

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

NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ÁGAR, AGAROSE E
KEFIRANA COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA**

Recife - PE

2014

NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ÁGAR, AGAROSE E
KEFIRANA COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Yara

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio
de Andrade Lima

Recife

2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- O58d Onofre, Natália Almeida.
Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata / Natália Almeida Onofre. - Recife: O Autor, 2014.
xiv, 94 folhas, il., gráfs., tabs.
- 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, 2014.
Inclui Referências.
1. Engenharia Biomédica. 2. Ágar. 3. Agarose. 4. Filmes. 5. Kefirana. 6. Nanopartículas de prata. 7. Polímeros naturais. I. Yara, Ricardo. (Orientador). II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade. (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2014-159

NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ÁGAR, AGAROSE E
KEFIRANA COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: _____

Prof. Dr. Ricardo Yara, Doutor pela Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Emmanuel de Souza, UFPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco - Recife, Brasil.

Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes, UFPE
Doutor pela Universidade Estadual de Campinas – Campinas, Brasil.

Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva, UFRPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco - Recife, Brasil.

Coordenador do PPGEb: _____

Prof. Dr. Rosa Amalia Fireman Dutra

Recife, Março de 2014

DEDICATÓRIA

A meus pais **Rui** e **Ana**, pelo amor, dedicação e apoio incondicional, meu esposo **Edvar Jr.** pelo companheirismo e incentivo, a **João Gabriel** por me fazer sentir um amor imensurável, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me carregou em seus braços quando faltaram forças.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Yara**, por ter aceitado me orientar e encarar esse desafio junto comigo, pela paciência e por todo o aprendizado; à minha co-orientadora **Prof. Dr^a. Cláudia Sampaio de Andrade Lima** pela oportunidade, pelos ensinamentos, mas principalmente pela amizade e carinho, sendo mais do que uma professora. À **Prof. Dr^a. Adriana Fontes** e **Prof. Dr^a. Beate Saegesser** por me receberem tão bem em seu laboratório e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos meus pais **Rui e Ana** pelo amor incondicional, por estarem ao meu lado em todos os momentos e me apoiarem nas decisões mais difíceis, inclusive na decisão de deixar tudo em Maceió e vir morar em Recife, por não medirem esforços para realizar meus sonhos, pelas oportunidades que me ofereceram e pela formação moral e profissional. Por serem minha inspiração nos momentos em que eu quis recuar. Sem eles nada disso faria sentido.

Ao meu esposo **Edvar Jr.** por ter iniciado tudo isso, me apresentando prof^a. Cláudia, pelo incentivo, compreensão, companheirismo, cuidado carinhoso, dedicação, sendo uma pessoa essencial nessa conquista.

Ao meu irmão **Rafael**, por sempre desejar meu sucesso e por me fazer mais feliz, me dando o bem mais precioso, meu sobrinho. A ele, **João Gabriel** por me fazer querer ser sempre uma pessoa melhor.

Ao **Prof. Dr. Renato Araújo** pela contribuição neste trabalho. Ao **Prof. Dr. Wagner Eduardo** pela colaboração fundamental. À **Prof. Dr^a. Paloma Medeiros, Fábio Brayer** e toda a equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA pelas análises no MEV. À equipe da Central Analítica do DQF pelas análises de FTIR. À **Prof. Dr^a Kêsia Xisto, Evelyne Solidônio** e todos do laboratório de Microbiologia Aplicada do UFPEDA.

A todos os amigos do **Laboratório de Biofísica Química – grupo NANOBIO/BIONAT**, pela acolhida, pelo companheirismo, pela amizade e pelos momentos de descontração. Em especial aos alunos de IC **Yago, Aline, Emília, Thâmara, Marlon e Larissa** pela ajuda com o cultivo do kefir. A **Rafael**, que foi meu primeiro amigo no laboratório e me acolheu me fazendo sentir muito bem. A **Dewson, Isabela, João Paulo,**

Paulo Euzébio e Renan por estarem sempre prontos para ajudar e por terem contribuído de forma importante para este trabalho. A **Carlos André e Gilvânia** pela colaboração e ajuda essenciais. À **Anna Livia** pelas análises de espalhamento dinâmico de luz e a **Lenine** pelo grande esforço em conseguir a análise de MET. A **Sr. Fredson**, que através de pequenos gestos de atenção contribui muito para o funcionamento do laboratório. Muito obrigada por me fazerem sentir em uma família.

À minha **Tia Rosa** por abrir as portas da sua casa quando precisei vir para Recife e aos meus primos **Rodrigo e Rodolfo** por terem me acolhido tão bem nesse momento.

Aos **meus avós**, em especial vovó **Nicinha**, pelas orações. À minha **Madrinha, Tios, Primos, Sogros e Cunhados** que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista e pelos bons momentos vividos juntos.

À família **Rodrigues** em nome de **Vanessa, Tia Naldinha, tio Edécio**; à **Tia Ana Rosa, Natália, Nayara e Rafael**; a **Alexandre, Majorie, Bernardo e Eveline** por serem a família que eu tenho em Recife e que muitas vezes me fizeram espantar um pouco a saudade de casa.

Às minhas orientadoras de Iniciação Científica **Profª. Maria Anilda, Profª. Aldenir** e minha orientadora do TCC **Profª Chiara** por me proporcionarem esta oportunidade, que despertou meu interesse na vida científica, e me fez gostar de pesquisa. Aos meus amigos de graduação **Julianna, Pedro Henrique, Ruth, Rodrigo e Larissa Isabela** pelas aventuras nos laboratórios do CESMAC, onde aprendemos muito juntos, pelo apoio e companheirismo.

A todos os meus amigos, em especial à **Ana Amélia, Fernanda, Julianna, Katherine e Ruth** pela compreensão na ausência, pelo incentivo e pela amizade sincera.

Aos **alunos** da Escola Técnica de Saúde de Alagoas e da Escola Técnica de Saúde Santa Bárbara por me fazerem acreditar ainda mais no meu sonho.

Aos **professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** e aos colegas de turma **Paulo, Cayo e Rodrigo**, pela ajuda e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A pele possui grande importância na proteção do organismo, com isso, havendo lesão cutânea é necessária rápida intervenção, garantindo regeneração tecidual. Os substitutos temporários de pele são utilizados para prevenir infecções e auxiliar nesta regeneração, sendo dispositivos muito úteis na medicina. A agarose e a kefirana são polímeros naturais com potencial uso em substitutos temporários de pele, onde podem ser acrescidos outros compostos com propriedades biológicas, a fim de favorecer a regeneração tecidual. As nanopartículas podem ser incorporadas a matriz de polímeros, modificando suas características ou adicionando novas propriedades. Dentre estas destacam-se as nanopartículas de prata (NPsAg) que apresentam ação antimicrobiana. Biomateriais contendo nanopartículas em suas matrizes são eficientes por unir as propriedades inerentes aos dois componentes utilizados. Nesse contexto, foram desenvolvidos filmes de ágar (T0), kefirana (T1) e agarose (T2), este último ainda incorporado com NPsAg (T3) e NPsAg com ascorbato de cálcio (T4). Os filmes foram caracterizados através de ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis) e do Infravermelho (FTIR), teor de umidade, absorção de água, transparência, espessura, resistência à tração e atividade antimicrobiana. A superfície do filme T0 avaliada por MEV apresentou alternância de regiões puras e com impurezas, sendo observada a necessidade de formulação de filmes com matéria prima mais pura. A superfície do filme T1 apresentou-se não homogênea e com rachaduras. Já os filmes T2 e T3 mostraram superfície lisa e homogênea. No filme T4 foram observadas cristais, possivelmente referentes ao ascorbato de cálcio. A análise na região do UV-Vis dos filmes T1 e T2 não apresentaram pico na região de 300-700 nm, pois não continham NPsAg. Os picos com máximo de absorção em 460nm, 408nm e 350 nm (com pico alargado e presença de um ombro em 400 nm) nos filmes T0, T3 e T4 respectivamente, confirmaram a presença de NPsAg. Na região do infravermelho, foi possível identificar os principais grupos funcionais da estrutura dos polímeros de formulação dos filmes T1, T2, T3 e T4. Os filmes apresentaram-se flexíveis, sendo T2 o filme de menor espessura (0,025 mm) e maior transparência. O filme que apresentou maior tensão e deformação de ruptura foi T3, com 56,22 Mpa e 41,78% respectivamente. Apenas T4 apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

Palavras-chave: ágar, agarose, filmes, kefirana, nanopartículas de prata, polímeros naturais.

ABSTRACT

Human skin has great importance in protecting the body, thus, having skin lesion swift action is needed, ensuring tissue regeneration. Used to prevent infection and assist in this regeneration, temporary skin substitutes are very useful device in medicine. Agarose and kefiran are natural polymers with potential use in temporary skin substitutes, which may be added other compounds with biological properties. Nanoparticles can be incorporated into the polymer matrix by modifying its characteristics or adding new properties. Among these there are the silver nanoparticles (AgNPs) that have antimicrobial action. Biomaterials containing nanoparticles in their matrix are efficient because unites the properties inherent to the two components used. In this context, ágar (T0), kefiran (T1) and agarose (T2) films have been developed, the latter also incorporated with AgNPs (T3) and calcium ascorbate AgNPs (T4). The films were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Ultraviolet-visible (UV-Vis) and Infrared (FTIR) Spectroscopy, moisture content, water absorption, transparency, thickness, tensile strength and antimicrobial activity assays. The film surface T0 evaluated by SEM showed variable pure and unpure regions, requiring the formulation of films with purest raw material. The film surface T1 showed unhomogeneous and cracks. The T2 and T3 films showed smooth and homogeneous surface. In the T4 film was observed crystals, possibly related to calcium ascorbate. The analysis in the UV-Vis region of T1 and T2 films didn't show peaks on the region of 300-700 nm, because they didn't contain AgNPs. The maximum absorption in 460 nm, 408 nm e 350 nm (with a wide peak and a shoulder in 400 nm) in T1, T3 and T4 films, respectively, confirmed presence of NPsAg. In the infrared region, it was possible to identify the main functional groups of the formulation structure of the polymers of T1, T2, T3 and T4 films. The films showed flexible, T2 was the lowest film thickness (0.025 mm) and greater transparency. The film that showed the highest stress and strain of rupture was T3 with 56.22 MPa and 41.78% respectively. Only T4 showed antibacterial activity against *S. aureus*.

Keywords: ágar, agarose, films, kefiran, silver nanoparticles, natural polymers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	A PELE.....	4
2.2	SUBSTITUTOS TEMPORÁRIOS DE PELE	7
2.3	POLÍMEROS	10
2.3.1	Ágar, agarose	13
2.3.2	Kefirana.....	15
2.4	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	17
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	PRODUÇÃO DO KEFIR.....	26
4.2	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA	27
4.3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NPSAG.....	29
4.4	DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS	30
4.4.1	Filmes de ágar (T0)	31
4.4.2	Filmes de kefirana (T1).....	31
4.4.3	Filmes de agarose (T2)	32
4.4.4	Filmes de agarose com NPsAg (T3)	32
4.4.5	Filmes agarose com NPsAg e ascorbato de cálcio (T4)	32
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	32
4.5.1	Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-Vis).....	32
4.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.5.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ..	33
4.5.4	Espessura.....	33
4.5.5	Transparência	33
4.5.6	Teor de umidade	34

4.5.7 Absorção de água	34
4.5.8 Resistência à tração.....	35
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 PRODUÇÃO DO KEFIR.....	39
5.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA.....	40
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NPSAG.....	42
5.4 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS	47
5.4.1 Filmes de ágar	47
5.4.2 Filmes de kefirana.....	48
5.4.3 Filmes de agarose	48
5.4.4 Filme de agarose com NPsAg	50
5.4.5 Filme de agarose com NPsAg e Ascorbato de cálcio.....	50
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	51
5.5.1 Espectroscopia no Ultravioleta-visível	51
5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	53
5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier.....	55
5.5.4 Espessura.....	60
5.5.5 Transparência	61
5.5.6 Teor de umidade	62
5.5.7 Absorção de água	62
5.5.8 Resistência à tração.....	63
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	65
6 CONCLUSÕES.....	69
6 PERSPECTIVAS.....	70
7 REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE A – TRABALHO APRESENTADO NO VII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das queimaduras.	5
Figura 2 – Fases do processo de cicatrização.....	7
Figura 3 – Tipos de biomateriais.	11
Figura 4 – (A) Relação meros-polímeros (B) Constituição básica do polímero polietileno. ..	12
Figura 5 – Exemplo de espécies de algas vermelhas produtoras de ágar: (A) <i>Gracilaria domingensis</i> ; (B) <i>Gelidiella acerosa</i>	13
Figura 6 – Fórmula estrutural da agarose.....	14
Figura 7 – Grãos de kefir cultivados utilizando como substrato açúcar mascavo.	16
Figura 8 – Fórmula estrutural da kefirana.....	17
Figura 9 – (A) Esquema da RPS em uma partícula metálica esférica (B) Gráfico do espectro de absorção gerado por NPsAg esféricas (C) Esquema da RPS em partículas não esféricas (D) Gráfico do espectro de absorção gerado por NPsAg não esféricas. ..	18
Figura 10 – Inibição de crescimento bacteriano por objetos metálicos.	19
Figura 11 – Esquema do aumento da área superficial com a diminuição do tamanho.....	20
Figura 12 – Esquema dos mecanismos de ação antimicrobiana das NPsAg.	21
Figura 13 – Esquema da formação de NPsAg.....	21
Figura 14 – Fórmula estrutural do ascorbato de cálcio.....	22
Figura 15 – Esquema de estabilização das nanopartículas (A) Estabilização estérica, (B) Estabilização eletrostática.	23
Figura 16 – Fluxograma do método de cultivo dos grãos de kefir.	26
Figura 17 – Fluxograma dos dois métodos de extração da kefirana.	28
Figura 18 – Fluxograma da metodologia de desenvolvimento dos filmes poliméricos.	31
Figura 19 – Execução do ensaio de resistência à tração de um filme.....	35
Figura 20 – Esquema representativo do método de difusão em meio líquido.	37
Figura 21 – Esquema representativo das metodologias de diluição e semeios em rede e descrito por Prates (2010).	38
Figura 22 – Gráfico de comparação do crescimento dos grãos de kefir, quando submetidos aos métodos de cultivo 1 e 2.	39

Figura 23 – Grãos de kefir (A) cultivados em solução de açúcar mascavo (B) cultivados em solução de açúcar cristal.....	40
Figura 24 – Gráfico de rendimento dos processos de extração de kefirana utilizando os métodos 1 e 2.....	41
Figura 25 – Kefirana (A) antes do processo de purificação por congelamento e descongelamento, (B) após o processo de purificação por congelamento e descongelamento.	42
Figura 26 – Coloração da solução na síntese das NpsAg (A) antes da adição do AgNO ₃ , (B) ao final da síntese, (C) NPsAg com ascorbato de cálcio.	43
Figura 27 – Curva referente ao espectro de extinção na região do UV-Vis das NPsAg sintetizadas com citrato de sódio em meio aquoso.....	44
Figura 28 – Curva referente ao espectro de extinção no UV-Vis das NPsAg e das das NPsAg com ascorbato de cálcio em meio aquoso (<i>insert</i>).....	45
Figura 29 – Histograma de distribuição de tamanho das NPsAg obtido por análise de Espalhamento Dinâmico de Luz.....	46
Figura 30 – Histograma de distribuição de tamanho das NPsAg com ascorbato de cálcio obtido por análise de Espalhamento Dinâmico de Luz.....	47
Figura 31 – Filme de ágar (T0).	48
Figura 32 – Filmes de kefirana (T1).....	48
Figura 33 – Filme de agarose (T2).	50
Figura 34 – Filme de agarose com NPsAg (T3).....	50
Figura 35 – Filme de agarose com NPsAg e ascorbato de cálcio (T4).....	51
Figura 36 – Curva referente ao espectro de extinção na região do UV-Vis do filme T0.	51
Figura 37 – Curva referente ao espectro de extinção na região do UV-Vis do filme T1.	52
Figura 38 – Curvas referentes aos espectros de extinção na região do UV-Vis dos filmes T2, T3, T4 e da solução aquosa de ascorbato de cálcio (<i>insert</i>).....	53
Figura 39 – Imagens de MEV do filme T0 com aumentos de 9000X e 4300X respectivamente, mostrando (A) região de ágar sem impurezas (B) região de ágar com impurezas.....	54
Figura 40 – Imagens de MEV do filme T1 com aumentos de 604X e 2490X respectivamente.	54

Figura 41 – Imagens de MEV de superfície de filmes de agarose (A) T2, com aumento de 1700X (B) T3, com aumento de 1730X (C) T4, com aumento de 1710X, respectivamente.	55
Figura 42 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T1.....	56
Figura 43 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T2.....	57
Figura 44 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T3.....	57
Figura 45 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T4.....	58
Figura 46 – Razão de intumescimento dos filmes de agarose	63
Figura 47 – Resultados da comparação do padrão de turvação dos tubos no teste de atividade antimicrobiana dos filmes:	66
Figura 48 – Resultados dos semeios em rede no teste de atividade antimicrobiana dos filmes.	67
Figura 49 – Resultados dos semeios em por escorrimento em placa (PRATES et al., 2010) no teste de atividade antimicrobiana dos filmes.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características das queimaduras.	6
Tabela 2 – Quantidade de agarose/cm ² e seus respectivos aspectos.	49
Tabela 3 – Quantidade de agarose/cm ² e seus respectivos aspectos.	49
Tabela 4 – Regiões dos espectros FTIR e grupos funcionais associados	59
Tabela 5 – Resultados da espessura dos filmes de kefirana e agarose.	60
Tabela 6 – Transparência dos filmes de kefirana e agarose.....	61
Tabela 7 – Teor de umidade dos filmes de kefirana e agarose.	62
Tabela 8 – Tensão de ruptura e deformação na ruptura dos filmes.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQF	Departamento de Química Fundamental
EUA	Estados Unidos da América
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GAGs	Glicosaminoglicanos
LEB	Laboratório de Engenharia Biomédica
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MH	Mueller Hinton
NPsAg	Nanopartículas de Prata
PHA	Polihidroxialcanoatos
PVA	Polivinil álcool
QS	Quitosana
RI	Razão de intumescimento
RPS	Ressonância de Plasmon de Superfície
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mL
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS/ SIGLAS

mm	milímetro
US\$	dólar
%	percentagem
nm	nanômetro
m	metro
g	grama
cm ²	centímetros quadrados
mL	mililitro
°C	grau Celsius
P.A.	pró análise
mol.L ⁻¹	mol por litro
pH	potencial Hidrogeniônico
µL	microlitro
cm/s ⁻¹	centímetro por segundo
T0	filme de ágar
T1	filme de kefirana
T2	filme de agarose
T3	filme de agarose + NPsAg
T4	filme de agarose + NPsAg + ascorbato de cálcio
mg	miligrama
KN	kilonewton
mm/min	milímetro por minuto
g/Kg	grama por kilograma
µm	micrometro
MPa	megapascal

1 INTRODUÇÃO

A pele recobre toda a superfície do corpo humano, sendo considerada seu maior órgão (BLANES, 2004). É a primeira linha de defesa do organismo, sendo responsável por desempenhar diversas funções, tais como proteção contra traumas físicos, químicos, toxinas, micro-organismos patógenos, impedir perda excessiva de água e proteínas, garantindo a regulação da temperatura corpórea e excreção de eletrólitos (GOTO, 2011; OGUIDO; SHIBATTA, 2011). Devido a sua extrema importância, havendo lesão na pele, é necessária rápida intervenção, a fim de se garantir a possibilidade de regeneração e recuperação de suas funções e evitar o aparecimento de desequilíbrio fisiológico, que pode levar a morte do indivíduo.

As principais causas de lesão cutânea são as queimaduras, os traumas e as úlceras (RODRIGUES, 2012). Estas lesões são comumente tratadas, visando principalmente a prevenção de infecções, com uso de curativos oclusivos associados a antimicrobianos de uso tópico. Estes curativos, entretanto, tendem a aderir na superfície da lesão e exigem trocas frequentes, dificultando o processo de reepitelização (HELM et al., 2012). Surgem assim os substitutos temporários de pele, que possuem a vantagem de serem aplicados apenas uma vez na área lesionada, não sendo necessária a realização de trocas. Estes substitutos são utilizados com a finalidade de auxiliar na regeneração do tecido lesionado, prevenindo a perda de líquidos e eletrólitos e o aparecimento de infecções (OSMAN; SOUZA; DOLCI, 2007).

Os substitutos temporários de pele são confeccionados com biomateriais, e são produzidos para serem utilizados, sejam sozinhos ou como parte de um sistema complexo, interligada com componentes de sistemas vivos, no curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária (ADRIÃO, 2011). Os polímeros representam uma classe importante de biomateriais, sendo vastamente utilizados nas áreas ortopédicas, odontológicas, cardiovascular e de engenharia de tecidos (RATNER et al., 2004). Polímero é um material orgânico ou inorgânico, composto por várias macromoléculas que possuem uma estrutura onde há repetição de unidades chamadas “meros” (CANDIAN, 2007). Estes polímeros podem ser sintéticos ou naturais (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

O desenvolvimento de polímeros naturais tem sido estimulado pela limitação crescente de disponibilidade do petróleo, bem como pelo impacto ambiental da geração destes. Isto vem impulsionando a busca de produção de matéria prima economicamente competitiva com os

polímeros sintéticos (PRADELLA, 2006). Os polímeros naturais já possuem inúmeras aplicações na área alimentícia, cosmética, na indústria de embalagens, com utilização terapêutica, entre outras (RATNER et al., 2004). Alguns exemplos de polímeros naturais que podem ser formulados como filmes, tendo potencial uso como substitutos temporários de pele são o ágar, a agarose e a kefirana. Os primeiros são extraídos de algas vermelhas (SOUZA, 2008) e o último é um material polimérico produzido por fermentação microbológica (LA RIVIÈRE; KOOIMAN, 1967).

A agarose é um polissacarídeo componente do ágar, polímero extraído de várias espécies de algas vermelhas (algas marinhas da divisão Rhodophyta) (SOUZA, 2008). É um polímero composto por unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (dímero constituído de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose) (ARVIZU-HIGUERA et al., 2007). Como biomaterial, a agarose vem sendo amplamente utilizada como uma matriz para imobilização de biomoléculas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006), bem como gel para eletroforese (YOSHIMURA, 2006; CONDE, 2011; SANTOS, 2011). Outro modo de obtenção de polímeros naturais é por processos fermentativos, utilizando-se micro-organismos. A produção de polissacarídeos microbianos mostra-se como uma alternativa aos de origem vegetal (BERWANGER et al., 2006).

Dentre os polímeros obtidos por processos fermentativos está a kefirana, produzida pela associação microbiana denominada de kefir (CARNEIRO, 2010). Esta associação consiste em uma suspensão de micro-organismos simbioses, formados por bactérias, predominantemente ácido-lácticas e leveduras. Apresenta-se macroscopicamente como grãos gelatinosos, de forma irregular e tamanhos variados entre 3 a 20 mm (DINIZ et al., 2003). Estes grãos são compostos basicamente pelos micro-organismos do consórcio e pelo biopolímero kefirana (GIACOMELLI, 2004). Este polímero é composto por dois monossacarídeos: glicose e galactose, em proporções quase iguais (LA RIVIÈRE; KOOIMAN, 1967; FRENGOVA et al., 2002; MAEDA et al., 2004), e apresentou atividades biológicas como ação anti-inflamatória (MOREIRA et al., 2008) e imunomoduladora (PIERMARIA et al., 2009), sendo ainda aplicado na indústria alimentícia (GHASEMLOU et al., 2011).

Novos biomateriais estão surgindo contendo a incorporação de nanopartículas em suas matrizes. Biomateriais incorporados com nanopartículas são interessantes por unir as propriedades inerentes aos dois componentes utilizados, podendo haver modificação de suas características ou adição de novas propriedades. Dentre estas nanopartículas, destacam-se as

nanopartículas de prata (NPsAg) que apresentam ação antimicrobiana de amplo espectro, contra bactérias (Gram positivas e negativas), fungos e vírus, tendo baixa toxicidade a tecidos animais (CARREIRA et al., 2009; BERNI NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

Este trabalho apresenta uma nova técnica de produção de filmes de ágar, kefirana e agarose, incorporando aos polímeros NPsAg, associando assim, ação antimicrobiana ao filme polimérico. Com isso, os filmes produzidos devem ter potencial para serem testados como substituto temporário de pele, a fim de contribuir para o arsenal terapêutico no tratamento de úlceras e queimaduras na pele, melhorando a eficiência na cicatrização e regeneração tecidual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, recobrindo toda sua superfície (BLANES, 2004). Constituindo a primeira linha de defesa do organismo contra agressões do meio ambiente, a pele é responsável por desempenhar diversas funções, tais como proteção contra traumas físicos, químicos, toxinas, micro-organismos patógenos, impedir perda excessiva de água e proteínas, garantir a regulação da temperatura corpórea e excreção de eletrólitos (GOTO, 2011; OGUIDO; SHIBATTA, 2011).

Possui ainda funcionalidade metabólica, com a produção de vitamina D; imunitária, com a presença de células de defesa; sensorial, pela presença de terminações nervosas, além de proteção contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (UV) (BRINGEL, 2011). Com isso, a perda da integridade da pele por lesões traumáticas ou doenças agudas, pode ocasionar prejuízo anatômico e funcional da região (COELHO; RESENDE; TENÓRIO, 1999).

Havendo dano ou destruição da pele, é necessária rápida intervenção, a fim de se garantir a restituição de suas funções e evitar o aparecimento de desequilíbrio fisiológico, que pode levar a morte do indivíduo. A principal causa de perda de integridade cutânea são as queimaduras; as demais incluem úlceras e traumas (RODRIGUES, 2012).

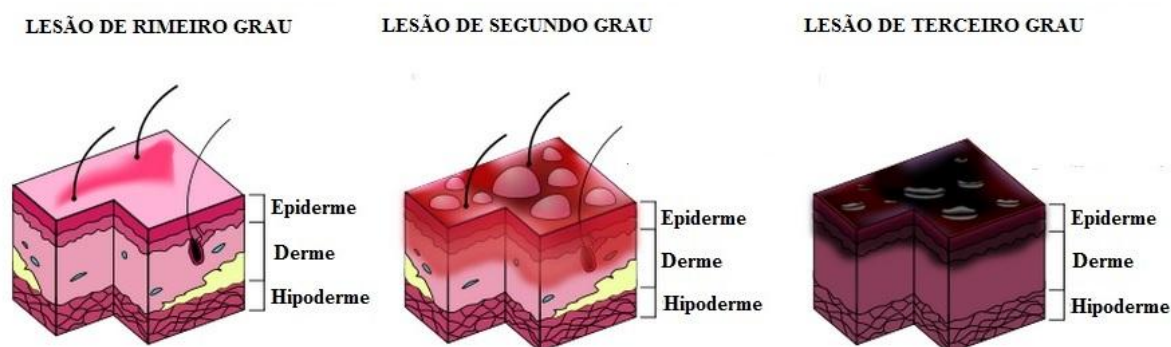
As queimaduras são lesões ocasionadas por agentes térmicos, químicos ou elétricos, capazes de produzir calor excessivo, danificando os tecidos corporais e levando a morte celular (BRASIL, 2012). As queimaduras têm um lugar de destaque nos gastos com serviços de saúde. Nos Estados Unidos da América (EUA), o custo médico de cuidados de saúde primários para um paciente internado com queimaduras varia de US\$ 3.000 para US\$ 5.000 por dia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2013b), no mundo, as queimaduras são responsáveis por cerca de 300.000 mortes por ano.

No Brasil, as queimaduras representam um agravo significativo à saúde pública. De acordo com o Ministério da Saúde, no ano de 2010 ocorreram 1.283 internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de queimados, onde a taxa de óbito por este agravo foi de 18,16%. Já em 2011, foram 1.437 internações em UTI, com taxa de óbito de 17,95% das internações. Existem 45 unidades hospitalares habilitadas em assistência às vítimas de queimaduras, distribuídas pelas cinco regiões do Brasil (BRASIL, 2012).

Outra causa importante de lesão cutânea são as úlceras. Úlcera é uma interrupção na integridade da epiderme e estruturas da derme que causa alterações na função fisiológica dos tecidos afetados (SILVA, 2009). Úlceras cutâneas podem ter várias etiologias. Dentre elas estão as causadas por pressão, que são lesões decorrentes de hipóxia celular devido a pressão aplicada à pele ser superior a pressão capilar normal e que geralmente acometem pessoas forçadas a imobilidade; por estase venosa, que são lesões derivadas principalmente de insuficiência venosa crônica, acometendo comumente a população idosa e as decorrentes de diabetes mellitus (DAVINI et al., 2005). As úlceras cutâneas crônicas representam um problema de gravidade mundial, sendo responsáveis por morbidade considerável, além de gerarem significativo impacto econômico (CARVALHO et al., 2011).

A classificação das lesões cutâneas é uma importante forma de avaliação e registro. Uma classificação quanto à estruturas comprometidas é adotada para avaliar lesões crônicas, como úlceras e queimaduras (Figura 1). Esta classificação engloba lesão superficial (ou de primeiro grau, quando trata-se de queimaduras) limitada à epiderme, lesão com perda parcial (ou de segundo grau) limitada à epiderme e camada superior da derme e lesão com perda total (ou de terceiro grau) onde há destruição da epiderme, derme, hipoderme, podendo atingir músculos, tendões e ossos (Tabela 1) (BLANES, 2004).

Figura 1 – Classificação das queimaduras.



Fonte: Adaptado de LEITE, 2013.

Tabela 1– Principais características das queimaduras.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	SINTOMAS	TEMPO DE RECUPERAÇÃO
Primeiro grau	Lesão com vermelhidão, sem formação de bolhas	Dor, edema e descamação	4 - 6 dias
Segundo grau	Lesão com formação de bolhas	Superficial: a base da bolha é rósea, úmida e dolorosa; Profunda: a base da bolha é branca, seca e indolor	7 - 21 dias
Terceiro grau	Lesão com placa esbranquiçada ou enegrecida e textura corácea	Ausência de dor	Não reepiteliza, necessitando de enxerto

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2012.

Outros aspectos que apontam a gravidade da lesão, como por exemplo, a localização, extensão, presença ou não de infecção, agente causador do trauma, estado nutricional do paciente, presença de doenças crônicas degenerativas e faixa etária, são importantes, pois podem afetar o processo de cicatrização e com isso devem influenciar na escolha do tratamento da lesão (FERREIRA et al., 2003)

O processo cicatricial consiste em uma perfeita e ordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem com a finalidade de reconstituição do tecido lesionado. Este processo envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que acontecem de forma harmoniosa para garantir a restauração tissular (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). A restauração total da barreira cutânea, que protege e isola o meio orgânico interno do meio ambiente, deve ser o objetivo final do tratamento de grandes lesões (GONÇALVES, 2013).

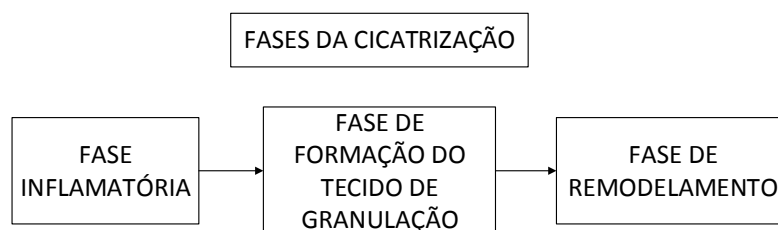
A cicatrização trata-se de um processo dinâmico, contínuo, complexo, e interdependente, sendo composta por uma série de fases (Figura 2) (BRASIL, 2008). A fase

inflamatória se inicia com o tamponamento de vasos rompidos através do processo de coagulação (BALBINO; PEREIRA; CURI; 2005). Em seguida ocorre a migração de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

A fase seguinte é a de formação do tecido de granulação, onde ocorre proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e angiogênese, com consequente formação do tecido de granulação (OLIVEIRA; DIAS, 2012). Ainda nesta fase ocorre contração da ferida e reepitelização, sendo que ao final desta fase o leito da ferida está completamente preenchido pelo tecido formado (BALBINO; PEREIRA; CURI; 2005).

Por fim, a fase de remodelamento, onde os elementos reparativos da cicatrização são transformados para tecido maduro, havendo aumento na produção de colágeno, com final formação do tecido cicatricial (BALBINO; PEREIRA; CURI; 2005; OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Figura 2 – Fases do processo de cicatrização.



O tratamento convencional das lesões visa principalmente a prevenção de infecções, através do uso tópico de agentes antimicrobianos. Curativos oclusivos com medicamentos a base de prata têm sido amplamente utilizados, devido às suas propriedades antimicrobianas. Estes curativos, entretanto, tendem a aderir na superfície da lesão e exigem trocas frequentes, dificultando a reepitelização. Além disso, estes curativos não impedem a desidratação devido a perda de líquido (HELM et al., 2012).

2.2 SUBSTITUTOS TEMPORÁRIOS DE PELE

Diante disso, a bioengenharia volta à atenção cada vez mais para o desenvolvimento de substitutos de pele. Estes são utilizados no sentido de restaurar, manter ou melhorar estrutural e funcionalmente tecidos lesionados (SOUZA, 2011). Os substitutos de pele podem

ser utilizados para a cobertura permanente da área lesionada, sendo estes permanentes ou permanecer aderido por semanas ou meses, até que um substituto permanente esteja disponível, sendo então semipermanentes. Podem ainda fornecer uma barreira mecânica até que ocorra a cicatrização normal, sendo classificados como temporários (DADALTI et al., 2007).

Utilizados com o propósito de prevenir a perda de líquidos, eletrólitos e infecção local e auxiliar no crescimento e regeneração do tecido lesionado, os substitutos temporários de pele hoje, possuem grande utilidade na medicina. Estes são projetados visando à isenção de toxicidade e apirogenia (OSMAN; SOUZA; DOLCI, 2007).

Possibilitam ainda a intervenção positiva sobre o processo cicatricial de lesões de pele, além de não exigirem troca frequente ou procedimentos de limpeza, o que pode representar uma melhoria na qualidade da vida dos pacientes, aumentando a qualidade final do processo regenerativo (COSTA; SOUZA, 2005). Além disso, os substitutos temporários não oferecem grandes riscos de rejeição, uma vez que o período de permanência no local lesionado é curto (RODRIGUES, 2012).

Quando se trata de substitutos de pele, algumas propriedades importantes devem ser observadas (GONÇALVES, 2013):

- Aderência: uma boa e uniforme aderência culmina na diminuição da dor e limitação de infecções, gerando uma melhor qualidade de cicatrização, além de permitir a movimentação do paciente.
- Transporte de vapor de água: o substituto deve permitir a passagem do vapor de água de maneira moderada, evitando a desidratação, com a evaporação excessiva ou o acúmulo de líquido, com a retenção.
- Elasticidade: a fim de permitir a mobilidade habitual do paciente, impedindo o rompimento ou o deslocamento do material em regiões articulares.
- Durabilidade: proporcionando um menor número de trocas e melhorando a qualidade de procedimentos simples do dia-a-dia do paciente, como tomar banho.
- Baixa antigenicidade e toxicidade: evitando a rejeição imunológica e apresentando maior biocompatibilidade.
- Ação antimicrobiana: já que área lesionada, exposta, está bastante propícia a infecções não apenas locais, mas sistêmicas.

De acordo com Gonçalves (2013) as principais vantagens do uso de substitutos temporários de pele em lesões graves, de difícil cicatrização são: proteção fisiológica da lesão; controle das perdas hidroeletrolítica e protéica; redução de contaminação e proliferação microbiana; aplicação única na maioria dos casos; facilidade de aplicação e remoção, quando necessário; facilitação de reepitelização e melhoria dos resultados estéticos; redução dos custos hospitalares, por poupar materiais para curativos e diminuir o tempo de internação e consequente melhoria da qualidade de vida do paciente. Atualmente diversos substitutos de pele foram desenvolvidos e muitos outros têm sido estudados, visando uma cobertura temporária de lesões. Alguns destes são:

Biobrane® (UDL Laboratories, Inc., Rockford, IL) que trata-se de um substituto temporário biossintético, feito de colágeno suíno, revestido de malha de nylon embutido em silicone. Foi projetado para aderir a um ferimento limpo, possuindo boa aderência e flexibilidade (HELM et al., 2012; GONÇALVES, 2013).

Integra® (Integra Lifesciences Corp., Plainsboro, NJ) também é um substituto biossintético composto por uma estrutura bilaminar de colágeno bovino e glicosaminoglicanos, coberta por uma camada de silicone que tem função de regular a perda de líquidos e formar uma barreira de proteção contra contaminações. A camada de colágeno do material incorpora-se no leito da lesão, sofrendo lenta biodegradação à medida que o organismo sintetiza uma nova derme. Ao final desta fase, a camada de silicone pode ser removida e então é aplicado um fino enxerto epidérmico autólogo (DADALTI, 2007; HELM et al., 2012; GONÇALVES, 2013).

AlloDerm® (Lifecell, Branchberg, NJ) é obtido através de pele cadavérica humana processada, sendo extraídos a epiderme e todos os componentes celulares da derme antes da criopreservação, com o objetivo de evitar uma resposta imune. Com a aplicação sobre o leito da ferida, este é repopulado por células do próprio organismo, revascularizado e incorporado ao tecido. Sua função é auxiliar na regeneração tecidual (HELM et al., 2012).

Bionext® é uma película de celulose sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum*, sendo semitransparente, flexível, biodegradável e atóxica. Ela permite a passagem de gases e funciona como barreira contra microrganismos. Em estudos realizados com pacientes com queimaduras de segundo grau na face, demonstrou facilidade no manuseio, diminuição da dor e melhora na velocidade de regeneração tecidual. (PINTO et al., 2010; OSMAN; SOUZA; DOLCI, 2007).

Opsite® (Smith & Nephew) e Tegaderm® (3M) são substitutos temporários de pele sintéticos, que tem estrutura de filme e constituição por poliuretano e cloreto de polivinil, que

fornece ao material grande elasticidade e permeabilidade ao vapor de água. Estes filmes aderem à pele íntegra (FERREIRA et al., 2003).

Duoderm® (Covatec) é um substituto de pele com bicamada, uma externa, impermeável à água e uma interna formada por hidrocolóides (gelatina, carboximetilcelulose sódica e pectina), associados a um polímero inerte. Possui adesão à pele sem ferimento. O exsudato liberado reage com os hidrocolóides, formando um gel que auxilia na migração de células epiteliais, estimulando o processo de cicatrização (FERREIRA et al., 2003).

Epigard® (Orthomed Medizintechnik GmbH) é um material sintético, formado por membrana de polipropileno com uma camada profunda de espuma de poliuretano (FERREIRA et al., 2003).

De modo geral, a utilização de um substituto temporário de pele pode resultar em uma melhor cicatrização, tanto estética como funcionalmente, desde que sejam seguidos os princípios gerais de cuidados com as lesões - limpeza, manutenção da umidade e cobertura da lesão. Uma vantagem adicional dos substitutos temporários de pele é a sua transparência, o que permite o acompanhamento diário, com observação do aspecto da região, possibilitando a detecção precoce de complicações (COELHO; RESENDE; TENÓRIO, 1999).

A procura por materiais com propriedades adequadas pode resultar em uma promissora alternativa para recuperação de pele lesionada. Com isso, muitas investigações para criar equivalentes dérmicos utilizando-se diferentes materiais têm sido realizadas (SANTOS JR.; WADA, 2007).

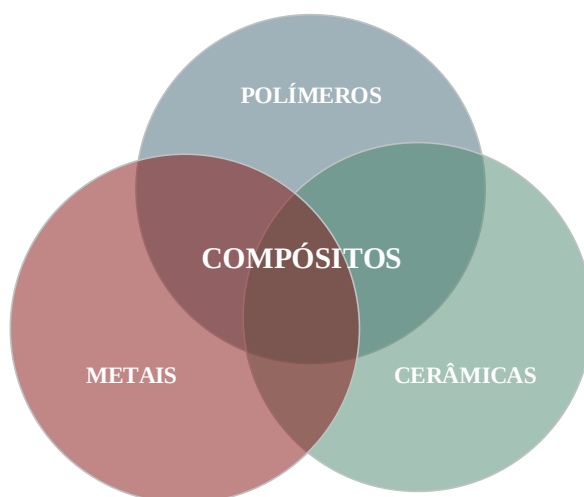
2.3 POLÍMEROS

Os polímeros representam uma classe importante de biomateriais (RATNER et al., 2004). Inicialmente biomaterial foi definido, na Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, como qualquer substância ou combinação de substâncias, natural ou sintética, que possa ser usada por um período de tempo indeterminado, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (AZEVEDO et al., 2007; CHRISSEY et al., 2003; OLIVEIRA, 2010; MEYER, 2012).

De acordo com Binyamin, Shafi e Mery (2006), o conceito de biomaterial também inclui qualquer material destinado a interagir com sistemas biológicos, permitindo que estruturas e combinação de dispositivos que interagem ativamente com o corpo sejam incluídos no campo. De acordo com Adrião (2011), biomateriais podem ser usado no curso de

qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária. Atualmente biomateriais são utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos, como por exemplo, próteses, lentes, enxertos, *stents*, cateters, tubos de circulação extra-corpórea, *scaffolds* empregados na Engenharia de tecidos, entre outros (SOARES, 2005; RIBEIRO, 2009). Todos estes são desenvolvidos objetivando-se a manutenção ou a melhoria na qualidade de vida do paciente. Eles podem ser constituídos por metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos, que trata-se da combinação de mais de um material (Figura 3) (CORREA; VICENTE; GRANDINI, 2013; GIL; FERREIRA, 2006).

Figura 3 – Tipos de biomateriais.



Polímeros são biomateriais vastamente utilizados nas áreas ortopédicas, odontológicas, cardiovascular e de engenharia de tecidos. Podem ser orgânicos ou inorgânicos, apresentando alto peso molecular. São compostos por um conjunto de cadeias poliméricas, sendo que cada uma destas é de uma macromolécula que possui uma estrutura onde há repetição de unidades chamadas “meros” (Figura 4A) (CANDIAN, 2007). Polímeros orgânicos são constituídos basicamente de átomos de carbono e hidrogênio ligados entre si por ligações covalentes (Figura 4B), apresentando características como baixa densidade, pequena resistência à temperatura, baixas condutividades elétrica e térmica (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). Polímeros inorgânicos não possuem necessariamente átomos de carbono em sua cadeia principal, podendo esta ser constituída de silício, fósforo, oxigênio, entre outros (MARK; ALLCOCK; WEST, 2005).

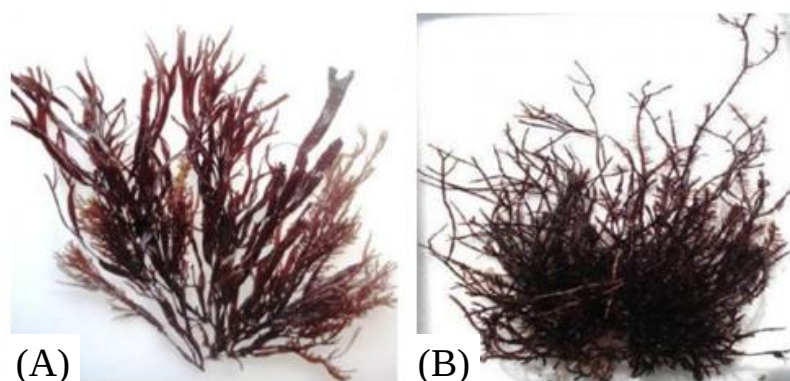
apresentam ainda a vantagem de serem muito análogos a macromoléculas presentes no ambiente biológico, estando este preparado para reconhecer e lidar metabolicamente. Com isso, problemas relacionados à citotoxicidade são atenuados. Outra característica importante dos polímeros naturais é sua capacidade de ser degradado por enzimas (RATNER et al., 2004), favorecendo sua biodegradação. A biodegradação consiste na degradação dos materiais poliméricos através de ação de enzimas excretadas por micro-organismos como bactérias e fungos (ROSA et al., 2002). Estas características favorecem seu uso como biomateriais. De acordo com Santos Jr. e Wada (2007) polímeros naturais são muito estudados quando se visa a restauração da pele.

A ampla aplicação de materiais poliméricos como biomateriais é fruto da flexibilidade dos polímeros em serem projetados a partir da organização da sua estrutura macromolecular e exibirem comportamentos específicos relevantes para cada aplicação. Os polímeros utilizados como biomateriais são chamados biopolímeros (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

2.3.1 Ágar, agarose

O ágar é um polímero natural da classe dos poligalactanos extraído da parede celular de algas marinhas vermelhas chamadas agarófitas (divisão *Rhodophyta*), principalmente das ordens *Gracilariales* (*Gracilaria* spp. e *Hydropuntia* spp.) (Figura 5A) e *Gelidiales* (*Gelidium* spp., *Pterocladia* spp. e *Gelidiella* spp.) (Figura 5B) (SOUZA, 2008; SANTOS, 2011), encontradas nos oceanos Pacífico e Índico e no mar do Japão (ALISTE, 2006).

Figura 5 – Exemplo de espécies de algas vermelhas produtoras de ágar: (A) *Gracilaria domingensis*; (B) *Gelidiella acerosa*.

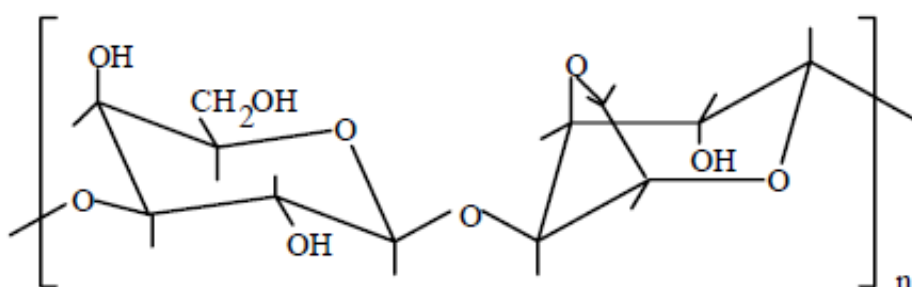


Fonte: SANTOS, 2011.

Em água fria, o ágar é insolúvel, porém se expande consideravelmente absorvendo grande quantidade de água. Em água quente, porém, a dissolução é rápida formando um gel firme. Suas propriedades de baixa viscosidade (em solução), elevada transparência, temperaturas de fusão/gelificação bem definidas (SOUZA, 2008) fazem com que o ágar apresente larga aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, biotecnológica, têxtil e de papel, como agente gelificante, espessante e estabilizante (YOSHIMURA, 2006).

O ágar é um polissacarídeo composto principalmente por agarose e agarpectina. A agarose, componente gelificante do ágar, é um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear de unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (dímero constituído de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose) (Figura 6) e a agarpectina é um polissacarídeo sulfatado, composto por agarose com grupos éster sulfatos, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico (ARVIZU-HIGUERA et al., 2007). A agarose é o principal componente do ágar, representando aproximadamente 70% (m/m) do total de sua composição.

Figura 6 – Fórmula estrutural da agarose.



Fonte: GARCIA; VIDAL, 2000.

Em referência ao mercado, existe um pequeno número de produtores de agarose purificada de elevada qualidade, para sua utilização principalmente voltada para aplicações biotecnológicas (YOSHIMURA, 2006; SANTOS, 2011). Como biomaterial, a agarose vem sendo amplamente aplicado como uma matriz para imobilização de biomoléculas, tais como enzimas, anticorpos e antígenos e gel para eletroforese (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). Devido a suas inúmeras aplicações, têm sido desenvolvidas pesquisas no sentido de conhecer melhor as propriedades dos géis de ágar e agarose, porém poucos são os estudos reportados sobre a aplicação destes polímeros em filmes (SOUZA, 2008).

2.3.2 Kefirana

Alguns micro-organismos tem habilidade de, através de processo fermentativo, sintetizar polissacarídeos. Nos últimos anos, o interesse pelo isolamento e identificação de polissacarídeos microbianos e suas aplicações é crescente, sendo sua produção uma alternativa aos polissacarídeos vegetais (BERWANGER et al., 2006).

Dentre estes polissacarídeos microbianos está a kefirana, que é uma substância hidrossolúvel, produzida pela associação microbiana denominada kefir. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, kefir é um produto cuja fermentação ocorre a partir de cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (BRASIL, 2007).

Os grãos de kefir são compostos adicionalmente por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*), não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces amnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus* (BRASIL, 2007). A composição microbiológica do kefir sofre variação com a origem dos grãos e com o método e substrato utilizados para o cultivo (GARROTE, 2001).

Originário das montanhas do Cáucaso, o kefir é utilizado na medicina popular há séculos pela população da região. A produção artesanal-familiar do kefir, a partir da cultura alimentar de povos do Caucásio difundiu-se, mundialmente, a partir do final do século XX. Ele passou então a ocupar um importante lugar na alimentação humana em muitas partes do mundo incluindo Sudoeste da Ásia, Leste e Norte da Europa, América do Norte, Japão, Oriente Médio e Norte da África devido a seus significativos valores terapêutico e nutricional (CARVALHO, 2011).

Na Rússia, Estados Unidos e outros países, o leite fermentado por grãos de kefir é produzido industrialmente e amplamente comercializado. No Brasil, até pouco tempo sua fabricação e consumo eram exclusivamente artesanais (CARNEIRO, 2010). Atualmente o kefir já é encontrado industrializado como alimentos, em forma de iogurtes, leites fermentados, sucos de frutas e cosméticos, em forma de gel dermatológico, creme hidratante corporal, shampoo, sabonete, gel de banho, entre outros.

O kefir apresenta-se macroscopicamente como grãos gelatinosos, de forma irregular, tamanhos variados entre 3 a 20 mm e coloração variável de acordo com o substrato (Figura 7),

que pode ser leite, suco de frutas ou água com açúcar mascavo, onde ocorre naturalmente a fermentação. (DINIZ et al., 2003). Durante a fermentação, os grãos se multiplicam e aumentam de volume, transferindo suas propriedades às gerações seguintes (WESCHENFELDER, WIEST; CARVALHO, 2009). A matriz do grão cultivado em leite é rica em proteínas (34% da composição) e polissacarídeos (45%), além de apresentar lipídios, vitaminas do complexo B, potássio, fósforo e magnésio (PINTO et al., 2011).

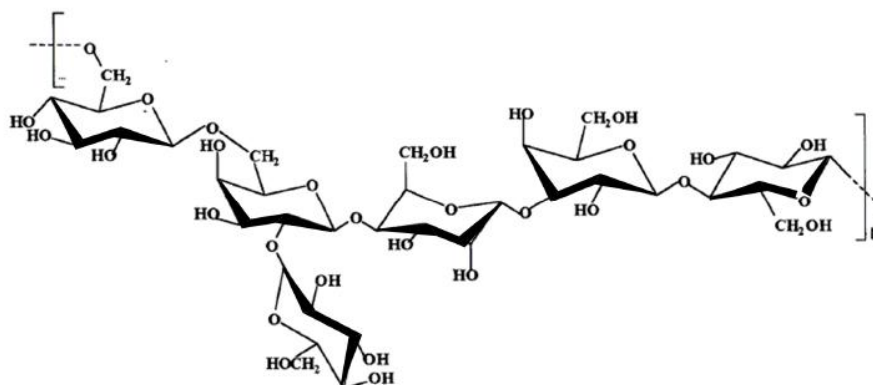
Figura 7 – Grãos de kefir cultivados utilizando como substrato açúcar mascavo.



O produto da fermentação dos grãos de kefir apresenta diversos benefícios à saúde, como ação antiinflamatória (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004), antioxidante e antimutagênica (LIU; CHEN; LIN, 2005), antimicrobiana (WESCHENFELDER; WIEST; CARVALHO, 2009; GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2000; CZAMANSKI, 2003), redução de intolerância à lactose (ALM, 1982), propriedades probióticas, além de efeito hipocolesterolêmico, redução da pressão arterial e glicemia (MOREIRA et al., 2008).

Kefirana é composta por dois monossacarídeos: glicose e galactose (Figura 8), em proporções aproximadamente iguais (LA RIVIÈRE; KOOIMAN, 1967; FRENGOVA et al., 2002; MAEDA et al., 2004). O interesse em relação a este polissacarídeo é crescente, principalmente por suas atividades biológicas. Segundo Piermaria et al. (2009) kefirana possui propriedade de imunomodulação. Moreira et al. (2008) descreveu a atividade anti-inflamatória do polímero produzido a partir do kefir, que foi ainda avaliado em relação a sua ação antitumoral em cobaias animais, apresentando resultados promissores (MAEDA et al., 2004).

Figura 8 – Fórmula estrutural da kefirana.



Fonte: VU et al., 2009.

Segundo Ghasemlou et al. (2011), o uso da kefirana vem crescendo na indústria de alimentos, como agente texturizante e gelificante. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas em busca da aplicação da kefirana na produção de filmes como embalagens biodegradáveis e/ou comestíveis, para alimentos, devido à sensibilização por questões ambientais e pelo interesse de manter a qualidade, aumentando o tempo de prateleira do produto (GHASEMLOU et al., 2011; PIERMARIA et al., 2009). Não foram encontrados estudos que referem o uso de kefirana como biomaterial.

2.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

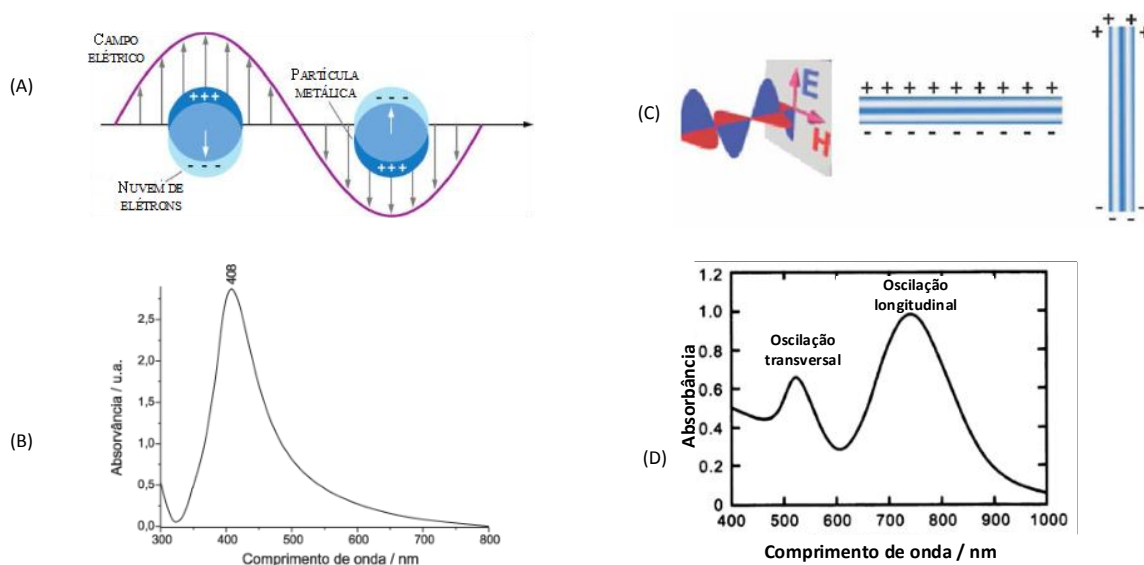
Novos biomateriais estão surgindo contendo a incorporação de nanomateriais em suas matrizes. Nanomateriais encontram-se na escala de 1 a 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) e podem variar quanto ao seu tamanho, forma, área superficial e composição química (BERNI NETO, 2010; SONAI, 2008). O estudo destes materiais em escala nanométrica vem sendo cada vez mais explorado, pois nesta dimensão, os materiais podem apresentar-se com propriedades novas ou melhoradas, quando comparadas aos mesmos materiais em escala macroscópica (CARREIRA et al. 2009; CRUZ, 2010; MELO JR. et al. 2012). Nanopartículas possuem aplicações em diversos setores, como a tecnologia de sensores, microeletrônica, aparelhos ópticos, marcadores biológicos, sistema de transporte de drogas e como agentes bactericidas (SONAI, 2008; CRUZ, 2010; MELO JR. et al 2012).

O comportamento óptico das nanopartículas metálicas é estritamente dependente do seu tamanho, formato e composição (MELO JR. et al, 2012). Ao serem submetidos a uma

radiação eletromagnética, os elétrons livres na superfície de nanopartículas metálicas esféricas sofrem oscilação coletiva, absorvendo parte da luz. Este fenômeno é denominado de efeito de ressonância de plasmon de superfície (RPS) (Figura 9A; B) (CRUZ, 2010).

Para partículas não esféricas, como bastões, o comprimento de onda de ressonância depende da orientação do campo elétrico. Portanto duas oscilações são possíveis: a longitudinal e a transversal (Figura 9C; D), podendo gerar duas bandas de absorção no espectro (OLIVEIRA, 2005; OTUBO, 2009; SERAFIM, 2010; GUIDELLI, 2011; FONTES, 2012).

Figura 9 – (A) Esquema da RPS em uma partícula metálica esférica (B) Gráfico do espectro de absorção gerado por NPsAg esféricas (C) Esquema da RPS em partículas não esféricas (D) Gráfico do espectro de absorção gerado por NPsAg não esféricas.



Fonte: Adaptado de EMMERICH; MADISON, 2012; SANTANA et al., 2006; SERAFIM, 2010; TOMA et al., 2010.

Com isso, o espectro na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) fornece informações importantes sobre as nanopartículas formadas. A largura das bandas está relacionada com a dispersão de tamanho, a variação do máximo de absorção refere-se ao tamanho médio das partículas formadas e a intensidade do pico é proporcional à concentração (BERNI NETO, 2010; CRUZ, 2010; GUIDELLI, 2011).

Dentre estas nanopartículas metálicas estão as NPsAg (CARREIRA et al., 2009). A prata é conhecida como um potente agente antimicrobiano, apresentando ação contra uma extensa faixa de micro-organismos, como bactérias Gram positivas (como *Staphylococcus*

aureus e *Streptococcus pneumonia*) e Gram negativas (como *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*), fungos e vírus (BERNI NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008; SONAI, 2008; MONTEIRO, 2009; MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Segundo Quinn e Milden (2002) a prata foi vastamente utilizada de forma sistêmica antes do advento dos antibióticos, devido a estas propriedades antimicrobianas. A utilização de NPsAg vem sendo explorada como uma alternativa aos antimicrobianos convencionais que, apesar de sua eficiência, tem originado resistência microbiana (BERNI NETO, RIBEIRO, ZUCOLOTTI, 2008). Pelczar, Reid e Chan (1980) demonstraram, em um experimento simples, a inibição de cepas de micro-organismos pelo metal, através da observação de halo de inibição de crescimento em superfície de meio de cultura semeado com bactérias, no local de inserção de moeda de prata. A Figura 11 é uma reprodução deste ensaio, utilizando uma moeda e um pingente de prata e uma moeda de cobre (RODRIGUES, 2011).

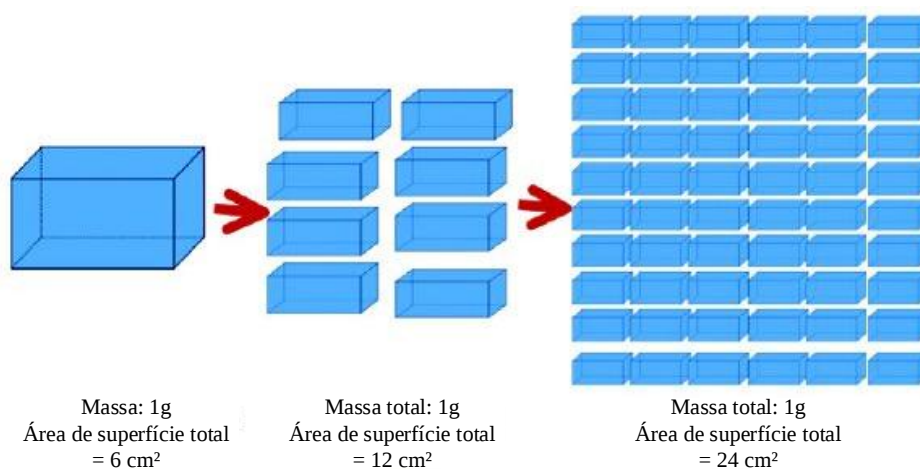
Figura 10 – Inibição de crescimento bacteriano por objetos metálicos.



Fonte: RODRIGUES, 2011.

Com a redução do tamanho das partículas de prata à escala nanométrica, a eficácia da ação antimicrobiana é aumentada devido à sua grande área superficial por unidade de volume (Figura 12) (SONAI, 2008; MONTEIRO, 2009; RATYAKSHI; CHAUHAN, 2009; REIS, 2011). Utilizando-se a mesma quantidade de material, as nanoestruturas se mostram mais reativas, em comparação às estruturas em escala micro e macrométricas (BERNI NETO, 2010).

Figura 11 – Esquema do aumento da área superficial com a diminuição do tamanho.

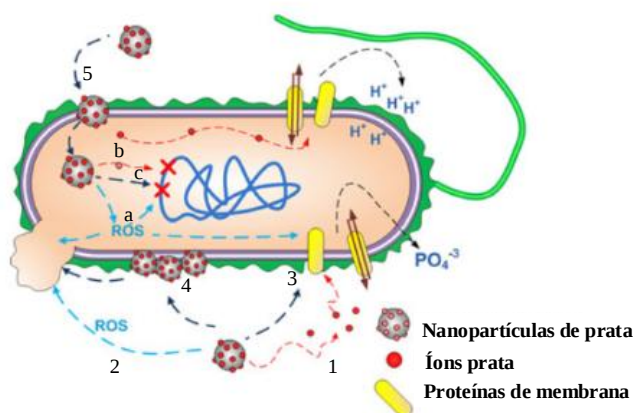


Fonte: Adaptado de HOSKINS; CHENG, 2012.

A prata é conhecida por apresentar baixa toxicidade em células animais (BERNI NETO, 2010; ROCHA, 2010; REIS, 2011; RODRIGUES, 2011). Rodrigues (2011) acredita que, como as células animais não possuem grupos tióis exteriores, esses íons sejam inertes nos animais. Além disso, de acordo com Berger et al. (1976) e Rocha (2010), as concentrações necessárias para a eficácia contra os micro-organismos são tão baixas, que não parecem ser capazes de trazer efeitos nocivos às células humanas.

A Figura 13 representa os principais mecanismos de ação antimicrobianas das NPsAg: dano direto a membrana celular, devido a sua afinidade com grupo tiol (-SH); interação com o ácido desoxirribonucléico (DNA), impedindo sua replicação; liberação de íons prata e geração de espécies reativas de oxigênio (BERNI NETO, RIBEIRO, ZUCOLOTTI, 2008; SONAI, 2008; MARCIANO, 2008; MONTEIRO, 2009; CARREIRA et al. 2009; ROCHA, 2010; BERNI NETO, 2010; DURÁN et al. 2010; MARAMBIO-JONES, HOEK, 2010).

Figura 12 – Esquema dos mecanismos de ação antimicrobiana das NPsAg.



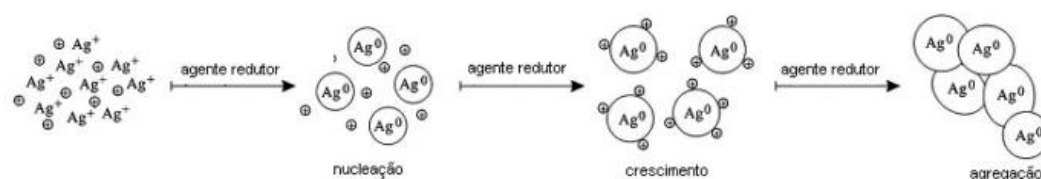
(1) liberação de íons prata (2) geração de ROS (3) interação com proteínas de membrana, afetando seu funcionamento correto (4) acúmulo na membrana celular, afetando a permeabilidade de membrana (5) penetração na célula onde pode: (a) gerar ROS, que podem vir a danificar DNA, membrana e proteínas (b) liberar íons que provavelmente afetarão DNA e proteínas de membrana e (c) agir diretamente afetando o DNA.

Fonte: Adaptado de MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010.

Segundo Berni Neto (2010) e Durán et al. (2010) as NPsAg podem ser sintetizadas por métodos físicos e químicos. A técnica mais simples e mais comumente utilizada é a redução química de sais de prata, utilizando como redutores agentes químicos, como o citrato de sódio e o borohidreto de sódio (NaBH_4) (SONAI, 2008; RATYAKSHI; CHAUHAN, 2009; MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010; REIS, 2011).

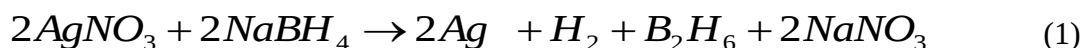
Esta síntese coloidal ocorre em duas fases: a primeira é a nucleação, onde ocorre a formação de pequenos núcleos, devido à presença do agente redutor e redução do íon prata para o estado metálico. Em seguida ocorre a fase de crescimento dos núcleos, por deposição de novos núcleos à superfície dos já existentes, levando ao crescimento das nanopartículas (Figura 14) (CRUZ, 2010).

Figura 13 – Esquema da formação de NPsAg.



Fonte: Adaptado de CRUZ, 2010.

A redução de AgNO_3 por NaBH_4 é um procedimento considerado simples, rápido, sendo o NaBH_4 um dos agentes redutores mais utilizados, e considerado muito eficiente. Esta redução ocorre segundo a reação (equação 1) (BERNI NETO, RIBEIRO, ZUCOLOTTO, 2008; BERNI NETO, 2010; MIGUEL, 2012):

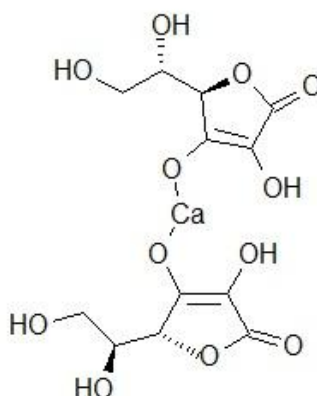


Nesta rota de síntese há redução de íons de prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0) seguido de uma agregação controlada, resultando na formação de NPsAg segundo a equação 2 (ANDRADE, 2008; LIMA, 2011; REIS, 2011; KEATING et al., 2012).



De acordo com McElhinny, Eversage e Lisensky (2011) e Marambio-Jones e Hoek (2010) o NaBH_4 é usado na preparação como um agente redutor forte e agente estabilizante, resultando na formação rápida de um grande número de núcleos de partículas, relativamente monodispersas. Agentes redutores fracos, como o ascorbato de cálcio (Figura 15) produzem reações de redução mais lentas, mas as nanopartículas obtidas tendem a ser mais polidispersas em tamanho. A fim de gerar nanopartículas com dimensões controladas, um método de dois passos é geralmente utilizado. Neste método, os núcleos das partículas são preparados utilizando um agente de redução forte e são ampliadas por um agente redutor fraco.

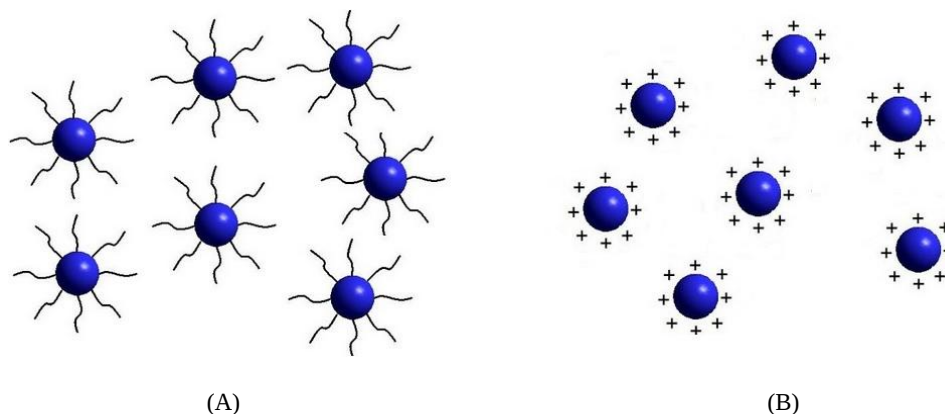
Figura 14 – Fórmula estrutural do ascorbato de cálcio.



A fim de fornecer estabilidade e impedir agregação das nanopartículas, são utilizados agentes estabilizantes (SONAI, 2008; REIS, 2011; STEVE; JOHNSON, 2014). Dois tipos de estabilização são possíveis: a estérica – onde é criada uma barreira mecânica na superfície das partículas através de seu revestimento com um polímero ou proteína (Figura 16A) – e a

eletrostática - onde um composto carregado positiva ou negativamente é adsorvido na superfície das partículas, conferindo-lhes potencial eletrostático (Figura 16B). Nos dois casos, o processo impede a aproximação das partículas, evitando o início da agregação.

Figura 15 – Esquema de estabilização das nanopartículas (A) Estabilização estérica, (B) Estabilização eletrostática.



Fonte: Adaptado de OLHAR NANO

<http://www.olharnano.com/artigos/4001/Estabiliza%C3%A7%C3%A3o-de-nanopart%C3%ADculas:-o-que-%C3%A9-e-qual-sua-finalidade>.

Muitos produtos são comercializados atualmente, empregando as propriedades antimicrobianas da prata. Como biomaterial, NPsAg vem sendo usada como agentes terapêuticos, em cateteres venosos e urinários, fios de sutura, curativos, adesivos ortodônticos, entre outros (MONTEIRO, 2009; REIS, 2011). No tratamento de queimaduras a Sulfadiazina de Prata 1% é um dos agentes tópicos mais utilizados (BOLGIANI; SERRA, 2010), com a finalidade de combater infecção local, sendo recomendada em queimaduras de segundo e terceiro grau, aplicados com curativos oclusivos (FERREIRA et al., 2003).

Alternativamente existem curativos que apresentam prata em sua composição, indicados geralmente para feridas infectadas, visando sua ação bactericida (SMANIOTTO, 2010). Alguns destes curativos são Acticoat®: curativo composto por duas camadas de malha de polietileno de alta densidade, recoberto com prata nanocristalina (YIN; LANG-FORD; BURRELL, 1999); Contreet®: curativo de espuma de poliuretano de alta absorção, que tem prata como componente ativo (MARINHO, 2008); Silvercel®: curativo absorvente antimicrobiano composto por alginato de cálcio e carboximetil celulose revestidos com prata.

Existe ainda uma cobertura primária (que necessita de uma cobertura secundária) de carvão ativado impregnado com prata, que possui um sistema de poros no tecido, capaz de reter bactérias que são inativadas pela ação da prata (BLANES, 2004). Filmes com nanopartículas metálicas incorporadas podem combinar as propriedades das nanopartículas e as do próprio filme, produzindo novas propriedades que estão além das dos componentes individuais (MARCIANO, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes poliméricos baseados em ágar, kefirana e agarose, com incorporação de NPsAg, para utilização potencial como substituto temporário de pele.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver novas formas de extração de kefirana;
- Desenvolver filmes de ágar, kefirana e agarose contendo ou não NPsAg;
- Realizar a caracterização espectroscópica na região do UV-Vis e Infravermelho dos filmes produzidos;
- Avaliar as propriedades mecânicas e a atividade antimicrobiana dos filmes, observando o efeito das NPsAg sobre estas;

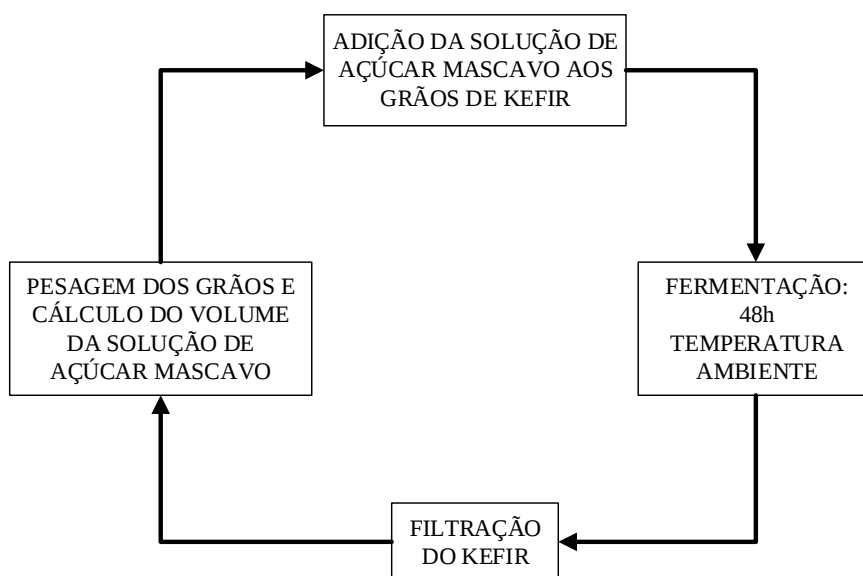
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DO KEFIR

A cultura do kefir foi previamente coletada de consumidores habituais do produto. Inicialmente, a cultura estava sendo mantida em solução de açúcar mascavo (obtido de fornecedor local), de acordo com orientação dos consumidores. Sendo assim, era medido o volume (mL) que os grãos ocupavam em um Becker e então, adicionava-se aos grãos, o triplo de volume de açúcar mascavo dissolvidos em água. Os grãos eram mantidos sob temperatura ambiente (25-30°C). Diariamente eram realizadas as repicagens. Este foi denominado de método de cultivo 1.

Adicionalmente foi elaborado um segundo método de cultivo, baseado em informações coletadas em catálogos, revistas de divulgação popular e na rede mundial de computadores. Neste método, os grãos drenados são pesados e o seu peso (g) serve de referência para calcular o volume de solução de açúcar mascavo a 50% (m/v). A solução de açúcar mascavo passou a ser filtrada para remover possíveis impurezas presentes no mesmo. Os grãos continuaram sendo mantidos em temperatura ambiente, a partir de múltiplas repicagens a cada 48 horas. Este foi denominado de método de cultivo 2. A Figura 17 apresenta um fluxograma do método de cultivo dos grãos de kefir.

Figura 16 – Fluxograma do método de cultivo dos grãos de kefir.



Os métodos de cultivo 1 e 2 foram comparados entre si. O delineamento experimental foi totalmente casualizado com cinco repetições.

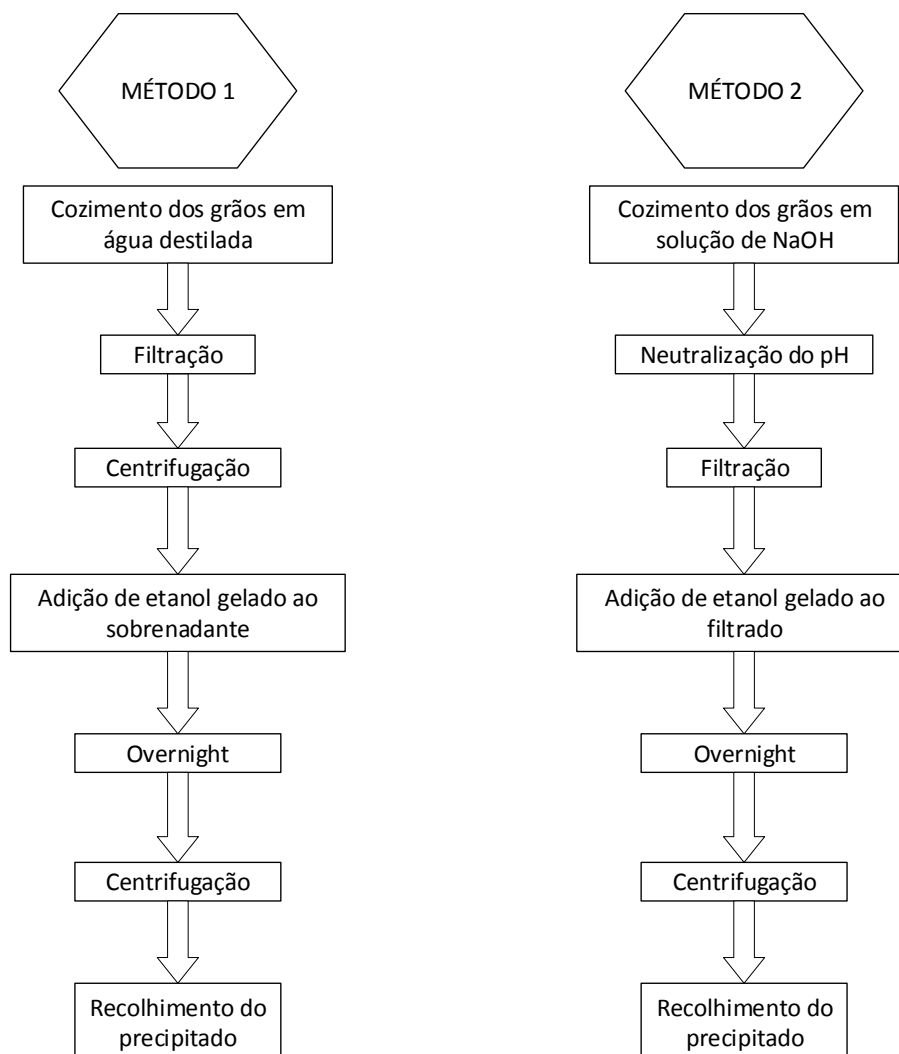
Visando a diminuição de impurezas da kefirana oriundas do açúcar mascavo, foi elaborado adicionalmente um processo de clareamento. Para tanto, os grãos, antes da extração foram cultivados em solução de açúcar cristal a 50% (m/v), sendo realizadas três repicagens.

4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA

Inicialmente, a extração da kefirana foi realizada a partir do protocolo descrito por Moreira et al. (2008), onde após crescimento exponencial da cultura em torno de 7 dias, os grãos foram colocados em Becker contendo água destilada fervente, na proporção de 1:2 sendo mantida sob agitação e fervura, em agitador magnético (IKA RH basic 1) durante 1 hora. Após esse período, a mistura foi resfriada, filtrada e centrifugada (Hettich Zentrifugen, Universal 320R) a 1920 g por 20 minutos. O precipitado foi então descartado e em seguida adicionou-se um volume igual de etanol 93° gelado ao sobrenadante. Em seguida, o produto foi mantido sob 4°C por 15 horas (overnight), sucedendo-se a centrifugação a 1920 g por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi recolhido e lavado duas vezes com etanol. Finalmente o polímero foi dissolvido em água quente. Este foi nomeado método de extração de kefirana 1 (Figura 18).

Outro método foi desenvolvido, onde os grãos de kefir foram colocados em Becker contendo uma solução de hidróxido de sódio P.A - NaOH (Cinética) 0,1 mol.L⁻¹, na proporção de 1:2 sendo mantida sob agitação e fervura durante 1 hora. Após esse período, a mistura foi resfriada e neutralizada com solução de ácido clorídrico – HCl (Dinâmica) 0,1 mol.L⁻¹, com auxílio de pHmetro (Metrohm Swiss Made, 827 pH lab), seguindo-se com filtração. Após a filtração, foi adicionado o dobro em volume de etanol 93° gelado. O produto foi mantido sob 4°C por 15 horas (overnight), sucedendo-se a centrifugação a 1920 g por 20 minutos. Após centrifugação o precipitado foi recolhido e lavado duas vezes com etanol. Finalmente o polímero foi dissolvido em água quente. Este foi nomeado método de extração de kefirana 2 (Figura 18).

Figura 17 – Fluxograma dos dois métodos de extração da kefirana.



Os rendimentos finais da extração de kefirana foram calculados pela diferença do peso inicial e final de cada processo, a partir da equação 3.

$$R(\%) = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

R = rendimento

Pf = peso final

Pi = peso inicial

O delineamento experimental para a comparação dos rendimentos foi totalmente casualizado com três repetições.

O polímero obtido foi ainda submetido à purificação pelo processo de congelamento e descongelamento, que consiste de solubilização do mesmo em água deionizada quente e posterior congelamento a -25°C e descongelamento à temperatura ambiente, sendo este processo repetido três vezes. Por fim, o precipitado foi novamente recolhido por centrifugação 1920 g por 15 minutos.

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NPSAG

Foram sintetizadas NPsAg utilizando-se três métodos diferentes. No primeiro, as nanopartículas foram preparadas de acordo com a técnica proposta por Lee e Meisel (1982). Para isto, 250 mL de uma solução de Nitrato de prata (AgNO_3) $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich) foi aquecida até entrar em ebulição. Neste momento, foram adicionados 5 mL de uma solução de Citrato de sódio (Sigma-Aldrich) 1% (m/v), seguida de agitação vigorosa com temperatura fixa. Após a adição do citrato de sódio, a coloração da solução foi se modificando, passando de incolor, a amarelo pálido e, por fim, amarelo acinzentado, indicando a formação de NPsAg por este método. O aquecimento e a agitação foram mantidos por 60 minutos, depois dos quais, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente.

No segundo método a síntese das nanopartículas foi realizada de acordo com o protocolo de McElhinny, Eversage e Lisensky (2011) modificado, através da redução de íons de prata, utilizando nitrato de prata P.A. - AgNO_3 (ACS, VETEC) como agente precursor, NaBH_4 P.A. (Merck Millipore) como redutor e uma solução de agarose como estabilizante. Para esta síntese, 250 μL de uma solução de agarose a 0,05% (m/v) foram adicionados em 5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 300 μL de uma solução recém-preparada de NaBH_4 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$). Finalmente, adicionou-se lentamente 5 mL de solução de AgNO_3 ($0,00025 \text{ mol.L}^{-1}$). O sistema reacional foi deixado em repouso, à temperatura ambiente por 30 minutos.

Para o terceiro método foram sintetizadas as NPsAg utilizando-se dois agentes redutores. Para isso, 250 μL de uma solução de agarose a 0,05% (m/v) foram adicionados em 5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 300 μL de uma solução recém-preparada de NaBH_4 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), sendo este o agente redutor forte. Finalmente, adicionou-se lentamente 5 mL de solução de AgNO_3 ($0,00025 \text{ mol.L}^{-1}$). O sistema reacional foi deixado em repouso, à temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final deste período, adicionou-se 0,5 g de ascorbato de cálcio, agente redutor mais brando.

A fim de confirmar a formação das NPsAg sintetizadas com citrato de sódio e com NaBH_4 foi realizada a análise de absorção UV-Vis em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer Shimadzu, UV-1800), na faixa de comprimento de onda (λ) de 300 a 700 nm, utilizando água deionizada como branco. Para a obtenção dos gráficos, foi utilizado o software OriginLab (version 8).

O tamanho das NPsAg foi estimado de acordo com a teoria de Mie (equação 4), onde o raio médio é dado pela relação entre a velocidade de Fermi do metal ($1,39 \times 10^8 \text{ cm.s}^{-1}$) e a largura de meia altura da banda de absorção, com relação ao máximo de absorção (SABATINI, 2007).

$$R = \frac{V_f}{\Delta\omega_{1/2}} \quad (4)$$

Onde:

R = raio da partícula

V_f = velocidade de Fermi do metal

$\Delta\omega_{1/2}$ = largura à meia altura da banda de absorção em unidades de frequência

A avaliação do tamanho das NPsAg sintetizadas com NaBH_4 foi feita através de análise do Espalhamento Dinâmico de Luz realizada no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Zetasizer Nano ZS 90, Malvern), com três repetições. Os resultados foram analisados através do Zetasizer Software e os histogramas gerados no Microsoft Office Excel 2007.

4.4 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS

Foram produzidos filmes de ágar, kefirana e agarose. Além disso, foram incorporadas aos filmes de ágar e agarose NPsAg e adicionalmente foi acrescentado ascorbato de cálcio em filmes de agarose contendo NPsAg, totalizando quatro tratamentos:

Tratamento 0 (T0) – filme de ágar

Tratamento 1 (T1) - filme de kefirana

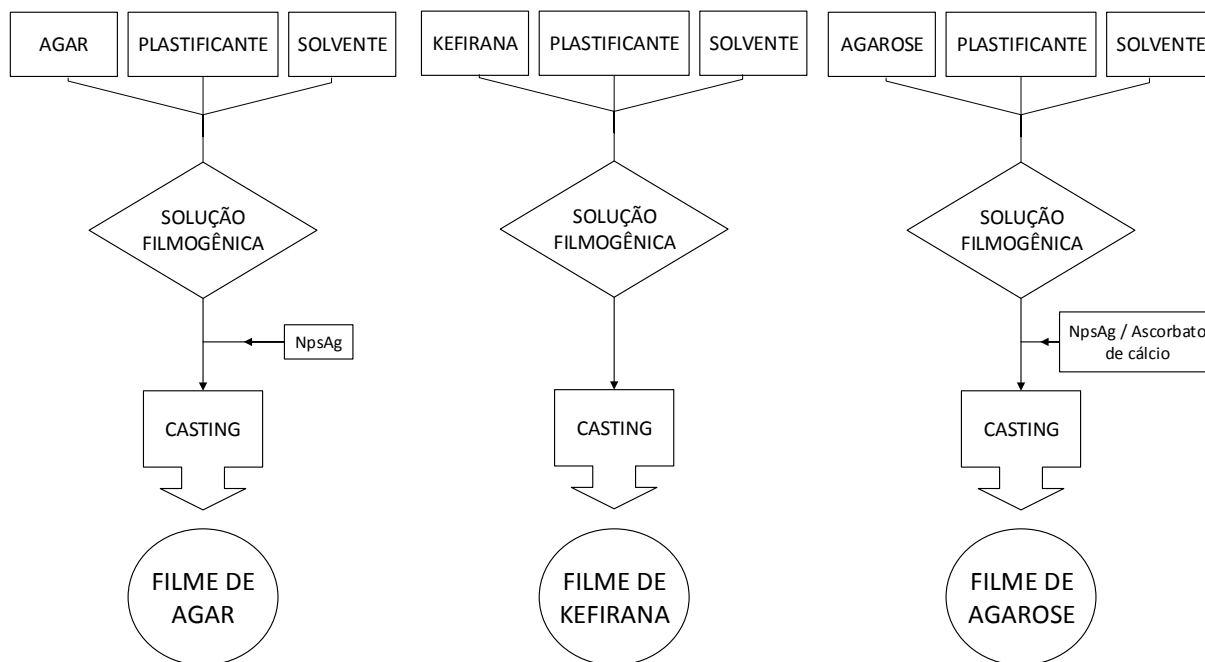
Tratamento 2 (T2) - filme de agarose

Tratamento 3 (T3) - filme de agarose + NPsAg

Tratamento 4 (T4) - filme de agarose + NPsAg + ascorbato de cálcio

Os filmes de ágar, kefirana e agarose foram obtidos pelo sistema de “casting” que é a secagem de uma solução do polímero. Como solvente foi utilizada água deionizada e como agente plastificante o glicerol (Figura 19).

Figura 18 – Fluxograma da metodologia de desenvolvimento dos filmes poliméricos.



4.4.1 Filmes de ágar (T0)

Foram inicialmente preparados filmes de ágar, utilizando-se 1 g de ágar bacteriológico HiMedia dissolvido em 40 mL de água destilada. Esta mistura foi aquecida sob agitação constante até total dissolução. Em seguida, acrescentou-se 1000 mg de glicerol e o aquecimento foi mantido até que o volume fosse reduzido a 30 mL. Por fim, a solução filmogênica foi depositada em uma placa de Petri (90x15 mm). Foram ainda preparados filmes de ágar com NPsAg. Para isso, foram adicionados 10 mL da suspensão de NPsAg sintetizadas utilizando citrato de sódio como agente redutor à solução filmogênica.

4.4.2 Filmes de kefirana (T1)

Para o processo de obtenção dos filmes de kefirana (T1), 16 g do polímero úmido foram dissolvidos em 30 mL de água deionizada, sendo aquecida em micro-ondas (Panasonic Family) obtendo-se um hidrogel. A seguir foram adicionados 400 mg de glicerol P.A.

(Fmaia), utilizada como agente plastificante. A solução foi vertida em uma placa de Petri (90x15 mm) e levada à estufa de secagem (TECNAL TE-394/3) com circulação forçada de ar por 16 horas a 40°C, para evaporação do solvente.

4.4.3 Filmes de agarose (T2)

Para preparação dos filmes de agarose, utilizou-se 0,016 g de agarose/cm² (agarose D-1 LOW EEO, Pronadisa), que foi dissolvida em 30 mL de água deionizada. Esta dissolução foi aquecida em micro-ondas por aproximadamente 4 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1000 mg de glicerol P.A. Para concluir o processo, o material foi depositado em uma placa de Petri (90x15 mm). A fim de se aprimorar a qualidade dos filmes foram realizados ensaios com diferentes teores de agarose/cm². Para tanto foram testados inicialmente 0,016, 0,008, 0,004 e 0,002 g de agarose/cm². Um segundo ensaio foi realizado com 0,008, 0,006 e 0,004 g de agarose/cm². Para os ensaios mecânicos foram preparados filmes de 0,006 g de agarose/cm².

4.4.4 Filmes de agarose com NPsAg (T3)

Para a obtenção dos filmes de agarose com NPsAg (T3) foi realizado o mesmo procedimento de produção do filme T2 com 0,006 g de agarose/cm² sendo, no final do processo inseridos 10 mL da solução de NPsAg sintetizadas utilizando-se NaBH₄ como agente redutor.

4.4.5 Filmes agarose com NPsAg e ascorbato de cálcio (T4)

Para a elaboração dos filmes de agarose com NPsAg e ascorbato de cálcio (T4) foi utilizada a mesma metodologia de produção do filme T2 com 0,006 g de agarose/cm², utilizando-se porém, no final da formulação do filme as NPsAg sintetizadas com NaBH₄ e ascorbato de cálcio como agentes redutores.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Foram avaliadas as propriedades microestruturais, físicas, mecânicas e espectroscópicas dos filmes.

4.5.1 Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-Vis)

Foram realizadas análises de espectroscopia na região do UV-Vis dos filmes T0, T1, T2, T3 e T4, na faixa de comprimento de onda (λ) de 190 a 700 nm, a fim de se avaliar a presença de NPsAg. Para a obtenção dos gráficos, foi utilizado o software OriginLab (version 8).

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise de MEV as amostras foram metalizadas. Os filmes T0 foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM-5900 no Departamento de Física da UFPE. Os filmes T1, T2, T3 e T4 foram metalizados no Fine Coat – 1100 – JEOL no Laboratório de Microscopia Eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE e observado no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL - JSM 5600LV do Núcleo de Integração Tecnológica-1/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ.

4.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Realizou-se ainda a espectroscopia FTIR, utilizando um espectrofotômetro (BRUKER IFS66), na Central Analítica, Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE, utilizando um intervalo de número de onda de $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, a fim de se identificar os grupos funcionais presentes nas amostras. Esta análise foi aplicada para filmes T1, T2, T3 e T4.

4.5.4 Espessura

A espessura dos filmes T1, T2, T3 e T4 foi obtida com auxílio de um micrômetro (Great Wall, modelo 428840), de precisão 0,01 mm. O delineamento experimental foi em blocos casualizados. Foram realizadas medidas de cada tratamento, em triplicata, tomando-se medida de 5 pontos diferentes de cada amostra, totalizando 15 medidas de cada tratamento. O resultado foi dado a partir da média das medidas de cada tratamento.

4.5.5 Transparência

Para a determinação da transparência dos filmes T1, T2, T3 e T4, foram medidas as absorbâncias dos filmes a 600 nm e a espessura dos mesmos. A transparência foi então

calculada através da equação 5. Um valor de T baixo representa menor transparência do filme (PIERMARIA et al., 2009).

$$T = \frac{-\log A_{600}}{x} \quad (5)$$

Onde:

T = Transparência

A₆₀₀ = Absorbância em 600 nm

x = Espessura do filme em mm

4.5.6 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes T1, T2, T3 e T4 foi avaliado através da medida de perda de peso, segundo Ferreira (2005). Para isso, amostras de cada filme, foram pesadas em balança analítica com quatro casas decimais (Shimadzu AUY 220) e em seguida aquecidas em estufa de secagem (Nova Técnica NT513) a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, até peso constante. As amostras foram então resfriadas em dessecador até temperatura ambiente até peso constante. A umidade contida nas amostras foi relacionada à perda de peso, de acordo com a equação 6.

$$U\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

U% = teor de umidade

M_i = Massa inicial

M_f = Massa final

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, em triplicata.

4.5.7 Absorção de água

A análise de absorção de água foi realizada para os filmes T1, T2, T3 e T4, através da avaliação da razão de intumescimento (RI), conforme descrito por Lima, Andreani e Soldi (2007). Para tanto, amostras de cada tratamento dos filmes foram secas em estufa a 105°C por 24 horas. Em seguida, foram pesadas, a fim de se obter a massa inicial (M_i). As amostras de massa conhecida foram imersas em 45 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 determinada em balança analítica com quatro casas decimais. O processo foi repetido até peso constante. A RI foi determinada a partir da equação 7.

$$RI = \frac{M_f}{M_i} \quad (7)$$

Onde:

RI = Razão de Intumescimento

M_f = Massa final

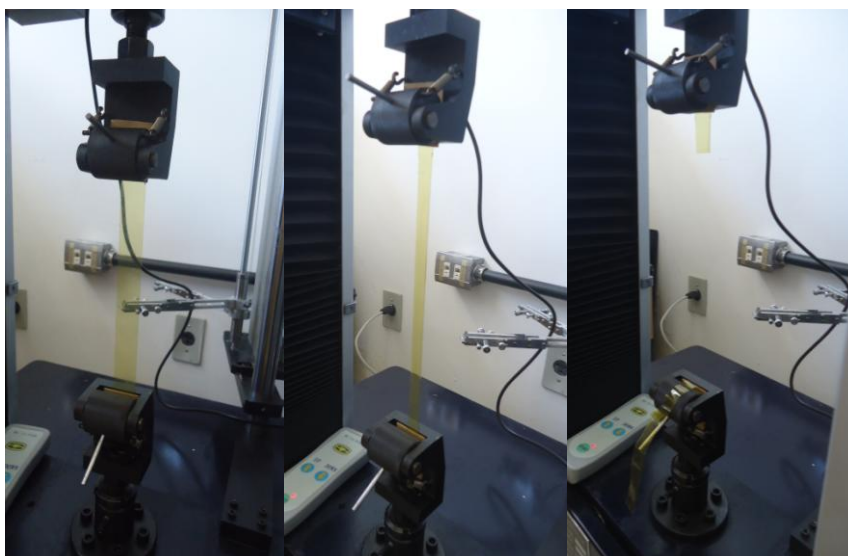
M_i = Massa inicial

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com três repetições para cada amostra.

4.5.8 Resistência à tração

Os ensaios de resistência à tração dos filmes T2, T3 e T4 foram realizados no Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB) da UFPE. A resistência à tração foi determinada utilizando uma Máquina Universal de Ensaio (WDW 300E) acoplada ao software WinWdW (Figura 20). O ensaio foi realizado de acordo com a norma ASTM D288-12, utilizando uma força de carga de 0,4 KN e velocidade de 25 mm/min. O delineamento experimental totalmente casualizado, com quatro repetições de cada amostra.

Figura 19 – Execução do ensaio de resistência à tração de um filme.



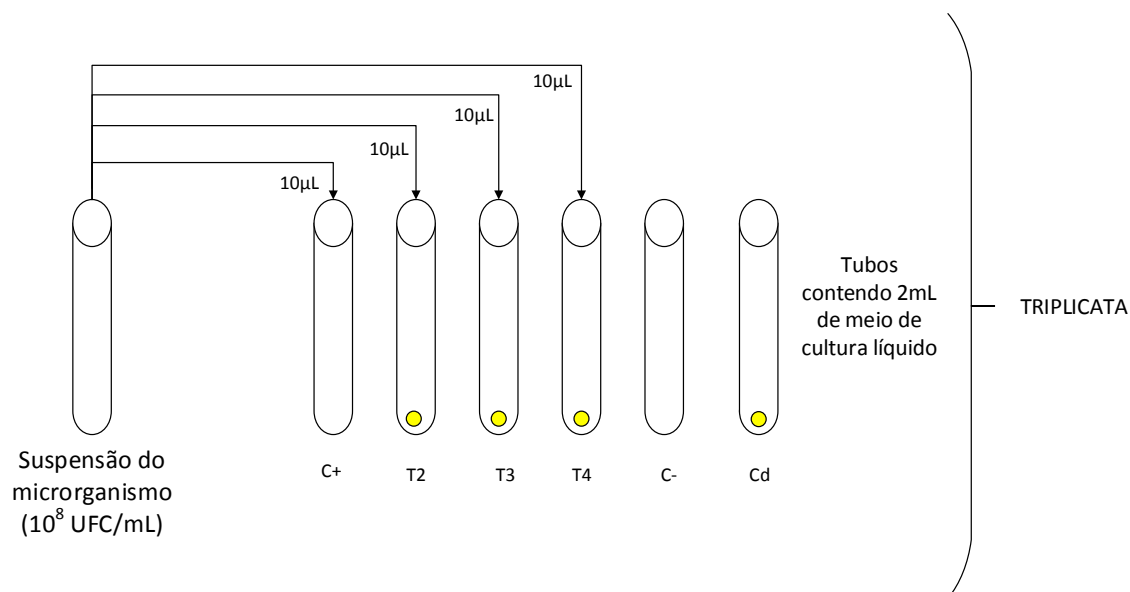
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos filmes de agarose (T2, T3 e T4), utilizando micro-organismos da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007), representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, respectivamente, sendo todos de importância clínica em queimaduras e feridas de pele.

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado utilizando-se o método de difusão em disco proposto por Bauer et al. (1966) modificado. Para isso, foram cortados discos de 6 mm de diâmetro de cada filme a ser testado. Os discos foram colocados sobre a superfície do meio semeado com as suspensões microbianas padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mcfarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias, em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas para bactérias e 48 horas para a levedura. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco. Os testes foram realizados em triplicata.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi ainda realizada através de um método de difusão em meio líquido (Figura 21). Para isso, a partir das isolados dos micro-organismos teste com 24 horas de cultivo, suspensões microbianas foram padronizadas em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias. Para a realização dos testes, 10 µL da suspensão dos micro-organismos foram adicionados a tubos contendo 2 mL meios de cultura Mueller-Hinton (MH) líquido para as bactérias e Sabouraud líquido para a levedura. Aos tubos foram então adicionados discos de 6 mm de diâmetro de cada um dos três tratamentos, em triplicata. Além disso, foram realizados os controles positivo, através de tubos contendo meio de cultura líquido e 10 µL da suspensão dos micro-organismos, controle negativo, contendo apenas o meio de cultura e controle do disco, contendo o meio de cultura com o disco (Figura 21).

Figura 20 – Esquema representativo do método de difusão em meio líquido.

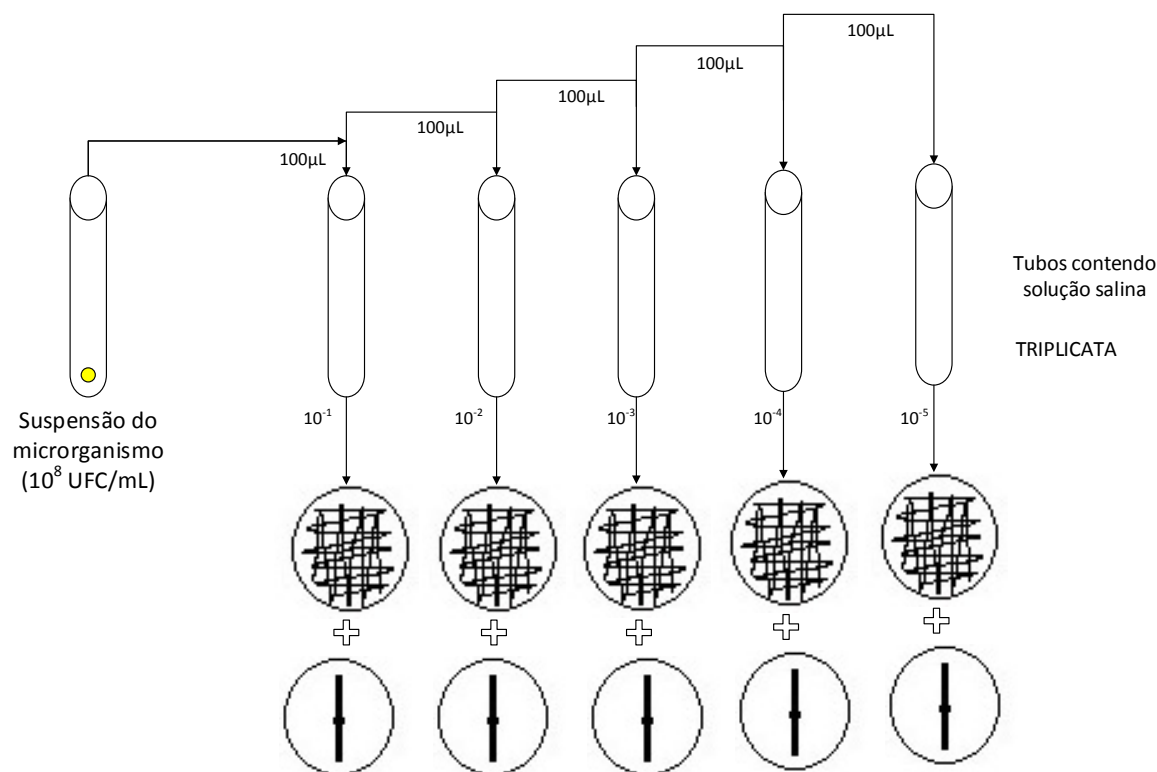


C+ controle positivo; T2 disco do tratamento 2; T3 disco do tratamento 3; T4 disco do tratamento 4; C- controle negativo; Cd controle do disco.

Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Após incubação, foram realizadas comparações da turbidez dos tubos testes e controle. A partir do padrão de turvação, foram então realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} dos tubos com turvação menor que o controle positivo. Alíquotas de 1 µL de cada diluição foram semeadas em rede, em meios de cultura contidos em placas de Petri (Figura 22). Estas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para a posterior contagem das UFC.

Adicionalmente, foi testada a metodologia descrita por Prates et al. (2010), como uma alternativa para o semeio. Para isso, alíquotas de 10 µL das diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram estriadas em triplicata em uma placa de Petri contendo meios de cultura (Figura 22). Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, procedendo-se a contagem de UFC. Toda a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Figura 21 – Esquema representativo das metodologias de diluição e semeios em rede e descrito por Prates (2010).



4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

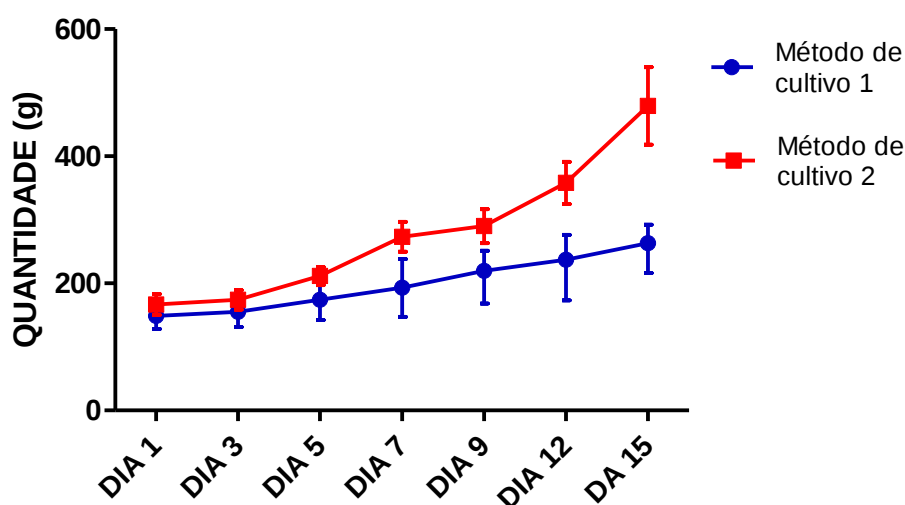
Para a análise da diferença estatística do rendimento entre os dois métodos de extração da kefirana, foi aplicado o teste t de *Student*, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados dos ensaios físicos e mecânicos foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para comparação de médias, também com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Prism5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DO KEFIR

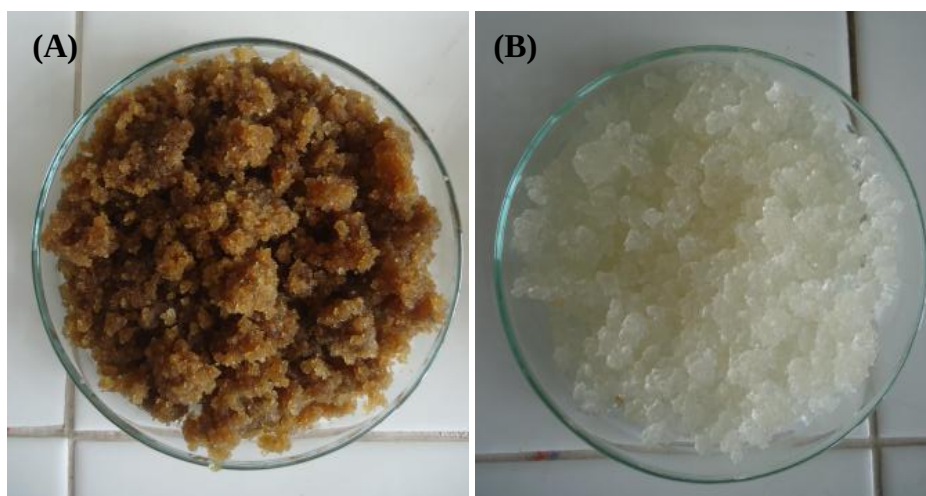
Após avaliações sobre o crescimento dos grãos de kefir, observou-se que as condições propostas pelo método de cultivo 1 não estavam resultando em um bom crescimento. Por este motivo foi desenvolvido o método de cultivo 2, utilizando-se padronização na quantidade de substrato em relação ao peso de grãos e maior intervalo de tempo entre as repicagens. Aparentemente o método de cultivo 2 apresentou-se mais eficaz, quando comparado com o método de cultivo 1, principalmente quando analisado o 15º dia (Figura 23).

Figura 22 – Gráfico de comparação do crescimento dos grãos de kefir, quando submetidos aos métodos de cultivo 1 e 2.



Em relação ao processo de clareamento, em que os grãos foram deixados em solução aquosa de açúcar cristal, este se mostrou eficaz pela diminuição da cor marrom típica do açúcar mascavo (Figura 24).

Figura 23 – Grãos de kefir (A) cultivados em solução de açúcar mascavo (B) cultivados em solução de açúcar cristal.

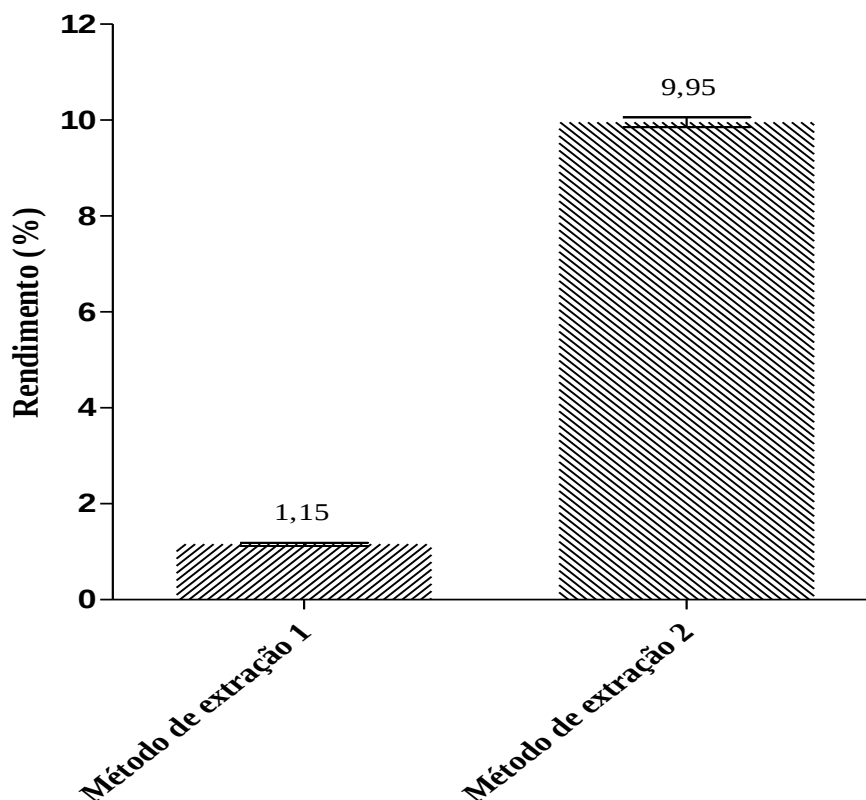


5.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA

Após alguns experimentos, observou-se que o processo realizado no método de extração 1 resultava em baixo rendimento, sendo então realizada uma adaptação, originando o método de extração 2. O método de extração 2 apresentou rendimento de 9,95% (99,5 g/Kg de grãos de kefir), em contraste o rendimento obtido pelo método de extração 1, foi de 1,15% (11,5 g/Kg de grãos de kefir), sendo esta diferença significativa ($p < 0,05$) (Figura 25).

Uma hipótese para este aumento no rendimento é que, com a adição de NaOH no processo de extração, ocorra uma desestabilização nas interações intramoleculares, levando a solubilização do polímero. Outra hipótese é que em solução alcalina, o polímero sofre hidrólise, ocorrendo a quebra de ligações interatômicas, resultando na formação de cadeias menores, que são posteriormente solubilizadas. Zara, Thomazini e Lanz (2012) mostraram que soluções de NaOH são mais eficientes na extração de polímeros naturais do que a água, devido a ação da força iônica.

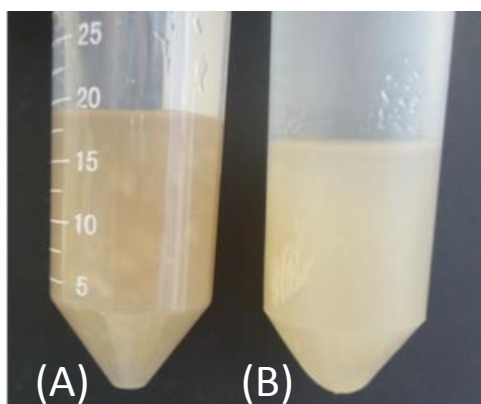
Figura 24 – Gráfico de rendimento dos processos de extração de kefirana utilizando os métodos 1 e 2.



O rendimento encontrado no método de extração 1 foi cerca de 10 vezes superior ao encontrado por Moreira et al (2008), que utilizando o mesmo método de extração, para grãos cultivados em açúcar mascavo, encontrou rendimento de 1,1 g/kg de grãos utilizados (0,11%). O clareamento prévio dos grãos pode ter levado a remoção de impurezas do açúcar mascavo, sendo esta uma hipótese para explicar o aumento no rendimento.

A Figura 26 mostra a diferença no aspecto da kefirana antes e após o processo de purificação por congelamento e descongelamento. Após a purificação, a kefirana se mostrou com coloração mais clara, indicando a remoção de resquícios do açúcar mascavo utilizado como substrato.

Figura 25 – Kefirana (A) antes do processo de purificação por congelamento e descongelamento, (B) após o processo de purificação por congelamento e descongelamento.



Este método de purificação já é utilizado para diversos polissacarídeos. Alquini (2010) realizou esta purificação para polissacarídeos obtidos de *Agaricus bisporus* e Oliveira; Carbonero (2014) aplicaram o mesmo processo para a purificação de polissacarídeos extraídos de *Pleurotus ostreatoroseus*, ambas as espécies de fungos basidiomicetos.

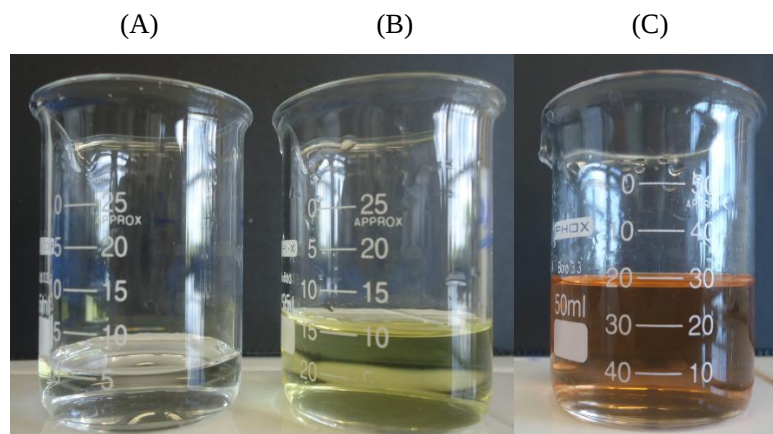
Alguns estudos de extração e purificação de ágar aplicam esta mesma técnica para remover impurezas em suspensão (KALIAPERUMAL; UTHIRASIVAN, 2001; SOUZA, 2008; SANTOS, 2011). Santos (2011) cita que durante esse processo ocorre eliminação dos pigmentos e de alguns sais indesejáveis e que o processo deve ser repetido até que se detecte visualmente a obtenção de um gel com aparência mais clara. Martins (2006) também realizou purificação de kefirana através de congelamento da solução do polímero, seguido de descongelamento à temperatura ambiente.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NPsAg

A formação nas NpsAg foi evidenciada ao longo do processo de síntese utilizando-se NaBH_4 , mediante a mudança de coloração da solução, de incolor (Figura 32A) para amarelado (Figura 32B), indicando a redução dos íons Ag^+ para Ag^0 . De acordo com Andrade (2008), Lima (2011), Reis (2011), Miguel (2012) e Melo Jr. et al. (2012), soluções de NpsAg possuem coloração tipicamente amarelada, que corresponde ao espectro resultante da absorção no comprimento de onda em torno de 400 nm que pode variar dependendo principalmente do tamanho das nanopartículas presentes. Na Figura 32(C), pode-se observar que houve alteração da coloração, do amarelo para o castanho com a adição do ascorbato de

cálcio, utilizado como um agente redutor mais brando na síntese das NPsAg. Além disso, esta síntese resultou em uma solução turva, com formação de precipitado.

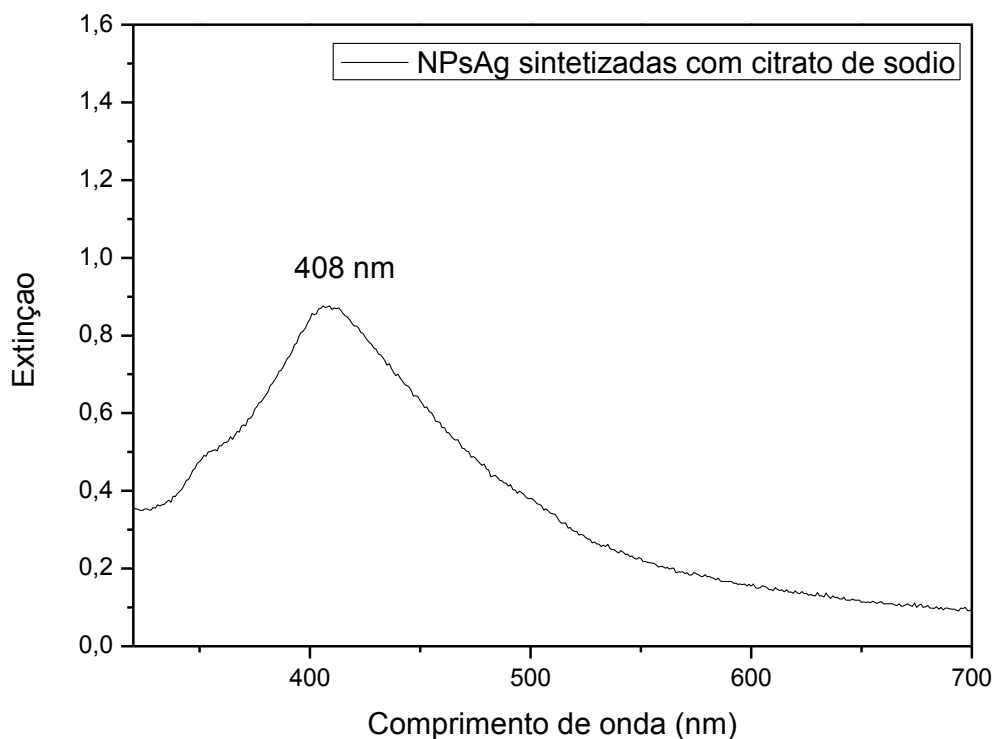
Figura 26 – Coloração da solução na síntese das NpsAg (A) antes da adição do AgNO_3 , (B) ao final da síntese, (C) NPsAg com ascorbato de cálcio.



A adsorção de íons BH_4^- na superfície das NPsAg é responsável por gerar forças eletrostáticas repulsivas que auxiliam na estabilidade do sistema (MELO JR., 2012). Além dessa estabilidade eletrostática, a adição do polímero durante a síntese gera uma estabilização estérica. (BERNI NETO, 2010).

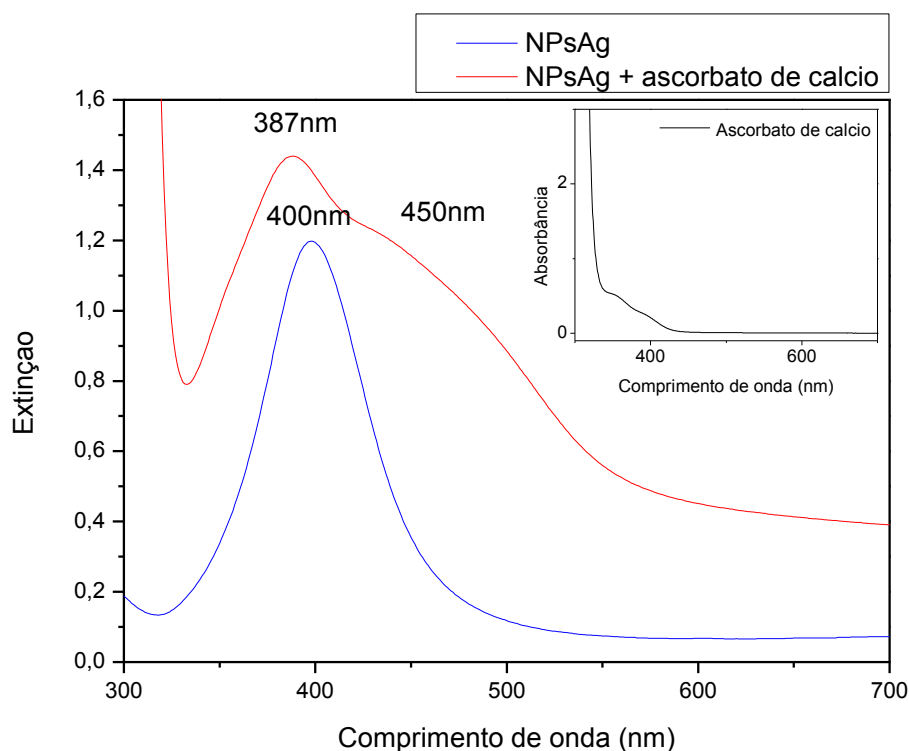
Com objetivo de se comprovar a formação das NPsAg, ao final da síntese foi realizado uma espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, na faixa de comprimento de onda de 300-700 nm. Analisando-se a espectroscopia de extinção na região do UV-Vis das NPsAg sintetizadas com citrato de sódio (Figura 33), a banda de plasmon caracterizou a formação das NPsAg em suspensão, com seu máximo em torno de 408 nm, indicando a obtenção de uma amostra com grande dispersão de forma e tamanho, devido ao alargamento do pico.

Figura 27 – Curva referente ao espectro de extinção na região do UV-Vis das NPsAg sintetizadas com citrato de sódio em meio aquoso.



O espectro referente a NpsAg sintetizadas com NaBH_4 (Figura 34) apresentou uma banda de plasmon com único pico em torno de 400 nm. O espectro referente a NPsAg sintetizadas com NaBH_4 com ascorbato de cálcio (Figura 34) exibiu um deslocamento do máximo de extinção de 13 nm para a esquerda, além de apresentar um alargamento da banda de extinção, com um ombro localizado em torno de 450 nm.

Figura 28 – Curva referente ao espectro de extinção no UV-Vis das NPsAg e das das NPsAg com ascorbato de cálcio em meio aquoso (*insert*).



Segundo Oliveira (2005), para NPsAg podem-se obter bandas de plasmons com máximo variando entre 400 e 670 nm. Martínez-Castañón et al. (2008) encontraram um espectro no UV-Vis para NPsAg semelhante ao obtido neste trabalho, e relacionaram o pico em torno de 410 nm às partículas de aproximadamente 7 nm. De acordo com Cruz (2010), Berni Neto (2010), Miguel (2012), Reis (2011) o pico único indica que foram formadas NPsAg com geometria próxima à esférica, fazendo com que ocorra apenas um modo de oscilação de ressonância plasmonica. A presença do ombro, observado no espectro no UV-Vis das NPsAg sintetizadas com NaBH_4 com ascorbato de cálcio pode ser indicativo da formação de partículas maiores, através da aglomeração de partículas menores, o que pode ser evidenciado pela turvação e presença de precipitado na solução.

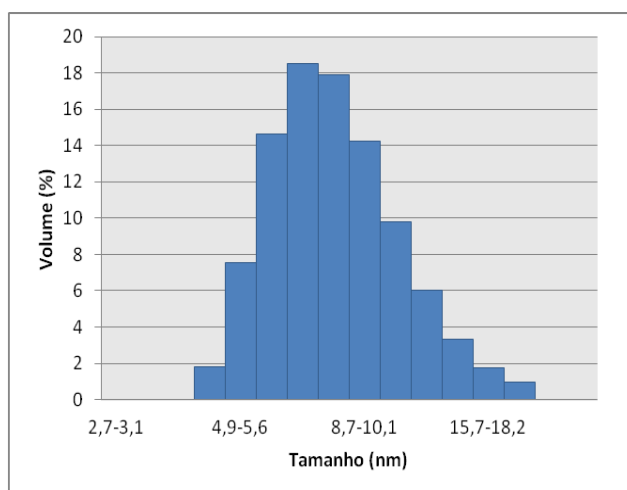
A variação do máximo de absorção está diretamente relacionada ao tamanho médio das partículas; assim partículas maiores levam ao deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimentos de onda e quando o deslocamento é para comprimentos de onda menores, partículas de menor dimensão são formadas. De acordo com Cruz (2010), quanto

mais larga for a banda, maior a dispersão de tamanho das nanopartículas formadas. Este alargamento pode ainda ser pela aglomeração das nanopartículas (ROCHA, 2010).

Para as NPsAg sintetizadas com citrato de sódio, o cálculo de Mie resultou em uma estimativa teórica para o tamanho médio das partículas em torno de 54,7 nm. O tamanho médio das NPsAg, obtidas sem ascorbato de cálcio, calculado pela teoria de Mie foi estimado em 10,4 nm. Sabatini (2007) estimou o tamanho médio das NPsAg, que tiveram espectro de absorção semelhante ao apresentado neste trabalho, através da teoria de Mie em 11 nm, o que foi confirmado através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para as nanopartículas obtidas com ascorbato de cálcio não foi possível aplicar o cálculo teórico, pelo fato de que esta síntese resultou em partículas grandes, levando a visualização de um ombro no espectro na região do UV-vis, o que impossibilitou a análise.

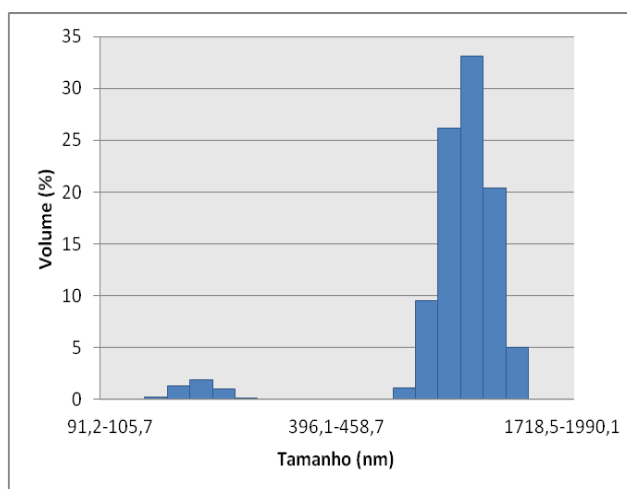
O histograma gerado através de análise de Espalhamento Dinâmico de Luz das NPsAg obtidas sem ascorbato de cálcio mostra a distribuição de tamanho de partículas de dimensões entre 4,85 nm até 18,16 nm, com média de 6,5 nm representando 18,5% da população de partículas (Figura 35).

Figura 29 – Histograma de distribuição de tamanho das NPsAg obtido por análise de Espalhamento Dinâmico de Luz.



O histograma gerado através de análise de Espalhamento Dinâmico de Luz das NPsAg com ascorbato de cálcio mostra que existem dois tipos de partículas, cujos diâmetros apresentaram média de 164,2 nm, representando 1,9% da população das partículas e 955,4 nm, representando 33,1% da população (Figura 36).

Figura 30 – Histograma de distribuição de tamanho das NPsAg com ascorbato de cálcio obtido por análise de Espalhamento Dinâmico de Luz.



A medida de tamanho das NPsAg com ascorbato de cálcio por Espalhamento Dinâmico de Luz indicou a presença de partículas grandes, em torno de 1 μm . Este efeito pode ser atribuído à aglomeração de partículas menores. A presença destas partículas maiores foi evidenciada pela observação da turvação da solução, com formação de precipitado.

Através do método de Espalhamento Dinâmico de Luz Power, Betts, Cassidy (2010) mediram o diâmetro das NPsAg produzidas, encontrando tamanho entre 8 nm-38 nm, com diâmetro médio de 21 nm e Bian et al. (2008) encontraram dois tipos de NPsAg, com diâmetros em 35 nm e 120 nm.

5.4 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS

5.4.1 Filmes de ágar

A partir da metodologia descrita, foram obtidos filmes ágar que macroscopicamente apresentaram-se homogêneos, sem rachaduras, flexíveis e sem cor (Figura 27). Rhim, Wang, Hong (2013) e Souza (2008) produziram filmes de ágar homogêneos e sem cor aparente.

Figura 31 – Filme de ágar (T0).



5.4.2 Filmes de kefirana

Os filmes de kefirana apresentaram-se macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis, sendo removidos das placas facilmente (Figura 28). Nos filmes de kefirana produzidos por Piernaria et al. (2011), a adição de glicerol levou a obtenção de filmes bastante flexíveis.

Figura 32 – Filmes de kefirana (T1).



5.4.3 Filmes de agarose

Os filmes de agarose preparados a partir de 1 g do polímero, o que corresponde a 0,016 g de agarose/cm², mostraram-se espessos e aparentemente apresentavam pouca flexibilidade. Com isso, foram realizados ensaios com menor teor de agarose/cm², a fim de produzir filmes mais finos e flexíveis. Por meio de uma avaliação qualitativa (Tabela 2),

observou-se que a diminuição da quantidade de agarose/cm² foi eficaz para aumentar a flexibilidade dos filmes obtidos, porém os filmes com menor teor de agarose (0,004 e 0,002 g de agarose/cm²) se apresentaram frágeis.

Tabela 2 – Quantidade de agarose/cm² e seus respectivos aspectos.

Quantidade de agarose por cm²	Avaliação qualitativa do filme obtido
0,016 g/cm ²	Filme volumoso e pouco flexível
0,008 g/cm ²	Filme menos volumoso e pouco flexível
0,004 g/cm ²	Filme fino, flexível e delicado
0,002 g/cm ²	Filme fino, flexível e delicado

Optou-se então em realizar um novo experimento utilizando-se dosagem intermediária entre 0,008 g/cm² e 0,004 g/cm² (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantidade de agarose/cm² e seus respectivos aspectos.

Quantidade de agarose por cm²	Avaliação qualitativa do filme obtido
0,008 g/cm ²	Filme volumoso e pouco flexível
0,006 g/cm ²	Filme fino e flexível
0,004 g/cm ²	Filme fino, flexível e delicado

Após estes ensaios, definiu-se a quantidade ideal para preparo de filmes com boas características de espessura e flexibilidade. Os filmes de agarose T2 foram então produzidos com 0,006 g de agarose/cm². Zhai et al. (2011) produziu filmes utilizando 0,4 g de agarose em 20 mL de água e Souza (2008) preparou os filmes de agarose utilizando 0,45 g do polímero em 30 mL de água.

Os filmes de agarose obtidos também apresentaram-se homogêneos, sem rachaduras e flexíveis e também foram facilmente removidos da placa. Os filmes de agarose (Figura 29) apresentaram-se incolores.

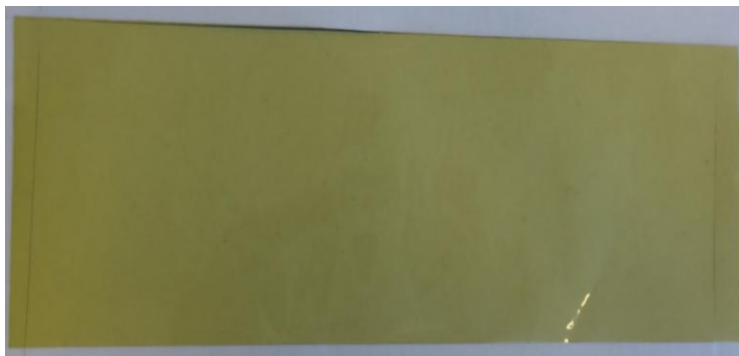
Figura 33 – Filme de agarose (T2).



5.4.4 Filme de agarose com NPsAg

Na adição de NPsAg o filme mostrou as mesmas características do filme T2, porém com uma leve coloração amarelada (Figura 30), típica das NPsAg.

Figura 34 – Filme de agarose com NPsAg (T3).



5.4.5 Filme de agarose com NPsAg e Ascorbato de cálcio

Os filmes de agarose com NPsAg e ascorbato de cálcio (Figura 31) também apresentaram mudança de coloração para o castanho, semelhante a coloração das NPsAg com ascorbato de cálcio.

Figura 35 – Filme de agarose com NPsAg e ascorbato de cálcio (T4).

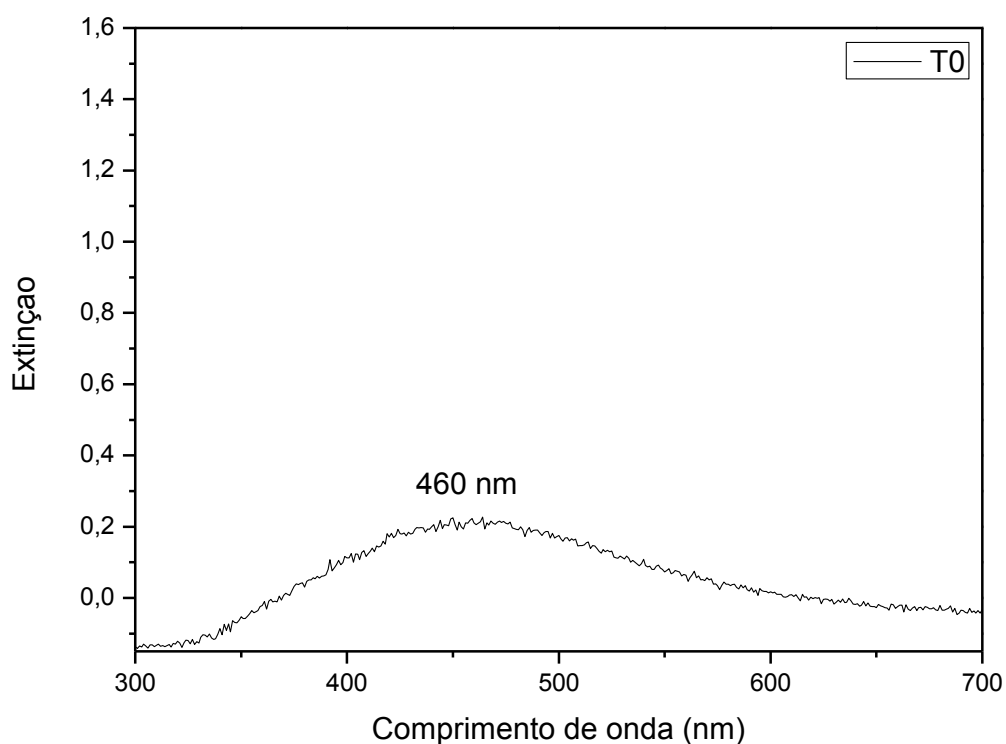


5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

5.5.1 Espectroscopia no Ultravioleta-visível

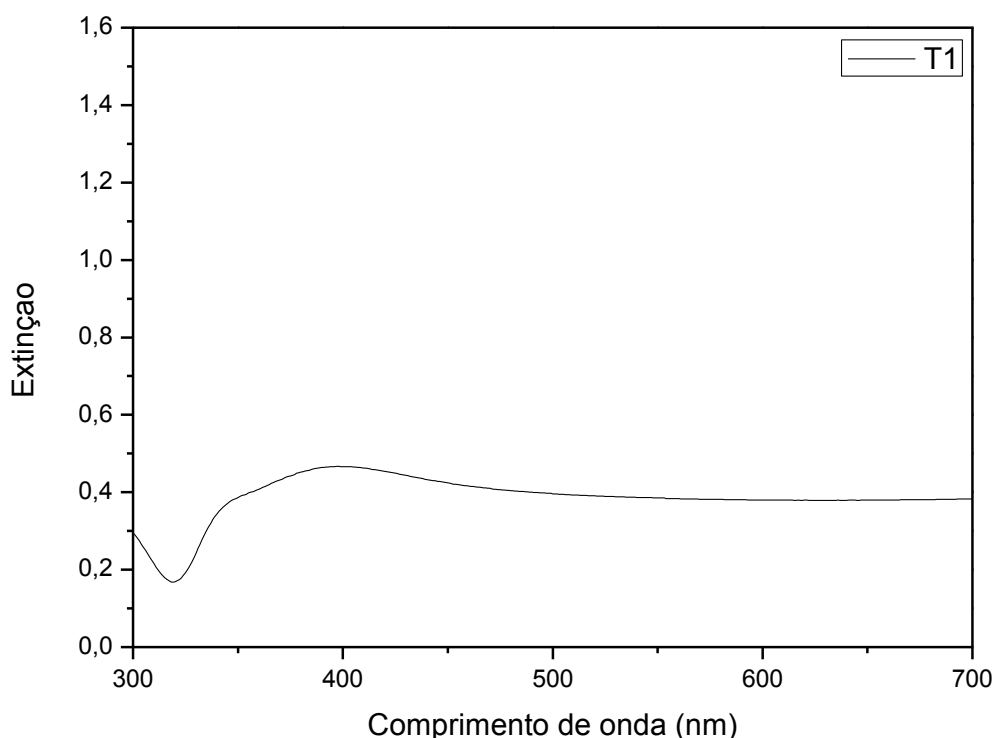
A técnica de UV-Vis também foi aplicada aos filmes. No espectro do filme T0 (Figura 37), a presença de NpsAg é sugerida pela presença pico em 460 nm. Na análise do filme T0, comparando-se com o espectro das NPsAg incorporadas, observa-se um deslocamento do máximo de extinção de 52 nm para direita provocado possivelmente pela modificação do ambiente onde encontram-se as NPsAg.

Figura 36 – Curva referente ao espectro de extinção na região do UV-Vis do filme T0.



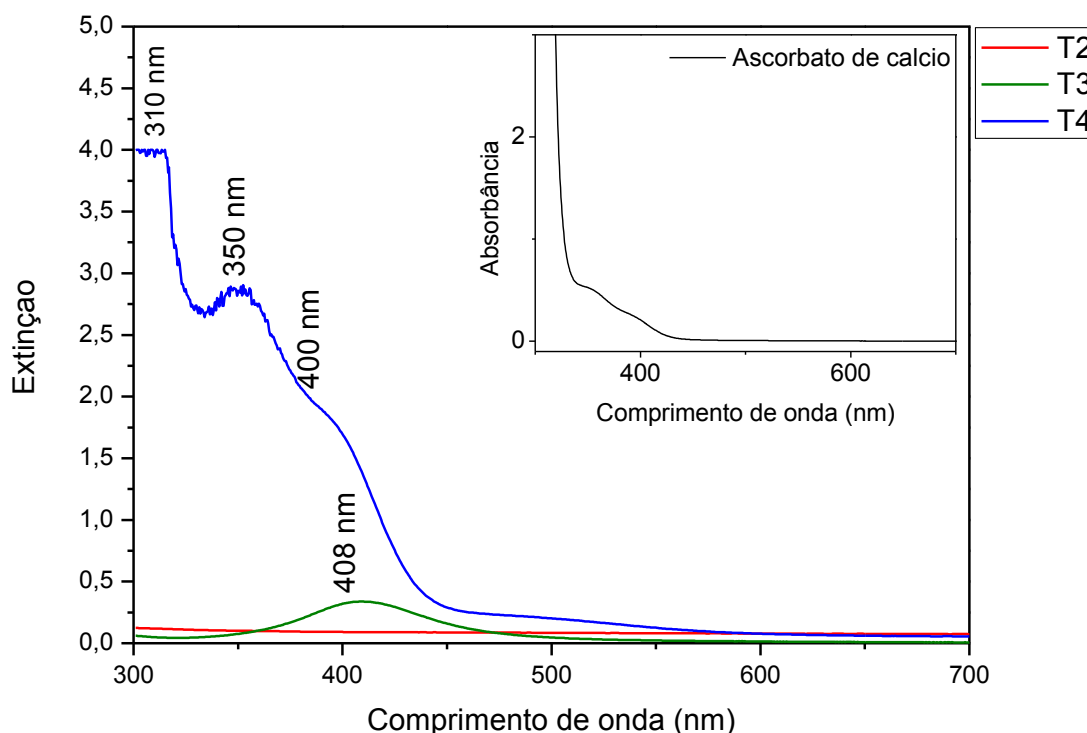
No espectro de extinção na região do UV-Vis do filme T1, observou-se a ausência de picos na região de 300 a 700 nm (Figura 38).

Figura 37 – Curva referente ao espectro de extinção na região do UV-Vis do filme T1.



Na análise da espectroscopia na região do UV-Vis dos filmes T2, não foi observados picos de extinção na faixa de comprimento de onda de 300 a 700 nm (Figura 39), o que era de se esperar, uma vez que este filme não contém prata. Para o filme T3 observa-se padrão semelhante ao espectro da solução de NPsAg, com o aparecimento de um pico em 408 nm, o que sugere a presença das mesmas no filme. O pequeno deslocamento do máximo de absorção de 8 nm para direita possivelmente é provocado pela interação polímero-NPsAg, que pode gerar mudança na banda de plasmon ou pela alteração do tamanho, mostrando que possivelmente as NPsAg associadas ao polímero apresentaram um maior tamanho que as nanopartículas livres. Berni Neto (2010) em sua pesquisa sobre desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo NPsAg para aplicações bactericidas também obteve um deslocamento do pico para maior comprimento de onda, em formulações de NPsAg recobertas com polivinil álcool (PVA) e quitosana (QS), em relação a solução que continha somente NPsAg.

Figura 38 – Curvas referentes aos espectros de extinção na região do UV-Vis dos filmes T2, T3, T4 e da solução aquosa de ascorbato de cálcio (*insert*).



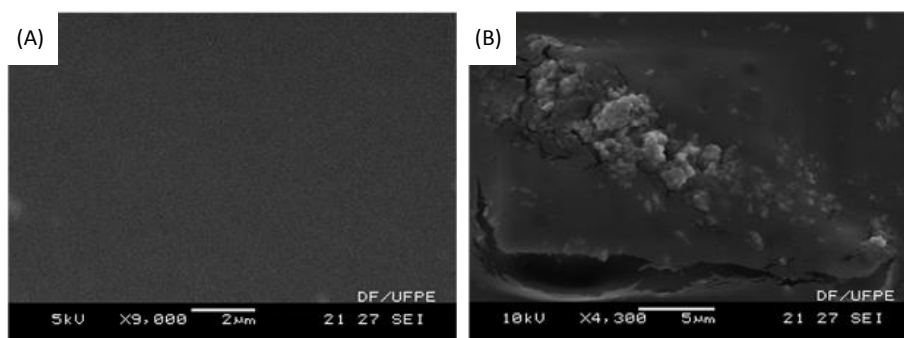
O filme de T4 apresentou um espectro com um pico em torno de 350 nm, com um ombro situado em 400 nm, o que indica a presença das NPsAg no filme (Figura 39). Além disso, a banda mostrou-se alargada. Este alargamento pode ser evidência do aumento da dispersão de tamanho das partículas. Estas alterações foram geradas pela presença do ascorbato de cálcio.

Foi observado outro pico, em 310 nm, mostrando a presença do ascorbato de cálcio, o que torna-se mais evidente através da comparação do espectro de absorção do mesmo (*inset* da Figura 39), que apresenta um pico máximo em torno de 310 nm. O ascorbato de cálcio, além de agente redutor fraco utilizado na síntese de NPsAg é um potente antioxidante e atua como cofator na síntese de colágeno (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007), podendo vir a auxiliar na ação estimulante de regeneração tecidual do filme, sendo um ponto importante no que diz respeito à sua aplicação.

5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens adquiridas a partir da técnica de MEV do filme T0 permitiram a observação de regiões de ágar sem impurezas se alternando com regiões do filme onde foram encontradas impurezas, conforme observado na Figura 40.

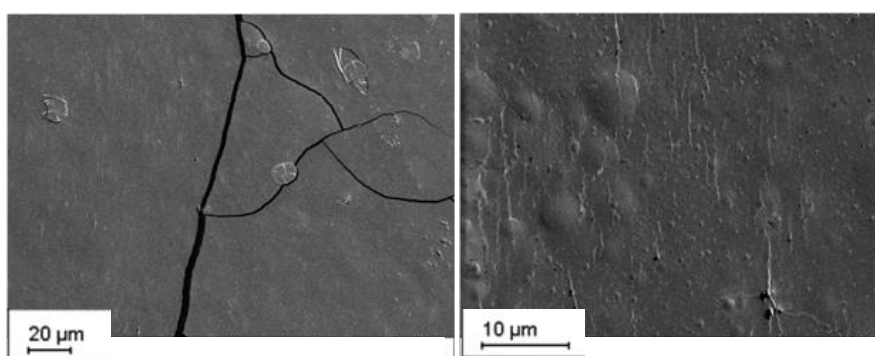
Figura 39 – Imagens de MEV do filme T0 com aumentos de 9000X e 4300X respectivamente, mostrando (A) região de ágar sem impurezas (B) região de ágar com impurezas.



Após os resultados destas análises preliminares, observou-se a necessidade de utilização de uma matéria prima mais pura. Por isso decidiu-se adotar a agarose para a elaboração dos filmes, por se tratar de uma fração do ágar livre de sulfato, e que sofreu maiores processos industriais de purificação em relação ao ágar bacteriológico, sendo considerado um polímero neutro (MOREIRA, 2000).

A microestrutura analisada por MEV dos filmes T1 estão apresentadas nas Figuras 41 e dos filmes T2, T3 e T4 na Figura 42.

Figura 40 – Imagens de MEV do filme T1 com aumentos de 604X e 2490X respectivamente.



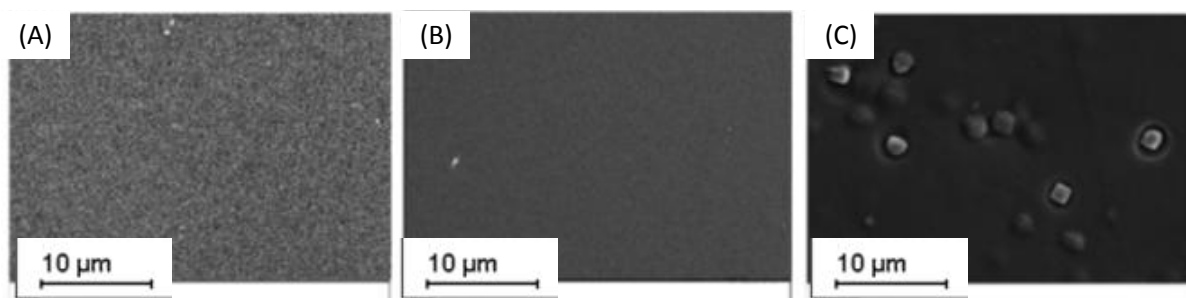
O filme T1 apresentou superfície não homogênea e com rachaduras. A falta de homogeneidade do filme pode ser resultado de impurezas presentes no polímero, e a presença de rachaduras pode ser devido a sua formulação. Piermaria et al. (2009) produziu filmes de kefirana plastificados com glicerol, a partir de um método diferente do utilizado neste

trabalho, observando uma superfície lisa e compacta. Entretanto, Ghasemlou et al. (2011), utilizando o mesmo método de Piermaria et al. (2009), obteve filmes de kefirana plastificados com glicerol, sem apresentar rachaduras mas com pequenas variações estruturais na sua superfície, em relação ao filme de kefirana sem plastificante, que apresentou estrutura homogênea.

Já os filmes de agarose T2 e T3 apresentaram estrutura homogênea, com morfologia de superfície uniforme, sem ocorrência de separação de fases. A adição de NPsAg não promoveu diferenças estruturais nos filmes. Rhim, Wang, Hong (2013) produziram filmes de ágar com NPsAg, encontrando superfície lisa.

Nas imagens de MEV do filme T4 foram observadas estruturas com aspecto cristalino, que são atribuídas ao ascorbato de cálcio, que cristalizou após o processo de secagem dos filmes.

Figura 41 – Imagens de MEV de superfície de filmes de agarose (A) T2, com aumento de 1700X (B) T3, com aumento de 1730X (C) T4, com aumento de 1710X, respectivamente.



5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier

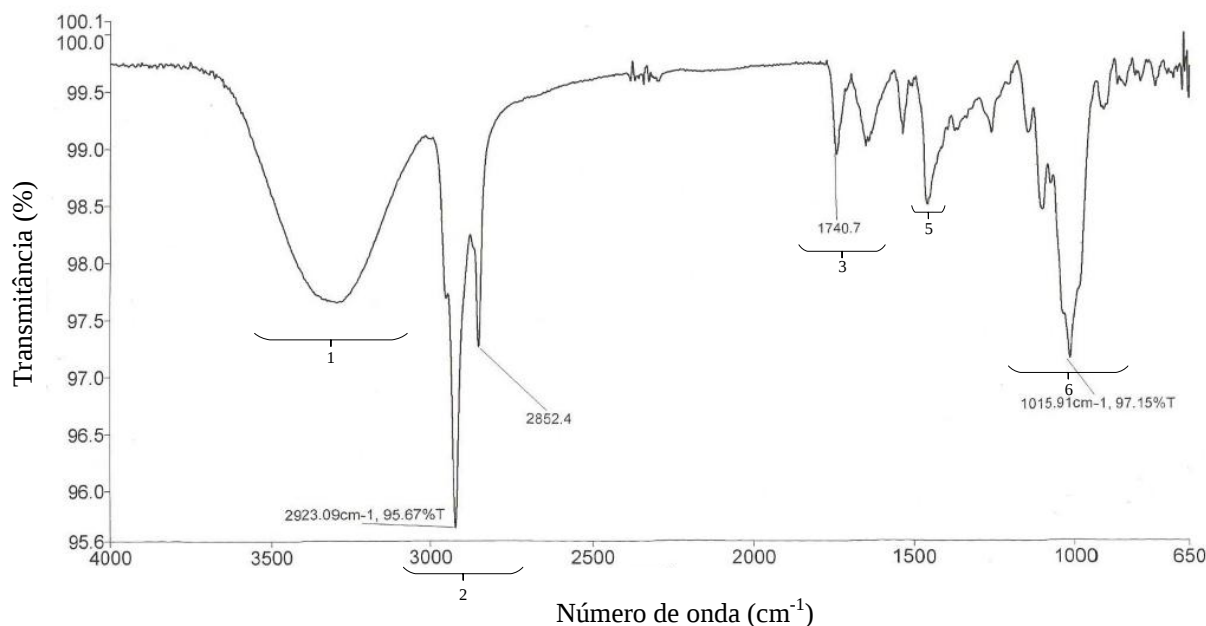
Os espectros na região do infravermelho dos filmes T1 (Figura 43), T2 (Figura 44), T3 (Figura 45) e T4 (Figura 46) apresentaram bandas situadas em basicamente seis regiões do espectro (Tabela 4). As bandas localizadas em 3250, 3275, 3272 e 3300 cm^{-1} nos filmes T1, T2, T3 e T4 respectivamente são atribuídas à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H) dos polímeros. As bandas localizadas em 2923 e 2852 cm^{-1} no filme T1, 2938 e 2883 cm^{-1} no filme T2, 2938 e 2884 cm^{-1} no filme T3 e 2927 cm^{-1} no filme T4 referem-se à deformação axial simétrica e assimétrica de C-H em grupos funcionais metileno (CH_2).

As bandas presentes em 1740, 1700, 1645 e 1700 cm^{-1} nos filmes T1, T2, T3 e T4 respectivamente são atribuídas ao modo de deformação angular de O-H em moléculas de

água. A banda em 1600 cm^{-1} presente apenas no espectro do filme T4 é conferida a deformação axial de grupo $\text{C}=\text{C}$ presente na molécula do ascorbato de cálcio.

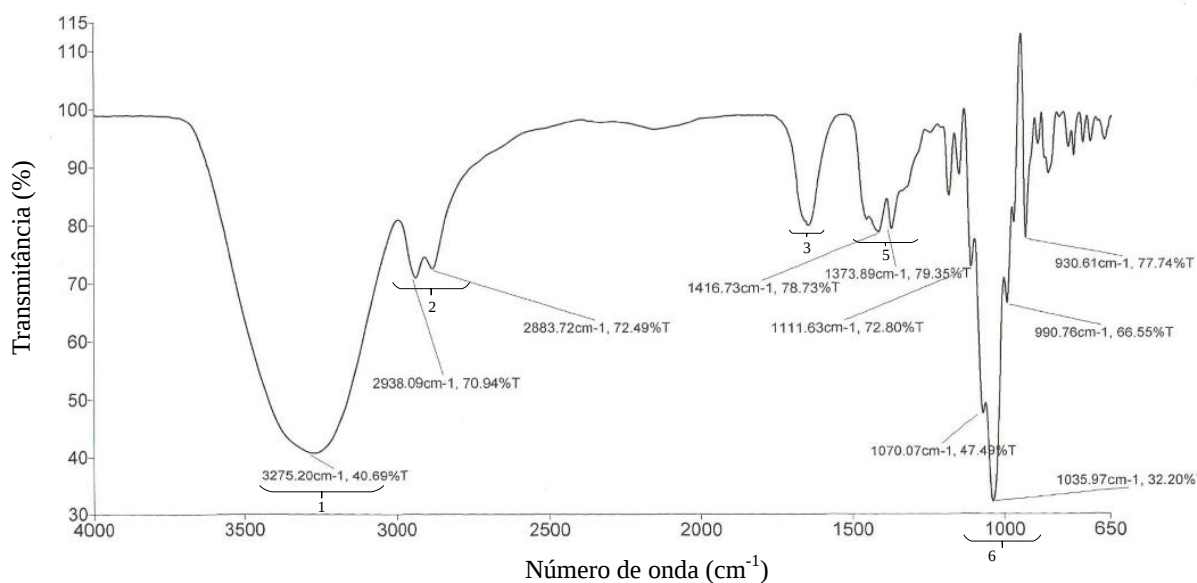
As bandas localizadas em 1490 , 1416 , 1417 e 1300 cm^{-1} nos filmes T1, T2, T3 e T4 respectivamente refere-se a deformação angular de C-H em grupos funcionais metileno (CH_2). Por fim, as bandas centradas em 1015 cm^{-1} no filme T1, 1036 cm^{-1} no filme T2, 1037 cm^{-1} no filme T3 e 1042 cm^{-1} no filme T4 referem-se à deformação angular de C-O-C dos anéis dos carboidratos presentes na estrutura dos polímeros, e aos grupamentos laterais C-OH e C-H .

Figura 42 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T1.



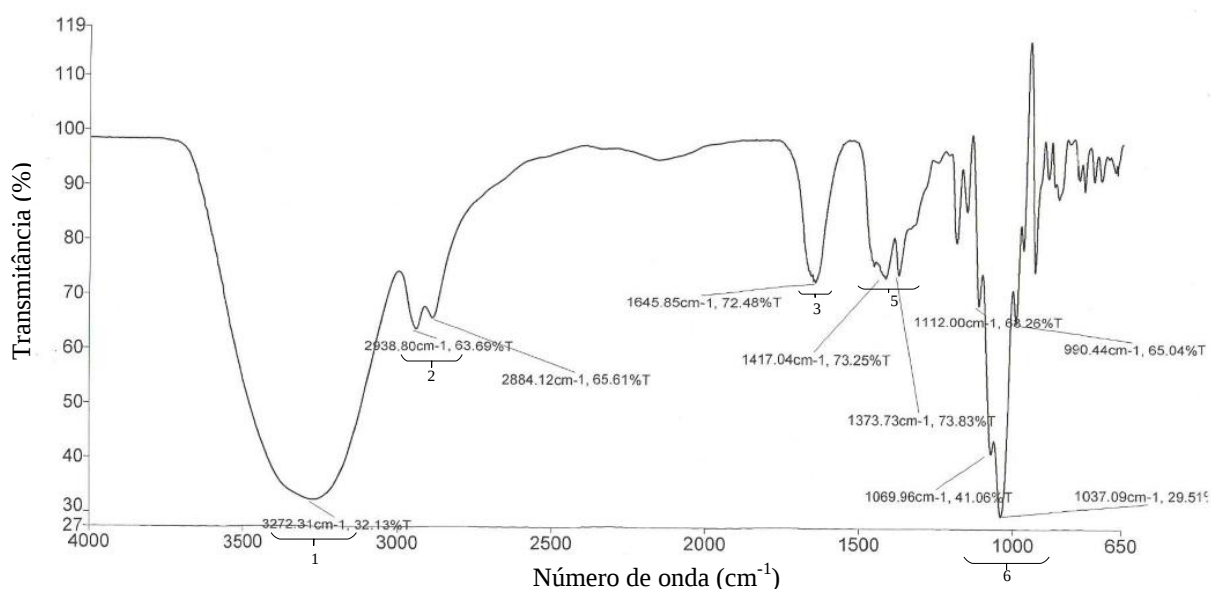
1: região referente a $3450 - 3260\text{ cm}^{-1}$; 2: região referente a $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$; 3: região referente a $1740 - 1600\text{ cm}^{-1}$; 5: região referente a $1500 - 1250\text{ cm}^{-1}$; 6: região referente a $1250 - 1000\text{ cm}^{-1}$.

Figura 43 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T2.



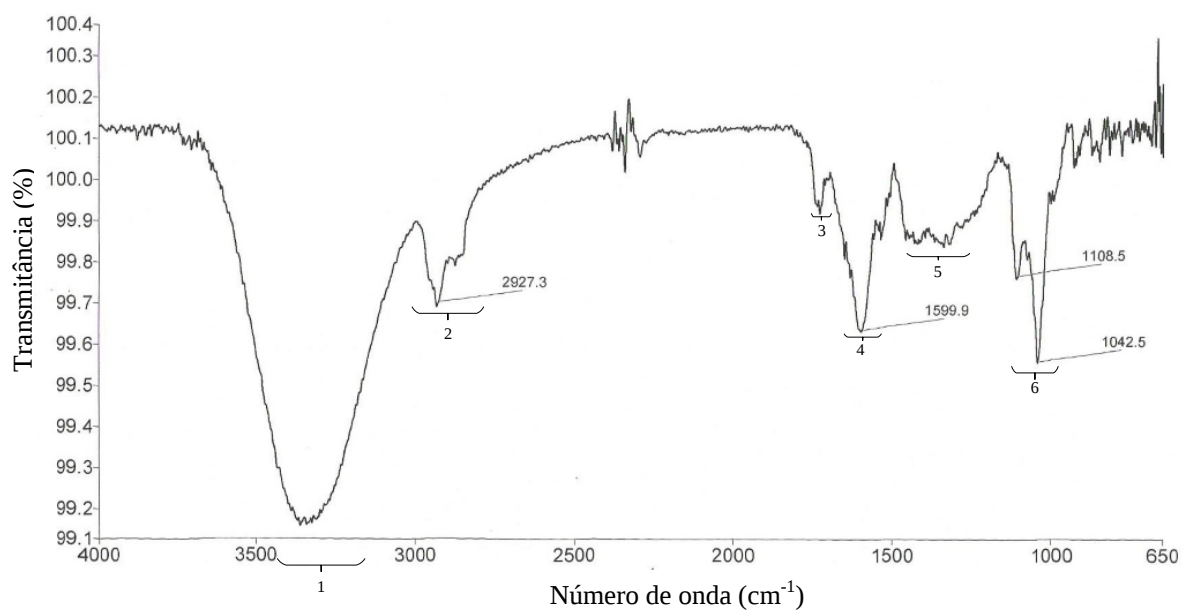
1: região referente a 3450 – 3260 cm^{-1} ; 2: região referente a 3000 – 2800 cm^{-1} ; 3: região referente a 1740 – 1600 cm^{-1} ; 5: região referente a 1500 – 1250 cm^{-1} ; 6: região referente a 1250 – 1000 cm^{-1} .

Figura 44 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T3.



1: região referente a 3450 – 3260 cm^{-1} ; 2: região referente a 3000 – 2800 cm^{-1} ; 3: região referente a 1740 – 1600 cm^{-1} ; 5: região referente a 1500 – 1250 cm^{-1} ; 6: região referente a 1250 – 1000 cm^{-1} .

Figura 45 – Gráfico referente ao espectro de FTIR do filme T4.



1: região referente a 3450 – 3260 cm^{-1} ; 2: região referente a 3000 – 2800 cm^{-1} ; 3: região referente a 1740 – 1600 cm^{-1} ; 4: região referente a 1600 cm^{-1} ; 5: região referente a 1500 – 1250 cm^{-1} ; 6: região referente a 1250 – 1000 cm^{-1} .

Tabela 4 – Regiões dos espectros FTIR e grupos funcionais associados

Região	Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Referência ¹
1	3450 – 3260	Deformação axial de hidroxila (O-H)	(1), (2), (4), (5), (7), (10), (11), (12), (13)
2	3000 – 2800	Deformação axial de CH ₂	(1), (2), (4), (5), (6), (7), (8), (10), (11), (12), (13)
3	1740 – 1600	Deformação angular de hidroxila (O-H)	(3), (5), (10)
4	1600	Deformação axial de C=C	(3), (11), (13)
5	1500 – 1250	Deformação angular de CH ₂	(7), (12), (13)
6	1250 – 1000	Deformação angular de C-O-C dos anéis de carboidratos e grupos laterais C-OH e C-H	(3), (6), (7), (10)

¹ (1) Berni Neto; Ribeiro; Zucolotto, 2008; (2) Berni Neto, 2010; (3) Cruz, 2010; (4) Garcia; Vidal, 2000; (5) Ghasemlou et al., 2011; (6) Goto, 2011; (7) Moreira et al., 2008; (8) Oliveira, 2010; 2012; (10) Piermaria et al., 2011; (11) Reis, 2011; (12) Wang; Bi, 2008; (13) Silverstein; Webster; Kiemle, 2012.

Garcia e Vidal (2000), em seu trabalho sobre preparação e caracterização estrutural de O-acetil agarose com baixo grau de substituição atribuiu duas bandas principais a agarose: em 3395 cm⁻¹, referente a deformação axial de O-H e em 2904, referente a deformação axial de C-H. De acordo com Moreira et al. (2008), bandas nas regiões 2 e 5, referentes a deformação axial e angular de C-H respectivamente, caracterizam a natureza alifática da substância. Segundo Wang e Bi (2008) polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxila, exibindo uma ampla banda em 3000 cm⁻¹.

A banda referente a essa região apresentou-se intensa e alargada nos espectros de todos os filmes, indicando que as substâncias estudadas tratam-se de polissacarídeos. Além

disso, a presença de hidratos de carbono está associada a região em 1250 e 1000 cm^{-1} , tratando-se da região de impressão digital (região abaixo de 1500 cm^{-1}) (WANG; BI, 2008), sendo que todas as amostras estudadas apresentaram banda forte nesta região, sugerindo mais uma vez que as substâncias são polissacarídeos. Os resultados encontrados estão de acordo com dados de outros trabalhos descritos na literatura, referentes à kefirana, agarose e outros polissacarídeos, como apresentados na tabela 4.

5.5.4 Espessura

Os filmes desenvolvidos apresentaram variações de espessura entre 0,025 e 0,096 mm (Tabela 5). Os filmes T2 e T3 apresentaram-se mais finos (0,025 mm), diferindo do filme de kefirana (T1) (0,096 mm). A espessura dos filmes variou em função da composição, quando comparados os filmes de kefirana - T1, e os demais, produzidos com agarose - T2, T3 e T4 ($p < 0,05$). Ao comparar os tratamentos dos filmes com mesma composição (agarose), não houve diferença em relação aos filmes T2 e T3 ($p > 0,05$), mas houve diferença na comparação entre os filmes T2 e T4 ($p < 0,05$), indicando que a adição do ascorbato de cálcio alterou esta propriedade.

Tabela 5 – Resultados da espessura dos filmes de kefirana e agarose.

FILME	ESPESSURA (mm)
T1	$0,096 \pm 0,008^a$
T2	$0,025 \pm 0,006^c$
T3	$0,025 \pm 0,003^c$
T4	$0,058 \pm 0,002^b$

Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ghasemlou et al. (2011) produziu filmes comestíveis de kefirana com espessura variando entre 0,058 e 0,067 mm. Já os filmes de kefirana produzidos por Piermaria et al. (2009) foram ainda mais finos (0,018 – 0,021 mm). Rhim, Wang e Hong (2013) desenvolveram filmes de agarose, variando entre 0,055 a 0,061 mm, sendo que a adição de NpsAg não alterou a espessura dos mesmos.

Segundo Pires; Moraes (2012), substitutos de pele são geralmente mais finos do que a derme humana, cuja espessura varia de 0,5 mm a 2 mm, dependendo da idade, gênero e área do corpo. Sendo assim, considerando este aspecto, os filmes preparados neste trabalho possuem potencial para serem utilizados como curativos cutâneos.

5.5.5 Transparência

Em relação à transparência, todos os filmes apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as formulações ($p < 0,05$) (Tabela 6). O filme formulado com kefirana (T1) apresentou menor transparência. Os filmes T2 e T3 apresentaram elevada transparência. A adição das NPsAg sintetizadas com ascorbato de cálcio levou a diminuição da transparência do filme T4 em relação aos outros filmes de agarose. A transparência do filme T1 foi um pouco superior a encontrada no filme de kefirana produzido por Piermaria et al (2009) onde esse valor foi de 2,71.

Tabela 6 – Transparência dos filmes de kefirana e agarose

	TRANSPARÊNCIA
T1	3,68 ^d
T2	44,32 ^a
T3	35,85 ^b
T4	4,01 ^c

Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Rhim; Wang; Hong (2013), em seu estudo sobre preparação e caracterização de filmes compósitos de ágar/nanopartículas de prata com atividade antimicrobiana, apresentaram filmes de ágar com elevada transparência (sem cor aparente) e diminuição da transparência dos filmes com o aumento da concentração de NPsAg. Almeida (2010) produziu filmes de celulose transparentes enquanto que os filmes adicionados de NPsAg apresentaram coloração escura.

5.5.6 Teor de umidade

A tabela 7 apresenta os resultados de teor de umidade, referentes à caracterização físico-química dos filmes.

Tabela 7 – Teor de umidade dos filmes de kefirana e agarose.

	TEOR DE UMIDADE (%)
T1	16,91 ± 0,520 ^c
T2	29,84 ± 0,784 ^a
T3	28,92 ± 0,007 ^a
T4	22,65 ± 0,325 ^b

Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

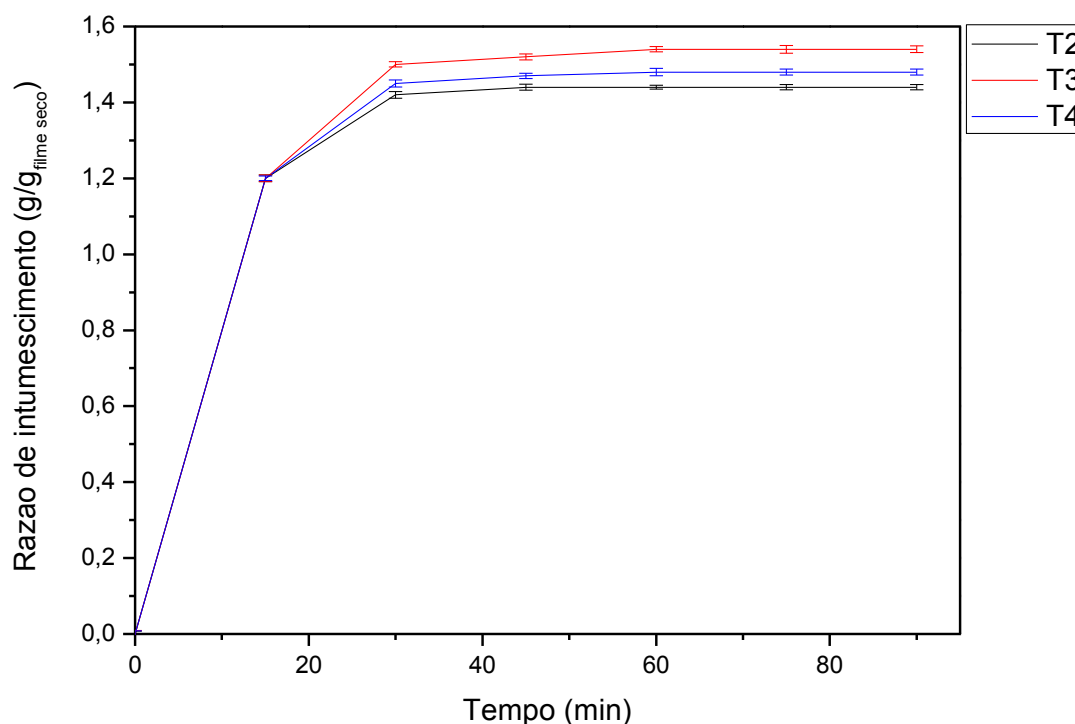
Ao comparar estatisticamente o teor de umidade dos filmes T2 e T3, observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Já o T2 em relação aos demais, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). O filme T4 exibiu menor umidade.

Piermaria et al. (2009), desenvolvendo filmes de kefirana, encontrou valores de umidade variando de 14,76% a 36,39%. Ghasemlou et al. (2011), também trabalhando com filmes de kefirana encontrou o teor de umidade variando entre 17,95% e 37,04%. Foi referido pelos autores que o aumento progressivo no teor de umidade foi devido ao aumento da concentração do agente plastificante, que atuou como agente de retenção de água. Ferreira (2005) encontrou 22% de umidade contida em filme polimérico obtido a partir de cinza de casca de arroz.

5.5.7 Absorção de água

Os filmes de agarose mantiveram sua integridade na presença de água. Já os filmes de kefirana se desintegraram nos primeiros minutos do teste e por este motivo não foi possível acompanhar a razão de intumescimento. Por isso também este filme não foi utilizado nos ensaios subsequentes. A razão de intumescimento, referente ao teste de absorção de água dos filmes de agarose se mostrou semelhante para os três tratamentos T2, T3 e T4 ($p > 0,05$) (Figura 47).

Figura 46 – Razão de intumescimento dos filmes de agarose



O ensaio de intumescimento revelou que os filmes de agarose absorvem grande quantidade de água nos primeiros 30 minutos, atingindo o equilíbrio de intumescimento após 1 hora. Oliveira, Thiré e Soares (2012) produziram filmes de PVA-Ag, que mostraram equilíbrio de intumescimento também após 1 hora. A razão de intumescimento ao final da avaliação dos filmes de alginato de sódio produzidos por Lima; Adreani; Soldi (2007) foi de 2,5 g/g_{filme seco}. De acordo com Oliveira, Thiré e Soares (2012), este padrão de intumescimento pode ser considerado ponto positivo em filmes candidatos a substitutos temporários de pele, uma vez que manteriam o local da lesão úmido.

5.5.8 Resistência à tração

Os dados dos ensaios de resistência à tração (tabela 8) foram obtidos a partir de gráficos de tensão x deformação.

Tabela 8 – Tensão de ruptura e deformação na ruptura dos filmes.

	TENSÃO DE RUPTURA (MPa)	DEFORMAÇÃO NA RUPTURA (%)
T2	40,4 ± 7,5 ^b	33,7 ± 11,4 ^a
T3	51,4 ± 2,5 ^a	37,8 ± 4,7 ^a
T4	22,0 ± 1,5 ^c	37,3 ± 9,3 ^a

Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação à tensão de ruptura, todos os filmes testados apresentaram-se diferentes entre si. O filme T3 apresentou maior tensão de ruptura ($51,4 \pm 2,5$ MPa), indicando que a presença das NPsA, atuaram aumentando significativamente a tensão suportada por este. O filme com menor tensão de ruptura foi T4 ($22,0 \pm 1,5$ MPa).

Rhim, Wang e Hong (2013) prepararam filmes compósitos de ágar com NPsAg, plastificados com glicerol. Os valores de tensão de ruptura foram $46,38 \pm 2,0$ MPa para filmes sem NPsAg, $34,17 \pm 2,36$ MPa para filmes contendo 0,2% de NPsAg e $53,44 \pm 3,35$ MPa para filmes com 2% de NPsAg. Apesar da diminuição na tensão de ruptura para o filme com menor quantidade de NPsAg, esta não foi considerada significativa; já para o filme com maior quantidade de NPsAg houve aumento significativo, sendo este aumento atribuído principalmente a atração física entre os componentes.

Em relação da deformação na ruptura, os filmes não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Souza (2008) produziu filmes de ágar, sem adição de plastificantes, para fins de embalagens biodegradáveis, encontrando tensão de ruptura de $65,4 \pm 10,3$ MPa e deformação de $1,63 \pm 0,55$. Devido a sua pequena deformação na ruptura, seus filmes foram considerados quebradiços, sendo que a adição de agentes plastificantes pode melhorar este parâmetro. Já o valor de tensão na ruptura foi indicativo de um filme resistente.

Mbhele et al. (2003) observaram que a matriz de PVA com incorporação de NPsAg resultou em um aumento da resistência mecânica do polímero, de forma semelhante a partículas de reforço em compósitos estruturais.

A formação de filmes poliméricos demanda, na maioria dos casos, a presença de um agente plastificante, pois sem ele, os filmes mostram-se duros e quebradiços (PINHEIRO et al. 2010). De acordo com Mali, Grossimann, Yamashita (2010), os plastificantes reduzem as

forças intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias dos polímeros. Com isso ocorre aumento da flexibilidade, melhorando suas propriedades mecânicas e facilitando seu manuseio (LIMA, ADREANI, SOLDI, 2007; MALI, GROSSIMANN, YAMASHITA, 2010; PINHEIRO et al., 2010).

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

No teste de difusão em disco não foi observada a formação de halos de inibição contra nenhum dos micro-organismos testados. O provável motivo pelo qual não se observou halos de inibição no teste realizado é a dificuldade de difusão das NpsAg, impregnadas no filme, no meio de cultura sólido. Ruparelia et al. (2008) cita que o efeito bactericida de NPsAg parece ser significativamente maior nos ensaios com nanopartículas dispersas em comparação com ensaios de difusão em disco.

Por este motivo, o teste de avaliação da atividade antimicrobiana foi novamente realizado, utilizando uma técnica alternativa – teste de difusão em meio líquido, para que esta dificuldade de difusão não tivesse influencia no resultado final do experimento.

A partir do padrão de turvação dos tubos, comparados com os controles positivo e negativo, observou-se que o filme T4 apresentou atividade apenas contra *S. aureus* (Figura 48). Os demais micro-organismos não foram inibidos pelo T4. Os filmes referentes aos T2 e T3 não apresentaram atividade contra os micro-organismos testados. A ausência de ação antimicrobiana do filme T2 era esperada, tendo em vista que o mesmo não contém princípio ativo. Foi observada uma mudança de coloração dos meios de cultura que continham T4. Kong e Jang (2008) constataram a mudança de cor, do amarelo para o marrom, da solução contendo imersa uma fibra de polímero com prata, relacionando esta mudança com a contínua liberação de NPsAg para a salina.

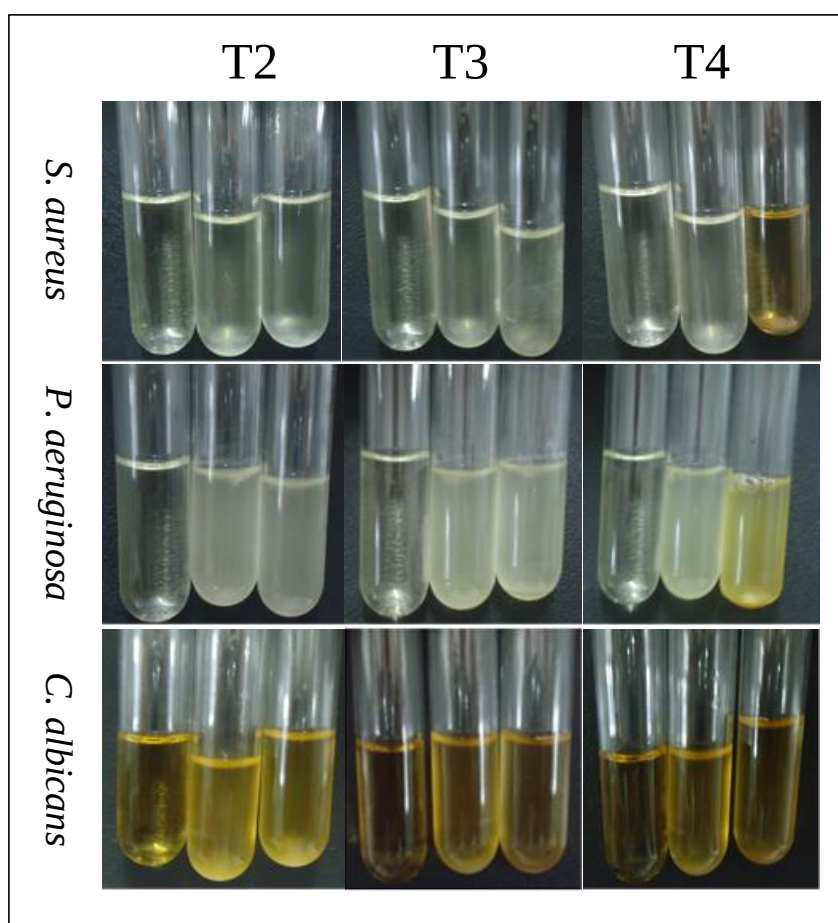
Damm, Munstedt, Rosch (2008) investigaram a ação antibacteriana de partículas de prata em tamanhos nano e micrométricos em compósitos de poliamida 6 frente a *E. coli*, verificando que ambas apresentam atividade antimicrobiana, tendo as partículas nanométrica, em torno de 20 nm, uma maior eficiência, em relação as partículas micrométricas de 1 a 10 μm .

Martínez-Castañón et al. (2008) compararam a ação antimicrobiana de NPsAg de diferentes tamanhos. As nanopartículas com cerca de 29 nm apresentaram maior atividade em relação a partículas menores, de cerca de 7 nm e maior eficiência em relação a nanopartículas maiores, em torno de 89 nm, concluindo que nanopartículas menores que 89 nm e maiores

que 7 nm apresentaram melhor ação antimicrobiana, evidenciando a dependência do tamanho das nanopartículas na interação com bactérias. Isso pode vir a explicar a ausência de atividade antimicrobiana dos filmes contendo NPsAg sintetizadas sem ascorbato de cálcio, que apresentaram tamanho em torno de 6,5 nm.

Uma outra hipótese para a ação antimicrobiana do filme T4 seria o alto índice de solubilidade do ascorbato de cálcio, o que promoveria uma melhor liberação das partículas no meio, aumentando a disponibilidade do composto ativo.

Figura 47 – Resultados da comparação do padrão de turvação dos tubos no teste de atividade antimicrobiana dos filmes:



A partir deste dado, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} para o controle e 10^{-3} para o tubo referente ao T4. Estas diluições foram semeadas em rede (Figura 49) e por escorrimento em placas (PRATES et al., 2010) (Figura 50).

Figura 48 – Resultados dos semeios em rede no teste de atividade antimicrobiana dos filmes.

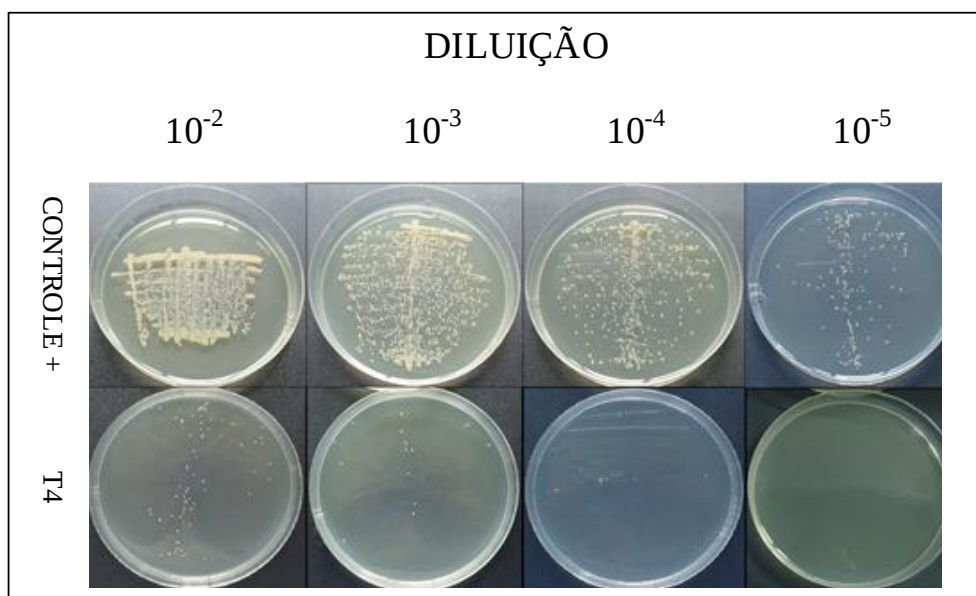
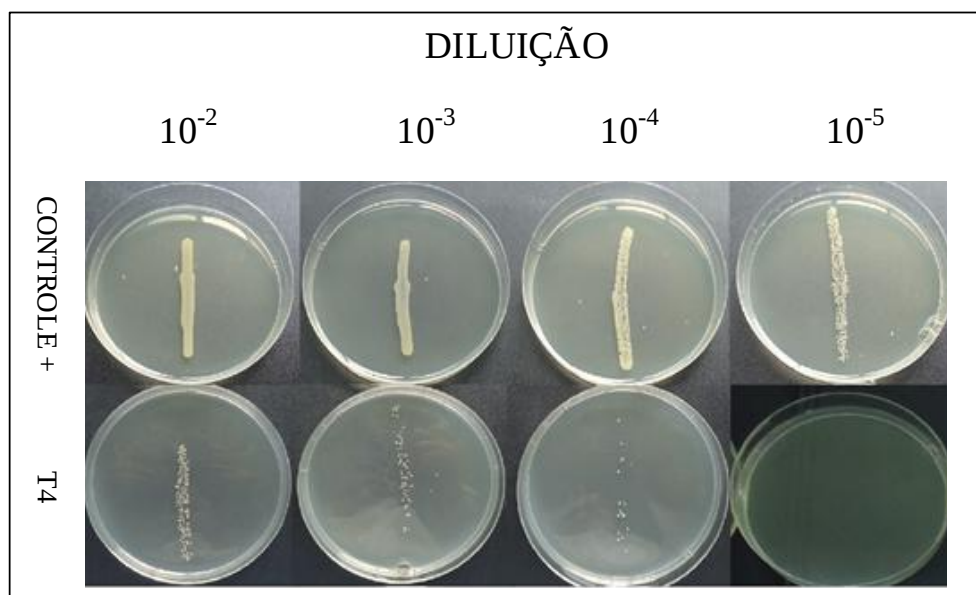


Figura 49 – Resultados dos semeios em por escorrimento em placa (PRATES et al., 2010) no teste de atividade antimicrobiana dos filmes.



Os resultados mostraram que houve inibição do crescimento de *S. aureus*, que é uma bactéria encontrada na pele e mucosas de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar graves infecções em indivíduos com imunidade comprometida, incluindo pacientes queimados, sendo um importante patógeno. É responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade, possuindo ainda alta capacidade de adquirir resistência a antibióticos, o que a

torna uma das espécies mais relevantes no quadro de infecções hospitalares (SANTOS et al., 2007; LEITE, 2008).

Muitos autores relatam ação de NPsAg contra *S. aureus* (LEE; YEO; JEONG, 2003; RUPARELIA et al., 2008; CARREIRA, 2009; CARREIRA et al., 2009; ANTUNES et al., 2013). Yoon et al. (2007), Ruparelia et al. (2008), Carreira et al. (2009) e Antunes et al. (2013) também encontraram uma melhor ação de NPsAg frente a bactérias Gram positivas, associando este fato a complexidade da parede celular de Gram negativas, que podem promover uma barreira contra as nanopartículas.

De acordo com Brayner et al. (2006), Murray; Rosenthal; Pfaller (2006), Carreira (2009) e Brooks et al. (2012), a parede celular de bactérias Gram negativas é mais complexa do que as das Gram positivas. Estruturalmente, as bactérias Gram negativas apresentam parede celular caracterizada pela presença de uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa, composta por lipoproteínas e lipopolissacarídeos. Segundo Brooks et al. (2012), as moléculas de antibióticos penetram lentamente através da membrana externa, o que contribui para a resistência relativamente alta de bactérias Gram negativas a antibióticos.

6 CONCLUSÕES

A partir de produção em batelada, utilizando-se açúcar cristal nas três últimas repicagens, obtiveram-se grãos de kefir de coloração branca, a partir dos quais foi extraída a kefirana. Desenvolveu-se ainda uma nova forma de extração da kefirana, utilizando-se uma solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH. Realizou-se ainda síntese de NPsAg por diferentes métodos, sendo a formação das partículas comprovada a partir do espectro de absorção na região do UV-Vis.

Após a obtenção dos polímeros e a síntese das NPsAg, produziram-se filmes de ágar, agarose e kefirana usando o sistema de “casting” e incorporou-se NPsAg nos filmes de ágar e agarose. A presença das NPsAg e do ascorbato de cálcio nestes filmes foi demonstrada após análises de espectroscopia nas regiões do UV-Vis e Infravermelho.

Observou-se que esta incorporação de NPsAg nos filmes poliméricos de agarose resultou em um aumento da resistência mecânica quando utiliza-se apenas o NaBH_4 . Quando utilizou-se adicionalmente o ascorbato de cálcio a resistência mecânica dos filmes diminuiu, porém esse incremento tornou os filmes mais ativos frente ao *S. aureus*.

Todos os filmes produzidos se mostraram macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis, porém o filme de ágar apresentou regiões de impurezas, quando avaliado através de MEV. O filme de kefirana apresentou menor espessura; os filmes de agarose e agarose + NPsAg apresentaram elevada transparência. Entretanto, dentre os filmes produzidos, o mais compatível com a aplicação proposta foi o filme de agarose + NPsAg + ascorbato de cálcio, por apresentar boas características de espessura, teor de umidade, absorção de água e uma melhor atividade antimicrobiana.

6 PERSPECTIVAS

Pretende-se elucidar a estrutura química da kefirana e ampliar os rendimentos na obtenção do polímero e adicionalmente a sua resistência à água, além de incorporar NPsAg aos filmes de kefirana.

Objetiva-se realizar análise de Ressonância Magnética Nuclear dos filmes produzidos e a Microscopia Eletrônica de Transmissão das NPsAg e dos filmes, a fim de confirmar a estrutura do filme e o tamanho das partículas.

7 REFERÊNCIAS

- ADRIÃO, R. J. B. **Biomateriais e reações de hipersensibilidade - um problema ortopédico?** 43 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.
- ALISTE, A. J. **Uso de substâncias antioxidantes na resposta a radiação dos hidrocolóides carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia.** 90 p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2006.
- ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. **J. of Dairy Science**, v.65, p.346 - 353, 1982.
- ALMEIDA, G. W. R. **Desenvolvimento e caracterização de filmes nanocompósitos de base celulósica e sua avaliação como embalagem ativa antimicrobiana.** 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- ALQUINI, G. **Caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação e cultivo submerso de *Agaricus bisporus*.** 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.
- ANDRADE, J. E. **Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH.** 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Núcleo de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2008.
- ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v.9, n.1, p.20-26, 2013.
- ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRIGUEZ-MONTESINOS, T. E.; MURILLO-ÁLVAREZ, J. I.; MUÑOZ-UCHOA, M.; HERNÁNDEZ-CARONA, G. Effect of alkali treatment time and extraction time on Ágar from *Glacilaria vermiculophylla*. **Journal of Applied Physiology**, v.20, p.515-519. 2007.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2.3, p. 27-34. 2007.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, 2005.
- BAUER, A. W. KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol.**, v. 45, p.493-496, 1966.

- BERGER, T. J.; SPADARO, J. A.; CHAPIN, S. E.; BECKER, R. O. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 9, p. 357. 1976.
- BERNI NETO, E. A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2010.
- BERNI NETO, E. A.; RIBEIRO, C. ZUCOLOTTI, V. **Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens**. São Carlos, EMBRAPA, 2008. (Comunicado Técnico 99).
- BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência e agrotecnologia**, v.31, n.1, p. 177-183, 2006.
- BIAN, F.; ZHANG, X.; WANG, Z. WU, Q. HU, H.; XU, J. Preparation and size characterization of silver nanoparticles produced by femtosecond laser ablation in water. **Chin. Phys. Lett.**, v.25, n.12. p.4463-4465, 2008.
- BINYAMIN, G.; SHAFI, B. M.; MERY, C. M. Biomaterials: a primer for surgeons. **Seminars in pediatric surgery**, v.15, p.276-283, 2006.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: Baptista-Silva JCC editor, 2004.
- BOLGIANI, A. N.; SERRA, M. C. V. F. Atualização no tratamento local das queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v.9, n.2, p.38-44, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.46, 23 de Outubro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília, 2007. 16p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Cartilha para tratamento de emergência das queimaduras**. Brasília, 2012. 17p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes**. Brasília, 2008. 93p.
- BRAYNER, R.; FERRARI-LLIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIÉVET, F. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. **Nano Lett.**, v.6, n.4, 2006.
- BRINGEL, F. A. **Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama: estudo em camundongos atímicos**. 122 p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; STEPHEN, A. M.; MIETZNER, T. A. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. **Artmed**. 25 Ed. Rio de Janeiro, 2012.
- CANDIAN, L. M. **Estudo do Polietileno de alta densidade reciclado para uso em elementos estruturais**. 153 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Estruturas) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de Kefir**. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- CARREIRA, C. M. **Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata**. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CARREIRA, C. M., PEREIRA, C. A. BOMBANA, A. C. JORGE, A. O. C. **Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias**. In XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, IX Encontro Latino Americano de Pós-graduação e III Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior. Trabalho apresentado. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.
- CARVALHO, G. B.; SILVA, F. A. A. S.; CASTRO, M. E.; FLORÊNCIO, R. S. Epidemiologia e riscos associados à úlceras por pressão em crianças. **Cogitare Enfermagem**, v.16, n.4, p.640-646, 2011.
- CARVALHO, N. C. **Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com Salmonella Typhimurium em camundongos**. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím. Nova**, v.30, n.2, 2007.
- CHRISEY, D. B.; PIQUÉ, A.; MCGIL, R. A.; HORWITZ, J. S. RINGEISEN, B. R. Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Films. **Chemical Reviews**, v.103, n.2, p.553-576, 2003.
- COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. F.; TENÓRIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.297-303, 1999.
- CONDE, L. M. S. **Polímeros naturais para aplicações Biomédicas**. 79p. Dissertação (Mestrado em Química). Área de Especialização em Química Medicinal. Escola de Ciências. Universidade do Minho, Braga, 2011.
- CORREA, D. R. N.; VICENTE, F. B. V.; GRANDINI, C. R. **Influência do tratamento térmico no módulo de elasticidade da liga Ti-10%pZr usado como biomaterial**.

Disponível em <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_37941133814.pdf> Acesso em: 12/ de setembro de 2013.

- COSTA, H.O.; SOUZA, F.C. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida à lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®. **ACTA ORL/ Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.23, p.23-27, 2005.
- CRUZ, D. S. M. G. **Biossíntese e caracterização de nanopartículas metálicas**. 80p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- CZAMANSKI, R. T. Valuation from antibacterial activity of artisan kefir filtered. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, n.2, p.143-144, 2003.
- DADALTI, P.; LOFEGO FILHO, J. A.; HURTADO, S.; LEIROS, M. A.; FRANCO, T. BOROJEVIC, R.; TAKYIA, C. M. Substitutos biológicos de pele. **Revista Brasileira de Medicina**, v.64, n.7, p. 306-313. 2007.
- DAMM, C.; MUNSTEDT; H.; ROSCH, A. The antimicrobial efficacy of polyamide6/silver-nano-and microcomposites. **Materials Chemistry and Physics**, v.108, p.61–66, 2008.
- DAVINI, R.; NUNES, C. V.; GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. R. J.; FASCINA, E.; OLIVEIRA, M.; POLLI, M.; GARCIA, M.; DOMINGUES, P. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. **Revista de Ciências Médicas**, v.14, n.3, p.249-258. 2005.
- DINIZ, R. O.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEENEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 19-21, 2003.
- DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; CONTI, R.; ALVES, O. L.; COSTA, F. T. M.; BROCCHI, M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **J. Braz. Chem. Soc**, v.21, n.6, p.949-959, 2010.
- EMMERICH, G. U. W.; MADISON, M. S. **Surface Plasmon resonance: technology overview and practical applications**. In: BIOTECHNOLOGY PROGRAM, EARLY DRUG DEVELOPMENT CLASS. 2012. Disponível em: <<http://gregemmerich.wordpress.com/2012/11/16/surface-plasmon-resonance-technology-overview-and-practical-applications/>> Acesso em: 20 de novembro de 2012.
- FERREIRA, C. S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir da cinza da casca de arroz**. 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.
- FERREIRA, E.; LUCAS, R. ROSSI, L. A.; ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Rev. Esc. Enferm.**, v.37, n.1, p.44-51, 2003.
- FONTES, A. M. **“Biotemplates” para automontagem de nanopartículas de ouro: buscando inspiração na natureza para sintetizar estruturas complexas**. 108p.

Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

- FRENGOVA, G. I., SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M.; SIMOV, Z. I., I. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. **Zeitschrift für Naturforschung**. v.57, p.805-810, 2002.
- GARCIA, R. B.; VIDAL, R. R. Preparation and Structural Characterization of O-Acetyl Agarose with Low Degree of Substitution. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.10, n.3, p.155-161, 2000.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.639-652, 2001.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 364-369, 2000.
- GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F. OROMIEHIE, A.; YARMAND, M. S. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. **Food Chemistry**, v.127, p.1496–1502. 2011.
- GIACOMELLI, P. **Kefir – alimento funcional natural**. Monografia (Graduação em Nutrição). Universidade de Guarulhos. Guarulhos, 2004.
- GIL, M. H.; FERREIRA, P. **Polissacarídeos como biomateriais**. 2006. Disponível em <http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_100_072_28.pdf> Acesso em: 12 de setembro de 2013.
- GONÇALVES, C. M. Substitutos Sintéticos da Pele. In: GOMES, D. R.; SERRA, M. C.; PELLON, M. A. **Queimaduras**. Livraria e Editora REVINTER Ltda. Disponível em: <<http://www.bibliomed.com.br/book>> Acesso em: 9 mai. 2013.
- GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização *in situ* a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases**. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.
- GUIDELLI, E. J. **Influência de nanoestruturas na resposta dosimétrica de compósitos particulados de alanina/ouro e alanina/prata**. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia, Departamento de Física, Universidade Federal de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- HELM, D. L.; ORGILL, B. D.; OGAWA, R.; ORGILL, D. P. Burn Dressings and Skin Substitutes. In: RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMINS, J. E. **Biomaterials Science, Third Edition: An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press. 1573p. 2012.
- HOSKINS, C. CHENG, W. P. Implementing Nanotechnology and Novel Drug Delivery Systems to Improve Dissolution and Solubilization. **American Pharmaceutical Review**. Disponível em: <<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured->

Articles/126889-Implementing-Nanotechnology-and-Novel-Drug-Delivery-Systems-to-Improve-Dissolution-and-Solubilization/> Acesso em: 18 de dezembro de 2012.

- KALIAPERUMAL, N.; UTHIRASIVAN, P. Commercial scale production of ágar from the red alga *Gracilaria edulis* (Gmelin) Suva. **Seaweed Res. Utiln**, v.23, p.55-58, 2001.
- KEATING, M.; CHEN, Y.; LARMOUR, I. A.; FAULDS, K.; GRAHAM, D. Growth and surface-enhanced Raman scattering of Ag nanoparticle assembly in agarose gel. **Meas. Sci. Technol**, v.23, 2012.
- KONG, H.; JANG, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. **Langmuir**, v.24, p.2051-2056, 2008.
- LA RIVIÈRE, J. W. M.; KOOIMAN, F. Kefiran, a Novel Polysaccharide Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. **Archiv für Mikrobiologie**, v.59, p.269-278, 1967.
- LEE, H. J.; YEO, S. Y.; JEONG, S. H. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. **Journal of Material Science**, v.38, p.2199-2204, 2003.
- LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v.86, p.3391-3395, 1982.
- LEITE, C. **Queimaduras**. Disponível em <<http://camillyleite.blogspot.com.br/2013/06/queimaduras.html> > Acesso em: 18 de outubro de 2013.
- LEITE, G. B. **Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília**. 101 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, 2008.
- LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v.30, n.4, p.832-837, 2007.
- LIMA, T. H. **Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata**. 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.
- LIU, J.R. ;CHEN, M.J; LIN, C.W. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53, p.2467-2474, 2005.
- MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefirifaciens* WT-2B^T. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, n.17, p.5533-5538, 2004.

- MALI, S.; GROSSIMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.1, p.137-156, 2010.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-410. 2003.
- MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **J Nanopart Res**, v.12, p.1531–1551, 2010.
- MARCIANO, F. R. **Estudo de crescimento de filmes de DLC com Nanopartículas de prata para aplicações espaciais e biomédicas**. 111 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores). Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. São José dos Campos, 2008.
- MARINHO, A. **Tecnologias Atuais para o Tratamento de Feridas: Hidrogel Hidrocolóide e Espuma com Prata**. Universidade Estadual do Rio de Janeiro. 2008. Disponível em: <<http://www.professorantoniozinho.com.br/resources/Tecnologias%20Atuais%20para%20o%20Tratamento%20de%20Feridas.pdf>> Acesso em: 15 de maio de 2014.
- MARK, J. E.; ALLCOCK, H. R.; WEST, R. Inorganic polymers. Second Edition. **Oxford University Press**, 2005.
- MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDONZA; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different size. **J Nanopart Res**, v.10, p.1343–1348, 2008.
- MARTINS, L. S. P. **Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentados pelos grãos de kefir e Fo Tibet utilizando técnicas voltamétricas, RP-HPLC**. 176p. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- MBHELE, Z. H. Fabrication and Characterization of Silver–Polyvinyl Alcohol Nanocomposites. **Chem. Mater**, v.15, n.26, p.5019–5024, 2003.
- McELHINNY, K.; EVERSAGE, J.; LISENSKY, G. **Synthesis of Silver Nanoprisms**. University of Wisconsin – Madison, Materials Research Science and Engineering Center. Disponível em: <<http://mrsec.wisc.edu/Edetc/nanolab/silver/index2.html>> Acesso em 20 de maio de 2011.
- MELO JR. M. A.; SANTOS, L. S. S.; GNÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro. Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v.XY, n.00, p. 1-7, 2012.
- MEYER, J. F. **Superfícies funcionais aplicados a biomateriais inteligentes**. 65 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica na Especialidade de Energia e

- Ambiente). Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
- MIGUEL, C. S. C. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas FeOx/Au/Ag em Multicamada Nucleo-concha**. 139p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada). Universidade da Madeira, Portugal, 2012.
- MONTEIRO, D. R. **Análise da incorporação de nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética**. 98 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2009.
- MOREIRA, M. E. C.; SANTOS, M. H.; PEREIRA, I. O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L. C. A.; SCHNEEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, v.31, p. 1738-1742, 2008.
- MOREIRA, M. F. P. **Secagem de gel ágar**. 125 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Elsevier, 5 Ed. Rio de Janeiro, 2006.
- OGUIDO, C. M. K.; SHIBATTA, L. S. Permeabilidade dos ativos na cosmetologia. In: CONGRESSO MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE. Londrina. **Anais...** Londrina: EdUnifil, p. 124 – 126, 2011.
- OLHAR NANO. **Estabilização de nanopartículas: o que é e qual sua finalidade?** Disponível em: <http://www.olharnano.com/artigos/4001/32001/Estabiliza%C3%A7%C3%A3o-de-nanopart%C3%ADculas:-o-que-%C3%A9-e-qual-sua-finalidade> Acesso em 18 de fevereiro de 2014.
- OLIVEIRA, G. K. F.; CARBONERO, E. R. **Determinação da estrutura química de uma β -glucana (1-3), (1-4) e (1-6) isolada do basidiomiceto *Pleurotus ostreatoroseus***. Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás. Disponível em: http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/GRACY_KE.PDF. Acesso em: 15 de janeiro de 2014.
- OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.
- OLIVEIRA, L. S. A. Biomateriais co-aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.
- OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. 147 p. Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

- OLIVEIRA, R. N.; THIRÉ, R. M.; SOARES, G. D. A. caracterização de um hidrogel nanocompósito PVA-prata para uso potencial como curativo. **7º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais**. Natal, 2012.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomaterias: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**. Child injuries and violence. Disponível em: <http://www.who.int/violence_injury_prevention/child/en/> Acesso em: 14 de maio de 2013b.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**. Facts about injuries: burn. Disponível em: <http://www.who.int/violence_injury_prevention/publications/other_injury/en/burns_factsheet.pdf>. Acesso em 14 de maio de 2013a.
- OSMAN, S. A., SOUZA, F. C.; DOLCI, J. E. Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos. *ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia*, v. 25, p.304-311, 2007.
- OUTUBO, L. **Química de nanoestruturas: funcionalização de nanopartículas metálicas e nanotubos de carbono**. 166 p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- PELCZAR, M., REID, R. CHAN, E. C. S. Microbiologia. I. São Paulo: **McGraw**, 1980.
- PIERMARIA, J. A.; BOSCH, A.; PINOTTI, A.; YANTORNO, O.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FTIR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, v.25, p.1261-1269, 2011.
- PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, v.23, p. 684–690, 2009.
- PINHEIRO, A. C.; PINHEIRO A. C.; CERQUEIRA M. A.; SOUZA B. W. S.; MARTINS J. T.; TEIXEIRA J. A.; VICENTE A. A. **Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares**. Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. Boletim de Biotecnologia, 2010.
- PINTO, B. G. G.; IKENOUE, F. A.; MIYAHARA, F. T. S. S.; SCARABEL, G. F.; CARVALHO, M. S. Kefir: Estudo da Produção. **IX Simpósio de Bases Experimentais das Ciências Naturais**. Universidade Federal do ABC , 2011.
- PINTO et al., Uso do curativo de biocelulose no tratamento de queimaduras de segundo grau superficial de face. *Revista Brasileira de Queimaduras*. São Paulo, v. 9, n. 4, 2010.
- PIRES, A. L. R., MORAES, A. M. Avaliação do efeito do ph e da temperatura de secagem nas características de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata. **7º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais**. Natal, 2012.

- POWER, A. BETTS, T. CASSIDY, J. Silver nanoparticle polymer composite based humidity sensor. **Analyst**, v.135, p.1645, 2010.
- PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial- LBI/CTPP. São Paulo, 2006, 119 p. (Relatório Técnico 84 396-205).
- PRATES, R. A.; SILVA, E. G.; SUZUKI L. C.; PAULA, C. R.; RIBEIRO, M. S. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**. v.4, n.1, p. 53-57, 2010
- QUINN, M.T; MILDNER, F. L. **The Science of Oligon**. Edwards Lifesciences, Ontário. 2002.
- RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMINS, J. E. **An introduction to materials in medicine**. Academic Press, San Diego, 2004.
- RATYAKSHI; CHAUHAN, R. P. Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. **Asian Journal of Chemistry**. v.21, n.10, p.113-116. 2009.
- REIS, M. O. **Desenvolvimento e caracterização de nanocompósitos produzidos a partir de miniemulsão acrílica aquosa contendo nanopartículas de prata**. 100p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.
- RHIM, J. W., WANG, L. F., HONG, S. I. Preparation and characterization of ágar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**. v.33, p.327-335, 2013.
- RIBEIRO, G. B. M. **Obtenção de biomateriais porosos utilizando sílica coloidal como aglutinante**. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- ROCHA JÚNIOR, P. R. S. **Estudo das condições de cultivo para a produção de PHB por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. 102 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- ROCHA, R. R. **Química verde: síntese de nanopartículas utilizando extratos vegetais**. 47p. Relatório. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- RODRIGUES, B. F. F. S. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- RODRIGUES, E. C. S. **Síntese de magnetita e ação antibacteriana do Ag₂O em matriz de alginato magnético**. 93p. Dissertação (Mestrado em Física). Programa de Pós-Graduação em Física. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Mossoró, 2011.

- ROSA, D.; CHUI, Q. S. H.; PANTANO FILHO, R.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da Biodegradação de Poli-b-(Hidroxibutirato), Poli-b-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-e-(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros**. v.12, n.4, 2002.
- RUPARELIA, J. P.; CHATTERJEE, A. K.; DUTTAQUPTA, S. P.; MUKHERJI, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomater**. v.4, n.3, p.707-716, 2008.
- SABATINI, C. A. **Modulação de Fluorescência de Amino coumarinas e Acridinas por Nanopartículas de Prata**. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.
- SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M.; CORIO, P.; EL HABER, F.; LOUARN, G. Preparação e caracterização de substratos SERS ativos: um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química Nova**, v.29, n.2, p.194-199, 2006.
- SANTOS JR. A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.17, n.4, p.308-317. 2007.
- SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FEITAS, C. C.; FERREITA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, n.6, p.413-423, 2007.
- SANTOS, J. P. **Avaliação do teor e análise qualitativa do ágar das espécies *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldmann and *G. Hamel* (Gelidiales, rhodophyta) e *Gracilaria dominensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie em costões rochosos dos municípios de Ilhéus e Uruçuca**. 94p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.
- SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. Quefir, um probiótico produzido por micro-organismos encapsulados e inflamação. In: Carvalho, J. C. T. (Ed.) **Fitoterápicos antiinflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 443–467. 2004.
- SERAFIM, R. A. C. **Desenvolvimento de aditivo têxtil com nanopartículas de prata e sua aplicação industrial**. Monografia (Bacharelado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- SILVA, E. F. H. **Estimulação elétrica de alta voltagem em úlceras crônicas de membros inferiores**. 87p. Dissertação (Mestrado em Fiosioterapia). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2009.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. LCT, 7ed, Rio de Janeiro, 2012.
- SMANIOTTO, P. H. S. Tratamento clínico das feridas. **Rev Med (São Paulo)**. v.89, p.137-41. 2010.

- SOARES, G. A. **Biomateriais**. Fórum de Biotecnologia Biomateriais. Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005.
- SONAI, G. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas de Prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone contendo trans-[RuCl₂(vpy)₄] para fins antimicrobiano**. Monografia (Bacharelado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- SOUZA, A. M. M. **Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2008.
- SOUZA, J. C. M. C. **Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- STEVE, N. G.; JOHNSON, C. **Synthesis of silver nanoparticles**. Disponível em: <education.mrsec.wisc.edu/nanolab/silver> Acesso em: 10 de fevereiro de 2014.
- TOMA H. E.; ZAMARION, V. M.; TOMA, S. H.; ARAKI, K. The coordination chemistry at gold nanoparticles. **J. Braz. Chem. Soc.** v.21 n.7, 2010.
- VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molecules** v.14. p.2535-2554. 2009.
- WANG, M. BI, J. Modification of characteristics of kefir by changing the carbon source of Lactobacillus kefirifaciens. **J Sci Food Agric.** v.88, p.763–769, 2008.
- WESCHENFELDER, S.; WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C. **Atividade anti-escherichia coli em kefir e soro de kefir tradicionais**. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 64, p.49-56, 2009.
- YIN, H. Q.; LANG-FORD, R.; BURRELL, R. E. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of Acticoat® antimicrobial barrier dressing. **Journal Burn Care Rehabil.** v.20, n.3, p.195-200, 1999.
- YOON, K. Y.; BYEON, J. H.; PARK, J. H.; HWANG, J. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. **Sci Total Environ.** v.5, p.373:572, 2007.
- YOSHIMURA, C. Y. **Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina)**. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ZARA, R. F.; M. H. THOMAZINI; G. F. LANZ. Estudo da eficiência de polímero natural extraído do cacto mandacaru (*Cereus jamacaru*) como auxiliar nos processos de coagulação e floculação no tratamento de água. **Revista de estudos ambientais** v.14, n.2, p.75-83, 2012.

ZHAI, W.; LI, D.; QU, L; FOSSEY, J. S. Multiple depositions of Ag nanoparticles on chemically modified agarose films for surface-enhanced Raman spectroscopy. **Cite this: Nanoscale.** v.4, p.137, 2011.

APÊNDICE A – Trabalho apresentado no VII Congresso Latino Americano de Órgãos
Artificiais e Biomateriais.



ELABORAÇÃO DE FILMES BASEADOS EM ÁGAR COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Natália A. Onofre¹, Thamara T. S. Correia², Aline L. Nascimento², Luciana S. A. de Melo³, Renato E. de Araujo³, Cláudia S.A. Lima⁴, Ricardo Yara¹.

¹Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

²Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

³Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

⁴Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

E-mail: ricardo.yara@gmail.com

Resumo. Ágar é um biopolímero extraído de algas marinhas que vem sendo amplamente utilizado como agente gelificante e estabilizante nas indústrias de alimentos e farmacêutica. A aplicação deste biopolímero na preparação de filmes é pouco relatada. Novos padrões de biomateriais estão surgindo contendo a incorporação de nanopartículas em suas matrizes. Dentre as nanopartículas com ação antimicrobiana destacam-se as nanopartículas de prata (NPsAg). O objetivo deste trabalho foi desenvolver novo filme de ágar com incorporação de NPsAg. Para tanto os filmes poliméricos foram preparados usando ágar bacteriológico e glicerol. As nanopartículas metálicas foram incorporadas ao filme durante o processo de preparação do biomaterial. As nanopartículas de prata foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão. As técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Visível e Tomografia por coerência óptica foram utilizadas para avaliar a presença das nanopartículas de prata no filme de ágar. A microscopia eletrônica de

varredura, permitiu a visualização de impurezas em algumas regiões do material. Os filmes obtidos apresentaram-se transparentes e homogêneos, com consistência flexível e a caracterização confirmou a incorporação das nanopartículas no seu interior.

Palavras-chave: Ágar, Biofilmes, Nanopartículas de prata.

1. INTRODUÇÃO

O ágar é um biopolímero da classe dos poligalactanos extraído de algas marinhas vermelhas (divisão *Rhodophyta*) chamadas agarófitas. Estas algas são encontradas nas famílias *Gracilariaceae*, *Gelidiaceae*, *Phyllophoraceae* e *Ceramiceae* (SOUZA, 2008). É um polissacarídeo composto principalmente por agarose e agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear de unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (dímero constituído de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose) e a agarpectina é um polissacarídeo sulfatado, composto por agarose com grupos éster sulfatos, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico (ARVIZU- HIGUERA et al., 2007). Em água fria, o ágar é insolúvel, porém se expande consideravelmente absorvendo água numa quantidade que pode atingir até vinte vezes o seu próprio peso. Em água quente, porém, a dissolução é rápida formando um gel firme. Suas propriedades de baixa viscosidade (em solução), elevada transparência, temperaturas de fusão/gelificação bem definidas (SOUZA, 2008) fazem com que o ágar apresente larga aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica como agente gelificante e estabilizante.

Existem vários biopolímeros extraídos de algas marinhas que são cada vez mais aplicados à biotecnologia. Dentre eles o ágar é o muito utilizado (MURANO et al., 1990). Apesar de suas inúmeras aplicações, são poucos os estudos relacionados à sua utilização para a preparação de filmes (SOUZA, 2008).

Novos padrões de biomateriais estão surgindo contendo a incorporação de nanopartículas em suas matrizes. Dentre as nanopartículas com ação antimicrobiana destacam-se as nanopartículas de prata (CARREIRA et al., 2009), acredita-se que a ação da prata deve-se a interação com grupos sulfúricos ou grupos tiol (-SH) nas membranas dos micro-organismos, causando alteração de sua permeabilidade e, com isso, a morte da célula

microbiana, uma segunda ação deve-se a interação com o ácido desoxirribonucléico (DNA) bacteriano, impedindo assim a reprodução celular (MORONES et al., 2005).

A incorporação de nanopartículas de prata a polímeros pode resultar em diversas aplicações, como cicatrizantes, cateteres venosos e urinários, fios de sutura, adesivos ortodônticos, máscaras cirúrgicas, entre outras (MONTEIRO, 2009).

O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar um filme de ágar com NPs Ag, com a finalidade de associar a ação antimicrobiana das NPs a um filme polimérico biocompatível, desenvolvendo uma alternativa para um curativo ou mesmo um substituto temporário de pele.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata (NPsAg) foram preparadas de acordo com a técnica proposta por Lee e Meisel (1982). Para isto, 250 mL de uma solução de Nitrato de prata (AgNO_3) $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich) foi aquecida até entrar em ebulição. Neste momento, foram adicionados 5 mL de uma solução de Citrato de sódio (Sigma-Aldrich) 1%. A partir deste instante, o sistema passou a ser submetido à agitação vigorosa e teve sua temperatura fixa. Após a adição do citrato de sódio, a coloração da solução foi se modificando, passando de incolor, a amarelo pálido e, por fim, amarelo acinzentado, indicando a redução dos íons de Prata. O aquecimento e a agitação foram mantidos por 60 minutos, depois dos quais, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente.

2.2 Preparação dos filmes poliméricos

Para preparação dos filmes, 1 g de ágar bacteriológico HiMedia foi dissolvido em 40 mL de água destilada. Esta dissolução foi aquecida sob agitação constante por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1000 μL de glicerol e o aquecimento foi mantido até que o volume fosse reduzido a 30 mL. Em seguida foram adicionados 5 mL da suspensão de nanopartículas de prata. Para concluir o processo de preparação do material, o sistema ágar- NPsAg foi depositado em uma placa de Petri (90x15 mm) e levado à estufa por 16 horas a 37° C.

Para este experimento, foram preparados grupos de amostras contendo, cada um, 1 filme apenas com ágar e dois filmes com ágar contendo NPs Ag em diferentes concentrações.

Neste procedimento foi utilizado o ágar bacteriológico que, apesar de não passar por processos de remoção de compostos nitrogenados, sais inorgânicos e vitaminas, possui características satisfatórias para realização de ensaios preliminares, e foi utilizado por ser mais acessível.

2.3 Caracterização dos filmes de ágar-NPsAg

Na caracterização dos materiais preparados foram empregados um Espectrofotômetro Evolution 600 UV-Vis, um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai 20, fabricado pela FEI, e um microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM-5900.

2.4 Tomografia por coerência óptica (OCT)

OCT é uma modalidade de imagem, não invasiva, que vem sendo utilizada para diagnóstico em tecidos biológicos. Baseia-se na interferometria de baixa coerência e, mais recentemente, vêm utilizando NPs metálicas como agentes de contraste para aumentar a intensidade do sinal e também a especificidade da técnica (Cang et al, 2005). Para a realização desta etapa do experimento foi utilizado o sistema de imagem por OCT da marca Thorlabs.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de síntese das NPs Ag, anteriormente descrito, permitiu a obtenção de uma amostra com grande dispersão de forma e tamanho, fato que pode ser comprovado a partir da avaliação das micrografias apresentadas na Fig. 1 (A) e (B).

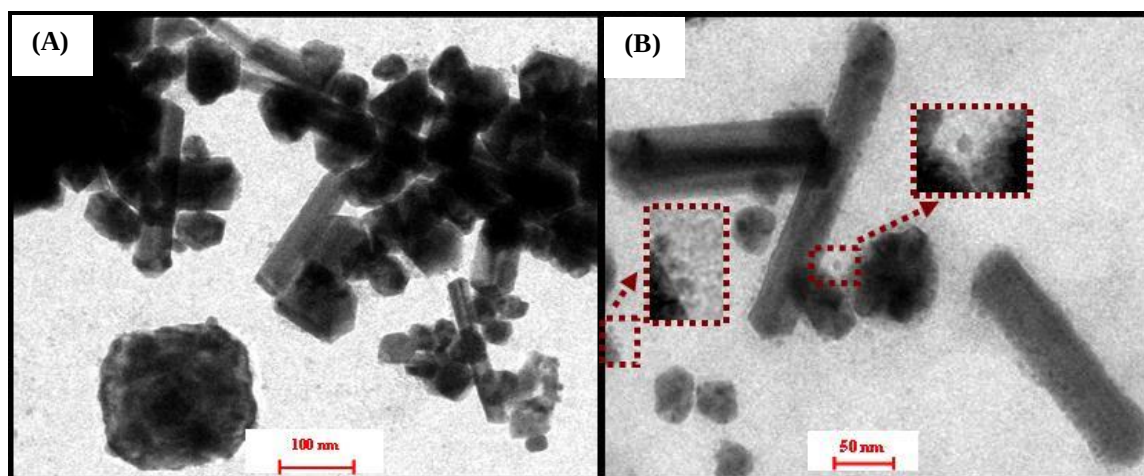


Figura 1 – Imagens por MET das NPs Ag em suspensão. Em A, enfatizando a dispersão de formas e em B de tamanho.

Analisando-se o gráfico obtido a partir da técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis, presente na Fig. 2, a banda de plasmon também caracterizou a formação das NPs Ag em suspensão, com seu máximo em torno de 408 nm. A técnica também foi aplicada aos filmes preparados confirmando a presença das NPsAg. Na análise dos filmes poliméricos, observa-se um deslocamento do máximo de absorção de 37 nm para direita provocado possivelmente pela modificação do ambiente onde encontram-se as NPsAg.

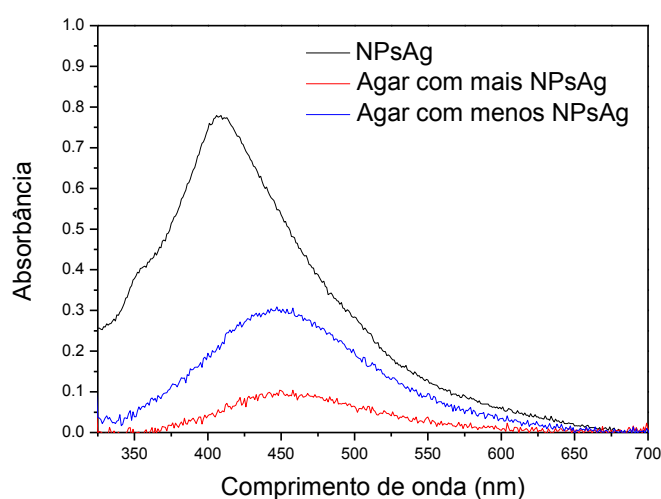


Figura 2 – Curvas referentes aos espectros de absorção no UV-Vis das NPsAg em suspensão, em preto, e dos filmes de ágar com NPs em maior (azul) e menor (vermelho) concentração.

As imagens adquiridas a partir da técnica de MEV permitiram a observação de regiões de ágar puro se alternando com regiões do filme onde foram encontradas impurezas, conforme se observa na Figura 3.

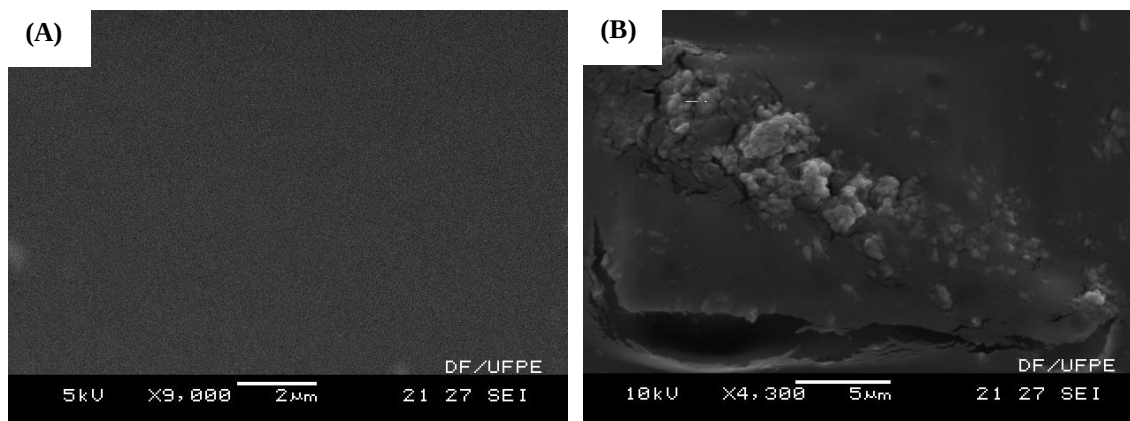


Figura 3 – Imagens do filme de ágar obtida pela técnica de MEV. Em A, região de ágar puro, em B detalhando regiões nas quais de encontram impurezas.

As imagens obtidas por OCT, na Fig. 4 mostram que à medida que a concentração de NPsAg no filme de ágar aumentou, o espalhamento da luz observado na amostra foi mais intenso, confirmando não só a presença das NPs, mas também detectando a variação de concentração na amostra.

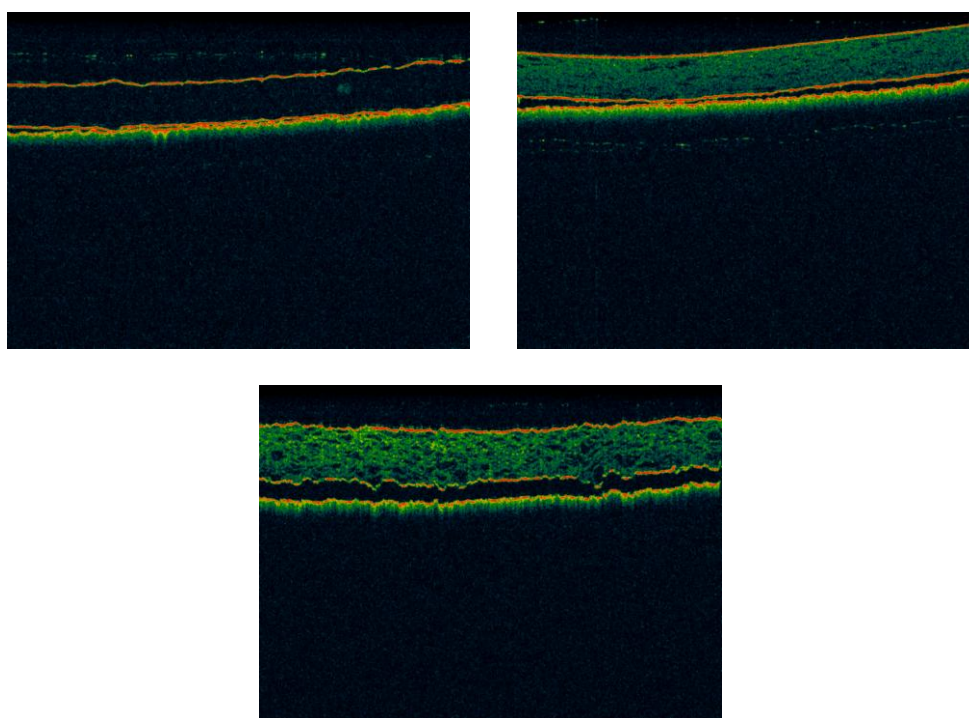


Figura 4 – Imagens obtidas pela técnica de OCT dos filmes de ágar, sem NPsAg, (em A) e com menos e maior concentração de NPs Ag (em B e C, respectivamente).

CONCLUSÕES

Após a realização dos experimentos apresentados, conclui-se que foram obtidos filmes de ágar sem NPsAg e com diferentes concentrações de NPsAg. A presença das NPs foi comprovada a partir da banda de plasmon detectada pela análise da técnica de espectroscopia de absorção no UV-Visível e também pelo aumento no espalhamento de luz observado nas imagens. Estes resultados geram a perspectiva de obter-se um curativo de pele com ação antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro prestado a partir do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INCT de Fotônica), e ao Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX - FACEPE/CNPq). Natália Onofre é bolsista de Mestrado pela FACEPE. Luciana Melo tem apoio do programa BFP da FACEPE. Os autores também agradecem ao

Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram feitas as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

REFERÊNCIAS

ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y. E.; MURILLO-ÁLVAREZ, J. I.; MUÑOZ-OCHOA, M. HERNÁNDEZ-CARMONA, G. Effect of alkali treatment time and extraction time on Ágar from *Glacilaria vermiculophylla*. **Journal of Applied Physiology**. Vol. 20, pp. 515-519. 2007.

CANG, H. ; SUN, T.; LI, Z. Y.; CHEN, J.; WILEY, B. J.; XIA, Y.; LI, X. Gold nanocages as contrast agents for spectroscopic optical coherence tomography. **Optics Letters**, Vol. 30, p. 3048-3050. 2005.

CARREIRA, C. M.; PEREIRA, C. A.; BOMBANA, A. C.; JORGE, A. O. C. **Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias**. In XIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, IX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO E III ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JÚNIOR. Trabalho apresentado. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

LEE, P. C. ; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry** Vol. 86, p. 3391-3395. 1982.

MONTEIRO, D. R. **Análise da incorporação de nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética**. 2009. 98 f. Dissertação de mestrado em Odontologia – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bacterial effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Vol. 16, p 2346-2353, 2005.

MURANO, E.; BRANDOLIN, C.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S.; RIZZO, R. Characterization of the Agar fraction extracted from *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**. Vol. 204/205, PP. 567 – 571, 1990.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. **Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens**. São Carlos, EMBRAPA, 2008. (Comunicado Técnico 99).

SOUZA, A. M. M. **Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2008.

PREPARATION OF FILMS BASED ON ÁGAR WITH INCORPORATION OF SILVER NANOPARTICLES

Natália A. Onofre¹, Thamara T. S. Correia², Aline L. Nascimento², Luciana S. A. de Melo³, Renato E. de Araujo³, Cláudia S.A. Lima⁴, Ricardo Yara¹.

¹Center for Technology and Geosciences, Federal University of Pernambuco, Recife (PE), Brazil

²Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife (PE), Brazil

³Department of Electronics and Systems, Federal University of Pernambuco, Recife (PE), Brazil

⁴Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife (PE), Brazil

E-mail: ricardo.yara@gmail.com

Abstract. Ágar is a biopolymer extracted from seaweed, widely used as gelling agent and stabilizer in food and pharmaceutical industries. The application of this biopolymer in films is rarely reported. New biomaterials are emerging containing the incorporation of nanoparticles in their matrix. Among the nanoparticles with antimicrobial activity stand out silver nanoparticles (AgNPs). The aim of this study was to develop a film based on ágar incorporated with AgNPs, with potential to be used as a new bandage. For the preparation of films were prepared using bacteriological ágar and glycerol. AgNPs were incorporated into the film during the preparation of biomaterials. The silver nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy. The absorption spectroscopy in the UV-Visible and optical coherence tomography were used to evaluate the presence of silver nanoparticles in

the film ágar. The scanning electron microscopy allowed the visualization of impurities in some regions of the material. The resulting films are transparent, homogeneous and flexible, the characterization confirmed the incorporation of nanoparticles inside the polymer matrix.

Keywords: Ágar, Biofilms, Silver nanoparticles.