

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

**PRISCYLLA CRISTINA FERREIRA MAIA ACCIOLY**

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTITUTOS DE PELE A PARTIR  
DE FILMES DE AGAROSE INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA E EXTRATO DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS**

Recife

2018

**PRISCYLLA CRISTINA FERREIRA MAIA ACCIOLY**

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTITUTOS DE PELE A PARTIR  
DE FILMES DE AGAROSE INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA E EXTRATO DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS**

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.

**Área de Concentração:** Bioengenharia.

**Linha de Pesquisa:** Produtos e Processos Biotecnológicos.

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Yara.

**Coorientador:** Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima.

Recife

2018

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

- A171e Accioly, Priscylla Cristina Ferreira Maia.  
Elaboração e caracterização de substitutos de pele a partir de filmes de agarose incorporados com nanopartículas de prata e extrato de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS / Priscylla Cristina Ferreira Maia Accioly. – 2018.  
97 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, 2018.  
Inclui Referências.
1. Engenharia Biomédica. 2. Agarose. 3. Filmes. 4. Nanopartículas de prata. 5. *S. cumini*. 6. Síntese verde. 7. Substitutos de pele. I. Yara, Ricardo. (Orientador). II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade. (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2019-63

PRISCYLLA CRISTINA FERREIRA MAIA ACCIOLY

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
SUBSTITUTOS DE PELE A PARTIR DE FILMES DE  
AGAROSE INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS  
DE PARA E EXTRATO DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.)  
SKEELS**

Essa 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.  
Área de Concentração: Bioengenharia  
Linha de Pesquisa: Produtos e Processos  
Biotecnológicos

Aprovada em: 27/02/2018.

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ricardo Yara, (Universidade Federal de  
Pernambuco – Recife, Brasil)

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Yara, DEBM – UFPE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima, DBR – UFPE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Emmanuel de Souza, DEBM – UFPE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Evelyne Gomes Solidônio – FACIPE

Coordenador do PPGEB:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edval José Pinheiro Santos

Recife, fevereiro de 2018

À **Deus**, Criador e Senhor da minha vida. Ao meu esposo **Davi**, meu eterno amor. Aos meus pais **Pedro** e **Patricia** e meu irmão **Paulo**, meus alicerces. Ao meu avô **José Pedro**, meu exemplo. Com todo meu amor e gratidão, dedico.

## AGRADECIMENTOS

“Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre!  
Amém.” Romanos 11:36

A Deus, pois sem Ele, nada sou.

Ao meu esposo Davi, por todo seu amor demonstrado através do companheirismo e dedicação em todos os momentos, não me deixando desistir diante as dificuldades. Obrigada por ser meu maior incentivador.

Aos meus pais Pedro e Patricia e ao meu irmão Paulo, pelo apoio incondicional e por estarem sempre presente alegrando minha vida e orando por mim.

A toda minha família pelo amor, carinho e cuidado, essenciais em minha vida.

A todos os meus amigos pela torcida e compreensão, tão importantes para minha caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Yara e à minha coorientadora Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima pelo acolhimento e por todos os ensinamentos. Sou grata por todos os momentos que passamos e enfrentamos juntos, são pessoas muito especiais que ficarão marcadas em minha vida.

A doutoranda e amiga Natália Onofre por estar sempre disposta a ajudar, por toda paciência e dedicação, e acima de tudo, pela amizade construída.

A companheira de turma e parceira de laboratório, Flávia Berenguer, com quem tive o prazer de dividir todos os momentos dessa trajetória tornando-se uma amiga muito especial que levarei sempre em meu coração.

A Profa. Kêsia Xisto por toda ajuda, ensinamentos e por me receber tão bem no laboratório de Microbiologia Aplicada do UFPEDA.

Ao Prof. Dr. Severino Urtiga pela parceria, receptividade e disponibilidade do laboratório.

Aos Professores. Dr. Maxime Montoya e Dra. Beate Saegesser pelo aprendizado concedido e ao Dr. Benedito Correia pela contribuição neste trabalho.

Aos colegas João Paulo, Rafael Padilha e Walter Leandro pela ajuda com análises e experimentos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biofísica Química pelo acolhimento e companheirismo, em especial aos amigos Ricardo, Bruno, Beatriz, Yago e Marília pela amizade e por compartilhar tanto os momentos bons como os mais difíceis.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica pelos ensinamentos e apoio. Aos meus colegas de turma pelo companheirismo, experiências trocadas e momentos compartilhados.

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

Ao Instituto Tecnológico das Cadeias Biossustentáveis (ITCBio) pelo financiamento da pesquisa.

**A todos, o meu mais sincero, muito obrigada!**

## RESUMO

A pele possui importante função na proteção do organismo. Assim, havendo lesão da pele é necessária rápida intervenção, garantindo a regeneração tecidual. Os substitutos de pele são usados para prevenir infecções e auxiliar nesta regeneração. A agarose é um biopolímero utilizado para a produção de filmes. As nanopartículas podem alterar as propriedades dos polímeros gerando compósitos nanoestruturados. Dentre elas, as nanopartículas de prata (NPsAg) apresentam interesse pela sua ação antimicrobiana, assim como outros produtos derivados da prata. O fruto da espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels, possui ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Formulações de materiais contendo produtos naturais e nanopartículas tem se destacado como alternativa promissora. Este projeto visou a elaboração e caracterização de filmes baseados em agarose com a incorporação de NPsAg e/ou extratos de *S. cumini*, como também caracterizar o comportamento do extrato e das NPsAg incorporados a filmes poliméricos avaliando a sua atividade antimicrobiana. Neste contexto, foi preparado extrato de *S. cumini* e NPsAg foram sintetizadas através das sínteses química e verde. Durante o processo da síntese química de nanopartículas foi desenvolvido um protocolo para estabilização das NPsAg. Foram produzidos filmes de agarose por “casting” incorporados com diferentes concentrações das NPsAg sintetizadas e do extrato de *S. cumini*. As NPsAg, o extrato e os filmes foram caracterizados através de espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e análises antimicrobianas. Este último utilizando os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans*. As NPsAg apresentaram coloração amarelada típica. Os filmes produzidos se mostraram homogêneos, sem rachaduras e flexíveis. Foi testada a estabilidade das NPsAg de síntese química durante dez dias a temperatura de 25 °C. A análise de UV-Vis revelou máximos de absorção em torno de 400 nm, indicando a formação das NPsAg e a presença das mesmas nos filmes. Na região do infravermelho, foi possível identificar os principais grupos funcionais da estrutura do polímero e da planta. O extrato apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *C. albicans*. Enquanto as NPsAg se mostraram eficientes contra *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis*, *E. coli*, *M. marcescens* e *C. albicans*. Em relação à atividade antimicrobiana das NPsAg por síntese química, as mesmas foram efetivas no método de

difusão em meio de cultura líquido e não efetivas em difusão em meios de cultura semi-sólido e filme polimérico. Um novo protocolo desenvolvido indicou que as NPsAg quando associadas a filmes poliméricos possuem atividade antimicrobiana restritas as superfícies dos filmes, sendo limitada a sua difusão em meio de cultura semi-sólido.

**Palavras-chave:** Agarose. Filmes. Nanopartículas de prata. *S. cumini*. Síntese verde. Substitutos de pele.

## ABSTRACT

Skin has an important function in the protection of the organism. Thus, if there is a skin lesion, rapid intervention is required, ensuring a tissue regeneration. Skin substitutes are used to prevent infections and help in this regeneration. Agarose is a biopolymer used for film production. Nanoparticles can change characteristics of polymers creating nanostructured composites. Among them, silver nanoparticles (AgNPs) are useful for their antimicrobial action, as well as products derived from silver. The fruit of the species *Syzygium cumini* (L.) Skeels, has anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial action. Material Materials formulations containing natural products and nanoparticles has emerged as a promising alternative. This project aimed at the development and characterization of agarose-based films embedding AgNPs and/or *S. cumini* extracts, as well as characterize the behavior of extract and NPsAg incorporated into polymeric films evaluating their antimicrobial activity. In this context, extract was prepared from *S. cumini* and AgNPs were synthesized through chemical and green syntheses. During the process of the chemical synthesis of nanoparticles a protocol was developed to stabilize the NPsAg. Agarose films were produced by casting and incorporated with different concentrations of synthesized AgNPs and *S. cumini* extract. AgNPs, extract and films were characterized by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), Infrared Spectroscopy Fourier Transform (IR-FT) and antimicrobial analysis. This last one using the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Candida albicans*. AgNPs presented typical yellowish coloration. Films produced were homogeneous, without cracking and flexible. The stability of the chemical synthesis NPsAg was tested for ten days at the temperature of 25 °C. UV-Vis analysis revealed absorption maximum at around 400 nm, indicating the production of the AgNPs and their presence in the films. In the infrared region, it was possible to identify the main functional groups of the polymer and plant structure. Extract showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* and *C. albicans* while AgNPs were efficient against *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis*, *E. coli*, *M. marcescense* and *C. albicans*. In relation to the antimicrobial activity of NPsAg by chemical synthesis, they were effective in the method of diffusion in the liquid culture medium and not effective in diffusion in semi-solid culture medium and polymeric film. A new protocol developed indicated that NPsAgs when associated with polymeric films have a

restricted antimicrobial activity to the surfaces of the films, being limited its diffusion in the semi-solid culture medium.

**Keywords:** Agarose. Films. Silver nanoparticles. *S. cumini*. Green synthesis. Skin substitutes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Classificação dos substitutos cutâneos.....	27
Figura 2 –	Fluxograma de atividades.....	34
Figura 3 –	Representação do método de difusão em meio líquido.....	44
Figura 4 –	Representação das diluições seriadas e semeio em estrias.....	45
Figura 5 –	Fluxograma da elaboração do filme base de agarose.....	46
Figura 6 –	Fluxogramas da elaboração dos filmes poliméricos.....	47
Figura 7 –	Espectroscopia UV-Vis do extrato alcóolico de <i>S. cumini</i> .....	53
Figura 8 –	Espectroscopia FT-IR do extrato alcóolico de <i>S. cumini</i> .....	54
Figura 9 –	NPsAg (síntese química).....	55
Figura 10 –	NpsAg. (A) – síntese verde 16; (B) – síntese verde 17.....	57
Figura 11 –	Espectroscopia UV-Vis das NPsAg por síntese química. Sínteses química 3, 4 e 7.....	58
Figura 12 –	Espectroscopia UV-Vis das NPsAg por síntese verde. Sínteses verde 16 e 17.....	59
Figura 13 –	Espectroscopia FT-IR da NPsAg.....	60
Figura 14 –	Espectroscopia UV-Vis das NPsAg estabilizadas e ressuspendidas em vários meios.....	61
Figura 15 –	Espectroscopia UV-Vis de T1 ao longo do tempo.....	62
Figura 16 –	Espectroscopia UV-Vis de T2 ao longo do tempo.....	63
Figura 17 –	Espectroscopia UV-Vis de T3 ao longo do tempo.....	63
Figura 18 –	Resultado do ensaio de difusão em meio líquido A) Fração sobrenadante; B) Fração precipitada; C) AgNO <sub>3</sub> ; D) Fração sobrenadante sem inoculo; E) Fração precipitada sem inoculo; F) AgNO <sub>3</sub> sem inoculo; G) Controle positivo com inoculo; H) Controle negativo sem inoculo.....	70
Figura 19 –	Filme de agarose (F1).....	71
Figura 20 –	Filme de agarose e NPsAg da síntese química 7 incorporadas (F3).....	72
Figura 21 –	Filme de Agarose e extrato de <i>S. cumini</i> (F5).....	72
Figura 22 –	Filme de agarose e NPsAg da síntese verde. (A) – Síntese verde 16 (F7); (B) – Síntese verde 17 (F8).....	73
Figura 23 –	Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose (F1).....	74
Figura 24 –	Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e solução de AgNO <sub>3</sub> (F2).....	74
Figura 25 –	Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e NPsAg incorporadas (F3).....	75

Figura 26 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e NPsAg na superfície (F4)...	75
Figura 27 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e extrato de <i>S. cumini</i> (F5)....	76
Figura 28 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose, NPsAg e extrato de <i>S. cumini</i> (F6).....	77
Figura 29 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e síntese verde 16 (F7).....	77
Figura 30 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e síntese verde 17 (F8).....	78
Figura 31 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose (F1).....	79
Figura 32 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e AgNO <sub>3</sub> (F2).....	80
Figura 33 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e NPsAg na superfície (F3).....	80
Figura 34 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e NPsAg na superfície (F4).....	81
Figura 35 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e extrato de <i>S. cumini</i> (F5).....	81
Figura 36 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose, NPsAg e extrato de <i>S. cumini</i> (F6).....	82
Figura 37 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e síntese verde 16 (F7).....	82
Figura 38 – Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e síntese verde 17 (F8).....	83
Figura 39 – Atividade antimicrobiana do filme F1.....	86
Figura 40 – Atividade antimicrobiana do filme F2.....	87
Figura 41 – Atividade antimicrobiana do filme F3.....	87
Figura 42 – Atividade antimicrobiana do filme F4 (Superfície com NPsAg virada para baixo).....	88
Figura 43 – Atividade antimicrobiana do filme F4 (Superfície com NPsAg virada para cima).....	88
Figura 44 – Atividade antimicrobiana do filme F5.....	89
Figura 45 – Atividade antimicrobiana do filme F6.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação das queimaduras quanto à profundidade da lesão.....	23
Tabela 2 –	Síntese Química: Concentrações de AgNO <sub>3</sub> , NaBH <sub>4</sub> , agarose e ascorbato de cálcio.....	37
Tabela 3 –	Bactérias e leveduras utilizadas da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).....	40
Tabela 4 –	Formulações de NPsAg (síntese química) utilizadas no teste antimicrobiano pelo método de difusão em disco.....	42
Tabela 5 –	Formulações de NPsAg (síntese química) utilizadas no teste antimicrobiano pelo método de difusão em poço.....	42
Tabela 6 –	Formulações dos filmes caracterizados.....	45
Tabela 7 –	Avaliação da Síntese Química.....	55
Tabela 8 –	Absorbância em 400 nm durante o teste de estabilidade das NPsAg.....	61
Tabela 9 –	Resultados do teste antimicrobiano para NPsAg e extrato de <i>S. cumini</i> (método de difusão em disco).....	64
Tabela 10 –	Resultados do teste antimicrobiano para NPsAg e extrato de <i>S. cumini</i> (método de difusão em poço).....	66
Tabela 11 –	Resultados da caracterização da atividade antimicrobiana das NPsAg purificadas (método de difusão em poço).....	68
Tabela 12 –	Regiões dos grupos funcionais encontrados nos filmes.....	78
Tabela 13 –	Espessura dos filmes.....	82
Tabela 14 –	Transparência dos filmes.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Prata
DATASUS	Departamento de Informática do Serviço Único de Saúde
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTO	Departamento de Terapia Ocupacional
FT-IR	Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier
GAGs	Glicosaminoglicanos
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LBQ	Laboratório de Biofísica Química
NaBH <sub>4</sub>	Borohidreto de Sódio
NPsAg	Nanopartículas de Prata
OMS	Organização Mundial da Saúde
PHA	Polihidroxialcanoatos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta – Visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°	Graus
$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Micrograma por litro
A.C.S	<i>American Chemical Society</i>
$\text{Ag}^+$	Íons de Prata
$\text{Ag}^0$	Prata Metálica
$\text{cm}^{-1}$	Número de onda
$\text{cm}^2$	Centímetro ao quadrado
g	Gramas
$\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	Gramas por centímetro quadrado
$\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Gramas por mililitro
L	Litro
m	Metro
m/m	Massa por massa
m/v	Massa por volume
%	Porcentagem
$\text{m}^2$	Metro ao quadrado
mg	Miligrama
$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Miligrama por litro
mL	Mililitro
$\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}$	Mililitros por centímetro quadrado
mm	Milímetro
mM	Milimolar
$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Mol por litro
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
P.A.	Para análise
P.S.	Para síntese
rpm	Rotações por minuto
$\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$	Unidade Formadoras de Colônia por mililitro
$\lambda$	Comprimento de onda

$\mu\text{L}$

Microlitro

$\mu\text{m}$

Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Pele.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Queimaduras.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Substitutos cutâneos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Biomateriais.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Polímeros.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Nanopartículas de Prata.....</b>	<b>30</b>
<b>2.7</b>	<b><i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparação do extrato alcoólico de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização do extrato alcóólico de <i>S. cumini</i>.....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	35
4.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	35
<b>4.3</b>	<b>Síntese química das nanopartículas de prata.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Síntese verde das nanopartículas de prata.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Caracterização das nanopartículas de prata.....</b>	<b>38</b>
4.5.1	Espectroscopia por Ultravioleta-Visível (UV-Vis) das NPsAg.....	38
4.5.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	39
<b>4.6</b>	<b>Separação das NPsAg.....</b>	<b>39</b>
4.6.1	Método de separação das NPsAg.....	39
4.6.2	Estabilidade de NPsAg separadas por centrifugação.....	39
<b>4.7</b>	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>40</b>
4.7.1	Atividade antimicrobiana do extrato de <i>S. cumini</i> e das nanopartículas de prata....	41
4.7.2	Caracterização da atividade antimicrobiana das NPsAg estabilizadas.....	43
<b>4.8</b>	<b>Elaboração dos filmes poliméricos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.9</b>	<b>Caracterização dos filmes poliméricos.....</b>	<b>48</b>
4.9.1	Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	48

4.9.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	48
4.9.3	Espessura.....	49
4.9.4	Transparência.....	49
<b>4.10</b>	<b>Atividade antimicrobiana dos filmes.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Preparação do extrato de <i>Syzygium cumini</i> (L.).....</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização do extrato alcóolico de <i>S. cumini</i>.....</b>	<b>51</b>
5.2.1	Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	51
5.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	52
<b>5.3</b>	<b>Síntese química das nanopartículas de prata.....</b>	<b>53</b>
<b>5.4</b>	<b>Síntese verde das nanopartículas de prata.....</b>	<b>55</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização das nanopartículas de prata.....</b>	<b>56</b>
5.5.1	Espectroscópica por Ultravioleta-Visível (UV-Vis) das NPsAg.....	56
5.5.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	58
<b>5.6</b>	<b>Separação das NPsAg.....</b>	<b>59</b>
5.6.1	Avaliação da separação das NPsAg.....	59
5.6.2	Estabilidade.....	60
<b>5.7</b>	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>63</b>
5.7.1	Atividade antimicrobiana do extrato de <i>S. cumini</i> e das nanopartículas de prata....	63
5.7.2	Caracterização da atividade antimicrobiana das NPsAg estabilizadas.....	67
<b>5.8</b>	<b>Elaboração dos filmes poliméricos.....</b>	<b>70</b>
<b>5.9</b>	<b>Caracterização dos filmes poliméricos.....</b>	<b>72</b>
5.9.1	Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	72
5.9.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	77
5.9.3	Espessura.....	82
5.9.4	Transparência.....	83
<b>5.10</b>	<b>Atividade antimicrobiana dos filmes.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele recobre toda a superfície do corpo humano, sendo considerado seu maior órgão, é a primeira linha de defesa do organismo, possuindo assim importante função na sua proteção. Quando ocorre uma lesão da pele é necessária rápida intervenção, a fim de se garantir regeneração tecidual (BLANES, 2004).

Uma das formas de tratamento para auxiliar no processo de reparo tecidual é utilização de substitutos de pele. Tratam-se de dispositivos de grande utilidade na medicina, usados no sentido de restaurar, manter ou melhorar estrutural e funcionalmente tecidos lesionados para prevenir infecções e auxiliar nesta regeneração (SOUZA, 2011).

Um dos materiais utilizados para fabricação desses substitutos é a agarose (ONOFRE, 2014), um polímero composto de subunidades de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopiranosose. Como biomaterial, a agarose vem sendo amplamente aplicada como uma matriz para imobilização de biomoléculas, tais como enzimas, anticorpos e antígenos e gel para eletroforese (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

O uso da prata como agente antimicrobiano é bastante conhecido pelo seu amplo espectro de atuação e pela a sua aplicação em curativos e substitutos de pele. Entretanto a prata apresenta toxicidade principalmente em doses mais elevadas.

As nanopartículas tem se mostrado uma ótima opção para incorporação em biomateriais, devido as suas dimensões (1 a 100 nanômetros). Se comparados a materiais em escala macroscópica, os nanomateriais possuem propriedades novas ou melhoradas (MELO JR. et al. 2012). As nanopartículas de prata (NPsAg) são conhecidas como um potente agente antimicrobiano, apresentando ação contra uma extensa faixa de micro-organismos, como bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*), fungos e vírus (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Formulações de materiais contendo produtos naturais e nanopartículas tem se destacado como alternativa promissora para uso em química verde, demonstrado por Rocha (2010), quando a autora estabeleceu protocolos para obtenção de extratos aquosos de uva Isabel (*Vitis labrusca* L.) e Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) com NPsAg (ROCHA, 2010).

O *Syzygium cumini* L. Skeels, é uma planta pertencente à família Myrtaceae, também conhecida popularmente como azeitona preta, jambolão, jamelão, azeitona-roxa, jamon, entre outras denominações. É uma planta nativa da Indomalasia e China sendo encontrada em vários países inclusive no Brasil (LORENZI e MATOS, 2002). Suas sementes possuem ácido

gálico e elágico, além destes compostos, esta planta também apresenta uma gama variada de antocianinas e altas taxas de compostos fenólicos (AYYANAR et al., 2012).

As propriedades farmacológicas do jambolão são conhecidas por apresentar potencial antidiabético (MIGLIATO et al., 2006), além de serem comprovadas a sua ação anti-inflamatória (MURUGANANDAN et al., 2001; LIMA et al., 2007), antioxidante e antimicrobiana (MOHAMED et al., 2013). Essas propriedades fizeram com que esta planta fosse incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS).

Este projeto visa a elaboração de filmes baseados em agarose com a incorporação de NPsAg e extratos de *S. cumini*, bem como caracterizar o comportamento de extratos e NPsAg incorporados a filmes poliméricos avaliando a sua atividade antimicrobiana.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Segundo Andrade (2005), o levantamento bibliográfico proporciona uma revisão da literatura referente ao assunto estudado.

### 2.1 Pele

A pele recobre toda a superfície do corpo humano, é considerada seu maior órgão uma vez que sua extensão corresponde a cerca de 2 m<sup>2</sup> e seu peso representa cerca de 16 % do peso corporal, sendo indispensável para a vida humana e fundamental para o perfeito funcionamento do organismo. É dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si (BLANES, 2004; GOTO, 2011; MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008). A camada subjacente, chamada de subcutânea, a hipoderme não faz parte da pele, mas serve de união a órgãos e outros tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

É a primeira linha de defesa do organismo, constituindo uma eficiente barreira e possuindo assim importante função na sua proteção contra traumas físicos, químicos, toxinas e micro-organismos patogênicos. Além disso, a pele desempenha diversas outras funções, tais como: impedir perda excessiva de água e proteínas para o exterior, garantindo a regulação da temperatura corpórea, controlar o sistema imunológico, ajudar na produção de vitamina D3, proteger contra radiação ultravioleta (UV), controlar a pressão sanguínea, curar e regenerar ferimento, participar da excreção de eletrólitos e atuar como órgão sensorial (GOTO, 2011; OGUIDO; SHIBATTA, 2011).

Como qualquer outro órgão, está sujeito a sofrer agressões de fatores externos e internos que irão causar o desenvolvimento de alterações na sua constituição e integridade podendo levar à incapacidade funcional e prejuízo anatômico (COELHO; RESENDE; TENÓRIO, 1999; MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

Havendo dano ou destruição da pele é necessária rápida intervenção, a fim de garantir a restituição de suas funções e a regeneração tecidual, evitando assim, 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 (BLANES, 2004; RODRIGUES, 2012).

No Brasil, as feridas acometem a população de forma geral, independente de sexo, idade ou etnia, constituindo assim, um sério problema de saúde pública. Porém não há dados estatísticos que comprovem este fato, devido à escassez dos registros desses atendimentos.

Contudo, o surgimento de feridas onera os gastos públicos e prejudica a qualidade de vida da população (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

Estas lesões são comumente tratadas com uso de curativos oclusivos associados à antimicrobianos de uso tópico, pois sem essa barreira natural que é a pele, agentes patológicos proliferam-se causando diversos tipos de doenças infecciosas secundárias que podem levar o indivíduo ao óbito. Estes curativos, entretanto, tendem a aderir na superfície da lesão e exigem trocas frequentes, dificultando o processo de reepitelização (HELM et al., 2012; MOTTA et. al., 2011).

Neste contexto, os substitutos temporários de pele são dispositivos preparados com biomateriais, que possuem grande aplicabilidade na área de saúde, pois são utilizados com a finalidade de prevenir a perda de líquidos, eletrólitos e infecção local e auxiliar na regeneração do tecido lesionado (OSMAN; SOUZA; DOLCI, 2007).

## **2.2 Queimaduras**

Dados do Departamento de Informática do Serviço Único de Saúde (DATASUS), apurados de maio de 2015 a maio de 2016 demonstram a ocorrência de cerca de 26.200 casos de queimaduras e corrosões tratados pelo Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS), não sendo contabilizados os pacientes que não procuraram atendimento hospitalar. O custo nacional, para esse mesmo período com estas internações, foi de aproximadamente R\$ 58.900.000,00 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Segundo a Associação Americana de Queimaduras, a causa mais comum de perda de integridade cutânea, é a lesão térmica. Elas constituem um importante problema de saúde pública. São lesões causadas, em ocasiões corriqueiras, por fatores térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. Esses elementos possuem ações destrutivas para os constituintes do tecido de revestimento, de abrangência total ou parcial, podendo atingir camadas mais profundas como tecido subcutâneo, ou ainda outros tecidos como músculos, tendões e ossos provocando agravamentos posteriores como a perda de um membro ou até levar o indivíduo ao óbito. Poucas são as doenças que trazem sequelas tão importantes como a queimadura. Mesmo com a sobrevivência física, as cicatrizes e as contraturas culminam, com frequência, na distorção da imagem, que será levada para sempre (RODRIGUES, 2012; GOMES 2016).

As queimaduras são classificadas de acordo com a sua profundidade e tamanho, sendo geralmente mensuradas pelo percentual da superfície corporal acometida, de acordo com graus de 1 a 3 (Tabela 1).

**Tabela 1 - Classificação das queimaduras quanto à profundidade da lesão**

Grau	Características
1°	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não sangra, geralmente seca;</li> <li>• Rosa e toda inervada;</li> <li>• Não passam da epiderme;</li> <li>• Queimadura de sol (por exemplo);</li> <li>• Hiperemia (vermelhidão);</li> <li>• Dolorosa</li> </ul>
2°	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atinge a derme;</li> <li>• Úmida;</li> <li>• Presença de flictenas (bolhas);</li> <li>• Rosa, hiperemia (vermelhidão);</li> <li>• Dolorosa;</li> <li>• Cura espontânea mais lenta, com possibilidade de formação de cicatriz</li> </ul>
3°	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atinge todos os apêndices da pele;</li> <li>• Ossos, músculos, nervos e vasos;</li> <li>• Pouca ou nenhuma dor;</li> <li>• Úmida;</li> <li>• Cor branca, amarela ou marrom;</li> <li>• Não cicatriza espontaneamente, necessita de enxerto</li> </ul>

Fonte: <http://sbqueimaduras.org.br/queimaduras-conceito-e-causas/>.

Ainda segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, a de 1° grau não produz bolhas e, apesar da vermelhidão local, há palidez na pele quando tocada. Geralmente melhoram no intervalo de 3 a 6 dias, podendo descamar e não deixam sequelas. Normalmente são casos que não chegam à emergência. A lesão de 2° grau atualmente é dividida em 2° grau superficial e 2° grau profundo. A superficial é aquela que envolve a epiderme e a porção mais superficial da derme, a cura é mais demorada em relação à queimadura de 1° grau, podendo levar até 3 semanas. Já as queimaduras de 2° grau profundas são aquelas que acometem toda a derme, sendo semelhantes às de 3° grau. Como há risco de destruição das terminações nervosas da pele, este tipo é bem mais grave, pode até ser menos doloroso que as queimaduras mais superficiais. As glândulas sudoríparas e os folículos capilares também podem ser destruídos,

fazendo com a pele fique seca e perca seus pelos. A cicatrização demora mais que 3 semanas e costuma deixar cicatrizes. As queimaduras de 3º grau são profundas e acometem toda a derme e atingem tecidos subcutâneos, com destruição total de nervos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e capilares sanguíneos, podendo inclusive atingir músculos e estruturas ósseas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS, 2017).

O tempo necessário para a cura da queimadura é um dos principais fatores que determina o desenvolvimento de complicações. Para evitar um efeito em cadeia que leve ao óbito ou o agravamento do quadro clínico, se faz necessário observação e controle constantes da ferida e do paciente. Contudo, os avanços no tratamento de queimados têm reduzido as taxas de letalidade e melhorado a qualidade de vida das vítimas, apesar das complicações infecciosas continuarem sendo um desafio e uma das principais causas de óbito do queimado. Além da extensão da superfície corporal queimada, que acarreta alteração estrutural na cobertura cutânea com grande carga de colonização bacteriana, outros fatores favorecem as complicações infecciosas nos queimados: a imunossupressão decorrente da lesão térmica, a possibilidade de translocação bacteriana gastrointestinal e a internação prolongada. O uso de cateteres e tubos, ou seja, os procedimentos invasivos diagnósticos e terapêuticos que levam ao comprometimento das defesas naturais do hospedeiro também favorecem a ocorrência de infecção (MACEDO e SANTOS, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o controle de infecção é uma medida que contribui para a redução significativa da morbidade de pacientes com queimaduras com ampla extensão. Portanto, a frequente avaliação microbiológica da ferida é necessária em pacientes queimados internados para que se mantenha um acompanhamento adequado para o controle de infecção (HENRIQUE et al., 2013; MACEDO e SANTOS 2006).

O esforço no desenvolvimento para o tratamento das queimaduras está direcionado na melhora, de longo prazo, do quadro clínico e aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes queimados. Neste sentido, para que ocorra à restauração oportuna das funções básicas da pele, como as proteções mecânicas e contra agentes patógenos, os substitutos cutâneos apresentam-se como uma eficiente alternativa terapêutica para os queimados (HALIM et al., 2010; ALRUBAIY e AL-RUBAIY, 2009).

### **2.3 Substitutos cutâneos**

Os substitutos cutâneos são utilizados no sentido de restaurar, manter ou melhorar estrutural e funcionalmente tecidos lesionados (SOUZA, 2011). São projetados visando à

isenção de toxicidade e apirogenia (OSMAN; SOUZA; DOLCI, 2007). Em casos de grandes áreas queimadas apresentam importante função ao cobrir a lesão quando a área doadora é insuficiente (WUNDERLICH et al., 2011). 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).

A aplicação dos substitutos de pele requer considerações prévias importantes para o adequado tratamento da lesão. Fatores como profundidade da queimadura, probabilidade de infecção da ferida, local da queimadura, probabilidade de contratura e custo relativo. Os substitutos devem fornecer uma solução para cobrir a ferida, reduzir ou remover fatores inibidores de cicatrização e redução da resposta inflamatória (HALIM et al., 2010; ALRUBAIY e AL-RUBAIY, 2009).

Quando se trata de substituto cutâneo, 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.

Segundo Halim et al. (2010), o substituto cutâneo considerado ideal deve possuir propriedades comparáveis às da pele humana além de características como prevenção contra perda de água, capaz de suportar as forças de cisalhamento, custo efetivo, matéria prima

amplamente disponível, longa vida útil e facilidade de armazenagem, espessura flexível, boa conformidade em superfícies irregulares e fácil aplicação.

Os substitutos de pele podem ser utilizados para a cobertura permanente da área lesionada ou serem semipermanentes ficando aderidos por semanas ou meses, até que um substituto definitivo esteja disponível. Podem ainda fornecer uma barreira mecânica até que ocorra a cicatrização normal, sendo classificados como temporários (DADALTI et al., 2007).

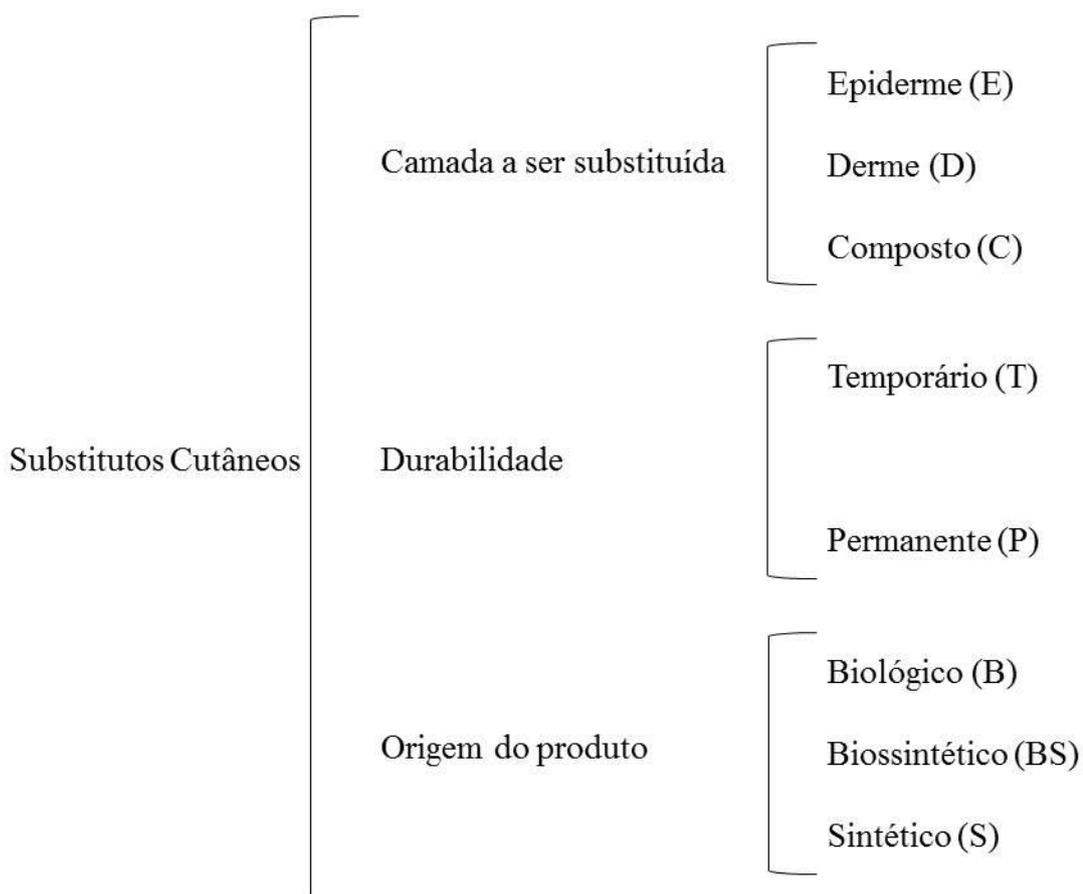
Uma vantagem adicional dos substitutos temporários de pele é a sua transparência, o que permite o acompanhamento diário, com observação do aspecto da região, possibilitando a detecção precoce de complicações (COELHO; RESENDE; TENÓRIO, 1999). Além disso, não oferecem grandes riscos de rejeição, uma vez que o período de permanência no local lesionado é curto (RODRIGUES, 2012).

Ao tradicional uso de algodão, gazes e ataduras, usados como materiais no auxílio de tratamento de feridas foram adicionados substâncias com o intuito de prevenir e controlar infecções microbianas, como iodo, prata, biguanida, hexametileno. Atualmente, novos tipos de materiais têm sido desenvolvidos para auxiliar no tratamento das lesões de pele, como os polímeros naturais ou ainda a associação entre polímeros naturais e sintéticos. No geral esses materiais são utilizados por apresentarem características desejáveis como substituto de pele devido sua: biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, acelerar a proliferação celular, apresentar função antibacteriana (GOMES, 2016).

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).

Nesse contexto, Ferreira et al. (2011) propõem que os substitutos cutâneos podem ser classificados segundo três critérios: camada da pele a ser substituída, subdivididos em epidérmicos (E), dérmicos (D) e compostos dermoepidérmicos (C); durabilidade no leito da ferida, subdivididos em temporários (T) e permanentes (P); e origem do material constituinte, subdivididos em biológicos (B), biossintéticos (BS) e sintéticos (S) (Figura 1).

**Figura 1 – Classificação dos substitutos cutâneos**



Fonte: Ferreira et al. (2011).

## 2.4 Biomateriais

Biomaterial é definido 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; CHRISEY et al., 2003; OLIVEIRA, 2010; MEYER, 2012). Eles também são destinados a interagir com sistemas biológicos, permitindo que estruturas e combinação de dispositivos interajam ativamente com o corpo (BINYAMIN; SHAFI; MERY, 2006).

Um biomaterial deve ter a capacidade de apresentar resposta adequada a uma situação específica, além de ser aceito pelos tecidos próximos e pelas demais partes do corpo, ou seja, o material deve ser biocompatível, não devendo produzir irritação, infecções, o que pode levar a rejeição (SHIRANE et al., 2010). Todos eles são desenvolvidos objetivando a manutenção ou a melhoria na qualidade de vida do paciente. Eles podem ser constituídos por metais,

cerâmicas, polímeros ou compósitos, que se trata da combinação de mais de um material (CORREA; VICENTE; GRANDINI, 2013; GIL; FERREIRA, 2006).

Dentre os biomateriais, os polímeros se destacam pela sua versatilidade e custo de fabricação.

## 2.5 Polímeros

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).

Tem como definição pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), substâncias químicas compostas de moléculas, caracterizadas pela repetição sucessiva de uma ou mais espécie de átomos ou grupamento de átomos, que formam unidades constitucionais ligadas entre si em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades que não varia notavelmente com a adição ou remoção de uma ou de algumas (poucas) unidades constitucionais, podendo ser obtidos de forma sintética ou natural (PAOLI, 2008).

Os polímeros podem ser material orgânico ou inorgânico. Polímeros orgânicos são constituídos basicamente de átomos de carbono e hidrogênio ligados entre si por ligações covalentes, apresentando características como baixa densidade, pequena resistência à temperatura, baixas condutividades elétrica e térmica (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). Já os polímeros inorgânicos não possuem átomos de carbono em sua cadeia principal, podendo essa ser constituída de silício, fósforo, oxigênio, entre outros (MARK; ALLCOCK; WEST, 2005).

Quanto a sua origem, os polímeros podem ser de origem sintética ou natural apresentando vasta versatilidade em usos e aplicações. Seu uso na forma de biomateriais vem de longa data auxiliando o tratamento e reabilitação em pacientes acometidos por danos internos e externos ao corpo (VILLANOVA et al., 2010; BLAINE, 1947).

As proteínas e polissacarídeos de origem biológica, presentes na totalidade dos organismos vegetais (como celulose e amido), algas (como alginato de sódio e agar), animais (como colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs), ácido hialurônico) e outros como polihidroxialcanoatos (PHA) que são produzidos por algumas gêneros de bactérias e acumulados como reserva energética e fonte de carbono são considerados polímeros naturais (ROCHA JUNIOR, 2005; RATNER et al., 2004).

Quando naturais, os polímeros apresentam 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 biodegradabilidade. Essas características favorecem seu uso como biomateriais. De acordo com Santos Jr. e Wada (2007) polímeros naturais são muito estudados quando se visa à restauração da pele.

Dentre os polímeros naturais encontra-se a agarose que é o principal componente do ágar. Este é composto principalmente pela agarose e por agaropectina, sendo a agarose responsável por aproximadamente 70% (m/m) do total de sua composição (ONOFRE, 2014).

A agarose é um biopolímero linear, rico em grupos hidroxilas (OH) e composto de subunidades de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopiranosose. É extraída de algas vermelhas e não possui citotoxicidade, além de que, por ser um polissacarídeo termossensível, quando aquecido em água a 90 °C, o pó da agarose se dissolve, assumindo a forma de gel ou filme quando a temperatura atinge cerca de 35 °C. Contudo, se aquecido novamente, volta ao seu estado líquido (SANTANA, 2015).

Este polímero possui aplicações em diversas áreas, podendo ser utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. No campo biomédico, como biomaterial, a agarose vem sendo amplamente aplicada como uma matriz para imobilização de biomoléculas (tais como enzimas, anticorpos e antígenos) ou nanopartículas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; RAPHAEL, 2010).

Alguns estudos recentes demonstram a possibilidade de incorporar a matriz de agarose, na forma de filme, certas substâncias a fim de melhorar suas propriedades físicas e químicas. Santana (2015) desenvolveu filmes de agarose com incorporação de ciprofloxacina a fim de se obter substitutos temporários de pele com atividade antimicrobiana. Onofre (2014) e Rhim et al. (2013) também desenvolveram filmes de agarose, nos quais foram incorporadas nanopartículas de prata, com o intuito de introduzir propriedades antimicrobianas ao polímero. Pasquine et al. (2012) desenvolveram filmes de agarose incorporando nanocristais de celulose, melhorando assim suas propriedades mecânicas. Giménez et al. (2013) elaboraram formulações filmogênicas com incorporação de extrato de chá verde. Su et al. (2013) realizaram a dopagem da agarose com dopamina a fim de promover uma superfície ideal para a utilização desse sistema como *scaffold* para cultura de células.

Devido a suas inúmeras aplicações, muitos estudos são desenvolvidos buscando melhor conhecimento sobre as propriedades da agarose, sendo esta uma alternativa na preparação de novos materiais para aplicações biomédicas.

## 2.6 Nanopartículas de Prata

Nano é um prefixo que vem do grego antigo e significa “anão”. Em nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo de metro, ou seja,  $10^{-9}$  m. Objetos destas dimensões podem ter propriedades físicas completamente diferentes de seus análogos macroscópicos, permitindo, assim, novas aplicações. Sabendo que essas propriedades dos materiais em escala nanométrica dependem do seu tamanho e forma, os cientistas conseguem um grau de controle das suas propriedades físicas e químicas tão alto, como nunca se tinha feito antes (GOTO 2011).

O estudo destes materiais em escala nanométrica vem sendo cada vez mais explorado. As nanopartículas, por exemplo, 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).

Dentre as nanopartículas metálicas, existem as nanopartículas de prata (NPsAg). O efeito antimicrobiano da prata é reconhecido há muito anos. Na antiguidade, a mesma era utilizada no tratamento de queimaduras e como agente quimioterápico contra patologias provocadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus*. Após a descoberta da penicilina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu consideravelmente. Porém, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em virtude do desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

As soluções coloidais de NPsAg, devido à alta relação área por volume, apresentam propriedades antimicrobianas contra diversos tipos de micro-organismos, tais como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. A Medicina tem demonstrado que a prata aniquila mais de 650 agentes patogênicos e não proporciona o desenvolvimento de resistência (PETICA et al., 2008).

Partículas de prata em dimensões maiores (micrométricas) causam a obstrução das membranas celulares, promovendo um envenenamento por prata, conhecido por argiria. Isto não acontece com o uso de partículas de prata em dimensões nanométricas. Essas partículas são tão finamente dispersas e estão em baixa concentração que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos organismos superiores, visto que a

concentração efetiva para a atuação contra micro-organismos é de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  e a concentração tóxica para os seres humanos é de  $10 \text{mg.L}^{-1}$  (ZARPELON, 2013).

NPsAg tem sido sintetizadas por técnicas físico-químicas como redução química, radiação de raios gama, micro emulsão, método eletroquímico, ablação a laser, autoclave, micro-ondas e redução fotoquímica (SRIKAR et al., 2016).

O método mais utilizado para síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) é o de redução química obtendo uma solução coloidal estável em água ou solventes orgânicos. Os redutores frequentemente usados são borohidreto, citrato, ascorbato e hidrogênio elementar. A redução de íon prata ( $\text{Ag}^+$ ) promove a formação de átomos de prata ( $\text{Ag}^0$ ), seguido pela aglomeração de partículas que em solução aquosa geralmente produz prata coloidal. Quando as partículas coloidais são muito menores do que o comprimento de onda da luz visível, as soluções apresentam cor amarela com uma banda intensa entre 380 - 400 nm e outras bandas menos intensas ou menores em mais comprimento de onda no espectro de absorção (SHARMA, 2009).

## 2.7 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

A *Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma planta pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente como jambolão, jamelão, azeitona-preta, azeitona-roxa, jamon, entre outras denominações. É uma planta nativa da Indomálasia e China sendo encontrada em vários países inclusive no Brasil (LORENZI e MATOS, 2002). Árvore de grande rusticidade e de rápido crescimento é amplamente plantada em beira de estradas. Apesar de sua origem tropical pode ser cultivada em todo o território brasileiro. Aprecia solos úmidos e o calor, tornando-se subspontânea em muitas regiões (LORENZI e TORRES, 2003). Suas sementes possuem ácido gálico e elágico, além deste fato essa planta também apresenta uma gama variada de antocianinas e altas taxas de compostos fenólicos (AYYANAR et al., 2012).

A árvore frondosa produz pequenos frutos ovóides, que são roxos quando maduros, parecidos com uma azeitona. O sabor é suave, sem aroma característico forte, embora um pouco adstringente ao paladar (AGOSTINI-COSTA e SILVA, 2008).

No jambolão são encontradas substâncias químicas denominadas fitoquímicos ou compostos secundários. Estas substâncias são produzidas naturalmente pelas plantas para se protegerem do ataque de pragas e doenças e também ajudam a suportar as condições adversas do ambiente. Muitos destes fitoquímicos atuam na prevenção e no combate de doenças crônicas como o câncer e as doenças cardiovasculares. Exemplos de fitoquímicos encontrados

nas diferentes partes da planta são flavonóides como as antocianinas, a quercetina, a rutina a mirecetina com seus glicosídeos (açúcares) e os taninos hidrolisáveis. Ainda a presença do polifenol, ácido elágico, deve ser considerada por ser uma substância comprovadamente eficaz na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (VIZZOTTO e FETTER, 2009).

Devido à grande diversidade de micro-organismos resistentes a antimicrobianos já conhecidos, muitos trabalhos têm sido realizados na busca de novos fármacos de ocorrência natural com potencial atividade antimicrobiana. Extratos de plantas apresentam capacidade de controlar o crescimento de uma ampla variedade de espécies de micro-organismos, mostrando bom potencial de aplicação contra diversos micro-organismos. Pesquisas sobre as atividades de extratos de plantas têm sido desenvolvidas em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, devido a possuírem uma grande diversidade de flora e uma tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (SILVA JÚNIOR et al., 2009).

As propriedades farmacológicas do jambolão são conhecidas por apresentar potencial antidiabético (MIGLIATO et al., 2006), além de serem comprovadas a sua ação anti-inflamatória (MURUGANANDAN et al., 2001; LIMA et al., 2007), antioxidante e antimicrobiana (MOHAMED et al, 2013). Estas propriedades fizeram com que esta planta fosse incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho estão apresentados abaixo.

#### 3.1 Objetivo Geral

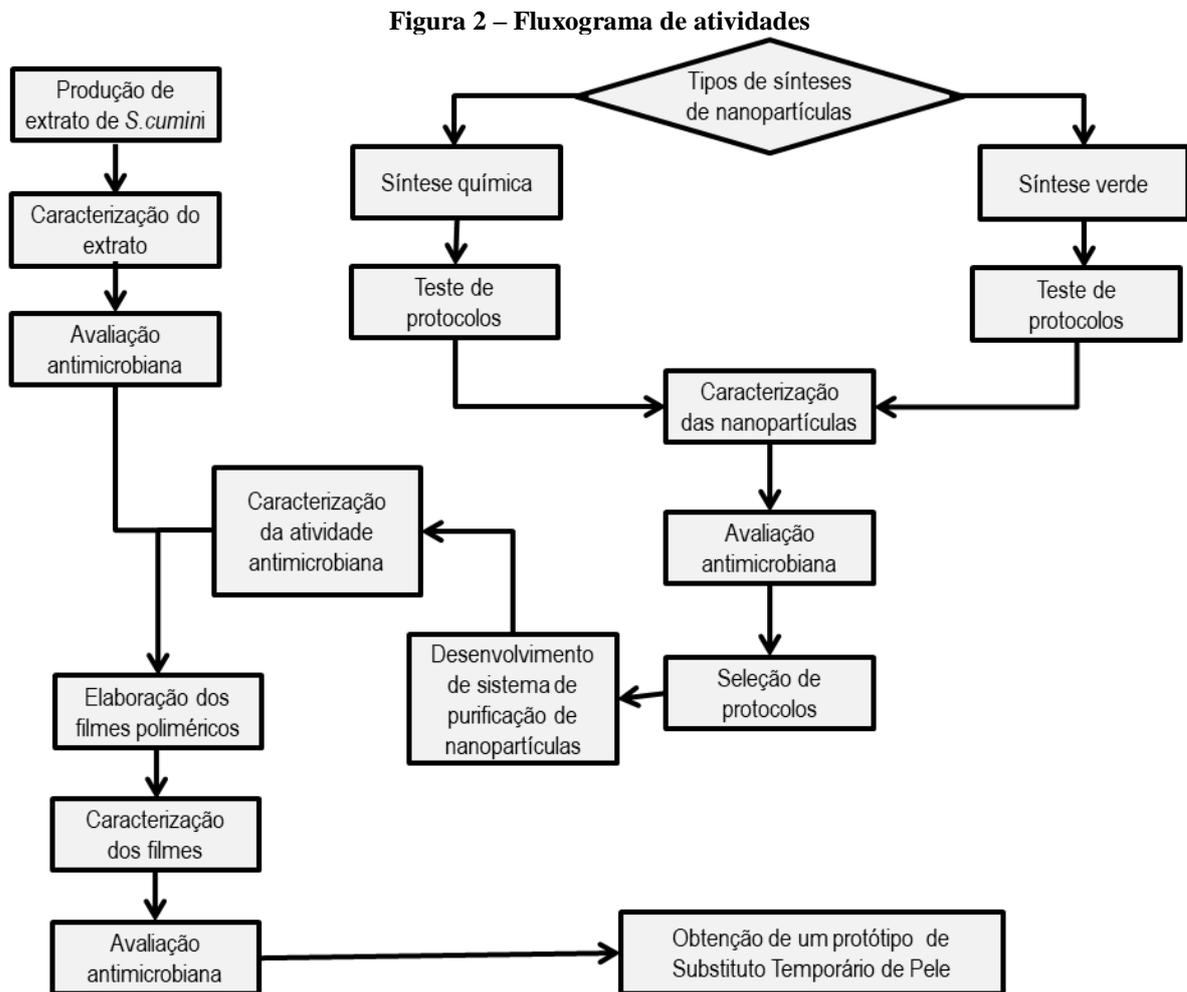
Elaborar e caracterizar filmes poliméricos baseados em agarose com incorporação de nanopartículas de prata NPsAg e/ou extrato de *S. cumini* visando desenvolver substitutos de pele.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o potencial antimicrobiano do extrato alcóolico de folhas de *Syzygium cumini*;
- Realizar e avaliar as sínteses química e verde de nanopartículas de prata;
- Desenvolver método de estabilização de NPsAg de síntese química e caracterizar a sua atividade antimicrobiana em meio aquoso e semi-sólido;
- Elaborar filmes de agarose com e sem incorporação de NPsAg e extrato de *S. cumini*; realizar a caracterização dos filmes produzidos através de métodos espectroscópicos convencionais e físico-químicos;
- Analisar os efeitos das NPsAg e do extrato de *S. cumini* na atividade antimicrobiana dos filmes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Visando elaborar um plano de ação foi confeccionado um esquema onde se pode observar as principais etapas para a obtenção de um substituto temporário de pele baseado em um compósito com matriz polimérica em agarose, acrescida de nanopartículas de prata e extrato de *S. cumini* (Figura 2).



Fonte: A autora.

### 4.1 Preparação do extrato alcoólico de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

No mês de maio de 2016, folhas de *Syzygium cumini* (L.) foram coletadas de árvores situadas em frente ao Departamento de Terapia Ocupacional (DTO) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (8°03'16.5''S 34°57'00.6''W), situado na cidade do Recife.

Após a coleta, as folhas foram selecionadas e separadas, descartando as que não estavam em bom estado. As folhas selecionadas foram lavadas com água corrente e submetidas à secagem em estufa (Tecnal TE-394/3) a 45°C com circulação forçada de ar por 5 dias. Depois de completamente secas, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura e posteriormente trituradas em moinho de facas (Wyllie Macro TE-650) obtendo-se um pó fino de folhas.

Deste pó fino, 200 g foram colocadas num percolador e embebidas em 2 L de álcool etílico absoluto 99,8% - P.A. A.C.S. Após 2 dias foi feita uma primeira filtragem do material, coletando apenas o extrato líquido e embebendo novamente o pó em 2 L de álcool etílico. Foram realizadas 3 filtrações do material e ao final de cada uma delas, o extrato líquido era submetido à destilação a vácuo em evaporador rotativo (Ika RV 10 Control) à uma temperatura de 45°C e disposto em dessecador por 31 dias até peso constante.

Todos os procedimentos de extração foram realizados no Laboratório de Biofísica Química (LBQ) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

## **4.2 Caracterização do extrato alcóolico de *S. cumini***

O extrato vegetal produzido foi caracterizado através da avaliação de propriedades espectroscópicas (UV-Vis e FT-IR).

### **4.2.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

A caracterização por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis do extrato vegetal foi realizada através de análises de varredura na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 700 nm. O extrato foi diluído em álcool etílico para realização da análise.

A análise foi feita utilizando um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Shimadzu UV-1800) que é operado pelo *software* UV Probe presente no Laboratório de Biofísica Química da UFPE. Para a obtenção do gráfico, foi utilizado o *software* OriginLab (version 8).

### **4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)**

Realizou-se também a espectroscopia FT-IR no Laboratório de Biofísica Química da UFPE. Foi utilizado um espectrofotômetro (Agilent Cary 630) módulo ATR. Cada amostra analisada foi prensada e os espectros de transmissão foram coletados mediante resolução de

8,4 scans, sob uma varredura de 4000 a 750  $\text{cm}^{-1}$  de radiação infravermelha. Esta análise teve o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes no extrato alcóolico de *S. cumini*.

### 4.3 Síntese química das nanopartículas de prata

As NPsAg foram sintetizadas quimicamente seguindo o protocolo de Onofre (2014), através da redução de íons de prata, utilizando nitrato de prata P.A. – A.C.S  $\text{AgNO}_3$  (Alphatec) como agente precursor, boroidreto de sódio P.S. -  $\text{NaBH}_4$  (Vetec) como agente redutor e agarose (LW Biotec) como agente estabilizante. Adicionalmente, ascorbato de cálcio (Roval) também foi utilizado como um agente redutor mais brando.

Para síntese, em 5 mL de água Milli-Q foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de agarose. Então, 300  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de  $\text{NaBH}_4$  recém preparada também foram adicionados. Por fim, adicionou-se lentamente e sob agitação, 5 mL de solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$ . O sistema reacional foi deixado em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Ainda para a síntese de NPsAg, utilizou-se um método com dois agentes redutores. O procedimento foi o mesmo descrito anteriormente, contudo após o sistema ter ficado em repouso, adicionou-se ascorbato de cálcio como um agente redutor mais brando do que o borohidreto de sódio.

Foram realizadas 15 formulações desta síntese com diferentes quantidades de ascorbato de cálcio ascorbato e utilizando também diferentes concentrações das soluções de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$  e agarose (Tabela 2).

Tabela 2 - Síntese Química: Concentrações de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$ , agarose e ascorbato de cálcio

Número da Síntese	Variável analisada***	Concentração de $\text{AgNO}_3$ ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	Concentração de $\text{NaBH}_4$ ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	Concentração de agarose - % (m/v)	Quantidade de ascorbato de cálcio (g)****
1		0,00025	0,01	0,05	Sem ascorbato
2	Ascorbato de Cálcio	0,00025	0,01	0,05	0,005
3*		0,00025	0,01	0,05	0,5
4		0,0010	0,01	0,05	Sem ascorbato
5	$\text{AgNO}_3$	0,0030	0,01	0,05	Sem ascorbato
6		0,0040	0,01	0,05	Sem ascorbato
7**		0,0050	0,01	0,05	Sem ascorbato
7**		Ascorbato de Cálcio ( $\text{AgNO}_3$ 0,0050 $\text{mol.L}^{-1}$ )	0,0050	0,01	0,05
8		0,0050	0,01	0,05	0,50
7**		0,0050	0,01	0,05	Sem ascorbato
9	Concentração de Agarose x $\text{NaBH}_4$	0,0050	0,01	0,25	Sem ascorbato
10		0,0050	0,05	0,25	Sem ascorbato
11		0,0050	0,05	0,50	Sem ascorbato
12		Ascorbato de Cálcio ( $\text{AgNO}_3$ 0,0050 $\text{mol.L}^{-1}$ )	0,0050	0,05	0,50
13		0,0050	0,05	0,50	0,050
14	e ( $\text{NaBH}_4$ 0,05 $\text{mol.L}^{-1}$ )	0,0050	0,05	0,50	0,125
15		0,0050	0,05	0,50	0,250

Fonte: A autora.

**Legenda:** \* Síntese original descrita por Onofre (2014)  
 \*\* Síntese que se repetiu como controle  
 \*\*\* Entre parênteses, alterações em relação a Onofre (2014)  
 \*\*\*\* Adicionados ao final aos 5,55ml do meio reacional

Todos os procedimentos das sínteses químicas foram realizados no Laboratório de Biofísica Química (LBQ) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

#### 4.4 Síntese verde das nanopartículas de prata

A síntese verde foi realizada de duas formas diferentes. Primeiro, seguindo o protocolo de Banerjee et al. (2011) modificado, 5 mg do pó fino das folhas de *S. cumini* foram misturados em 100 mL de água destilada e fervido durante 5 minutos, para então decantá-lo. A suspensão foi centrifugada (5000 rpm) numa centrífuga (Hettich Universal 320 R) a 4°C por 15 minutos e em seguida, o volume de extrato foi filtrado utilizando-se um filtro de papel (47 mm). 10 mL do extrato foi adicionado a 90 mL de uma solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (1mM)

para a redução dos íons de  $\text{Ag}^+$  e incubado em temperatura ambiente protegido da luz por 24 horas. Após este período observou-se a mudança de cor. A solução foi então centrifugada (9000 rpm) a  $25^\circ\text{C}$  por 22 minutos para separação das nanopartículas e lavadas 3 vezes com água destilada (denominado **Síntese 16**).

Nanopartículas também foram sintetizadas a partir do protocolo descrito por Kumar et al. (2010) modificado, onde 4 g do pó fino das folhas de *S. cumini* foram misturados em 50 mL de água destilada e incubado por 24 horas em temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada (9000 rpm) a  $4^\circ\text{C}$  por 25 minutos e lavadas 2 vezes com água destilada. O volume de extrato foi ajustado para 50 mL e filtrado através de um filtro  $0,2\ \mu\text{m}$ . 10 mL do extrato foi adicionado a 90 mL de uma solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (1mM) e incubado em temperatura ambiente protegido da luz por 24 horas. Uma mudança de cor foi observada após o período de incubação. Em seguida, a solução foi centrifugada (9000 rpm) a  $25^\circ\text{C}$  por 27 minutos para separação das nanopartículas e lavadas 3 vezes com água destilada (denominado **Síntese 17**).

As sínteses verdes foram realizadas no laboratório de biofísica química (LBQ) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

#### 4.5 Caracterização das nanopartículas de prata

As nanopartículas sintetizadas tanto através da síntese química como pela síntese verde, foram caracterizadas através da avaliação de propriedades espectroscópicas (UV-Vis e FT-IR).

##### 4.5.1 Espectroscopia por Ultravioleta-Visível (UV-Vis) das NPsAg

A caracterização por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis das soluções de NPsAg também foram realizadas através de análises de varredura na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 700 nm a fim de se verificar a formação das nanopartículas.

As análises foram feitas tanto para as nanopartículas obtidas através da síntese verde quanto para as nanopartículas sintetizadas quimicamente (antes e depois do processo de separação das mesmas – item 4.6).

#### 4.5.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia FT-IR foi realizada apenas para as nanopartículas obtidas através da síntese química 7 após o processo de separação (item 4.6). Para a análise as nanopartículas foram ressuspensas em água e secas em desumidificador (Arsec) por 12 horas. Foi utilizado um intervalo de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda.

### 4.6 Separação das NPsAg

O método de separação das NPsAg e o procedimento para análise da sua estabilidade estão descritos a seguir.

#### 4.6.1 Método de separação das NPsAg

O processo de separação de NPsAg de síntese química baseou-se no método de Banerjee et al. (2011) modificado, que foi empregado para NPsAg de síntese verde. Para tanto, as suspensões das nanopartículas sintetizadas quimicamente, após terem sido deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, foram transferidas para microtubos e centrifugadas (Eppendorf® MiniSpin) a 13.400 rpm por 25 minutos. As nanopartículas foram lavadas 2 vezes com água destilada e depois ressuspensa em diferentes solventes para realização de sua caracterização. Os solventes testados para ressuspensão foram: água destilada, solução aquosa de agarose a 0,05% (m/v), álcool etílico absoluto, solução tampão fosfato-salino (PBS) e Dimetilsulfóxido (DMSO). A presença de nanopartículas no sobrenadante e precipitado, após o processo de separação, foi monitorada por análise espectroscópica em UV-Vis (item 4.5.1).

O procedimento de separação das nanopartículas foi realizado no Laboratório de Biofísica Química (LBQ) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

#### 4.6.2 Estabilidade de NPsAg separadas por centrifugação

A estabilidade temporal das NPsAg foi monitorada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis durante 10 dias. O teste foi realizado através de análises de varredura na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 700 nm a fim de se verificar o comportamento da

curva de absorção, em especial o pico gerado em torno de 400 nm (indicativo da presença das nanopartículas de prata).

A formulação de NPsAg escolhida foi a síntese química 7 após processo de separação e ressuspensão de duas formas diferentes, em água destilada e em solução aquosa de agarose. As suspensões foram deixadas em estufa com termoperíodo e fotoperíodo (Eletrolab EL202/3) com luminosidade e temperatura controladas (25°C).

O experimento foi realizado em quintuplicata para três diferentes tratamentos das nanopartículas: ressuspensas em água destilada e mantidas ao abrigo da luz (T1); ressuspensas em agarose e protegidas da luz (T2); ressuspensas em agarose, mas expostas a luminosidade (lâmpada fluorescente branca 20 W) 24 horas (T3).

#### 4.7 Atividade Antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato alcóolico de *S. cumini* e das nanopartículas de prata (síntese química e verde) utilizando bactérias e leveduras da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) (Tabela 3), estes são representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes e leveduras. Os micro-organismos selecionados são de importância clínica, indicadores ou modelo de patogenicidade, sendo que alguns destes são relevantes em queimaduras e feridas de pele.

**Tabela 3 - Bactérias e leveduras utilizadas da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA)**

<b>Código UFPEDA</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>Grupo</b>
UFPEDA 01	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positiva
UFPEDA 06	<i>Micrococcus luteus</i>	Gram positiva
UFPEDA 16	<i>Bacillus subtilis</i>	Gram positiva
UFPEDA 39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram negativa
UFPEDA 71	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Álcool-ácido resistente
UFPEDA 138	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram positiva
UFPEDA 224	<i>Escherichia coli</i>	Gram negativa
UFPEDA 398	<i>Serratia marcescens</i>	Gram negativa
UFPEDA 1007	<i>Candida albicans</i>	Levedura

**Fonte: A autora.**

As análises microbianas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Antibióticos da UFPE.

#### 4.7.1 Atividade Antimicrobiana do extrato de *S. cumini* e das nanopartículas de prata

As atividades antimicrobianas do extrato e das nanopartículas foram avaliadas pelos métodos de difusão em disco e difusão em poço.

##### *Difusão em disco*

Para o teste de atividade antimicrobiana utilizando-se o método de difusão em disco foram cortados discos de papel-filtro esterilizado e com 6 mm de diâmetro de cada. Aos discos, e com pipeta de volume fixo, foi transferido 20  $\mu\text{L}$  de cada formulação de NPsAg (síntese química) e 20  $\mu\text{L}$  de uma solução (0,1  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do extrato alcóolico de *S. cumini* dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para os discos de papel-filtro.

Utilizando-se pinça esterilizada, os discos, previamente impregnados com as soluções do extrato e das nanopartículas foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do meio de cultura em placas de Petri preparadas antecipadamente e semeado com as suspensões microbianas utilizando um “swab” estéril e deixadas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos. As suspensões microbianas foram padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mcfarland, que corresponde a aproximadamente  $10^8$  UFC. $\text{mL}^{-1}$  para bactérias. As placas foram incubadas a 37° C, por 24 horas para bactérias e 48 horas para a levedura. Após o período de incubação, o halo de inibição do crescimento formado em volta do disco foi medido utilizando régua milimetrada. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada um dos micro-organismos.

Foram selecionadas as sínteses químicas 3, 4, 7 e 8 para a análise pelo método de difusão em disco (Tabela 4). Ainda para as formulações 3 e 4 da síntese química realizou-se os mesmos procedimentos uma segunda vez. Contudo, foram pipetados nos discos 10  $\mu\text{L}$  de NPsAg e 10  $\mu\text{L}$  de uma solução (0,1  $\text{g}/\text{mL}$ ) do extrato alcóolico de *S. cumini* dissolvido em DMSO.

**Tabela 4 - Formulações de NPsAg (síntese química) utilizadas no teste antimicrobiano pelo método de difusão em disco**

Síntese Química	Concentração de AgNO <sub>3</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de NaBH <sub>4</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de agarose - % (m/v)	Quantidade de ascorbato de cálcio (g)
3*	0,00025	0,01	0,05	0,5
4	0,0010	0,01	0,05	Sem ascorbato
7	0,0050	0,01	0,05	Sem ascorbato
8	0,0050	0,01	0,05	0,5

Fonte: A autora.

Legenda: \* Síntese original descrita por Onofre (2014).

Para a formulação 3 da síntese química com adição do extrato vegetal, os testes com os micro-organismos *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis* e *S. marcescens* não foram realizados. Para as formulações 7 e 8 da síntese química e formulações os testes não foram realizados para o micro-organismo *E. faecalis*.

#### *Difusão em poço*

Foram feitos poços de 6 mm de diâmetro nas placas contendo meio de cultura sólido e preparadas antecipadamente. Com um swab estéril, o inóculo microbiano com turvação 0,5 da escala de MacFarland foi distribuído uniformemente sobre a superfície do meio, deixadas em repouso em temperatura ambiente, por aproximadamente 3 minutos. Dispensou-se em cada poço, 100 µL de cada amostra. As placas foram incubadas em estufa a 37° C, por 24 horas para bactérias e 48 horas para a levedura. Mediu-se em milímetros o halo de inibição do crescimento, utilizando régua milimetrada. Os testes foram realizados em triplicata.

Para a realização deste ensaio foram utilizados, solução do extrato alcóolico de *S. cumini* (0,015 g.mL<sup>-1</sup>) dissolvido em DMSO, sínteses verdes 16 e 17, sínteses químicas 7 e 8 (Tabela 5).

**Tabela 5 - Formulações de NPsAg (síntese química) utilizadas no teste antimicrobiano pelo método de difusão em poço**

Síntese Química	Concentração de AgNO <sub>3</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de NaBH <sub>4</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de agarose - % (m/v)	Quantidade de ascorbato de cálcio (g)
7	0,0050	0,01	0,05	Sem ascorbato
8	0,0050	0,01	0,05	0,5

Fonte: A autora.

Para o extrato de *S. cumini* os testes não foram realizados para o micro-organismo *S. aureus*. Para as sínteses química 7 e 8 não foi testado o micro-organismo *E. faecalis*. Já para as sínteses verde 16 e 17, o teste foi excepcionalmente realizado no Laboratório de Biofísica-Química do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE apenas com o micro-organismo *C. albicans* linhagem UFPEDA 1007, cedido gentilmente pela Profa. Dra. Adriana Fontes.

#### 4.7.2 Caracterização da atividade antimicrobiana das NPsAg estabilizadas

Com a finalidade de verificar quais os componentes da síntese química das NPsAg eram ativos, foram realizados ensaios com frações centrifugadas (descrito no item 4.6.1). A presença de NPsAg foi monitorada por espectroscopia UV-Vis de acordo com o item 4.5.1.

As atividades antimicrobianas das frações centrifugadas foram avaliadas pelos métodos de difusão em poço e difusão em meio líquido.

##### *Difusão em poço*

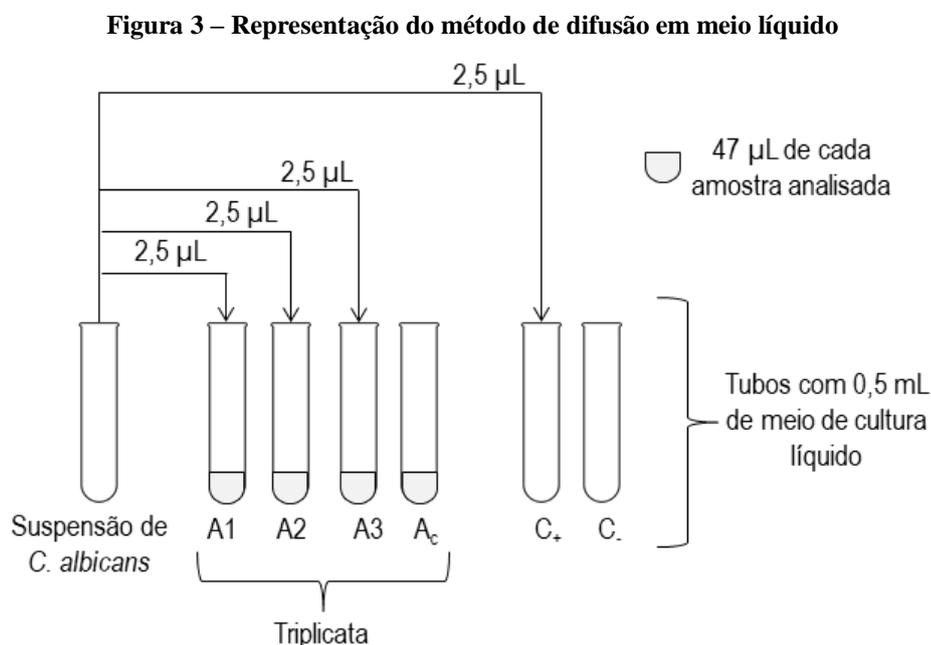
O teste utilizando o método de difusão em poço seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 4.6.1. Para o ensaio com NPsAg estabilizadas foram testadas: solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  ( $0,0050 \text{ mol.L}^{-1}$ ), síntese química 7 após processo de separação e ressuspensão em água destilada (item 4.6.1), além do sobrenadante resultante do primeiro processo de centrifugação. Para este método não foi utilizado o micro-organismo *S. aureus*.

##### *Difusão em meio líquido*

A avaliação da atividade antimicrobiana foi ainda realizada através do um método de difusão em meio líquido utilizando a levedura *C. albicans* linhagem UFPEDA 1007 (cedida por Adriana Fontes) no Laboratório de Biofísica-Química do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Para este método foram selecionadas três amostras: solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  a  $0,0050 \text{ mol.L}^{-1}$  (A1), síntese química 7 após processo de separação (item 4.6.1), e ressuspensão em água destilada (A2) e o sobrenadante do processo de centrifugação (A3).

A partir da suspensão microbiana com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, 2,5  $\mu\text{L}$  desta suspensão foram adicionados a tubos contendo 0,5 mL de meio de cultura *Sabouraud* líquido. Aos tubos foram então adicionados 47  $\mu\text{L}$  de cada uma das

amostras analisadas. Além disso, foi realizado o controle positivo ( $C_+$ ), com tubos contendo 0,5 mL de meio de cultura líquido e 2,5  $\mu\text{L}$  da suspensão do micro-organismo; controle negativo ( $C_-$ ), contendo apenas 0,5 mL de meio de cultura; controle da amostra ( $A_c$ ), contendo 0,5 mL de meio de cultura com 47  $\mu\text{L}$  de cada amostra. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas e o experimento foi realizado em triplicata (Figura 3).



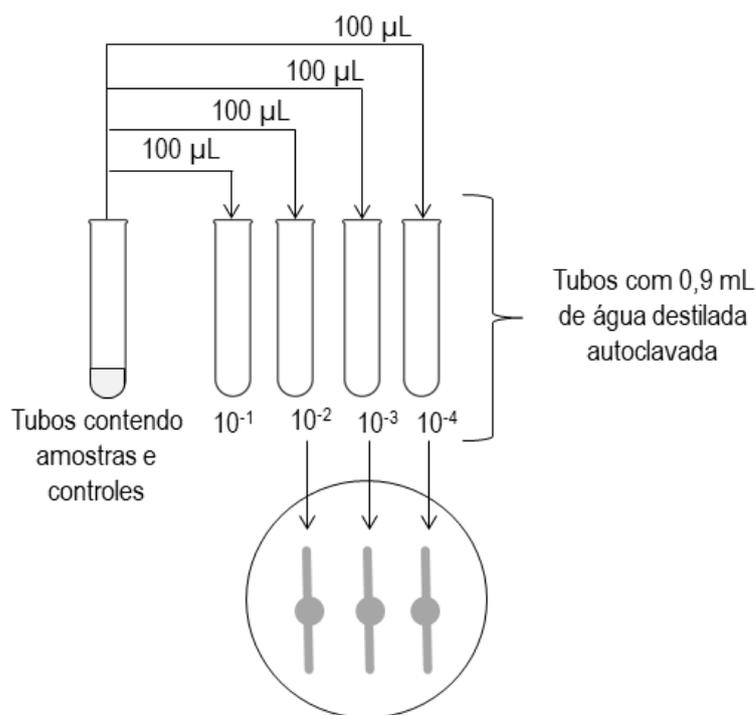
Fonte: A autora.

**Legenda:**

- A1 –  $\text{AgNO}_3$ ;
- A2 – NPsAg estabilizadas;
- A3 – Sobrenadante;
- $A_c$  – Meio de cultura + amostra (controle da amostra);
- $C_+$  - Meio de cultura + micro-organismo (controle positivo);
- $C_-$  - Meio de cultura (controle negativo).

Após o período de incubação, foram realizadas comparações entre a turbidez dos tubos contendo as amostras e a turbidez dos tubos com os controles. Em seguida, foram feitas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  de todos os tubos e alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  das diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  de todas as amostras e controles foram semeadas em estrias em uma placa de Petri contendo meios de cultura (Figura 4). Estas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, procedendo-se a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

**Figura 4 – Representação das diluições seriadas e semeio em estrias**



Fonte: A autora.

#### 4.8 Elaboração dos filmes poliméricos

Os filmes elaborados estão sumarizados na tabela 6. As formulações que envolvem síntese química de NPsAg (filmes F3, F4 e F6) foram obtidas pela síntese química 7 estabilizadas de acordo com o processo descrito no item 4.6.1 (centrifugadas e ressuspensas em água destilada).

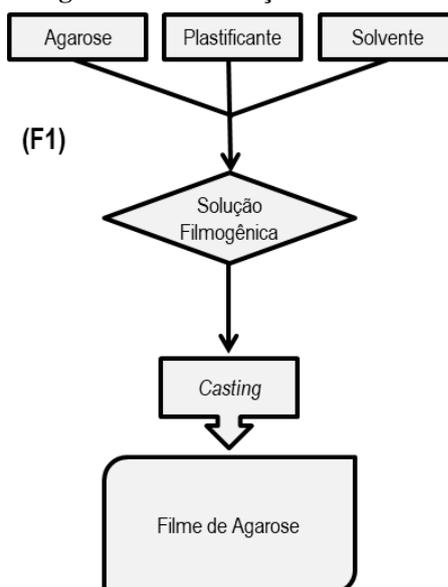
**Tabela 6 – Formulações dos filmes caracterizados**

Filmes	Formulação
F1	Agarose
F2	Agarose + Solução de AgNO <sub>3</sub>
F3	Agarose + NPsAg (Síntese química 7 incorporada)
F4	Agarose + NPsAg (Síntese química 7 na superfície)
F5	Agarose + Extrato de <i>S. cumini</i> (0,015 g.mL <sup>-1</sup> )
F6	Agarose + NPsAg (Síntese química 7 na superfície) + Extrato de <i>S. cumini</i> (0,015 g.mL <sup>-1</sup> )
F7	Agarose + NPsAg (Síntese verde 16 segundo Banerjee et al. 2011 modificado)
F8	Agarose + NPsAg (Síntese verde 17 segundo Kumar et al. 2010 modificado)

Fonte: A autora.

Todos os filmes foram elaborados a partir de uma solução de agarose dissolvida em água destilada e aquecida em micro-ondas por aproximadamente 2 minutos. Em seguida acrescentou-se glicerol P.A. – A.C.S (Alphatec) como agente plastificante. As soluções foram vertidas em placa de Petri de plástico de 60 x 15 mm e colocadas em estufa a 45°C com circulação forçada de ar por 24 horas, ou seja, foram secas através técnica de “casting”. Para a matriz polimérica de todos os filmes foram utilizados 0,006 g.cm<sup>-2</sup> de agarose, 0,006 g.cm<sup>-2</sup> de glicerol e 0,500 mL.cm<sup>-2</sup> de água destilada (Figura 5, F1).

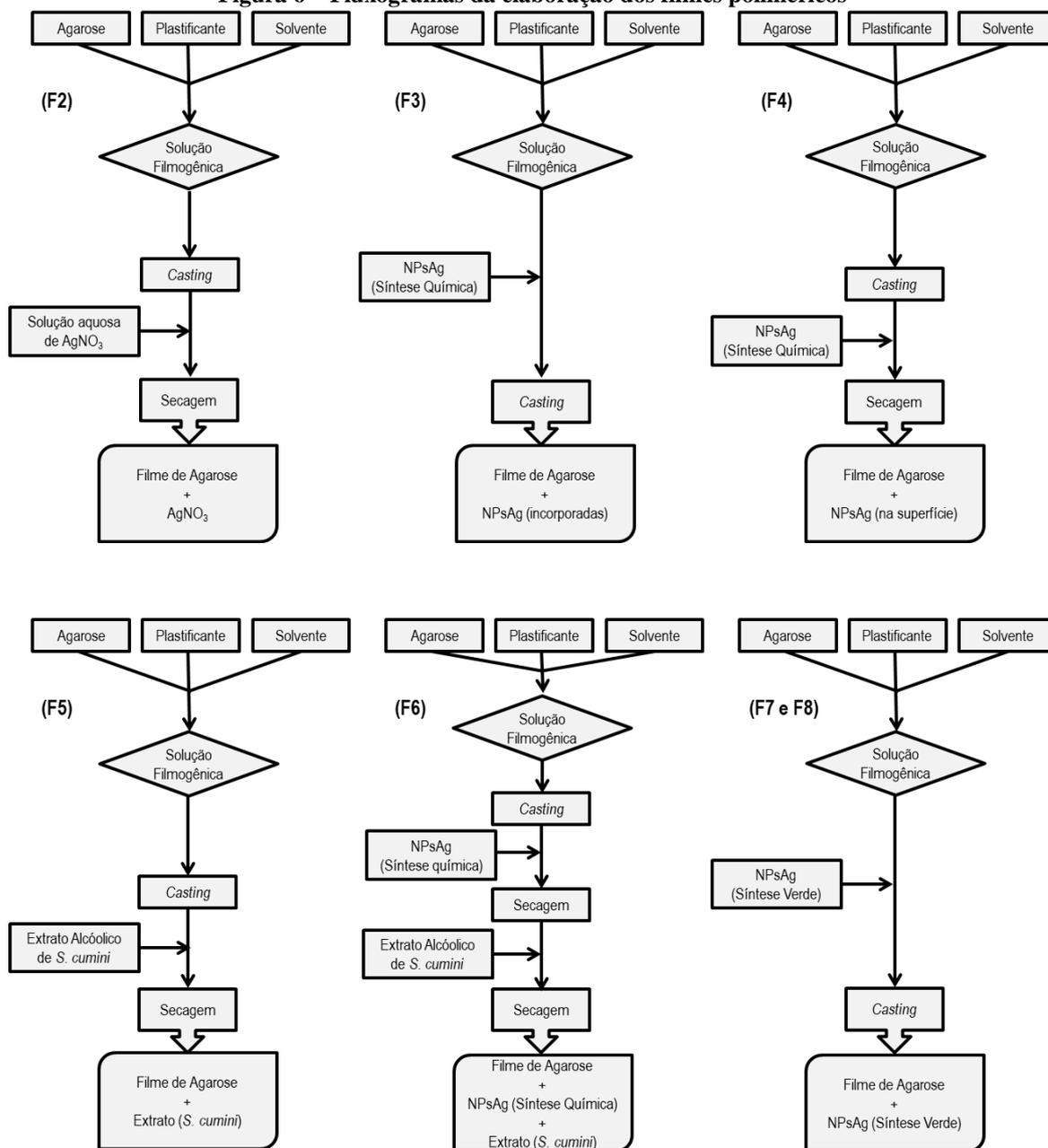
**Figura 5 - Fluxograma da elaboração do filme base de agarose**



**Fonte: A autora.**

Os filmes foram produzidos com diferentes tratamentos para a análise dos efeitos (isoladamente ou em conjunto) das NPsAg e do extrato de *S. cumini*. As formulações elaboradas foram: filme somente de agarose (Figura 5, F1), filme de agarose com extrato alcóolico de *S. cumini* (Figura 6, F5), filme de agarose com AgNO<sub>3</sub> (Figura 6, F2), filme de agarose com incorporação de NPsAg sintetizadas quimicamente (Figura 6, F3), filme de agarose com deposição de NPsAg sintetizadas quimicamente (Figura 6, F4), filme de agarose com NPsAg por síntese verde (Figura 6, F7 e F8), filme de agarose com NPsAg sintetizadas quimicamente e extrato alcóolico de *S. cumini* (Figura 6, F6).

**Figura 6 – Fluxogramas da elaboração dos filmes poliméricos**



Fonte: A autora.

Para os filmes contendo agarose com NPsAg obtidas tanto através da síntese química como da síntese verde,  $0,320 \text{ mL.cm}^{-2}$  da solução aquosa das mesmas foram incorporadas na solução filmogênica de agarose antes do processo de secagem por “casting”. Para as NPsAg sintetizadas quimicamente outro procedimento também foi realizado, onde a solução de NPsAg foram incorporadas à superfície do filme após o processo de secagem por “casting” e levado novamente à estufa por mais 24 horas a  $45^\circ\text{C}$  para secagem completa. Obteve-se, desta forma, dois tratamentos distintos para os filmes de agarose com NPsAg de síntese química: um com as nanopartículas na superfície e outro com as nanopartículas incorporadas.

Para os filmes de agarose com NPsAg (síntese química) e extrato de *S. cumini*, primeiro  $0,320 \text{ mL.cm}^{-2}$  da solução de NPsAg foi incorporado à superfície do filme de agarose como descrito anteriormente e após o segundo processo de secagem,  $0,320 \text{ mL.cm}^{-2}$  de uma solução alcóolica do extrato ( $0,015 \text{ g.mL}^{-1}$ ) foi vertida sobre à superfície do filme, e este, seco mais uma vez.

Já para os filmes de agarose com nitrato de prata,  $0,320 \text{ mL.cm}^{-2}$  de uma solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  ( $0,0050 \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi vertida sobre a superfície do filme de agarose seco e então levado à estufa a  $45^\circ\text{C}$  mais uma vez por 24 horas para secagem da solução de nitrato. O mesmo procedimento foi realizado para os filmes de agarose com o extrato de *S. cumini*, onde  $0,320 \text{ mL.cm}^{-2}$  de uma solução alcóolica do extrato ( $0,015 \text{ g.mL}^{-1}$ ) foi vertida sobre a superfície do filme de agarose.

Os filmes foram elaborados no Laboratório de Biofísica Química (LBQ) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

#### **4.9 Caracterização dos filmes poliméricos**

Os filmes elaborados foram caracterizados através da avaliação de propriedades espectroscópicas (UV-Vis e FT-IR), físicas (espessura e transparência).

##### **4.9.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

As análises de espectroscopia na região do UV-vis dos filmes produzidos na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 700 nm, foram realizadas para avaliação da presença de NPsAg e do extrato de *S. cumini*. Os filmes analisados por UV-Vis foram F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8.

##### **4.9.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)**

A espectroscopia FT-IR foi realizada num intervalo de  $4000$  a  $500 \text{ cm}^{-1}$  de número de onda com o intuito de identificar os grupos funcionais presentes nos filmes produzidos. Os filmes analisados por FT-IR foram: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8.

#### 4.9.3 Espessura

A espessura dos filmes 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 cinco pontos diferentes de cada tratamento. O resultado foi dado a partir da média das medidas de cada um dos filmes analisados (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8).

#### 4.9.4 Transparência

Para a determinação da transparência dos filmes, foram medidas as absorbâncias dos filmes a 600 nm e a espessura dos mesmos. As transparências dos filmes F1, F2, F3, F4, F5 e F6 foram então calculadas através da equação:

$$T = \frac{-\log A_{600}}{x}$$

Onde:

T = Transparência

A<sub>600</sub> = Absorbância em 600 nm

x = Espessura do filme em mm

### 4.10 Atividade antimicrobiana dos filmes

A atividade antimicrobiana dos filmes F1, F2, F3, F4, F5 e F6 foi avaliada utilizando o micro-organismo *Candida albicans* linhagem UFPEDA 1007 representante do grupo das leveduras (cedido pela Profa. Adriana Fontes). Foram utilizados o método de difusão em disco e um método de atividade por contato. O teste foi realizado no Laboratório de Biofísica-Química do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

#### *Difusão em disco*

Este método foi desenvolvido de modo semelhante ao já descrito para a análise antimicrobiana das NPsAg e do extrato (item 4.6). Contudo, os discos com 6 mm de diâmetro foram cortados de cada um dos tratamentos dos filmes e utilizando pinça esterilizada, foram

distribuídos uniformemente sobre a superfície do meio de cultura em placas de Petri preparadas antecipadamente e semeadas com a suspensão da levedura utilizando um “swab” estéril e deixadas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos. A suspensão microbiana foi padronizada de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mcfarland. As placas foram incubadas a 37° C, por 24 horas. O halo de inibição do crescimento formado em volta dos discos de filme foi medido utilizando régua milimetrada após o período de incubação. As análises foram realizadas em triplicata para cada um dos tratamentos e o filme de agarose (F1) foi utilizado como controle.

#### *Atividade por contato*

Afim de verificar a atividade por contato dos filmes foi desenvolvido um novo ensaio baseado no método de difusão por disco.

Para este método o mesmo procedimento descrito por difusão em disco foi adotado, contudo em substituição aos discos de 6 mm de diâmetro, foram cortados quadrados com 1,5 cm de lado de cada um dos filmes analisados.

Novamente o filme F1 foi utilizado como controle e a análise foi realizada em triplicata para cada um dos filmes.

Os filmes F2, F4, F5 e F6 foram colocados na placa de forma que sua superfície contendo a formulação ficasse em contato com o meio de cultura. Ainda para o filme F4, o teste foi realizado tanto para sua superfície em contato com o meio quanto para sua superfície virada para cima.

A avaliação do crescimento foi realizada por meio da observação visual do crescimento microbiano sob o filme.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e dados obtidos a partir dos experimentos realizados serão apresentados a seguir.

### 5.1 Preparação do extrato de *Syzygium cumini* (L.)

O extrato foi produzido conforme procedimento descrito (item 4.1). O rendimento foi de 25,2 g (12,6 %) de extrato alcóolico de *S. cumini*, a partir de 200 g da folha seca e triturada. O extrato foi armazenado em forma de pó e em local seco e protegido da luz.

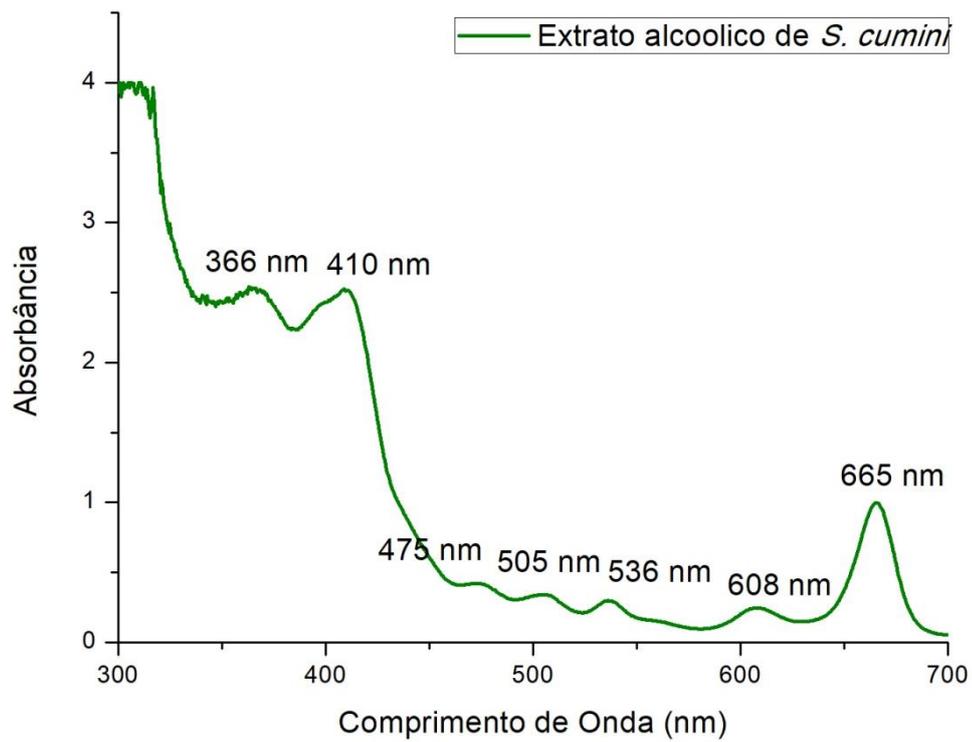
### 5.2 Caracterização do extrato alcóolico de *S. cumini*

Os resultados da caracterização do extrato alcóolico de *S. cumini* por Espectroscopia no Ultravioleta-Visível e no Infravermelho com Transformada de Fourier estão apresentados e discursados abaixo.

#### 5.2.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia UV-Vis para o extrato alcóolico de *S. cumini* apresentou três picos mais significantes em torno de 366 nm, 410 nm e 665 nm. Outros picos também podem ser observados em 475 nm, 505 nm, 536 nm e 608 nm, aproximadamente (Figura 7).

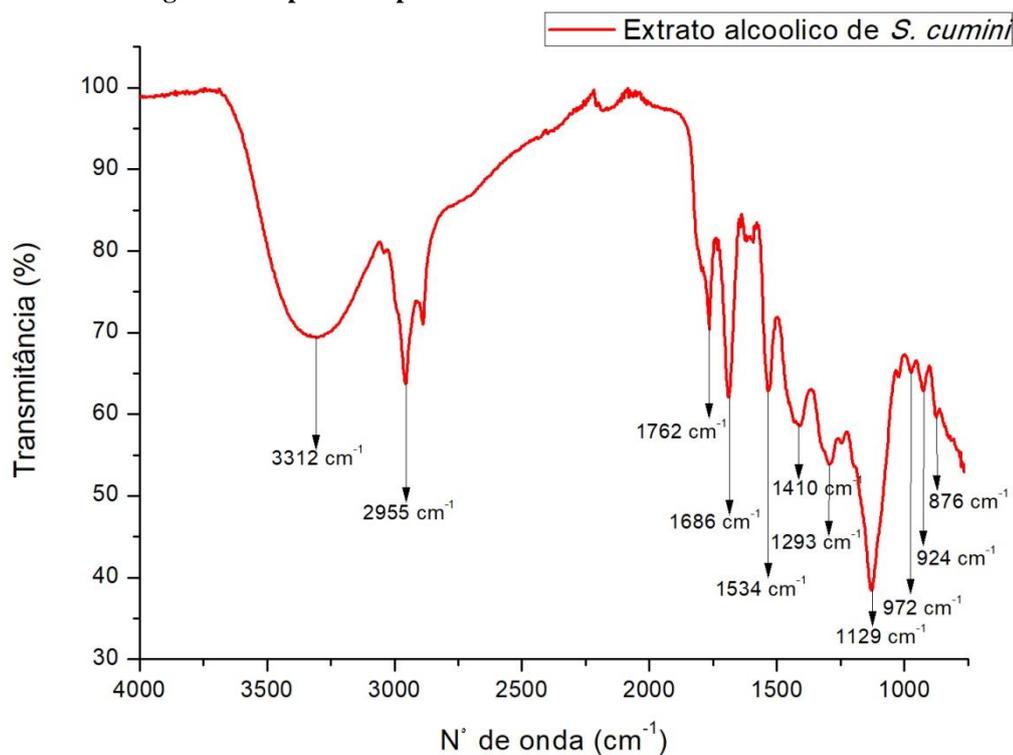
**Figura 7 – Espectroscopia UV-Vis do extrato alcólico de *S. cumini***



### 5.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O resultado da análise espectroscópica na região do infravermelho do extrato alcólico de *S. cumini* apresenta bandas situadas em diferentes regiões (Figura 8).

**Figura 8 - Espectroscopia FT-IR do extrato alcólico de *S. cumini***



O espectro exibiu uma ampla banda em torno de  $3312 \text{ cm}^{-1}$  atribuída a álcool e grupo hidroxila (O-H). Esta banda também pode indicar a presença de fenol e flavonoides. O pico observado em  $2955 \text{ cm}^{-1}$  indica a presença de grupos alcanos (C-H). Outro pico a  $1762 \text{ cm}^{-1}$  é atribuído a aldeídos e alifáticos saturados (H-C=O). O pico em  $1686 \text{ cm}^{-1}$  representa amins primárias (N-H). Já o pico em  $1534 \text{ cm}^{-1}$  indica a presença de nitro compostos (N-O). Os picos em  $1410$  e  $1293 \text{ cm}^{-1}$  mostram a presença de alcanos (C-H) enquanto o pico em  $1129 \text{ cm}^{-1}$  refere-se a presença de amins alifáticas (C-N). Por fim, os picos em  $972$ ,  $924$  e  $876 \text{ cm}^{-1}$  representam trechos C-H de alcenos.

Este resultado de análise de espectro FTIR do extrato alcólico de *S. cumini* sugere a presença de grupos funcionais característicos de álcool, hidroxila, alcanos, aldeídos, compostos nitro, amins primárias e amins alifáticas.

### 5.3 Síntese química das nanopartículas de prata

A formação nas NPsAg através da síntese química foi evidenciada mediante a mudança de coloração da solução de incolor para amarelado, indicando que houve a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$  (Figura 9). Os tons de amarelo variaram de acordo com a concentração de

AgNO<sub>3</sub> utilizada para a síntese. Quanto maior a concentração de AgNO<sub>3</sub> mais forte o tom de amarelo seguindo para um tom castanho.

**Figura 9 - NPsAg (síntese química)**



**Fonte: A autora.**

Em relação à variável ascorbato de cálcio, para uma concentração de 0,00025 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> (Tabela 7), observou-se que a solução de NPsAg contendo 0,5 g do agente (síntese química 3) precipitou logo após a adição do mesmo. As sínteses 1 e 2 (sem ascorbato e com 0,005 g de ascorbato, respectivamente) não precipitaram.

Analisando as NPsAg sintetizadas a partir de diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub> (Tabela 7) constatou-se que as sínteses 4 e 5 não precipitaram, contudo, as sínteses 6 e 7 precipitaram após 1 hora de concluída a síntese. Em função destes fatos, ensaios posteriores foram desenvolvidos visando um processo de estabilização das NPsAg.

Para as formulações 7 e 8 que utilizaram uma dosagem maior de AgNO<sub>3</sub> (0,0050 mol.L<sup>-1</sup>), observou-se a precipitação imediata causada pela adição de 0,5 g ascorbato de cálcio (Tabela 7).

Utilizando novamente a síntese 7 como referência, foram testadas diferentes concentrações para agarose e NaBH<sub>4</sub>. Neste experimento foi observado que as sínteses 9, 10 e 11 formaram aglomerados não havendo a síntese adequada das NPsAg (Tabela 7). Acredita-se que este fato ocorreu devido ao aumento das quantidades de agarose e de NaBH<sub>4</sub>.

Por fim, a partir da formulação da síntese 11, ou seja, utilizando as mesmas concentrações de AgNO<sub>3</sub>, agarose e NaBH<sub>4</sub> foram preparadas formulações contendo diferentes quantidades de ascorbato de cálcio. As sínteses de 12 a 15 (tabela 7) precipitaram.

Tabela 7 – Avaliação da Síntese Química

Número da Síntese	Variável analisada***	Quantidades utilizadas	Outras mudanças em relação a Onofre (2014)***	Aspecto
1		Sem ascorbato		Não precipitou
2	Ascorbato de cálcio****	0,005 g de ascorbato		Não precipitou
3*		0,5 g de ascorbato		Precipitou imediatamente
4		0,0010 mol.L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub>		Não precipitou
5	AgNO <sub>3</sub>	0,0030 mol.L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub>		Não precipitou
6		0,0040 mol.L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub>		Precipitou após 1 h
7**		0,0050 mol.L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub>		Precipitou após 1 h
7**		Sem ascorbato		Precipitou após 1 h
8	Ascorbato de cálcio****	0,50 g de ascorbato	0,0050 mol.L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub>	Precipitou imediatamente
7**		0,05 % Agarose (m/v)	0,01 NaBH <sub>4</sub> mol.L <sup>-1</sup>	Precipitou após 1 h
9	Concentração de agarose x NaBH <sub>4</sub>	0,25 % Agarose (m/v)	0,01 NaBH <sub>4</sub> mol.L <sup>-1</sup>	Formação de aglomerados
10		0,25 % Agarose (m/v)	0,05 NaBH <sub>4</sub> mol.L <sup>-1</sup>	
11		0,50 % Agarose (m/v)	0,05 NaBH <sub>4</sub> mol.L <sup>-1</sup>	
12		0,005 g de ascorbato		
13	Ascorbato de cálcio****	0,050 g de ascorbato	0,0050 AgNO <sub>3</sub> mol.L <sup>-1</sup> e NaBH <sub>4</sub>	Precipitou imediatamente
14		0,125 g de ascorbato	0,05 mol.L <sup>-1</sup>	
15		0,250 g de ascorbato		

Fonte: A autora.

Legenda:

\* Síntese original descrita por Onofre (2014)

\*\* Síntese que se repetiu como controle

\*\*\* Onofre (2014) utilizou: 0,00025 AgNO<sub>3</sub> mol.L<sup>-1</sup>, 0,01 NaBH<sub>4</sub> mol.L<sup>-1</sup>, 0,05% (m/v) agarose e 0,5g ascorbato de cálcio

\*\*\*\*Adicionados ao final aos 5,55ml do meio reacional

A partir dos dados obtidos foram selecionadas as sínteses químicas 4 e 7 para prosseguimento dos trabalhos, também foi utilizada a síntese 3 (Onofre 2014) como padrão.

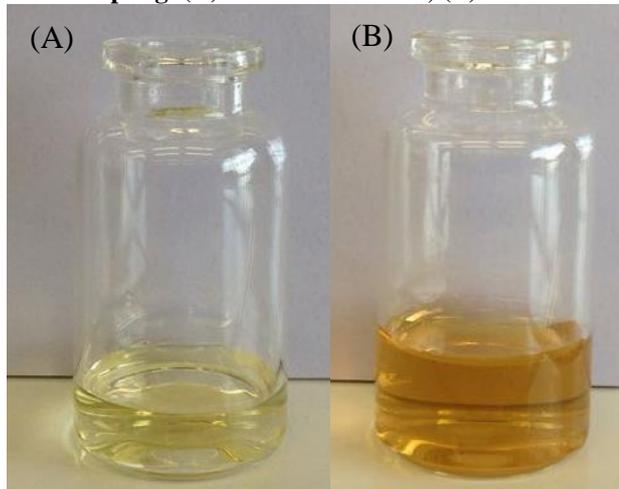
#### 5.4 Síntese verde das nanopartículas de prata

Foi constatado que o extrato das folhas de *S. cumini* possui potencial para sintetizar nanopartículas de prata a partir do nitrato de prata. O extrato vegetal atuou como agente redutor dos íons de prata durante a síntese.

Nos dois protocolos seguidos para a síntese verde das NPsAg pode-se observar a mudança de cor dos extratos de *S. cumini* após adição do nitrato de prata. Na síntese 16 houve mudança de cor do verde claro (característico do extrato) para amarelo claro (característico das NPsAg). Na síntese 17 passou de verde claro para amarelo escuro (Figura 10). Resultados

semelhantes foram obtidos por Banerjee et al. (2011) e Kumar et al. (2010) que utilizaram a semente e a folha da referida planta.

**Figura 10 – NpsAg. (A) – síntese verde 16; (B) – síntese verde 17**



**Fonte: A autora.**

## **5.5 Caracterização das nanopartículas de prata**

Assim como para o extrato alcóolico de *S. cumini*, as NPsAg foram caracterizadas por Espectroscopia no Ultravioleta-Visível e no Infravermelho com Transformada de Fourier e os resultados e dados obtidos estão apresentados e discursados a seguir.

### **5.5.1 Espectroscópica por Ultravioleta-Visível (UV-Vis) das NPsAg**

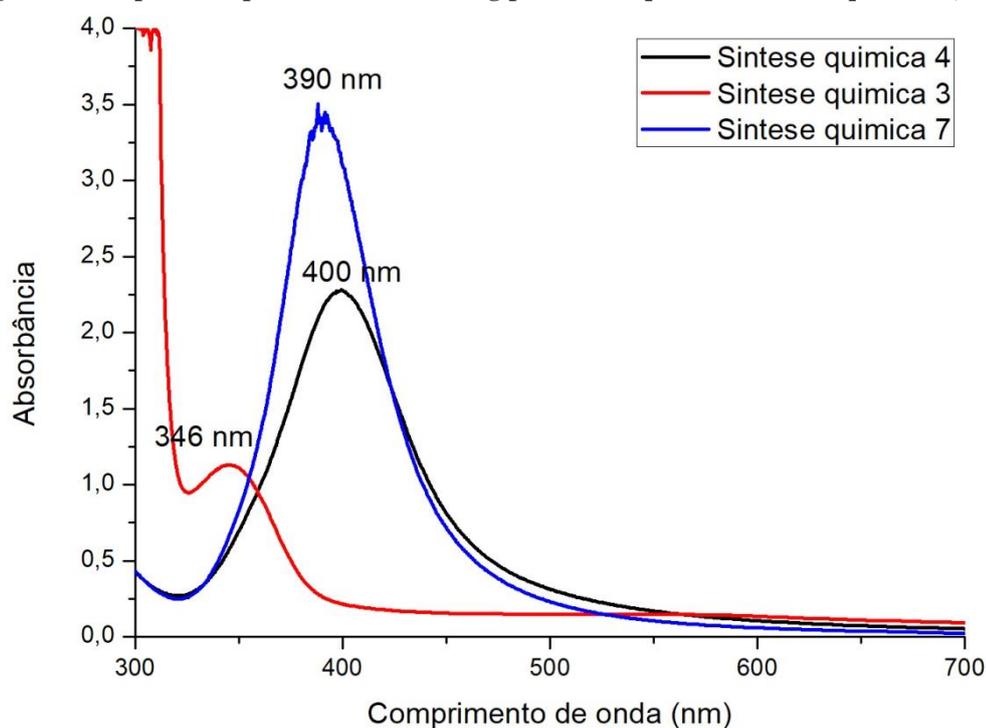
Como citado anteriormente a síntese de NPsAg faz com que a coloração da solução passe de incolor para amarelada e apresente um pico de absorção da luz no comprimento de onda em torno de 400 nm. Esta absorção pode variar de acordo, principalmente, com o tamanho das nanopartículas de prata formadas durante o processo de síntese. Ou seja, partículas maiores apresentam picos deslocados para maiores comprimentos de onda, já partículas menores apresentam um deslocamento para comprimentos de onda menores. Sabe-se ainda que quanto mais larga for a banda, maior será a dispersão de tamanho das nanopartículas ou devido à uma aglomeração das NPsAg.

Para comprovar a formação das NPsAg ao final das sínteses, foram realizadas espectroscopia de absorção UV-Vis, numa faixa de comprimento de onda entre 300 e 700 nm.

### *Espectroscopia UV-Vis das NPsAg por síntese química*

As nanopartículas sintetizadas através da síntese química apresentaram picos únicos em torno de 390 nm para a síntese química 7 e 400 nm para a síntese química 4, além de indicar amostras com pouca dispersão de forma e tamanho devido ao estreitamento do pico. Contudo a síntese química 3 apresentou um pico único deslocado para a esquerda em torno de 346 nm (Figura 11).

**Figura 11 – Espectroscopia UV-Vis das NPsAg por síntese química. Sínteses química 3, 4 e 7**

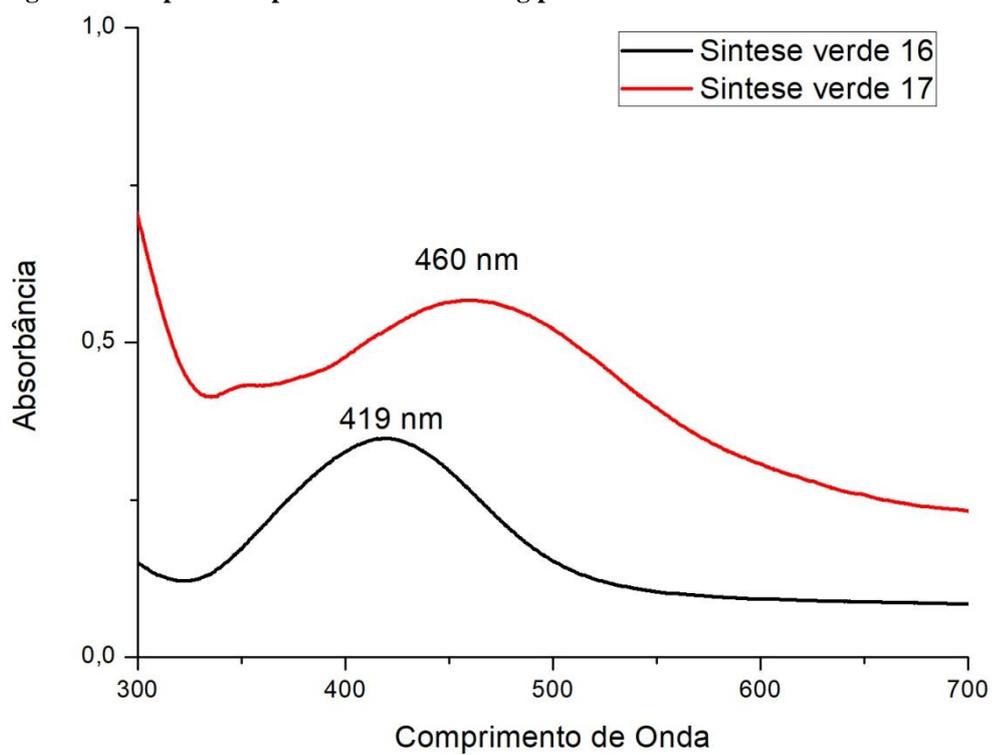


Fonte: A autora.

### *Espectroscopia UV-Vis das NPsAg por síntese verde*

As sínteses verdes 16 e 17 também apresentaram máximos de absorção entre 419 nm para a síntese verde 16 e 460 nm para a síntese verde 17, contudo os picos se mostraram mais alargados do que os obtidos na síntese química, o que pode indicar uma síntese de NPsAg com grande distribuição de tamanhos, especialmente na síntese 17 (Figura 12).

Figura 12 - Espectroscopia UV-Vis das NPsAg por síntese verde. Sínteses verde 16 e 17

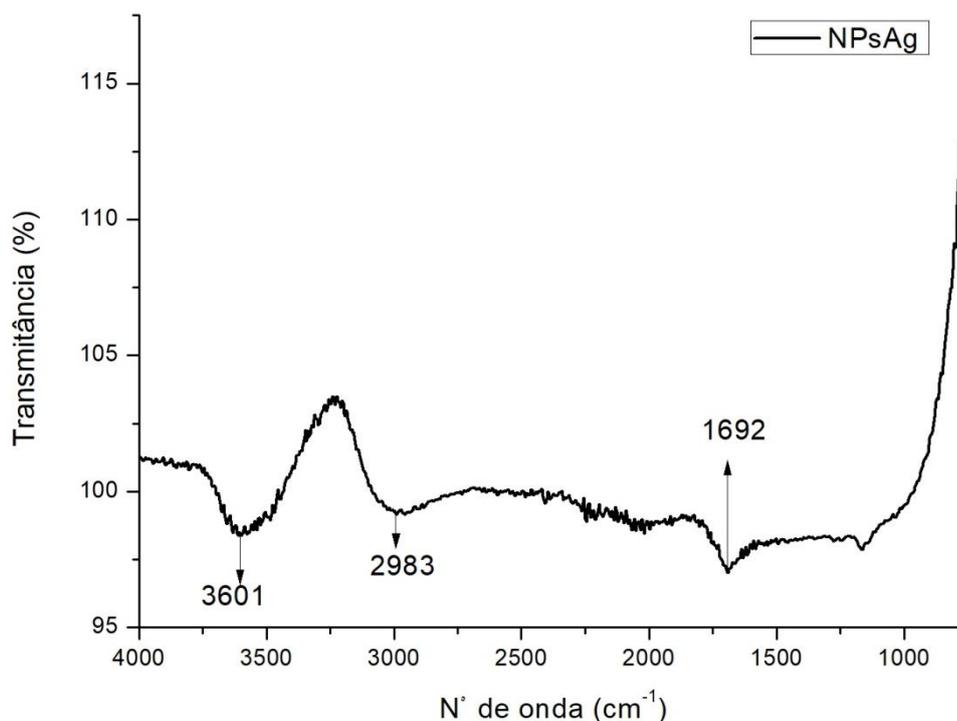


Fonte: A autora.

### 5.5.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O resultado da análise espectroscópica na região do infravermelho das NPsAg (síntese química 7) purificadas e ressuspensas em água está apresentado na figura 13.

Figura 13 - Espectroscopia FT-IR da NPsAg



Fonte: A autora.

## 5.6 Separação das NPsAg

Devido a instabilidade das NPsAg, notada na síntese química 7 e caracterizada pelo processo de crescimento e precipitação da Ag, optou-se por testar métodos que permitissem a separação das nanopartículas em suspensão e precipitado.

### 5.6.1 Avaliação da Separação das NPsAg

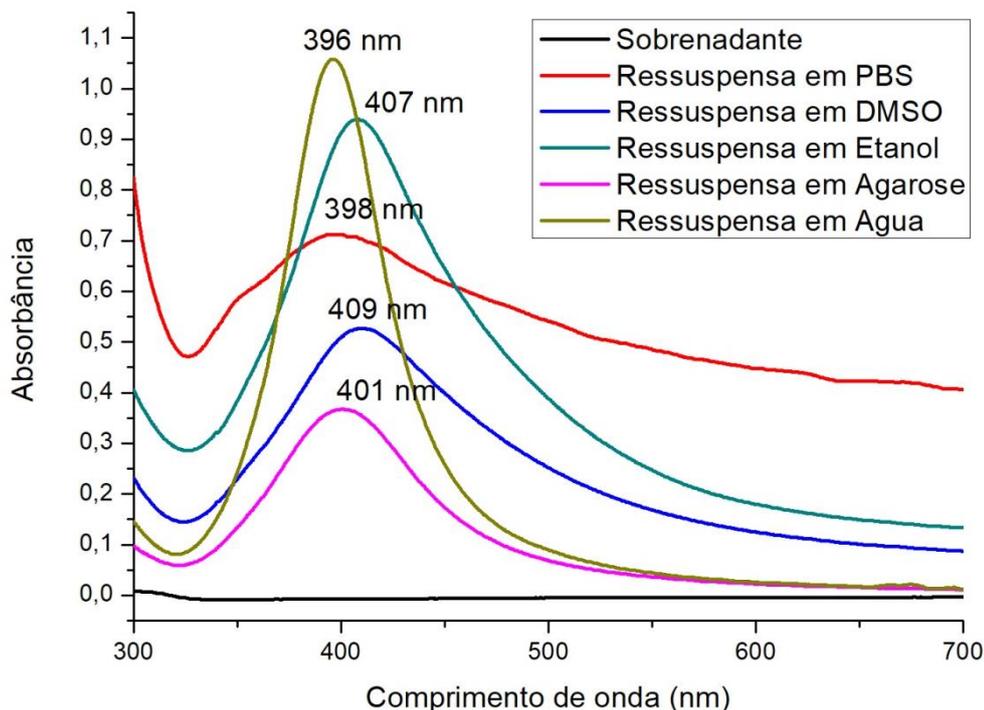
Diversos métodos de separação têm sido empregados para nanopartículas. Critérios como a possibilidade de aumento de escala do processo, a possibilidade de ressuspender as nanopartículas após a separação e a baixa complexidade do método são julgados importantes na seleção do método visando o objetivo proposto (SOUSA et al., 2014).

Assim sendo, por sua possibilidade de ressuspensão das NPsAg após a separação, pela facilidade do aumento de escala e pela simplicidade, foi escolhida a técnica de separação por centrifugação para este trabalho.

Após processo de centrifugação (item 4.3.1) as nanopartículas foram ressuspensas em diferentes solventes: água destilada, solução aquosa de agarose, álcool etílico absoluto,

solução PBS e DMSO. A presença de nanopartículas no sobrenadante e nos precipitados ressuspensos foi analisada por espectroscopia UV-Vis (Figura 14).

**Figura 14 - Espectroscopia UV-Vis das NPsAg estabilizadas e ressuspensas em vários meios**



**Fonte: A autora.**

A presença de NPsAg foi comprovada nos precipitados ressuspensos por todos os solventes, pois suas curvas apresentaram picos em torno de 400 nm. Já o sobrenadante do processo não apresentou picos em sua curva, comprovando a ausência de NPsAg.

Apesar da presença do pico em torno de 400 nm para todas as nanopartículas, as que foram ressuspensa em água destilada apresentaram o pico mais estreito indicando pouca dispersão de tamanho e forma das nanopartículas. Levando-se em conta o perfil dos espectros UV Vis obtidos, a mudança da coloração do precipitado e a facilidade de ressuspender as amostras, foram selecionadas as ressuspensão em água e agarose para o ensaio de estabilidade.

### 5.6.2 Estabilidade

A estabilidade temporal das NPsAg foi monitorada através do pico de absorbância em 400 nm da curva de cada um dos tratamentos (T1, T2 e T3) durante 10 dias. As médias das quintuplicatas dos tratamentos estão expressas na tabela 8.

Tabela 8 – Absorbância em 400 nm durante o teste de estabilidade das NPsAg

Absorbância em 400 nm						
Amostra	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	192 horas	240 horas
T1	1,016±0,068	0,981±0,096	0,985±0,096	0,997±0,108	0,992±0,101	0,991±0,115
T2	0,826±0,037	0,837±0,042	0,873±0,055	0,897±0,056	0,903±0,058	0,903±0,897
T3	0,797±0,073	0,813±0,082	0,806±0,091	0,774±0,081	0,957±0,322	0,999±0,324

Fonte: A autora.

Nota: Resultados estão expressos pela média e desvio padrão.

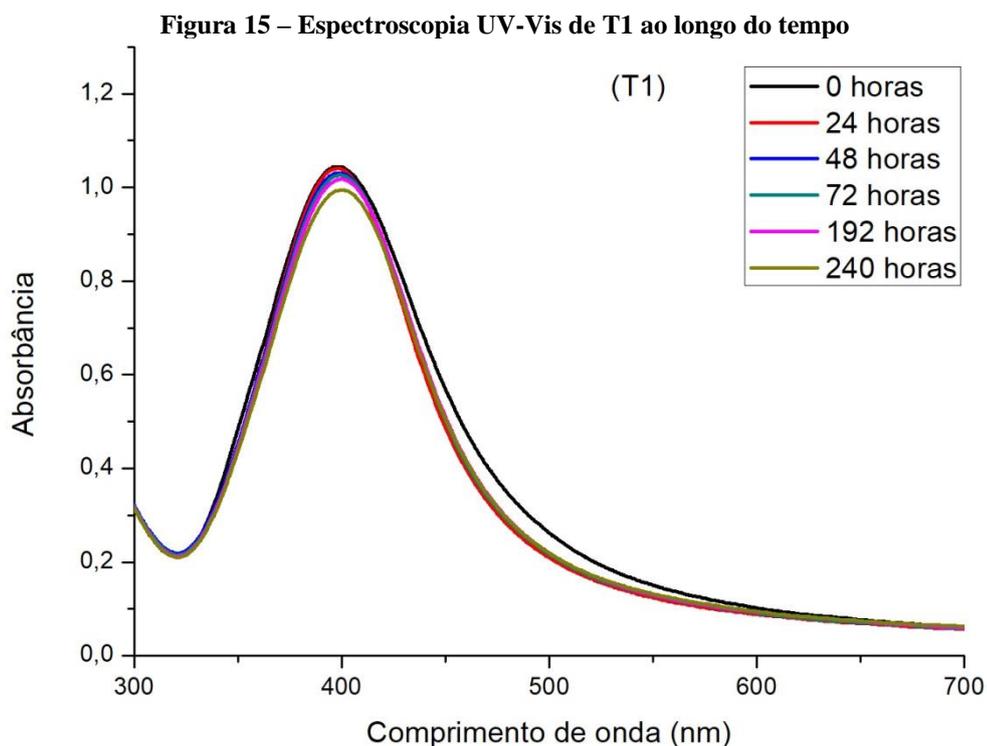
Legenda: T1 - NPsAg ressuspensas em água destilada e mantidas ao abrigo da luz.

T2 NPsAg ressuspensas em agarose e protegidas da luz.

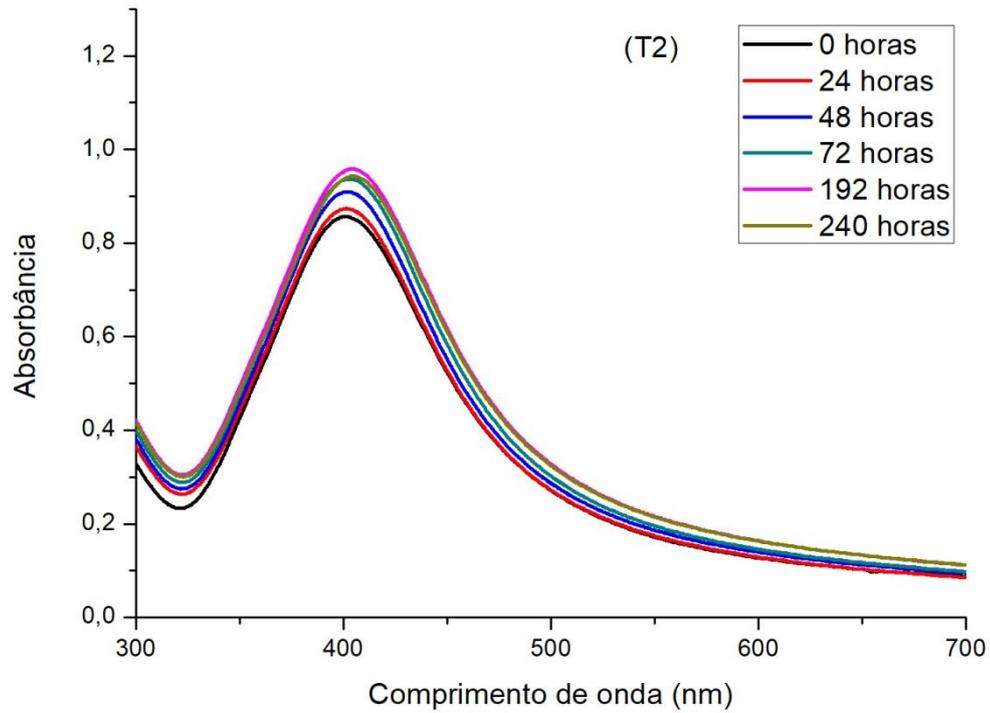
T3 NPsAg ressuspensas em agarose, mas expostas a luminosidade (lâmpada fluorescente branca 20 W) 24 horas

As curvas do T1 (Figura 15) mostraram-se mais estáveis ao longo do tempo, pois não apresentaram alargamento de pico significativo, além de exibirem as menores variações de absorbância.

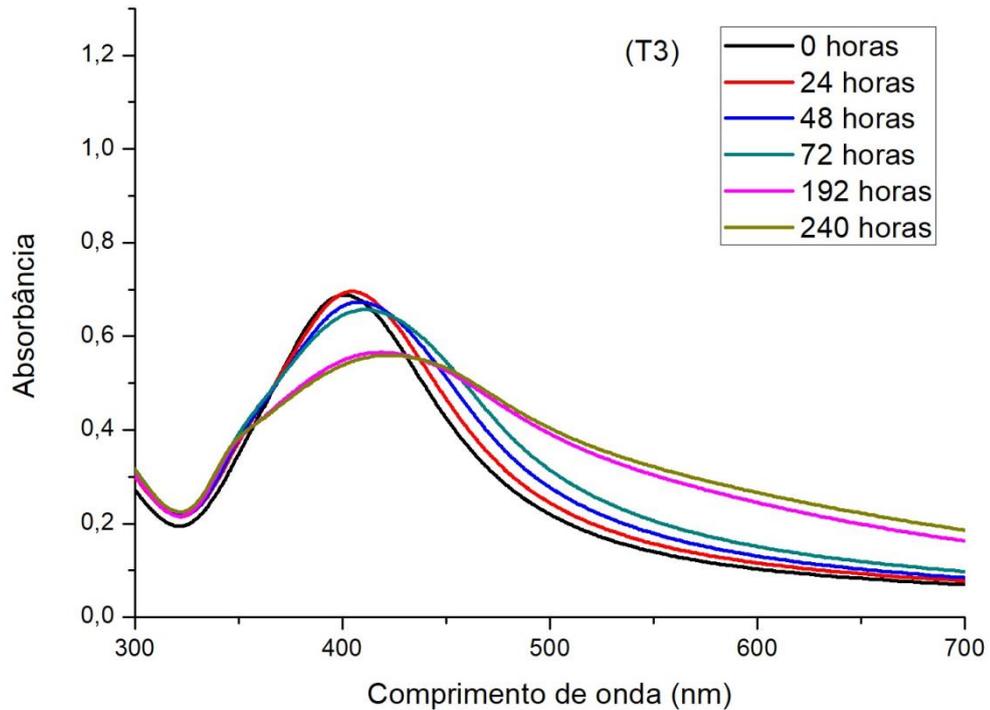
As curvas de T2 e T3 apresentaram maiores variações de absorbância e seus alargamentos ao longo do tempo, especialmente T3 (Figuras 16 e 17).



Fonte: A autora.

**Figura 16 - Espectroscopia UV-Vis de T2 ao longo do tempo**

Fonte: A autora.

**Figura 17 - Espectroscopia UV-Vis de T3 ao longo do tempo**

Fonte: A autora.

Ao final deste ensaio, optou-se pelo uso de estabilização de NPsA por processo de centrifugação e ressuspensão em água destilada.

## 5.7 Atividade antimicrobiana

A análise dos resultados e dados obtido através da avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *S. cumini* e das NPsAg está desenvolvida nas próximas subsecções.

### 5.7.1 Atividade Antimicrobiana do extrato de *S. cumini* e das nanopartículas de prata

#### *Método por difusão em disco*

No método por difusão em disco, todas as NPsAg com presença de ascorbato de cálcio não apresentaram halos de inibição contra os micro-organismos testados.

Para as NPsAg por síntese química também não foi observada a formação de halos de inibição contra os micro-organismos testados, exceto para a formulação contendo  $0,0050 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  que inibiu *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*.

Em relação ao extrato alcóolico de *S. cumini* e a combinação entre NPsAg sintetizadas quimicamente e extrato vegetal, foram observados excelentes halos para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, além de inibir também *Candida albicans* (Tabela 9).

O extrato alcóolico de *S. cumini* apresentou excelentes halos para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e inibiu a levedura *Candida albicans*.

Tabela 9 - Resultados do teste antimicrobiano para NPsAg e extrato de *S. cumini* (método de difusão em disco)

Tratamento	Micro-organismos								
	UFPEDA 01	UFPEDA 06	UFPEDA 16	UFPEDA 39	UFPEDA 71	UFPEDA 138	UFPEDA 224	UFPEDA 398	UFPEDA 1007
EASc	19,33± 0,58	21,00± 0,00	11,33± 0,58	0,00	0,00	17,67± 1,15	0,00	0,00	11,00± 0,00
Síntese Química 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Síntese Química 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Síntese Química 4 + EASc	17,33± 0,58	20,00± 0,00	11,00± 0,00	0,00	0,00	18,00± 0,00	0,00	0,00	9,33± 0,58
Síntese Química 3 + EASc	20,00± 0,00	21,00± 0,00	X	X	X	17,00± 0,00	0,00	X	9,33± 0,58
Síntese Química 7	14,00± 0,00	10,33± 0,58	9,00± 0,00	11,33± 0,58	0,00	X	11,00± 0,00	10,33± 0,58	9,00± 1,00*
Síntese Química 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	X	0,00	0,00	0,00

Fonte: A autora.

Nota: Resultados estão expressos pela média e desvio padrão em mm.

Legenda: \* - Discreta diminuição do crescimento em 30%.

X – Testes não realizados para o micro-organismo.

EASc - Extrato alcoólico de *S. cumini* (0,1 g.mL<sup>-1</sup>).Síntese Química 4 - 0,0010 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>.Síntese Química 3- 0,00025 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> + 0,5 g de Ascorbato de Cálcio.Síntese Química 7 - 0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>.Síntese Química 8 - 0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> + 0,5 g de Ascorbato de Cálcio.UFPEDA 01 *Staphylococcus aureus*UFPEDA 06 *Micrococcus luteus*UFPEDA 16 *Bacillus subtilis*UFPEDA 39 *Pseudomonas aeruginosa*UFPEDA 71 *Mycobacterium smegmatis*UFPEDA 138 *Enterococcus faecalis*UFPEDA 224 *Escherichia coli*UFPEDA 398 *Serratia marcescens*UFPEDA 1007 *Candida albicans*

### *Método por difusão em poço*

Assim como no método por difusão em disco, as NPsAg sintetizadas quimicamente e com presença de ascorbato de cálcio não apresentaram halos de inibição contra os micro-organismos testados no método por difusão em poço.

Contudo, os resultados para a formulação de NPsAg, sintetizada quimicamente (síntese 7) sem ascorbato de cálcio mostram que a mesma foi eficiente contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*. A maioria apresentou excelentes halos de inibição. Pode-se observar ainda que houve uma diminuição de crescimento de 80% contra *Candida albicans* (Tabela 10).

Devido a eficiência da síntese química 7 frente a diversos micro-organismos (Tabela 9 e 10) e a atividade inibitória da mesma para *C. albicans* em ensaio de poço (cerca 15 mm) e leve inibição em ensaio de disco (diminuição do crescimento em 30%), esta síntese foi escolhida para os ensaios posteriores

Para as NPsAg obtidas através das sínteses verde, somente o micro-organismo *Candida albicans* foi testado. Apenas a síntese verde 16 promoveu a formação de halo de inibição de crescimento (Tabela 10).

O extrato de *S.cumini* (0,0150 g.mL<sup>-1</sup>) apresentou halos de inibição para *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados do teste antimicrobiano para NPsAg e extrato de *S. cumini* (método de difusão em poço)

Amostras	Micro-organismos								
	UFPEDA 01	UFPEDA 06	UFPEDA 16	UFPEDA 39	UFPEDA 71	UFPEDA 138	UFPEDA 224	UFPEDA 398	UFPEDA 1007
Síntese Química 7	17,33 ± 0,58	17,00±1,00	13,00±0,00	15,33 ± 0,58	12,33 ± 0,58	X	13,00 ± 0,00	6,67 ± 5,77	15,00*± 0,00
Síntese Química 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	X	0,00	0,00	0,00
Síntese Verde 16	X	X	X	X	X	X	X	X	14,67±0,58
Síntese Verde 17	X	X	X	X	X	X	X	X	0,00
EASc	X	19,00±1,00	0,00	0,00	19,33±1,15	9,00±0,00	0,00	0,00	15,33±0,00

Fonte: A autora.

Nota: Resultados estão expressos pela média e desvio padrão em mm.

Legenda: X – Testes não realizados para o micro-organismo

\* – Diminuição do crescimento em 80%.

Síntese Química 7 - 0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>.Síntese Química 8 - 0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> + 0,5 g de Ascorbato de Cálcio.

Síntese Verde 16 – segundo Banerjee et al. (2011).

Síntese Verde 17 – segundo Kumar et al. (2010).

EASc - Extrato alcoólico de *S. cumini* (0,0150 g.mL<sup>-1</sup>).UFPEDA 01 *Staphylococcus aureus*UFPEDA 06 *Micrococcus luteus*UFPEDA 16 *Bacillus subtilis*UFPEDA 39 *Pseudomonas aeruginosa*UFPEDA 71 *Mycobacterium smegmatis*UFPEDA 138 *Enterococcus faecalis*UFPEDA 224 *Escherichia coli*UFPEDA 398 *Serratia marcescens*UFPEDA 1007 *Candida albicans*

### 5.7.2 Caracterização da atividade antimicrobiana das NPsAg estabilizadas

A partir dos ensaios de estabilização das NPsAg foi formulada a hipótese de que a principal causa da desestabilização da síntese química 7, após uma hora, era a presença de reagentes ao final da síntese, e que estes transformariam a suspensão em precipitados de prata. Desta forma, pode-se explicar a estabilidade após o processo de centrifugação e lavagens das NPsAg.

Todavia, se a hipótese for verdadeira a ação antimicrobiana da reação pode ser devido a dois fatores: a bioatividade das NPsAg sintetizadas ou, alternativamente, poderia ser atribuída ao  $\text{AgNO}_3$ , matéria-prima da reação que também possui atividade antimicrobiana.

A partir destes novos questionamentos foram organizados dois ensaios para verificar qual das frações após a centrifugação eram ativas: o sobrenadante onde deveriam estar os reagentes utilizados na reação ou o precipitado onde estariam as NPsAg. Para esta finalidade foi realizado um ensaio de difusão em poço e em meio líquido, em ambos os ensaios a presença de NPsAg nas frações foi verificada por espectroscopia UV Vis. O ensaio confirmou a presença de NPsAg exclusivamente na fração precipitada.

#### *Difusão em poço*

O ensaio de difusão em poço demonstra a falta de atividade antimicrobiana do precipitado (tabela 11), o que indica que a atividade é oriunda da matéria-prima ( $\text{AgNO}_3$ ). Outro fator que corrobora com a hipótese da atividade oriunda dos reagentes está na atividade da fração sobrenadante sobre várias cepas (tabela 11), típico de agente antimicrobiano não específico como é  $\text{AgNO}_3$ . Ademais o perfil antimicrobiano do nitrato de prata é semelhante ao sobrenadante (tabela 11). Desta forma conclui-se que neste ensaio as NPsAg presentes na fração precipitada não apresentaram atividade biológica.

Tabela 11 - Resultados da caracterização da atividade antimicrobiana das NPsAg purificadas (método de difusão em poço)

Amostras	Micro-organismos								
	UFPEDA 01	UFPEDA 06	UFPEDA 16	UFPEDA 39	UFPEDA 71	UFPEDA 138	UFPEDA 224	UFPEDA 398	UFPEDA 1007
AgNO <sub>3</sub>	X	17,33±0,58	10,67±0,58	15,33±	16,00±1,73	11,67±0,58	11,67±0,58	0,00	15,33±0,00
Síntese Química 7 estabilizada	X	0,00	0,00	0,00	0,00	X	0,00	0,00	0,00
Sobrenadante	X	17,00±1,00	11,33±0,58	15,00±1,00	13,00±1,73	11,33±1,73	12,67±0,58	0,00	15,33±0,58

Fonte: A autora.

Nota: Resultados estão expressos pela média e desvio padrão em mm.

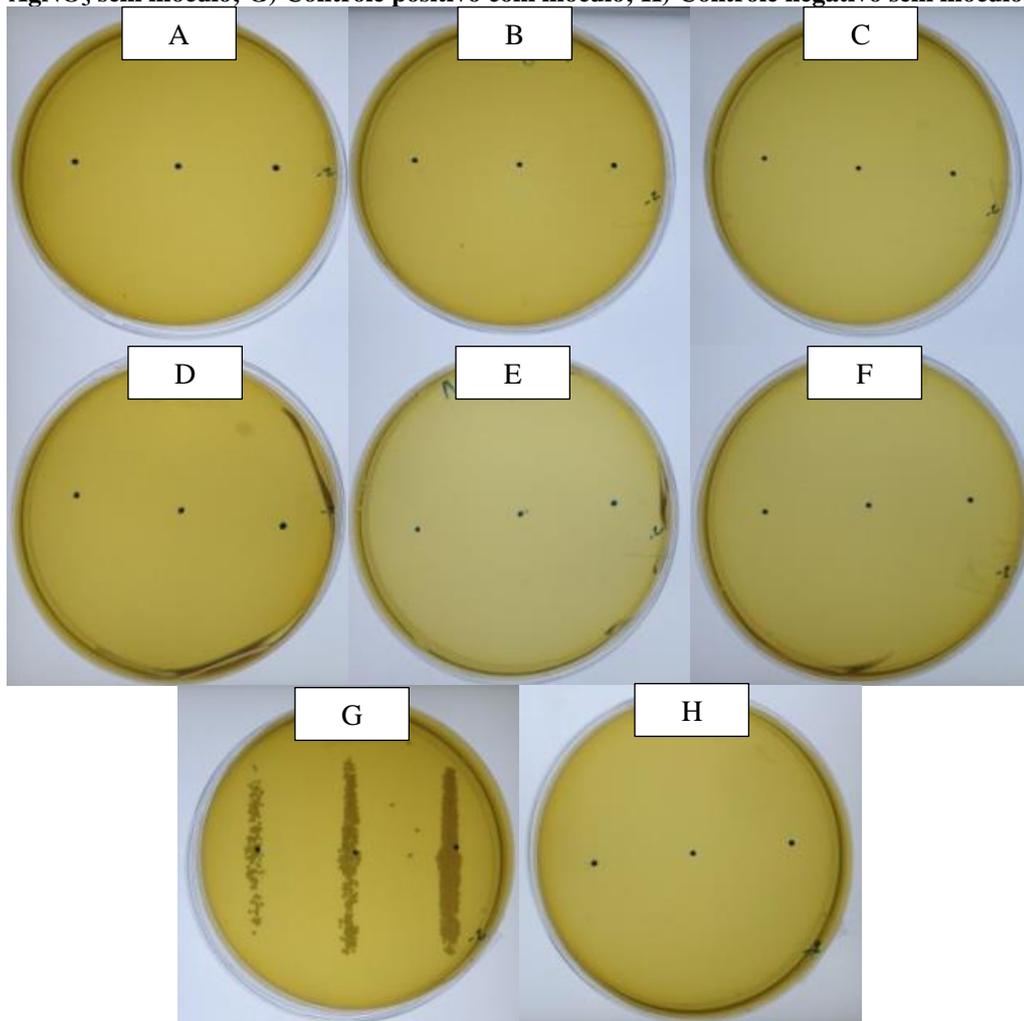
Legenda: X – Testes não realizados para o micro-organismo

AgNO<sub>3</sub> – Solução aquosa de 0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>.Síntese Química 7 estabilizada – Síntese química 7 (0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>) após processo de separação e ressuspensão em água destilada.Síntese Verde 16 – Sobrenadante resultante do processo de centrifugação da síntese química 7 (0,0050 mol.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>).UFPEDA 01 *Staphylococcus aureus*UFPEDA 06 *Micrococcus luteus*UFPEDA 16 *Bacillus subtilis*UFPEDA 39 *Pseudomonas aeruginosa*UFPEDA 71 *Mycobacterium smegmatis*UFPEDA 138 *Enterococcus faecalis*UFPEDA 224 *Escherichia coli*UFPEDA 398 *Serratia marcescens*UFPEDA 1007 *Candida albicans*

### *Difusão em meio líquido*

Os ensaios de difusão em meio líquido demonstraram a efetividade dos compostos de prata sobre os micro-organismos. Neste caso, tanto o sobrenadante como o precipitado que contém NPsAg apresentaram atividade antimicrobiana inibindo qualquer crescimento da levedura (Figuras 18-A e 18-B).

**Figura 18 - Resultado do ensaio de difusão em meio líquido. A) Fração sobrenadante; B) Fração precipitada; C)  $\text{AgNO}_3$ ; D) Fração sobrenadante sem inóculo; E) Fração precipitada sem inóculo; F)  $\text{AgNO}_3$  sem inóculo; G) Controle positivo com inóculo; H) Controle negativo sem inóculo.**



**Fonte: A autora.**

Neste ensaio foram realizados controles experimentais para avaliar mais precisamente a atividade antimicrobiana. O controle  $\text{AgNO}_3$  (Figura 18-C) indica a ação fungicida da matéria-prima bem como é concordante com o ensaio de difusão em poço. A efetividade do inóculo utilizado é demonstrada na figura 18-G (controle positivo); a figura 18-H (controle negativo) mostra a assepsia geral do ensaio; as figuras 18-D, 18-E e 18-F (controles das

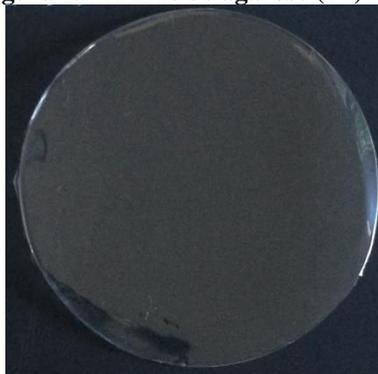
amostras) comprovam a ausência de contaminação do sobrenadante, precipitado e  $\text{AgNO}_3$  utilizados.

Quando analisados em conjunto, os resultados dos ensaios de difusão em poço e em meio líquido são concordantes no que diz respeito a fração sobrenadante, e divergentes para as NPsAg (precipitadas). Considerando a natureza dos ensaios foi inferido que a ação NPsAg se restringiam a atividade por contato, ou seja, em meio líquido teríamos a possibilidade de contato da NPsAg com o micro-organismo. Já em meio semi-sólido como nos ensaios de difusão em poço e disco e em última estância nos filmes, teríamos uma ação localizada das NPsAg. Para elucidar esta questão, ensaios com NPsAg incorporados aos filmes foram realizados.

## 5.8 Elaboração dos filmes poliméricos

O filme de agarose (F1) apresentou-se macroscopicamente homogêneo, sem rachaduras, flexível, aderente e incolor (Figura 19).

**Figura 19 – Filme de agarose (F1)**



**Fonte: A autora.**

O Filme F2 (agarose +  $\text{AgNO}_3$ ) após o processo de secagem a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  mudou de coloração passando a apresentar coloração amarelada típica de filmes com nanopartículas.

Os filmes de agarose com NPsAg obtidas através de síntese química 7 tanto incorporadas como na superfície (F3 e F4, respectivamente), também se mostraram homogêneos, sem rachaduras, flexíveis e aderentes, com diferença na coloração para amarelada, típica das NPsAg (Figura 20).

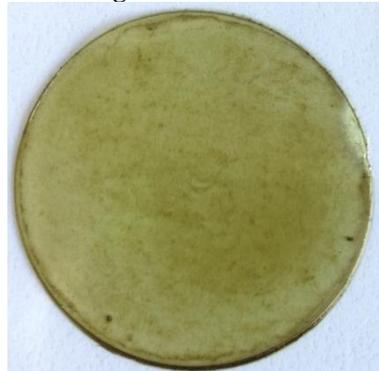
**Figura 20 - Filme de agarose e NPsAg da síntese química 7 incorporadas (F3)**



**Fonte: A autora.**

O filme de agarose com o extrato de *S. cumini* na superfície (F5) não apresentou rachaduras e se mostrou flexível e aderente, contudo pouco homogêneo. Sua coloração foi esverdeada devido ao extrato vegetal (Figura 21).

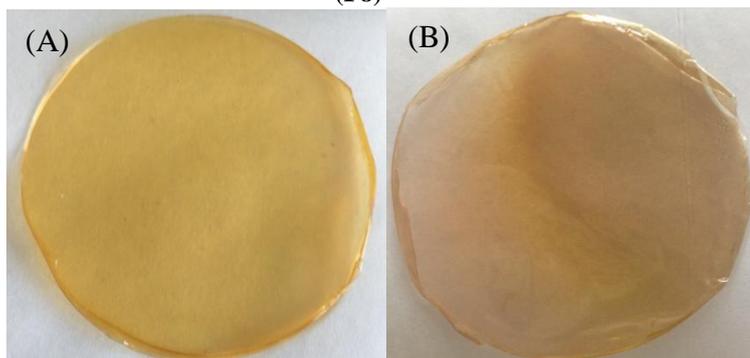
**Figura 21 – Filme de Agarose e extrato de *S. cumini* (F5)**



**Fonte: A autora.**

Os filmes F7 e F8 de agarose com NPsAg, obtidas através do método de síntese verde segundo Banerjee et al. (2011) modificado e segundo Kumar et al. (2010) modificado respectivamente, mostraram-se muito semelhantes aos filmes de agarose com NPsAg obtidas através da síntese química (Figura 22).

**Figura 22 – Filme de agarose e NPsAg da síntese verde. (A) – Síntese verde 16 (F7); (B) – Síntese verde 17 (F8)**



**Fonte: A autora.**

Vale ressaltar que essas características observadas do ponto de vista macroscópico são importantes e estão em conformidade com o que se espera de um dispositivo cuja finalidade é ser usado como substituto temporário de pele.

## **5.9 Caracterização dos filmes poliméricos**

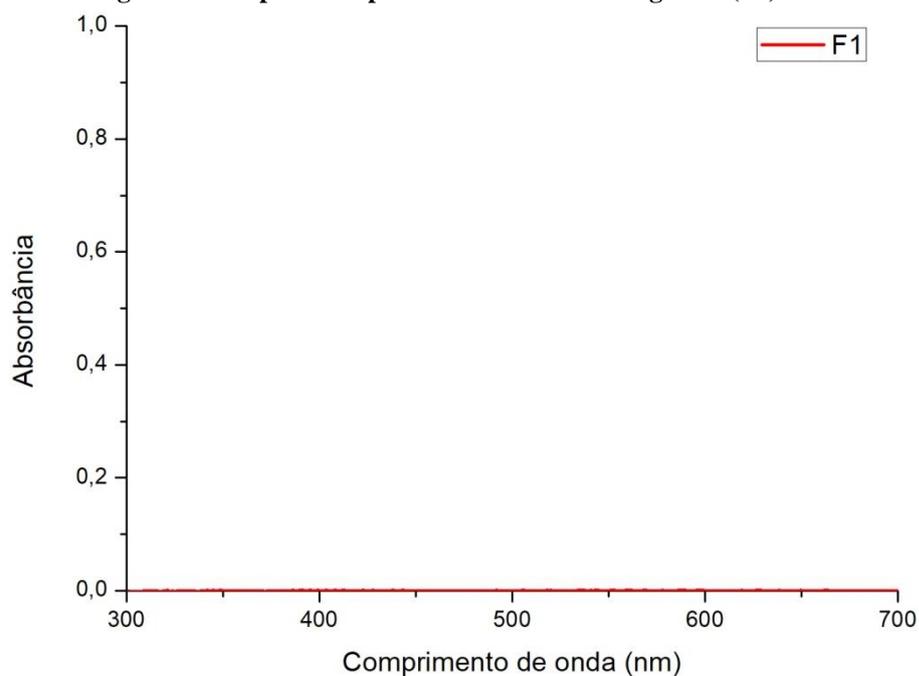
A seguir, estão apresentados e discursados os resultados obtidos a partir da caracterização dos filmes poliméricos produzidos.

### **5.9.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

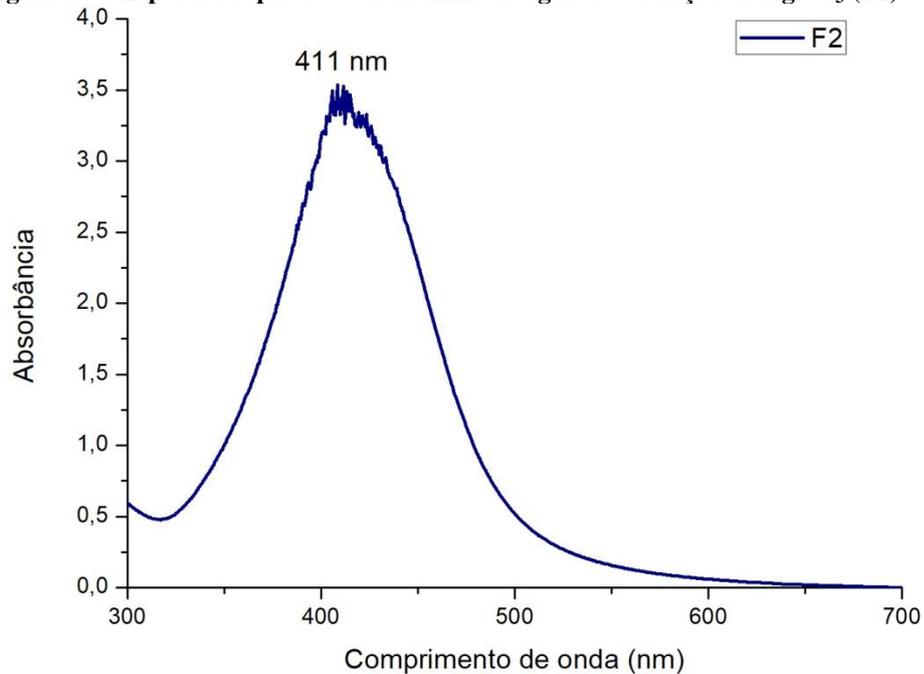
A técnica de espectroscopia UV-vis também foi aplicada aos filmes elaborados.

No espectro do filme apenas de agarose (F1) não se observa picos, o que era esperado devido à ausência de nanopartículas de prata e de extrato (Figura 23).

Para o filme de agarose e solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  na superfície (F2) o espectro apresenta um pico único em torno de 411 nm, o que vem a corroborar com o aparecimento da cor amarelada no filme indicando que a elaboração deste filme pode ter resultado em mais um processo de formação de NPsAg (Figura 24). Os resultados sugerem que a secagem a 45°C em filme de agarose pode favorecer a síntese de nanopartículas, sem a necessidade de agentes redutores, o que indica novas investigações neste contexto.

**Figura 23 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose (F1)**

Fonte: A autora.

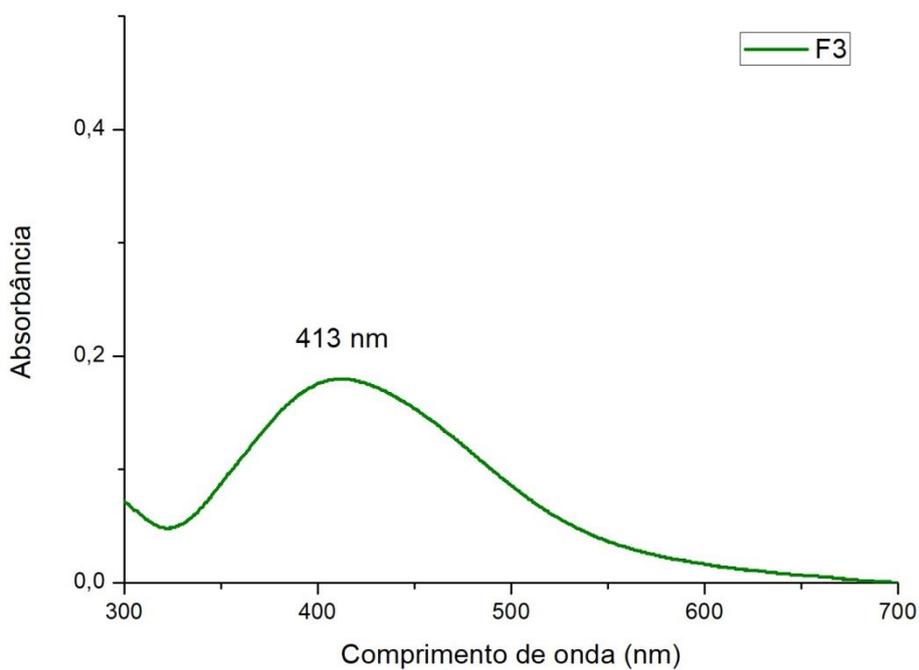
**Figura 24 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e solução de  $\text{AgNO}_3$  (F2)**

Fonte: A autora.

Nos filmes de agarose com NPsAg estabilizadas da síntese química 7 tanto incorporadas ao filme (F3) como na superfície do mesmo (F4) podemos observar a presença do pico único em torno de 413 nm e 418 nm, respectivamente, confirmando a incorporação das nanopartículas. Contudo, ambos os picos deslocaram-se um pouco para a direita do espectro

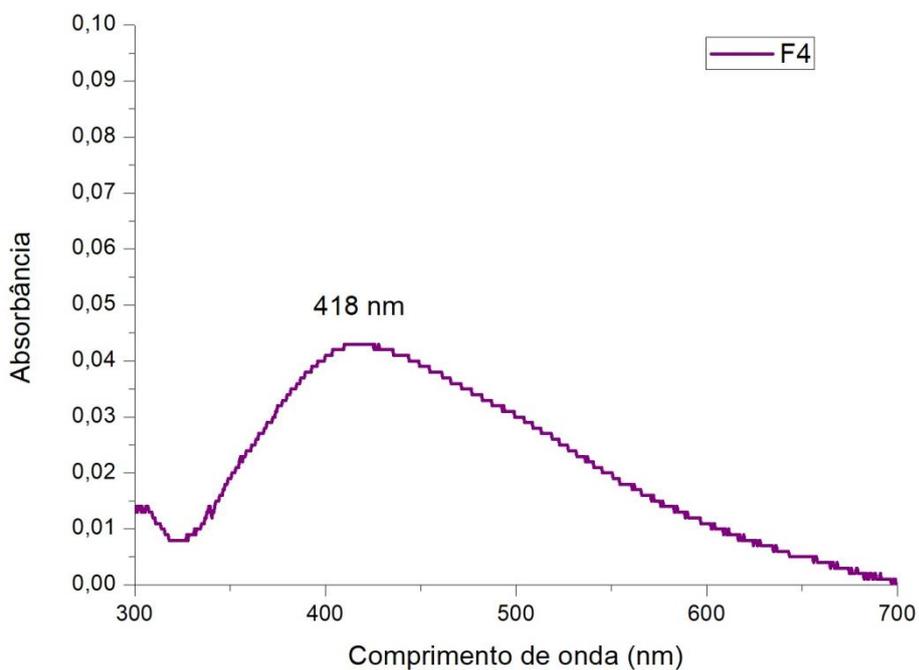
se comparados com o pico apresentado na curva das NPsAg (síntese química 7) estabilizadas e ressuspensas em água (item 5.6.1). Houve também um alargamento de ambos os picos (Figuras 25 e 26). Estes dados indicam a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias de incorporação deste ativo aos filmes visando maximizar a sua efetividade.

**Figura 25 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e NPsAg incorporadas (F3)**



Fonte: A autora.

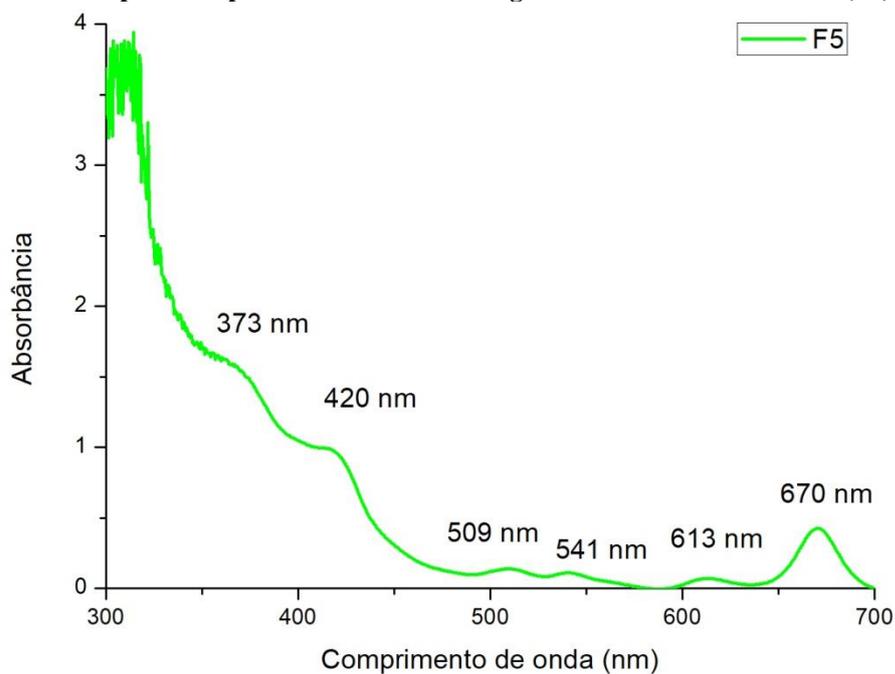
**Figura 26 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e NPsAg na superfície (F4)**



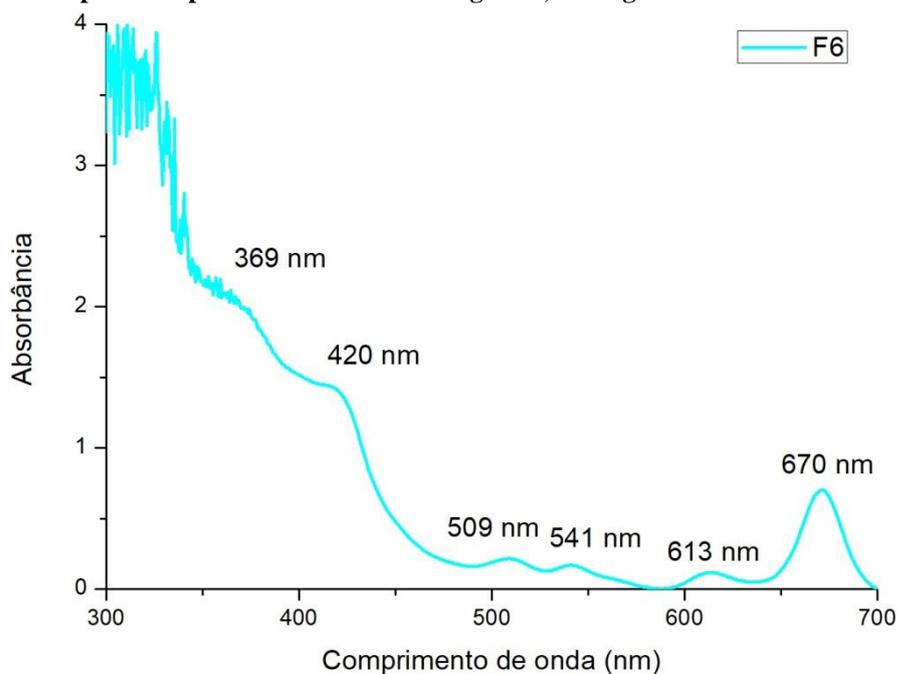
Fonte: A autora.

Para o filme de agarose e extrato de *S. cumini* incorporado à superfície (F5) podemos notar três picos predominantes em torno de 373 nm, 420 nm e 670 nm, além de picos menores em 509 nm, 541 nm e 613 nm, aproximadamente. Todos os picos observados coincidem com os apresentados no espectro do extrato de *S. cumini* (item 5.2.1). A mesma análise se repete para o filme de agarose, extrato de *S. cumini* e NPsAg (F6) que apresentou gráfico bastante semelhante ao do filme F5 (Figuras 27 e 28).

**Figura 27 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e extrato de *S. cumini* (F5)**

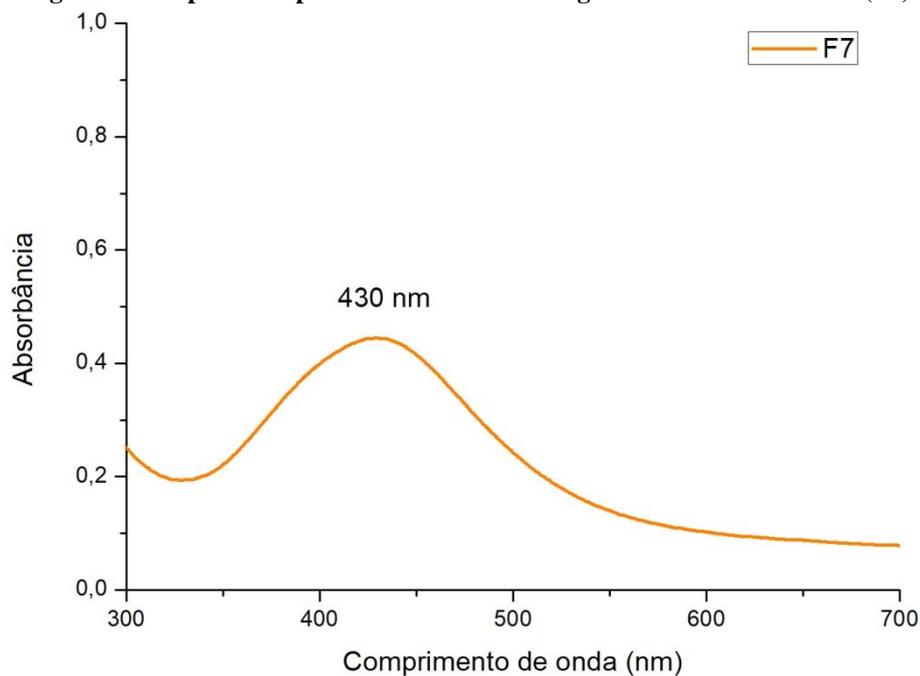


**Fonte: A autora.**

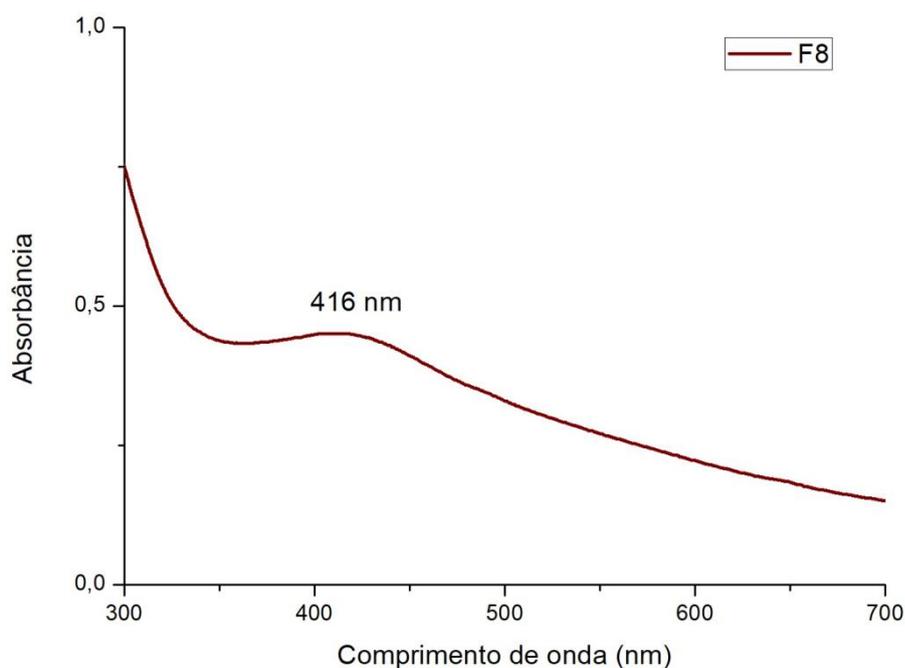
**Figura 28 – Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose, NPsAg e extrato de *S. cumini* (F6)**

Fonte: A autora.

Os filmes de agarose com NPsAg incorporadas e obtidas através das sínteses verdes 16 e 17 (F7 e F8) apresentaram espectros semelhantes aos das NPsAg de síntese verde isoladamente (item 5.5.1). Suas curvas apresentaram picos em torno de 430 nm para F7 e 416 nm para F8 (Figuras 29 e 30).

**Figura 29 - Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e síntese verde 16 (F7)**

Fonte: A autora.

**Figura 30 - Espectroscopia UV-Vis do filme de agarose e síntese verde 17 (F8)**

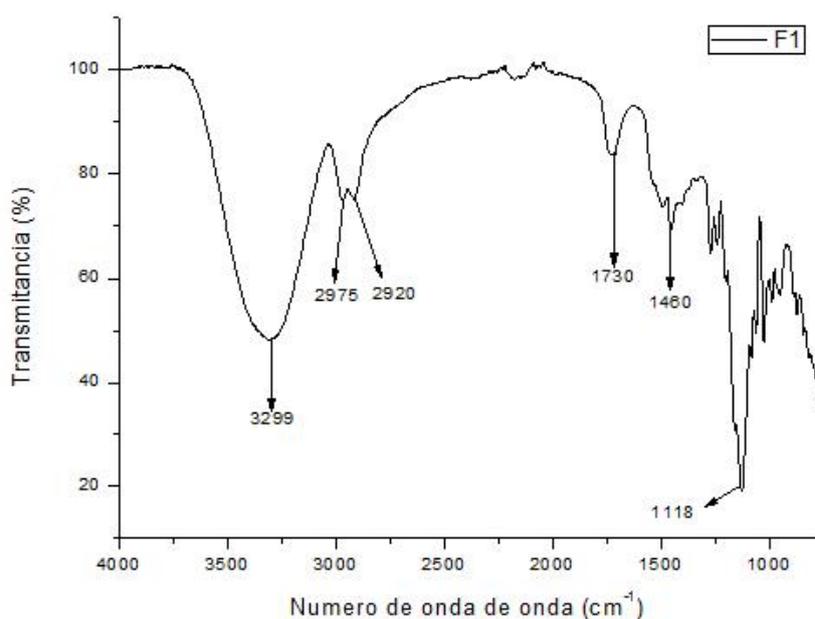
**Fonte: A autora.**

Pela semelhança das curvas e a coincidência dos picos de absorção entre os espectros dos filmes e de seus componentes analisados isoladamente, podemos concluir que houve a incorporação do extrato e das NPsAg (síntese química estabilizada e síntese verde) ao filme.

### 5.9.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho dos filmes F1 a F8 apresentaram bandas situadas em diferentes regiões do espectro (Figuras 31 a 38).

O gráfico referente ao espectro na região do infravermelho do filme de agarose apresentaram bandas situadas em 6 regiões do espectro (Figura 31).

**Figura 31 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose (F1)**

Fonte: A autora.

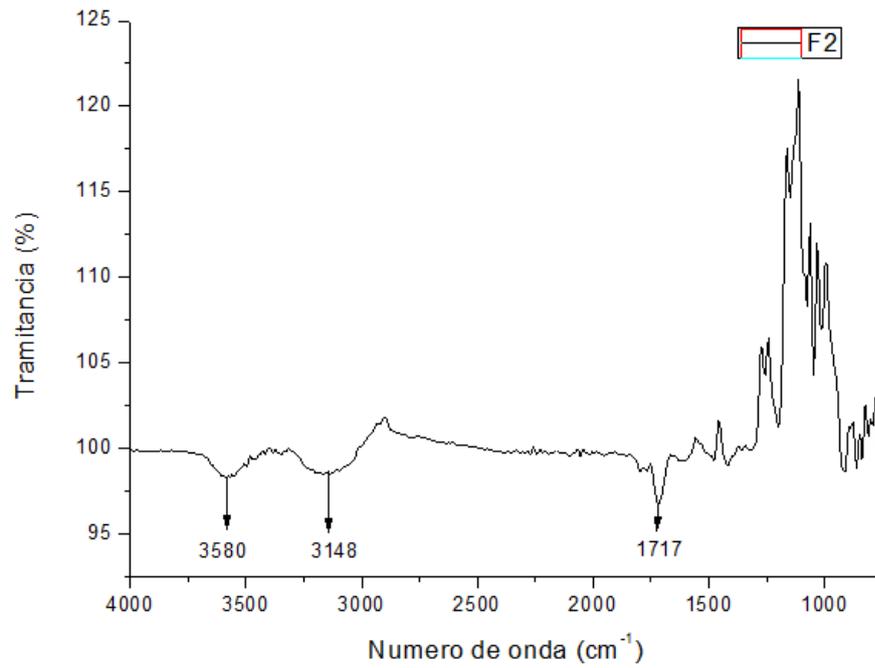
O filme apresentou um estiramento largo arredondado na região de  $3299\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial de hidroxila. Os picos em  $2975\text{ cm}^{-1}$  e  $2920\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos a deformação axial de  $\text{CH}_2$ . O estiramento em  $1730\text{ cm}^{-1}$  é característico da deformação angular da hidroxila. O pico em  $1460\text{ cm}^{-1}$  refere-se à deformação angular de  $\text{CH}_2$ .

Após a análise do filme de agarose (F1), os espectros seguintes foram construídos subtraindo-se os picos já encontrados (Figuras 32 a 38). As bandas encontradas nos demais filmes estão apresentadas na tabela 12.

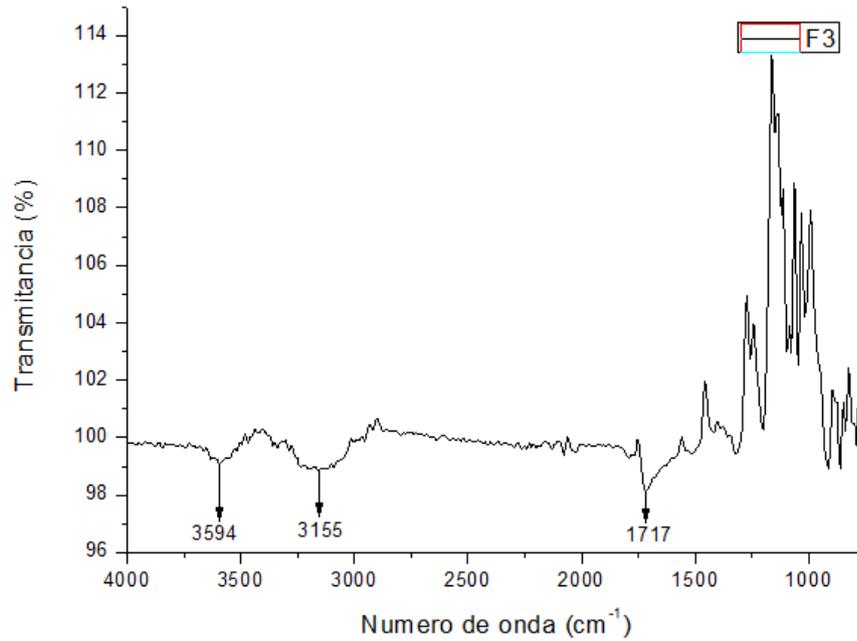
**Tabela 12 - Regiões dos grupos funcionais encontrados nos filmes**

Frequência	Grupo Funcional
3450 – 3260	Deformação axial de hidroxila (O-H)
3000 – 2800	Deformação axial de $\text{CH}_2$
1740 – 1600	Deformação angular de hidroxila (OH)
1500 – 1250	Deformação angular de C-O-C
1250 – 1000	Deformação angular de C-O-C dos anéis de carboidratos e grupos laterais C-OH e C-H

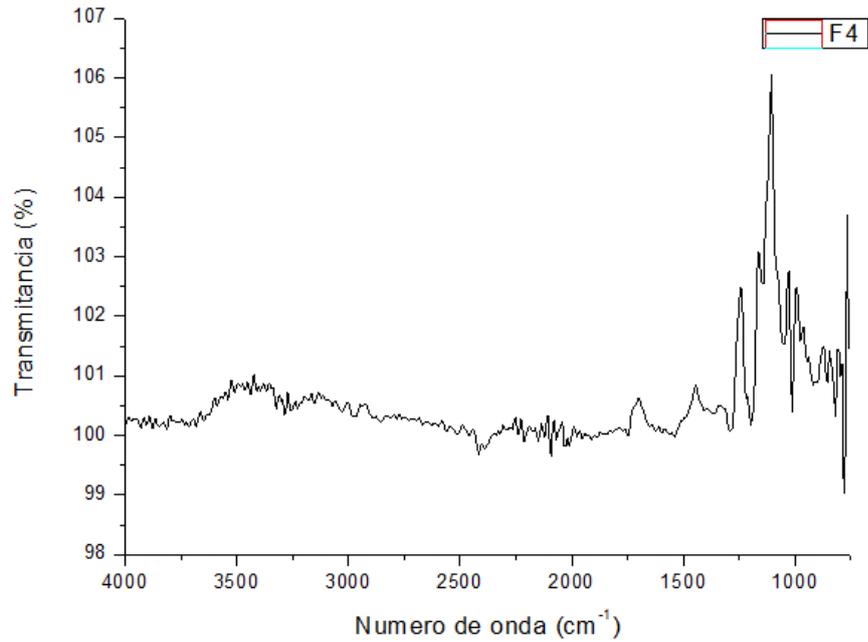
Fonte: A autora.

**Figura 32 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e  $\text{AgNO}_3$  (F2)**

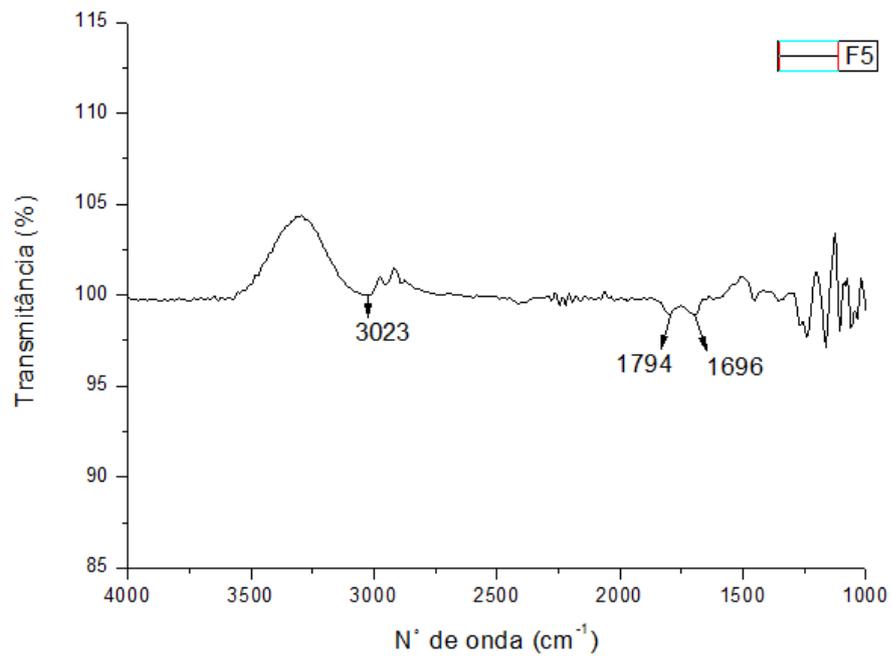
Fonte: A autora.

**Figura 33 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e NPsAg na superfície (F3)**

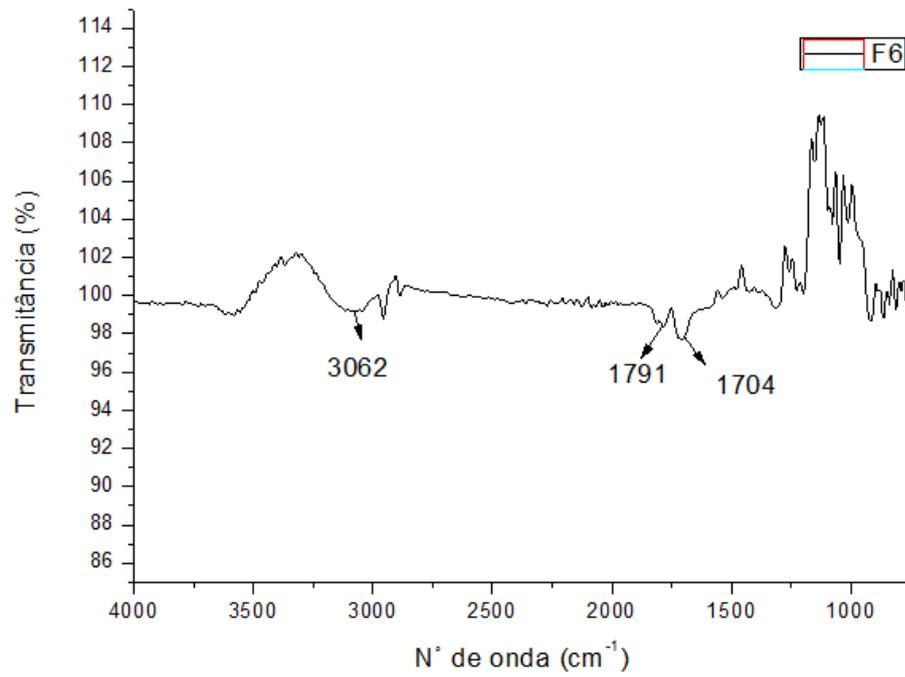
Fonte: A autora.

**Figura 34 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e NPsAg na superfície (F4)**

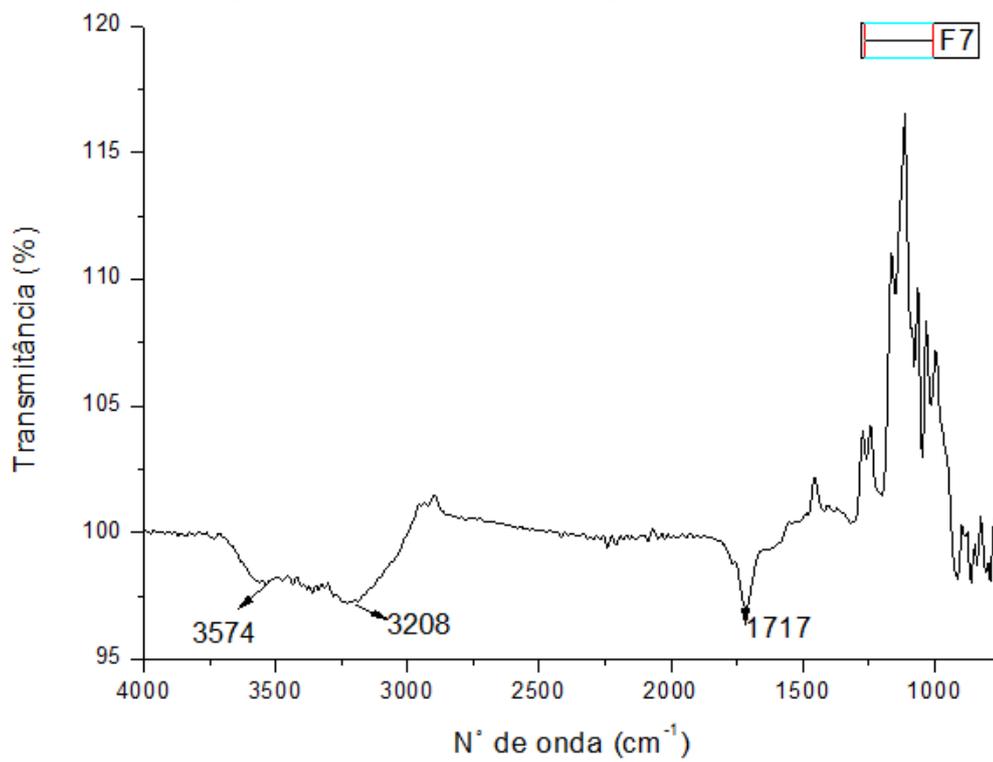
Fonte: A autora.

**Figura 35 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e extrato de *S. cumini* (F5)**

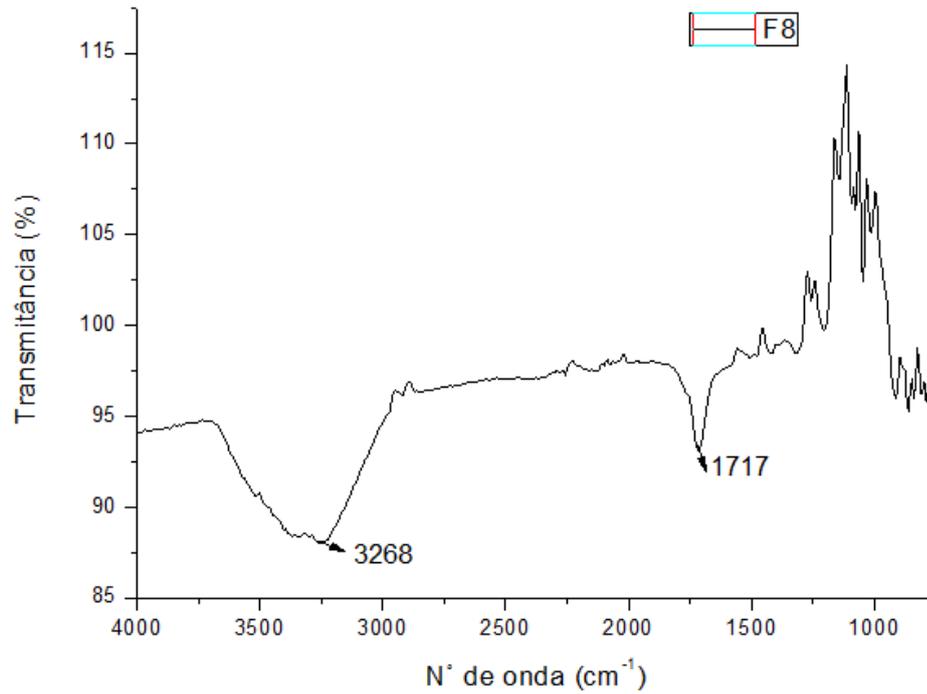
Fonte: A autora.

**Figura 36 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose, NPsAg e extrato de *S. cumini* (F6)**

Fonte: A autora.

**Figura 37 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e síntese verde 16 (F7)**

Fonte: A autora.

**Figura 38 - Espectroscopia FT-IR do filme de agarose e síntese verde 17 (F8)**

**Fonte: A autora.**

### 5.9.3 Espessura

Os filmes desenvolvidos apresentaram variações de espessura em função de sua composição.

Os resultados estão expressos por média  $\pm$  desvio padrão (Tabela 13).

**Tabela 13 – Espessura dos filmes**

<b>Filme</b>	<b>Espessura (mm)</b>
F1	0,097 $\pm$ 0,008
F2	0,108 $\pm$ 0,008
F3	0,112 $\pm$ 0,010
F4	0,090 $\pm$ 0,016
F5	0,093 $\pm$ 0,004
F6	0,105 $\pm$ 0,005
F7	0,088 $\pm$ 0,019
F8	0,070 $\pm$ 0,007

**Fonte: A autora.**

As espessuras dos filmes F1 a F8 apresentaram variações de espessura entre 0,070 e 0,112 mm, o que está em acordo com o que afirma Pires; Moraes (2012) que substitutos de pele geralmente são 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.

Os filmes desenvolvidos neste trabalho mostraram-se mais espessos do que os filmes de agarose desenvolvidos por Onofre (2014) cujas espessuras variaram entre 0,025 e 0,058 nm e a adição das NPsAg não alterou a espessura dos mesmos.

#### 5.9.4 Transparência

Os filmes desenvolvidos apresentaram transparências entre 11,38 e 30,93 (Tabela 14).

**Tabela 14 – Transparência dos filmes**

<b>Filme</b>	<b>Transparência</b>
F1	30,93
F2	11,38
F3	16,03
F4	21,76
F5	17,42
F6	13,01
F7	11,27
F8	9,31

**Fonte: A autora.**

Segundo Piermaria et al., um valor baixo de T significa uma menor transparência do filme. Como esperado, o filme de agarose F1 apresentou a maior transparência dentre os filmes (T = 30,93).

Os filmes contendo NPsAg sintetizadas quimicamente (F3 e F4), mostraram-se menos transparentes se comparados com o elaborado por Onofre (2014) que apresentou T = 35,85, provavelmente pelo aumento da concentração do AgNO<sub>3</sub>.

O filme com extrato de *S.cumini* (F5) apresentou uma maior transparência do que o filme com a combinação entre extrato e NPsAg (F6). Este por sua vez mostrou-se mais transparente do que os filmes com NPsAg por síntese verde (F7 e F8).

### 5.10 Atividade antimicrobiana dos filmes

Os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e atividade por contato sugerem que a forma de incorporação das nanopartículas de prata é fundamental para atividade da mesma. Deste modo, foram elaborados dois ensaios para verificar a efetividade da difusão das NPsAg e verificar também a atividade das NPsAg sobre a superfície dos filmes elaborados.

#### *Difusão em disco*

No ensaio utilizando o método de difusão em disco, apenas no filme F2 (agarose e  $\text{AgNO}_3$ ) foi observado a formação de halo de inibição (diâmetro de  $13,33 \pm 0,58$  mm) contra o micro-organismo testado (*C. albicans*). Este dado reafirma a capacidade do  $\text{AgNO}_3$  difundir sobre uma matriz e atuar a distância. Levando em consideração a toxicidade da prata e a possibilidade do  $\text{AgNO}_3$  difundir-se para tecidos saudáveis e causar danos aos mesmos, então, a combinação de  $\text{AgNO}_3$  e NPsAg poderia proporcionar dispositivos com melhor capacidade antimicrobiana e menor toxicidade do que o uso somente de  $\text{AgNO}_3$ .

A dificuldade de difusão das NpsAg do filme no meio de cultura semi-sólido levou a ineficácia das NpsAg neste ensaio. Entretanto a eventual capacidade de atividade antimicrobiana por contato não pôde ser avaliada, principalmente nos casos de atividade parcial como o de NPsAg para *C. albicans*.

#### *Atividade antimicrobiana por contato*

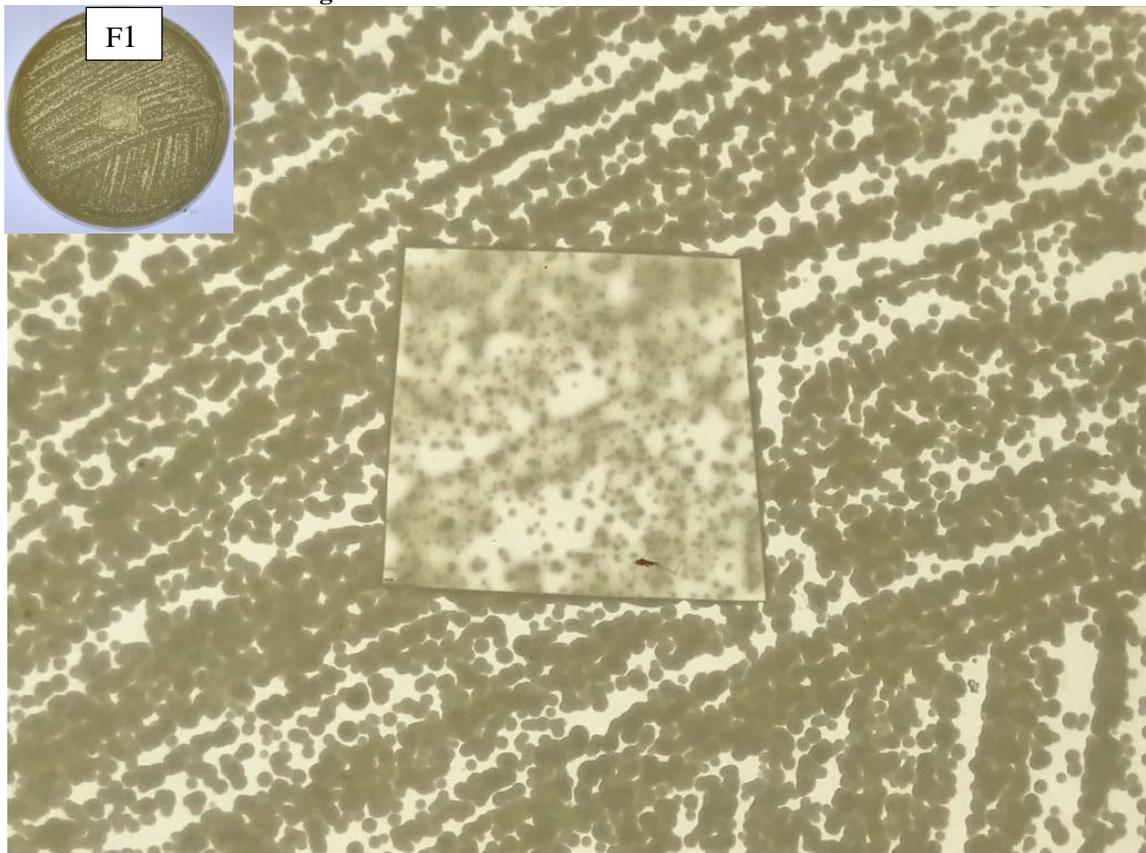
Para tornar melhor a análise do que acontece na superfície de contato do meio com o filme, foi desenvolvido um novo teste baseado no ensaio de difusão, que utilizou quadrados de 1,5 cm de lado dos filmes produzidos para o ensaio de disco (item 5.10).

Novamente houve formação de halo de inibição (diâmetro de  $24,67 \pm 0,58$  mm) somente no filme F2 (Figura 40). Contudo, foi possível observar a mudança de padrões de crescimento microbiano sob o filme. Podendo-se observar a olho nu três comportamentos básicos que se reproduzem uniformemente nas três repetições dos tratamentos:

- O primeiro observa-se nenhum crescimento microbiano sob o filme, este caso se restringe aos filmes F2 de agarose e  $\text{AgNO}_3$  (Figura 40);

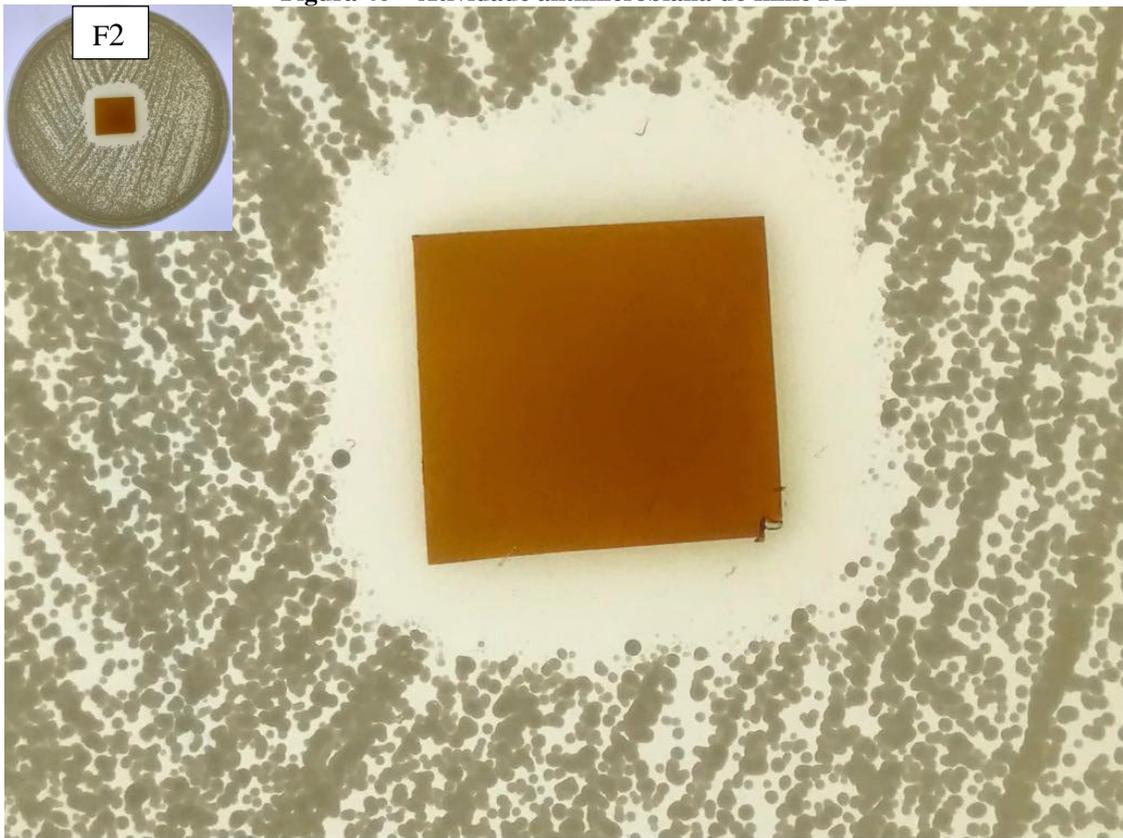
- O segundo padrão, observa-se um crescimento microbiano menor que o entorno do filme, mas uniforme sob toda extensão do mesmo. Este padrão foi observado para os filmes F1, F4 e F5, que correspondem respectivamente a filme de agarose (Figura 39), filme de agarose e NPsAg depositadas na superfície com as nanopartículas voltadas para cima (Figura 43) e filme de agarose e extrato de *S. cumini* (Figura 44);
- O terceiro padrão é referente aos filmes que apresentaram crescimento microbiano menor do que os do segundo grupo. Foram os tratamentos F3 e F4, que correspondem respectivamente ao filme de agarose e NPsAg com as nanopartículas incorporadas (Figura 41) e filmes de agarose e NPsAg depositadas na superfície com as nanopartículas voltadas para o meio de cultura (Figura 42).

**Figura 39 - Atividade antimicrobiana do filme F1**



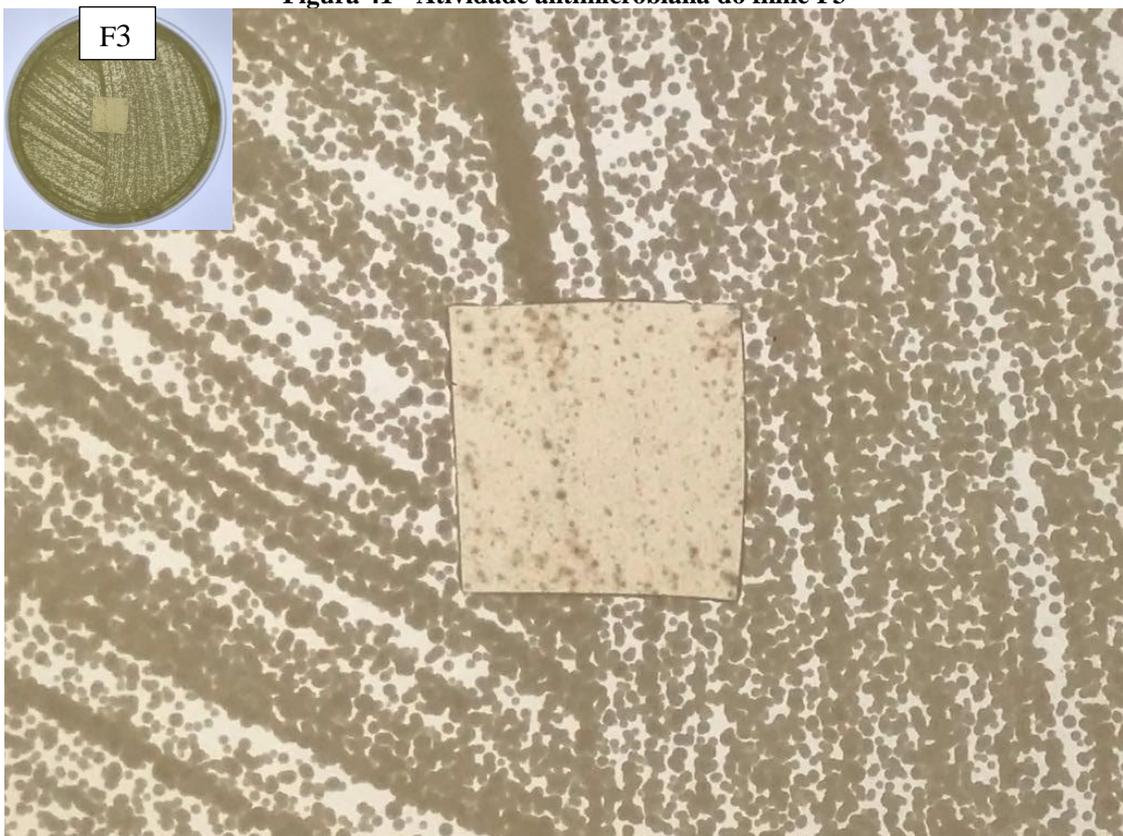
**Fonte: A autora.**

**Figura 40 – Atividade antimicrobiana do filme F2**



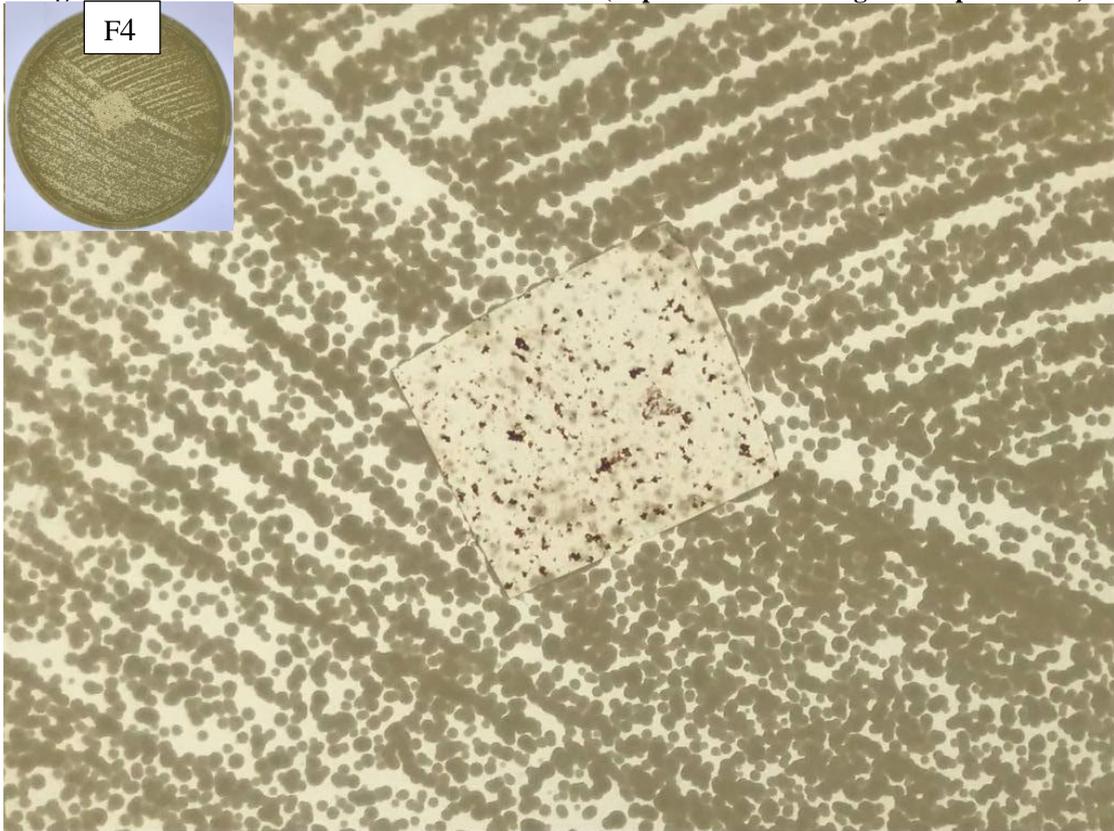
**Fonte: A autora.**

**Figura 41 - Atividade antimicrobiana do filme F3**



**Fonte: A autora.**

**Figura 42 - Atividade antimicrobiana do filme F4 (Superfície com NPsAg virada para baixo)**



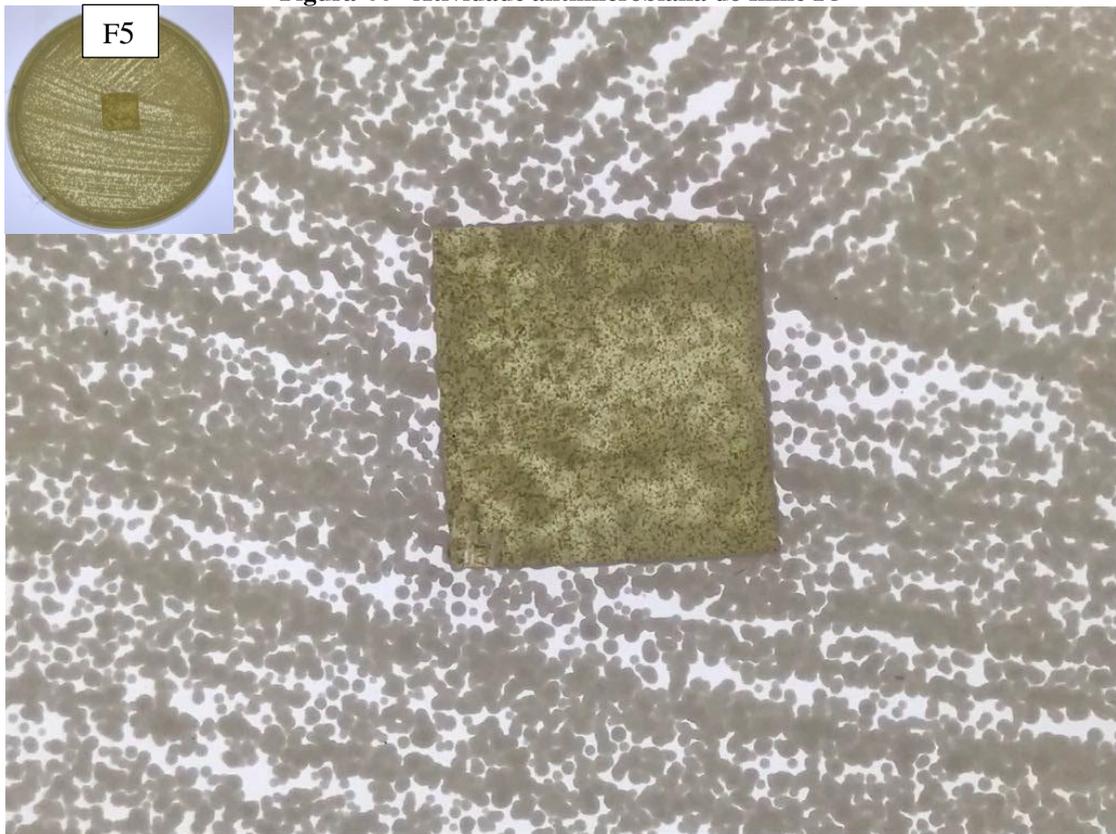
Fonte: A autora.

**Figura 43 - Atividade antimicrobiana do filme F4 (Superfície com NPsAg virada para cima)**



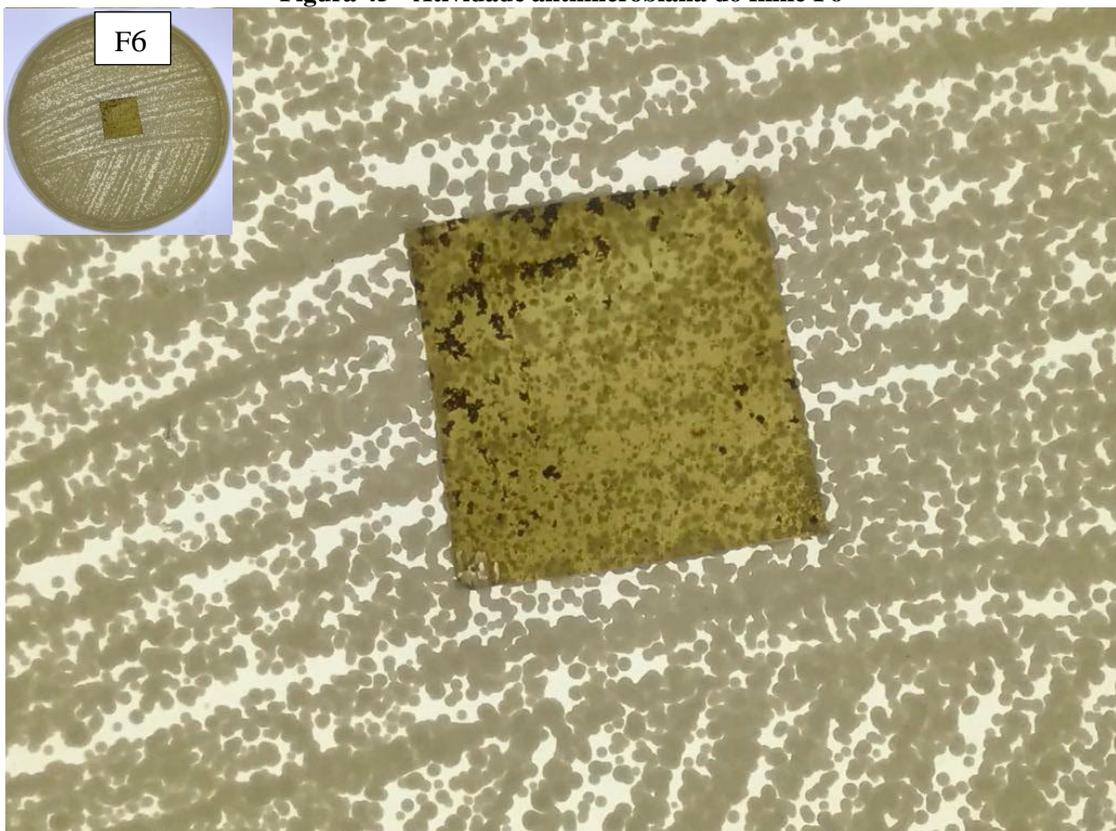
Fonte: A autora.

**Figura 44 - Atividade antimicrobiana do filme F5**



**Fonte: A autora.**

**Figura 45 - Atividade antimicrobiana do filme F6**



**Fonte: A autora.**

O protocolo para avaliar a atividade antimicrobiana por contato demonstrou-se robusto pela uniformidade das repetições de cada tratamento, todavia ainda apresenta algumas dificuldades. Entre elas:

- O método de avaliação foi qualitativo, sendo eventualmente necessária a utilização de testes estatísticos não paramétricos para a sua avaliação. O desenvolvimento de novas técnicas para gerar dados quantitativos é desejável, seja por aprimoramento da análise por imagem ou pelo desenvolvimento de técnicas microbiológicas;
- A visualização do resultado depende da transparência do filme, neste caso o uso de extratos de plantas não permite a visualização da região de contato, para este ensaio foi diminuída a quantidade que é usualmente empregada em ensaios de difusão em disco. Isto refletiu no poder antimicrobiano do filme. A presença de precipitados, como ocorreu no filme de agarose e NPsAg depositadas na superfície (F4), também teve sua avaliação comprometida.

Finalmente o protocolo pode constatar o efeito antimicrobiano da superfície dos filmes contendo NPsAg da síntese 7 estabilizadas. Este protocolo também demonstrou o efeito da deposição de NPsAg na superfície do filme, visto que o comportamento do filme com NPsAg na superfície foi dependente da face utilizada para o ensaio. Esta constatação viabiliza o desenvolvimento de dispositivos precisos na sua forma atuação.

## 6 CONCLUSÕES

O extrato alcóolico de folhas de *Syzygium cumini* apresentou os principais grupos funcionais da estrutura da planta e se mostrou eficiente contra os micro-organismos *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *C. albicans* nos testes antimicrobianos.

As NPsAg deste estudo apresentaram coloração amarelada, típica das mesmas, com formação comprovada através dos espectros de absorção na região do UV-Vis e se mostraram eficientes contra *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis*, *E. coli*, *M. marcescens* e *C. albicans*.

Por meio da técnica de centrifugação e ressuspensão foi possível obter NPsAg estabilizadas. Esta fração se mostrou ativa em meio líquido, porém não apresentou atividade antimicrobiana em ensaio de difusão em meio de cultura semi-sólido ou filmes.

Os filmes de agarose por “casting” com NPsAg e extrato se mostraram homogêneos, sem rachaduras, aderentes e flexíveis, sendo possível verificar a incorporação das NPsAg e do extrato ao filme de agarose.

Foi desenvolvido um filme polimérico baseado em agarose e NPsAg que além de possuir as características mecânicas acima citada se mostrou fungistático para *C. albicans* tendo sua ação localizada, ou seja, restringido-se a superfície do dispositivo.

## 7 PERSPECTIVAS

Objetiva-se realizar análises complementares para se obter um melhor conhecimento sobre os filmes produzidos, tais como atividade antimicrobiana, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e ensaios mecânicos. Desta forma será possível analisar os efeitos das NPsAg e do extrato de *S. cumini* nas características, propriedades e estrutura dos filmes.

Desenvolvimento de novas tecnologias para incorporar NPsAg em filmes poliméricos, preservando as características da síntese.

Investigar a possibilidade da síntese de NPsAg diretamente em filmes poliméricos utilizando a estufa de secagem.

Desenvolver filmes contendo NPsAg e  $\text{AgNO}_3$ .

Desenvolver melhoramentos no protocolo de avaliação antimicrobiana por contato.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B. da. **Jambolão: a cor da saúde**. 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Jambolao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Jambolao/index.htm)>.
- ALRUBAIY, L. Al-Rubaiy K. K. Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications. **Oman Med J**. 2009 January; 24(1): 4–6. doi: 10.5001/omj.2009.2
- ANDRADE, Maria Margarida de. **Introdução à metodologia do trabalho científico: elaboração de trabalhos de graduação**. 7. ed. São Paulo: Atlas, 2005.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pac J Trop Biomed**. 2012 Mar; 2(3): 240–246.
- 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.
- BANERJEE J, NARENDHIRAKANNAN RT. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Syzygium Cumini* (L.) Seed Extract and Evaluation Of Their In Vitro Antioxidant Activities. **Dig J Nanomater Bios**. 2011; 6: 961-968.
- BLAINE, G. Experimental observations on absorbable alginate products in surgery. **Annals of Surger** v. 125 N. 1, 1947.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: Baptista Silva JCC editor, 2004.
- CHOPRA, I. 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59:587-590.
- 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.
- CORREA, D. R. N.; VICENTE, F. B. V.; GRANDINI, C. R. **Influência do tratamento térmico no módulo de elasticidade da liga Ti-10%Zr usado como biomaterial**. Disponível em <[http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_37941133814.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_37941133814.pdf)>
- 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**. 2010. 80p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

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.

FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA NETO, N.; SANTOS, G. B. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação **Rev. Bras. Cir. Plást.** v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. **Polissacarídeos como biomateriais**. 2006. Disponível em <[http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ\\_100\\_072\\_28.pdf](http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_100_072_28.pdf)>

GIMÉNEZ, B., LACEY, A. L., SANTÍN, E. P., CABALLERO, M. E. L., MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agaregelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 264-271, 2013.

GOMES, D. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de alginato incorporados com extratos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan visando o desenvolvimento de substituto temporário de pele**. 2016. Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

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>>

GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases**. 2011. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

HALIM A. S. KHOO T. L. MOHD S. J. Y. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. **Indian J Plast Surg.** 2010 Sep; 43: S23–S28.

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.

HENRIQUE D. M. SILVA L. D. COSTA A. C. R. Rezende A. P. M. B. SANTOS J. A. S. MENEZES M. M. Controle de infecção no centro de tratamento de queimados: revisão de literatura. **Rev Bras Queimaduras**. 2013;12(4): p 230-234

KUMAR, V., YADAV, S.C. AND YADAV, S.K. Syzygium cumini Leaf Extract and Seed Extract Mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 85, 1301-1309, 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2427>

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, L. A.; SIANI, A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RIEHL, C. A. S. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (myrtaceae). **Química Nova**, 30(4), 860-864, 2007.

LORENZI, H., TORRES, H. M., 2003. *Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 368 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002.

MACEDO, J. L. S., SANTOS, J. B. COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS EM PACIENTES QUEIMADOS. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.**, v. 21, n. 2, p. 108-11, 2006

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.

MARK, J. E.; ALLCOCK, H. R.; WEST, R. Inorganic polymers. Second Edition. **Oxford University Press**, 2005.

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**, 35, No. 9, 1872-1878, 2012.

MEYER, J. F. **Superfícies funcionais aplicados a biomateriais inteligentes**. 2012. 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.

MIGLIATTO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORREA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense** 25 (2): 310-4, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil); DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS - DATASUS. **Informações de Saúde, Epidemiológicas e Morbidade: banco de dados**, 2016.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* Leaves. **PLoS ONE** 8(4), 2013.

MORAIS, G. F. da C.; OLIVEIRA, S. H. dos S.; SOARES, M. J. G. O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto contexto - enferm.**, Florianópolis, v. 17, n. 1, mar. 2008.

MORAIS, Gleicyanne C.; OLIVEIRA, Simone S.; SOARES, Maria Júlia O. Avaliação de Feridas pelos Enfermeiros de Instituições Hospitalares da Rede Pública. **Texto Contexto**

**Enfermagem.** Florianópolis, v.17 n.1, p. 98-105, jan./ mar., 2010. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>.

MOTTA, A.A.; AUN M,V,; KALI, J.; GIAVINA-BIANCHI, P. Dermatite de Contato. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.**; v. 34(3):73-82, 2011

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S. K.; LAL, J.; RAVIPRAKASH, V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia** 72 (2001) 369-375.

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.

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.

ONOFRE, N. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de agar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata.** 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomaterias: fundamentos e aplicações.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

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.

PAOLI, M. A. **Degradação e Estabilização de Polímeros.** 2 ed. Chemkeys, 2008.

PASQUINI, D., HENRIQUE, A.; SILVÉRIO, A.H. Preparação e caracterização de nanocompósitos de matriz de Agarose reforçados com nanocristais de celulose extraídos de fibras de caroço de manga. **52.º Congresso Brasileiro de Química**, Recife, 2012.

PETICA, A.; GAVRILIU, S.; LUNGU, M.; BURUNTEA, N.; PANZARU, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering B**, 152:22-27, 2008.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 44-48, Julho 2013. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252013000300014&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252013000300014&lng=en&nrm=iso)>.

RAPHAEL, E. **Estudo de eletrólitos poliméricos a base de ágar para a aplicação em dispositivos eletrônicos.** 2010. 147 p. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMINS, J. E. **An introduction to materials in medicine.** Academic Press, San Diego, 2004.

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.

ROCHA JÚNIOR, P. R. S. **Estudo das condições de cultivo para a produção de PHB por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. 2005. 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**. 2012. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SANTANA, G. M. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos baseados em agarose com a incorporação de ciprofloxacina para utilização como novo substituto temporário de pele**. 2015. Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

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.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**. Vol. 145. P 83-96, 2009.

SHIRANE, H. Y. ODA, D. Y., PINHEIRO, T. C., CUNHA, M. R. Implantes de Biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de rato. **Rev. Bras. Ortop**. v. 45, n. 5, p. 478-82, 2010.

SILVA JÚNIOR, C. A. da; SOUZA, R. M. de; SILVA, L. C. N. da; ARAÚJO, J. M. de; CAVALCANTI, M. S.; CORREIA, M. T. S. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE *Syzygium cumini* (L.)**. In: Reunião Anual da SBPC, 62, 2009, Natal, RN. Anais (on-line). Disponível: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/5857.htm>.

SONAI, G. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas de Prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone contendo trans-[RuCl<sub>2</sub>(vpy)<sub>4</sub>] para fins antimicrobiano**. 2008. Monografia (Bacharelado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SOUSA, W. F. de. **Avaliação da centrifugação como método para separação granulométrica de nanopartículas de prata**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SOUZA, J. C. M. C. **Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

SRIKAR, S. K., GIRI, D. D., PAL, D. B., MISHRA, P. K&UPADHYAY, S. N. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. **Green and Sustainable Chemistry**, 6(01), 34, 2016.

SU, Y., CHU, B., GAO, Y., WU, C., ZHANG, L., CHEN, P., WANG, X., TANG, S. Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. **Carbohydrate Polymers**, v. 92 p. 2245– 2251, 2013.

VILLANOVA, J. C. O., ORÉFICE, R. L., CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VIZZOTTO, M., FETTER, M. R. da. Jambolão: o poderoso antioxidante. Artigo de Divulgação na Mídia da Embrapa Clima Temperado, online, Rio Grande do Sul, maio, 2009. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/noticias/artigo-jambolao-o-poderoso-antioxidante>.

WUNDERLICH, B. L., MARCOLLA, B., SOUZA, J. A., ARAUJO, E. J., FEIJÓ, R., PEREIRA, M. J. L. Curativo com pressão negativa e matriz de regeneração dérmica: uma nova opção de tratamento para feridas extensas. **Rev. Bras. Queimaduras**, v. 10, n. 3, p. 78-84, 2011.

ZARPELON, F. **Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de Efluentes Industriais para Reuso**. 2013. 82f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em engenharia e ciência dos materiais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.