrupamentos observados no Scatter Plot, entretanto aparentemente as amostras dos dispositivos DP-FE estão mais agrupadas (Figura 34).

Corina (2022) propôs a utilização da Ferramenta FreeViz para gerar gráficos utilizando a seguinte regra: A) Utiliza-se 4 PCs dispostos ortogonalmente entre si; B) Os eixos são proporcionais aos valores estimados dos PCA. Neste caso, em uma escala de 0 a 10 cm, teriam graficamente PC1 9,69 cm, PC2 1,7 cm, PC3 0,8 cm e PC4 0,3 (Figura 35).

Figura 36 - Gráfico Free Viz com quatro PCs gerados a partir da regra empírica proposta por Corina (2022)

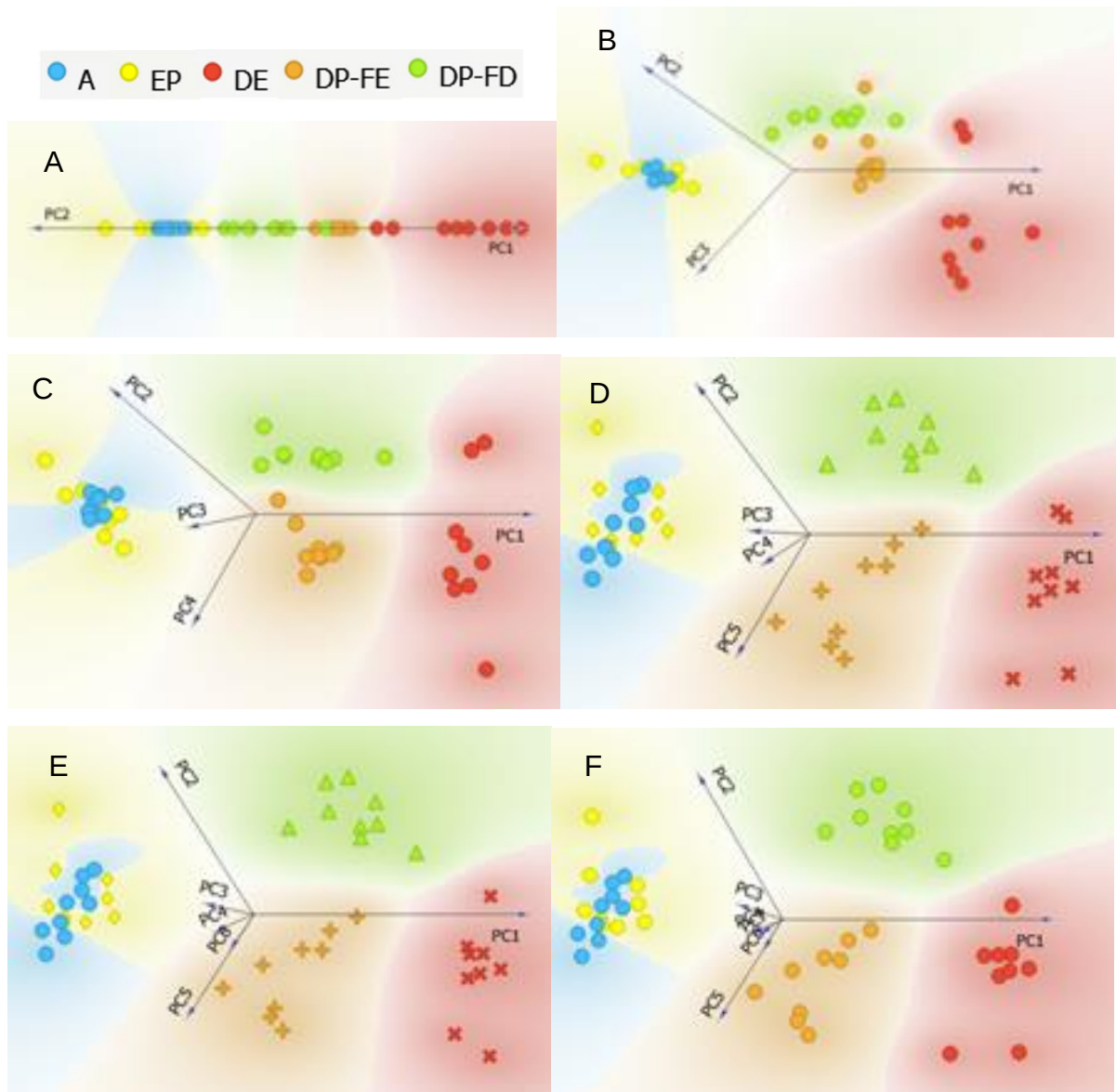


Fonte: A Autora (2023)

Esta disposição possibilitou visualizar além dos grupos, uma distribuição linear dos dispositivos que curiosamente foram dispostos de acordo com a contribuição da matéria prima utilizada. A esquerda ficou os dispositivos baseados em agarose (EP, A), a direita dispositivos baseados em beta glucana (DE), a centro-esquerda dispositivos dupla camada que foram analisados em sua face de agarose (DP-FE) e a centro-direita, dispositivos de dupla camada que foram analisados em sua face de beta glucana (DP-FD).

Adicionalmente foram realizadas simulações com os componentes principais PC2, PC3, PC4, PC5, PC6 e PC7 no Free Viz utilizando o recurso de otimização. Observou-se que à medida que são inseridas as PCs, em uma certa medida houve melhor definição das bordas dos grupos, e adensamento das repetições no gráfico.

Figura 37 - Efeitos da adição de componentes principais nos gráficos otimizados gerados pelo programa FreeViz



Fonte: A Autora (2023)

6 CONCLUSÕES

Dispositivos dupla-camada mimetizando a pele humana foram viabilizados utilizando uma combinação de polímeros bioinertes, polímeros bioativos e ativos antimicrobianos. Este dispositivo combina as características dos polímeros como resistência a água e capacidade de retenção de líquidos.

Paralelamente desenvolveu-se também novas técnicas de avaliação de filmes poliméricos combinando-se técnicas de espectroscopia, ferramentas de controle de qualidade e análise multivariada.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, Priscylla Cristina Ferreira Maia. Elaboração e caracterização de substitutos de pele a partir de filmes de agarose incorporados com nanopartículas de prata e extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BERENGUER, Flávia de Araújo. Desenvolvimento de substituto temporário de pele a partir de exopolissacarídeo extraído do consórcio microbiano BIONAT 1 associado ao extrato de *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BLANES, Leila. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: [s.n]; 2004. [23 p.]
- BOTELHO, Priscilla S. et al. Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soymilk. Carbohydrate polymers, v. 107, p. 1-6, 2014.
- CHEN, Fa-Ming; LIU, Xiaohua. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Progress in polymer science, v. 53, p. 86-168, 2016.
- CORDEIRO, Natália Almeida Onofre. Kefir de água BIONAT-I: análise metagenômica dos grãos, obtenção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo consorciana e seu potencial biotecnológico. 2018.
- CRUZ, Luiz Gustavo Balaguer. Uso de matriz dérmica acelular heteróloga em cirurgia plástica reparadora. Rev Bras Cir Plást, v. 31, n. 1, p. 88-94, 2016.
- DAUGHERTY, Susan; SPEAR, Marcia. Skin and skin substitutes—an overview. Plastic and Aesthetic Nursing, v. 35, n. 2, p. 92-97, 2015.
- DAVISON-KOTLER, Evan et al. A universal classification system of skin substitutes inspired by factorial design. Tissue Engineering Part B: Reviews, v. 24, n. 4, p. 279-288, 2018.
- DE ANGELIS, Barbara et al. Wound healing: in vitro and in vivo evaluation of a bio-functionalized scaffold based on hyaluronic acid and platelet-rich plasma in chronic ulcers. Journal of clinical medicine, v. 8, n. 9, p. 1486, 2019.
- DE PAIVA, Igor Moura. Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de Kefir. 2013.
- FERREIRA, Marcus Castro et al. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. Revista Brasileira de Cirurgia Plástica, v. 26, p. 696-702, 2011. .
- FISCHER, Michele Roberta et al. Biosynthesis and characterization of bacterial nanocellulose for tissue engineering. Matéria (Rio de Janeiro), v. 22, 2017.

GOMES, Diogo do Nascimento. Desenvolvimento e caracterização de filmes de Alginato incorporados com extratos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan visando o desenvolvimento de substituto temporário de pele. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

GORDON, Alex J. et al. Evidence for healing diabetic foot ulcers with biologic skin substitutes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of plastic surgery*, v. 83, n. 4S, p. S31-S44, 2019.

GURTNER, Geoffrey C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

ICHINOSE, Nobuyuki; URA, Hodaka. Concentration dependence of the sol-gel phase behavior of agarose-water system observed by the optical bubble pressure tensiometry. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 2620, 2020.

HU, Michael S. et al. Embryonic skin development and repair. *Organogenesis*, v. 14, n. 1, p. 46-63, 2018.

JOURIA JÚNIOR, Jassim M. Clinical Applications of Human Anatomy and Physiology for Healthcare Professionals. Irvine: Brown Walker Press, 2018.

JÚNIOR FILHO, E. M. L. MODM, Costa BA, Rohleder AVP, Rocha MBS, Fachine FV, Forte AJ, Alves APNN, Júnior FRS, Martins CB, et al. Innovative Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft: A Phase II Randomized Controlled Trial. *J. Burn. Care Res*, v. 41, p. 585-592, 2020.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 13th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. p. 170-201

KABASHIMA, Kenji et al. The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, n. 1, p. 19-30, 2019.

KISHIDA, Akio et al. Polymer drugs and polymeric drugs X: slow release of 5-fluorouracil from biodegradable poly (γ -glutamic acid) and its benzyl ester matrices. *Journal of bioactive and compatible polymers*, v. 13, n. 4, p. 270-278, 1998.

LEITE, Marcus Vinicius Romero Deleão et al. Gestão da qualidade: implantação de um sistema de gestão da qualidade em uma fábrica de telhas de concreto. 2012.

LÍMOVÁ, Markéta. Active wound coverings: bioengineered skin and dermal substitutes. *Surgical Clinics*, v. 90, n. 6, p. 1237-1255, 2010.

LIN, Weikang et al. Skin-inspired piezoelectric tactile sensor array with crosstalk-free row+ column electrodes for spatiotemporally distinguishing diverse stimuli. *Advanced Science*, v. 8, n. 3, p. 2002817, 2021.

LUCAS, James B. The physiology and biomechanics of skin flaps. *Facial Plastic Surgery Clinics*, v. 25, n. 3, p. 303-311, 2017.

MAAROF, Manira et al. Secretion of wound healing mediators by single and bi-layer skin substitutes. *Cytotechnology*, v. 68, p. 1873-1884, 2016.

MENON, G. K.; KLIGMAN, A. M. Barrier functions of human skin: a holistic view. *Skin pharmacology and physiology*, v. 22, n. 4, p. 178-189, 2009.

MEULI, Martin et al. A cultured autologous dermo-epidermal skin substitute for full-thickness skin defects: a phase I, open, prospective clinical trial in children. *Plastic and reconstructive surgery*, v. 144, n. 1, p. 188-198, 2019.

MOHAMMADINEJAD, Reza et al. Recent advances in natural gum-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: a review. *Polymers*, v. 12, n. 1, p. 176, 2020.

MORAIS, Lécia Pinto Ferreira de et al. Análise de componentes principais aplicada ao estudo termoanalítico de sementes e a produção vegetal do Mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). 2018.

NATHOO, Rajiv; HOWE, Nicole; COHEN, George. Skin substitutes: an overview of the key players in wound management. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, v. 7, n. 10, p. 44, 2014.

NYAME, Theodore T. et al. Tissue-engineered skin substitutes. *Plastic and reconstructive surgery*, v. 136, n. 6, p. 1379-1388, 2015.

ONOFRE, Natália Almeida. Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

ONOFRE-CORDEIRO, Natália A. et al. Agarose-silver particles films: effect of calcium ascorbate in nanoparticles synthesis and film properties. *International journal of biological macromolecules*, v. 119, p. 701-707, 2018

PANERO, Francisco dos Santos et al. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. *Eclética Química*, v. 34, p. 33-40, 2009.

PHILLIPSON, Mia; KUBES, Paul. The healing power of neutrophils. *Trends in immunology*, v. 40, n. 7, p. 635-647, 2019.

PICASSO, Regina Silva. Caracterização estrutural e atividade citotóxica e imunomodulatória de um novo exopolissacarídeo extraído dos grãos de Kefir. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

PRESTON, Robin R.; WILSON, Thad E. *Fisiologia ilustrada*. Artmed Editora, 2014.

ROCHA, Henrique Martins. *Controle Estatístico de Qualidade*. Volume único. Rio de Janeiro: Fundação Cecierj, 2019. p. 150-178

SAJID, Muhammad et al. Layered double hydroxide-modified membranes for water treatment: Recent advances and prospects. *Chemosphere*, v. 287, p. 132140, 2022.

SANTANA, Gilvania Marinete de. Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos baseados em agarose com a incorporação de ciprofloxacina para utilização como novo substituto temporário de pele. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SANTOS, Rodrigo Vergne de Abreu. Polímeros superabsorventes: processos de produção, aplicações e mercado. 2016.

SAVOJI, Houman et al. Skin tissue substitutes and biomaterial risk assessment and testing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 6, p. 86, 2018.

SHARIATI, Aref et al. Wound healing properties and antimicrobial activity of platelet-derived biomaterials. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1032, 2020.

SILVA, Andreza Tallyne de Aguiar. Cultivo de kefir em soro de leite e avaliação da viabilidade celular por liofilização. 2015.

SILVA, João Bosco P. da et al. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN ^1H : o caso dos 3-*aril* (1, 2, 4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. *Química Nova*, v. 28, p. 492-496, 2005. Sociedade Brasileira de Queimaduras [internet]. Brasil 2013.

STURLA, Dres Flavio M. et al. La matriz extracelular en la curación de las heridas cutáneas. Aspectos físicos, químicos y biológicos. *Revista de la Asociación Médica Argentina*, v. 131, n. 2, 2018.

TELLES, Iris Sol Figueiredo; DO PRADO, Maira; SIMÃO, Renata Antoun. Nanopartículas e aplicações endodônticas: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 74, n. 2, p. 167, 2017.

VANPUTTE, Cinnamon; REGAN, Jennifer; RUSSO, Andrew. *Anatomia e Fisiologia de Seeley-10ª Edição*. McGraw Hill Brasil, 2016.

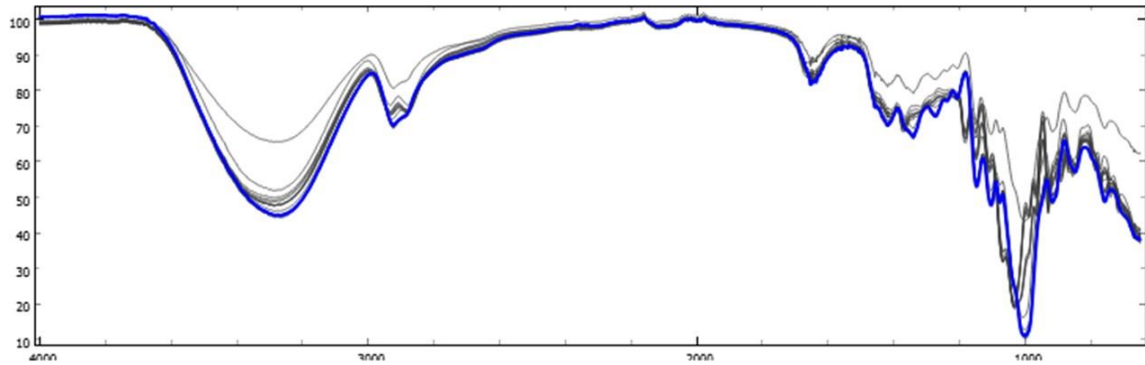
VARKEY, Mathew; DING, Jie; TREDGET, Edward E. Advances in skin substitutes—potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *Journal of functional biomaterials*, v. 6, n. 3, p. 547-563, 2015.

WENG, Tingting et al. Regeneration of skin appendages and nerves: current status and further challenges. *Journal of translational medicine*, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2020.

World Health Organization. Burns [Internet]. Genebra: World Health Organization ; 2019 ZOMER, Helena D.; TRENTIN, Andrea G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of dermatological science*, v. 90, n. 1, p. 3-12, 2018.

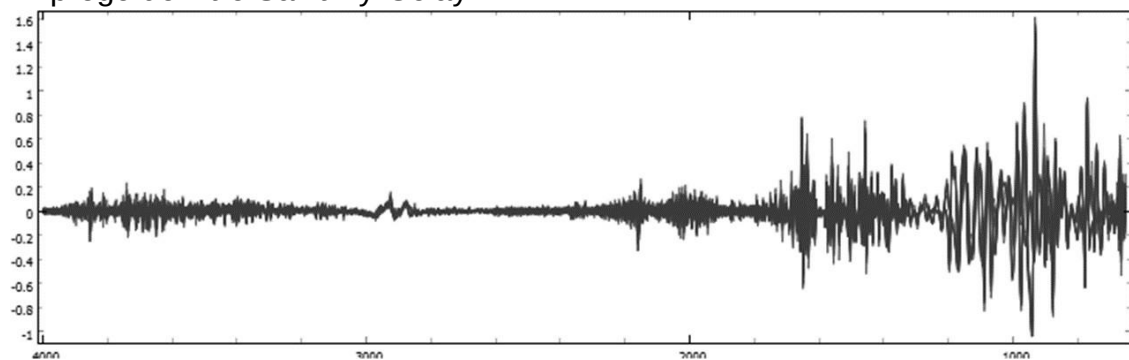
APÊNDICE A – PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTOS E SUAUIZAÇÃO DE DADOS, UTILIZANDO SOFTWARE ORANGE

Dados originais



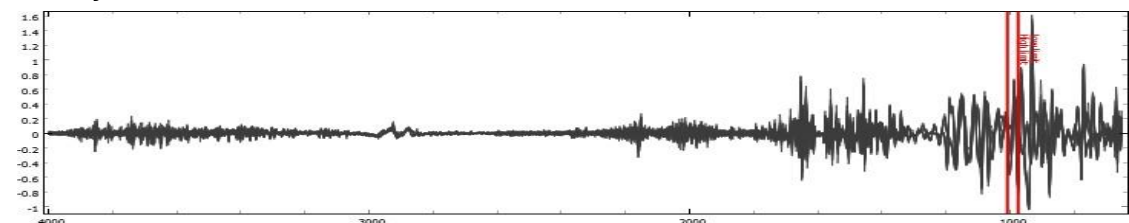
Fonte: A autora (2023)

Emprego do filtro Savitzky-Golay



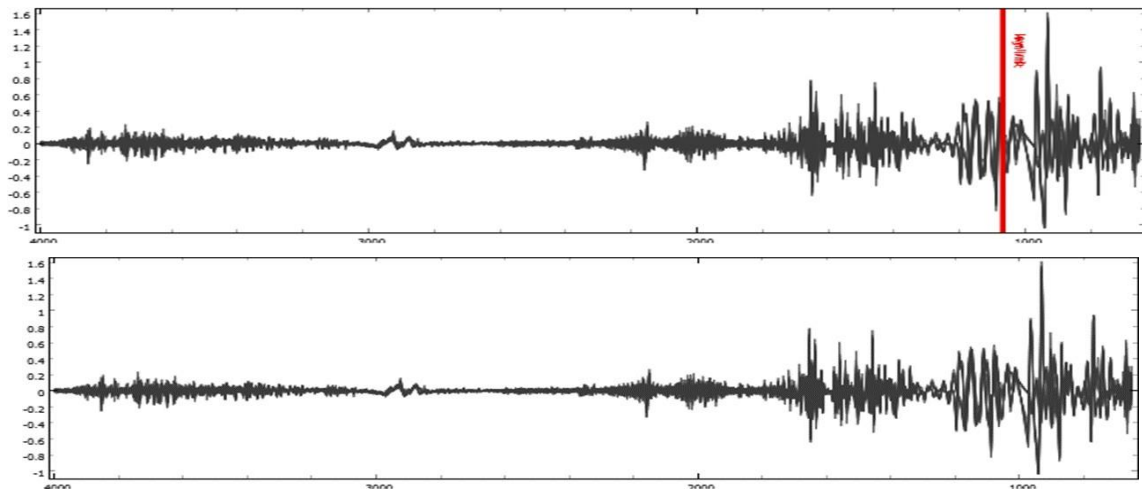
Fonte: A autora (2023)

Remoção de dados de 974 a 100



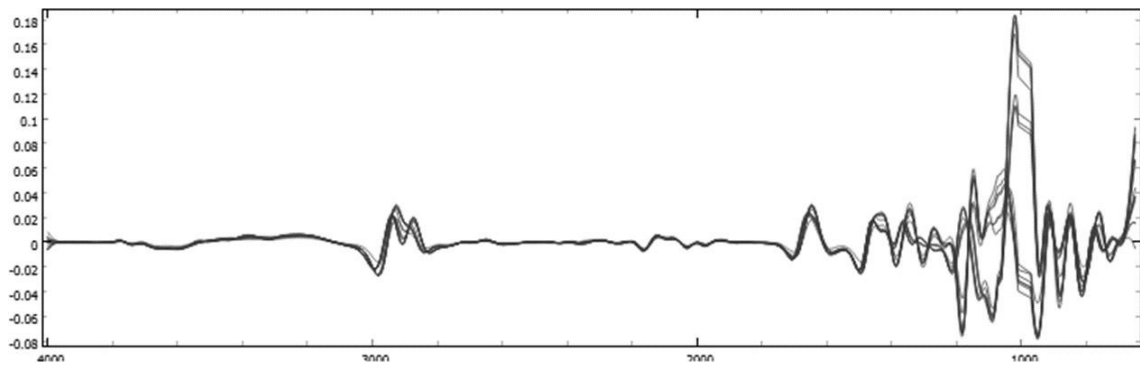
Fonte: A Autora (2023)

Remoção de dados de 1064 a 1071



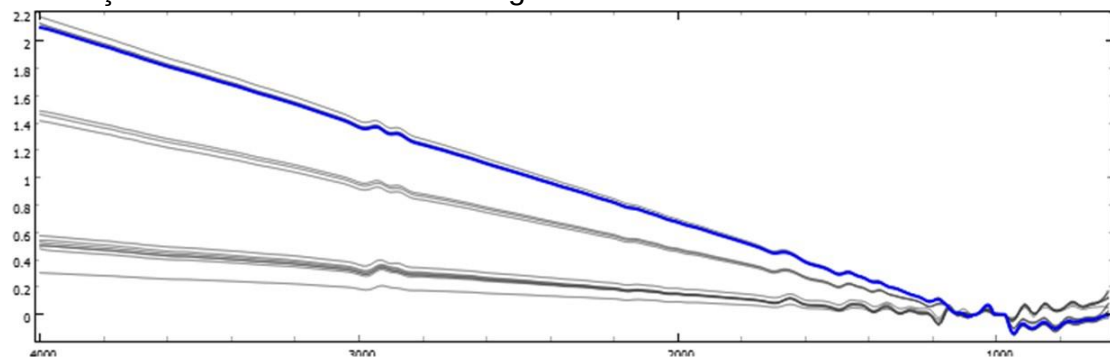
Fonte: A Autora (2023)

Suavização Gaussiana



Fonte: A Autora (2023)

Correção de linha de bases nas regiões 974 a 1008 e 1064 a 1071



Fonte: A Autora (2023)