UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

LORENA OLIVEIRA DE SOUSA

**Membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata
para regeneração tecidual**

São Carlos

2018

LORENA OLIVEIRA DE SOUSA

Membranas de quitosana/gelatina com nanopartículas de prata para regeneração tecidual

Versão Corrigida
(Original da Unidade)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais
de Oliveira Junior

São Carlos
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S725 Sousa, Lorena Oliveira de
m Membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas
de prata para regeneração tecidual / Lorena Oliveira de
Sousa; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior.
São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais e Área de
Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Gelatina. 2. Quitosana. 3. Nanopartículas de
prata. 4. Regeneração tecidual. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciado **LORENA OLIVEIRA DE SOUSA**.

Título da tese: "Membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata para regeneração tecidual".

Data da defesa: 09/11/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Oswaldo Novais de Oliveira Junior**
(Presidente)
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovada

Profa. Dra. **Eliana Cristina da Silva Rigo**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

aprovada

Dra. **Natalia Mayumi Inada**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovada

Profa. Dra. **Marisa Masumi Beppu**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

APROVADA

Profa. Dra. **Rafaela Cristina Sanfelice**
(Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Rafael Salomão**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Aos meus queridos avôs, mãe, irmãs e sobrinhos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao professor Osvaldo Novais de Oliveira Junior (Chu), por ter me auxiliado tão atenciosamente durante essa longa caminhada, e ter aceitado essa junção complexa e desafiadora de Biologia, Física e Engenharia de Materiais.

Aos meus familiares, que sempre foram presentes mesmo há quase 1000 quilômetros de distância. Principalmente a minha irmã primogênita, Lazara Aline. Os olhos enchem para falar e agradecer. Desde o início, não teve um momento se quer que deixasse de me incentivar e amparar. A entrega dessa tese, nos marca com o início de uma outra luta particular, que sabemos que seremos vencedoras.

Ao meu namorado Caio, companheiro e incentivador desde o início dessa jornada. Nos últimos meses aguentou firmemente e pacientemente as noites e dias tensos de escrita, cheios de estresse.

Aos amigos, professores e técnicos do Grupo de Polímeros – Instituto de Física de São Carlos. Especialmente, a técnica Débora Balogh por tanta paciência, a Livia pela melhor risada que já ouvi, e a Simone pelas melhores histórias. Por todos os desabafos na famosa “copinha” que faziam com que saíssemos dali cheios de café, porém, mais esperançosos e mais leves.

Ao pesquisador Robson Rosa, pelo auxílio com as sínteses de nanopartículas e imagens de microscopia.

Ao Grupo de Ótica – IFSC, especialmente a doutoranda Ila e a técnica Natalia pelo auxílio com os ensaios *in vitro* e discussões que foram fundamentais para a conclusão desta tese.

À Embrapa Instrumentação, especialmente a doutoranda Kel, que auxiliou nos primeiros ensaios *in vitro*.

E à Capes pelo fomento.

RESUMO

SOUSA, O. L. **Membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata para regeneração tecidual. 102 p.** Tese (Doutorado) – Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Nesta tese, foram produzidas e estudadas membranas de gelatina e quitosana com nanopartículas de prata, visando obter sinergia em suas propriedades para aplicações em engenharia de tecidos. Os materiais foram escolhidos por suas propriedades e aplicações similares. A gelatina é um polipeptídeo biocompatível e biodegradável, obtido do colágeno de animais. A quitosana, um polímero encontrado na parede celular de alguns organismos do reino fungi, pode ser obtida da desacetilação da quitina. É biocompatível, biodegradável, e pode ter efeito antimicrobiano. Nanopartículas de prata também têm efeito antimicrobiano. As membranas foram preparadas por método de *casting*, e as nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas com o método de Turkevich adaptado (TK-AgNPs) e outro similar com adição de ácido tânico (AT-AgNPs). Membranas com diferentes composições foram fabricadas: de gelatina apenas, de quitosana, e blendas de gelatina com quitosana (GQ), com adição de diferentes concentrações de AT-AgNPs ou TK-AgNPs, reticuladas com glutaraldeído (Gta) ou não. O objetivo era identificar uma composição com boa capacidade antimicrobiana e baixa toxicidade para células humanas. As membranas eram visualmente homogêneas, e a incorporação de nanopartículas foi comprovada por difração de raios X e espectroscopia no infravermelho. As AT-AgNPs eram menores e mais monodispersas do que as TK-AgNPs. As membranas contendo apenas quitosana e gelatina não apresentaram atividade antimicrobiana. As que continham AgNPs foram tóxicas para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* segundo testes de halo de inibição, com toxicidade dependente da concentração de AgNPs. As mais eficazes foram as membranas quitosana/TK-AgNPs/Gta, GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs. Nenhuma das membranas apresentou toxicidade contra células de fibroblastos humano. Tais resultados confirmam a possibilidade de aplicação dos materiais estudados como curativos para regeneração tecidual.

Palavras-chaves: Gelatina. Quitosana. Membrana. Nanopartículas de prata. Regeneração tecidual.

ABSTRACT

SOUSA, O. L. **Gelatin/chitosan membranes with silver nanoparticles for tissue regeneration.** 102 p. Tese (Doutorado) – Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

In this thesis, gelatin and chitosan membranes with silver nanoparticles were produced and studied, aiming at obtaining synergy in their properties for tissue engineering applications. The materials were chosen for their similar properties and applications. Gelatin is a biocompatible and biodegradable polypeptide derived from animal collagen. Chitosan, a polymer found in the cell wall of some fungi, can be obtained from the deacetylation of chitin. It is biocompatible, biodegradable, and may have antimicrobial effect. Silver nanoparticles also have antimicrobial effect. The membranes were prepared using the casting method, and the silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized with an adapted Turkevich method (TK-AgNPs) and a similar one with addition of tannic acid (AT-AgNPs). Membranes with different compositions were made: gelatin only, chitosan, and blends of gelatin and chitosan (GQ), with the addition of different concentrations of AT-AgNPs or TK-AgNPs, crosslinked with glutaraldehyde (Gta) or not. The objective was to identify a composition with good antimicrobial capacity and low toxicity to human cells. The membranes were visually homogeneous, and the incorporation of nanoparticles was confirmed by X-ray diffraction and infrared spectroscopy. The AT-AgNPs were smaller and more monodisperse than the TK-AgNPs. Membranes containing only chitosan and gelatin had no antimicrobial activity. Those containing AgNPs were toxic to the Gram-positive *Staphylococcus aureus* bacterium according to halo tests, with AgNP concentration-dependent toxicity. The most effective were the chitosan/TK-AgNPs/Gta membranes, 0.05% GQ AT-AgNPs and 0.1% GQ AT-AgNPs. None of the membranes showed toxicity against human fibroblast cells. These results confirm the possibility of application of the membranes as curatives for tissue regeneration.

Key-words: Gelatin. Chitosan. Membrane. Silver nanoparticles. Tissue regeneration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composições das membranas obtidas (total de 16), com as concentrações de gelatina, quitosana, AgNPs e reticulante utilizadas para produção de cada uma.....	39
Tabela 2 - Principais características da quitosana utilizada. Adaptado (Soares, 2012).	49
Tabela 3 - Rugosidades média (Ra) e RMS (Rq) das membranas sobre diferentes áreas projetadas, obtidas das imagens de microscopia de força atômica, com análise pelo software NanoScope.	63
Tabela 4 - Membranas que formaram halo de inibição.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do processo de reticulação de gelatina/quitosana com glutaraldeído.	31
Figura 2 - Estrutura química do ácido tânico.	35
Figura 3 – Esquema de reação química para a síntese de AgNPs com o agente estabilizador ácido tânico (AT) e citrato de sódio (CS) como principal agente redutor.	35
Figura 4 - Sistema da síntese de nanopartículas esféricas de prata (AgNPs) pelo método de Turkevich (TK-AgNPs) e (AT- AgNPs) com adição de ácido tânico.	38
Figura 5 - Procedimento para medida de espessuras das membranas.	41
Figura 6 - Suspensões de AgNPs obtidas pelo método de Turkevich (TK- AgNPs) (a), e com adição ácido tânico (AT-AgNPs) (b).	50
Figura 7 - Micrografias de transmissão (MET) da suspensão de nanopartículas obtidas pelo método de Turkevich (TK-AgNPs) (a,b e c), com tamanho médio de 59,1 nm, e histograma de distribuição de tamanhos (d).	50
Figura 8 - Micrografias (MET) da suspensão de nanopartículas, obtidas pela adição de ácido tânico (AT-AgNPs), no intervalo de 5 min, com tamanho médio de 9,6 nm.	52
Figura 9 - Micrografia (MET) da suspensão de nanopartículas obtidas pela adição de ácido tânico (AT-AgNPs), no intervalo de 10 min, com tamanho médio de 9,8 nm.	52
Figura 10 - Espectroscopia de UV-Vis. da suspensão resultante da síntese TK-AgNPs.	54
Figura 11 - Espectros no UV-Vis. da suspensão resultante da síntese AT-AgNPs (primeiros intervalos).	55
Figura 12 - Espectros no UV-Vis. da suspensão resultante da síntese AT-AgNPs (últimos intervalos).	56
Figura 13 - Espectros no UV-Vis. da suspensão resultante da síntese TK- AgNPs e AT-AgNPs.	56
Figura 14 – Distribuição de tamanho de partículas a partir de resultados de DLS para a solução da síntese de TK-AgNPs, concentração de 0,009%.	57
Figura 15 – Distribuição de tamanho de partículas a partir de resultados de DLS para a suspensão resultante da síntese de AT-AgNPs.	58
Figura 16 - Fotografias das membranas. Puras: gelatina (G), quitosana (Q), gelatina/quitosana (GQ). Membranas com TK-AgNPs: gelatina (G TK-AgNPs), quitosana (Q TK-AgNPs), gelatina/quitosana (GQ TK-AgNPs). Membranas reticuladas: gelatina (G/Gta), quitosana (Q/Gta), gelatina/quitosana (GQ/Gta). Membranas com TK-AgNPs reticuladas: gelatina (G TK-AgNPs/Gta), quitosana (Q TK-AgNPs/Gta), gelatina/quitosana (GQ TK-AgNPs/Gta).	59
Figura 17 - Fotografia das membranas com AT-AgNPs.	59
Figura 18 - Micrografias das membranas de gelatina G (a), gelatina com TK-AgNPs (b), quitosana (c), quitosana com TK-AgNPs (d), gelatina/quitosana (e), gelatina/quitosana/AgNPs (f).	60
Figura 19 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) das membranas em diferentes concentrações de nanopartículas de prata.	62
Figura 20 - Difrátogramas das membranas puras: gelatina (G), quitosana (Q), membrana de gelatina/quitosana (GQ) e gelatina/quitosana/AgNPs.	64
Figura 21 - Difrátogramas das membranas reticuladas com Gta: gelatina (G/Gta), quitosana (Q/Gta) e difratometria das membranas reticuladas com Gta e com adição de AgNPs: G TK-AgNPs e Q-TK-AgNPs.	65

Figura 22 - Difratoogramas das membranas gelatina/quitosana (GQ) com NPs com adição de ácido tânico (AT-AgNPs): GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs.....	66
Figura 23 - Espectros no infravermelho por ATR em membrana pura de gelatina (G) e membrana de gelatina com TK-AgNPs (G TK-AgNPs).	67
Figura 24 - Espectros no infravermelho por ATR em membrana pura de quitosana (Q) e membrana de quitosana com (Q-TK-AgNPs).	68
Figura 25 - Espectros no infravermelho por ATR em membrana pura de quitosana (Q) e membrana de quitosana com (Q-TK-AgNPs).	69
Figura 26 - Espectros no infravermelho por ATR em membranas com adição de AT- AgNPs.	70
Figura 27 - Ensaio de intumescimento das membranas puras (lado esquerdo): G, Q e GQ. Membranas reticuladas com Gta (lado esquerdo): G/Gta, Q/Gta e GQ/Gta. Membranas com adição de TK-AgNPs (lado direito): G TK-AgNPs, Q TK-AgNPs, GQ TK-AgNPs e Membranas reticuladas com Gta e adição de TK-AgNPs (lado direito): G/gta TK-AgNPs, Q/Gta TK-AgNPs e GQ/Gta TK-AgNPs.....	72
Figura 28 - Ensaio de intumescimento das membranas na ausência de AT-AgNPs: GQ e das membranas com adição de AT-AgNPs: GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs, AT-GQ 0,1% AgNPs.....	74
Figura 29 - Espectros no UV-Vis para membranas: GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs em solução PBS (pH 7,4), no período de 24 h.....	75
Figura 30 - Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória por diluição em caldo das AT-AgNPs nas concentrações de 0,031mM; 0,0062 mM; 0,0125, 0,05 mM e 0,1 mM em contato com a cepa da bactéria Gram-positiva <i>S.aureus</i>	77
Figura 31 - Ensaio microbiológico por diluição em caldo da concentração original de AT-AgNPs (0,025 mM) por diluição em caldo, utilizando fase líquida (sobrenadante) e fase sólida (precipitado). Não houve efeito antimicrobiano.	79
Figura 32 - Ensaio microbiológico por diluição em caldo da concentração original de AT-AgNPs (0,1 mM), utilizando fase líquida (sobrenadante) e fase sólida (precipitado). Houve efeito antimicrobiano somente para as duas fases.....	79
Figura 33 - Ensaio microbiológico com as membranas TK-AgNPs em contato na cultura de bactéria Gram negativa <i>S.aureus</i> : (1) membrana G, (2) membrana Q, (3) membrana GQ,(4) membrana GQ/Gta, (5) membrana G/TK-AgNPs,(6) membrana GQ/TK-AgNPs, (7) membranas G/TKAgNPs. Somente a membrana (6) membrana GQ TK-AgNPs formou halo de inibição.	80
Figura 34 - Ensaio Microbiológico por disco difusão com discos de papel filtro imersos em soluções de G TK-AgNPs, G TK-AgNPs/Gta, Q TK-AgNPs, Q TK-AgNPs /Gta, GQ TK-AgNPs e GQ TK-AgNPs, em cultura de bactéria gram-positiva <i>S.aureus</i>	82
Figura 35 - Ensaio Microbiológico com a cultura de bactéria gram-negativa <i>E.coli</i> com discos de papel filtro imersos em soluções de gelatina/AgNPs (G/Ag), gelatina/AgNPs/gta (G/Ag/Gta), quitosana/AgNPs (Q/Ag) e quitosana/AgNPs /glutaraldeído(Q/AgNPs/Gta.	82
Figura 36 - Ensaio Microbiológico com a cultura de bactéria Gram-positiva <i>S. aureus</i> com as membranas: GQ, GQ 0,0125% AT- AgNPs, GQ 0,025% AT- AgNPs, GQ 0,05% AT- AgNPs, GQ 0,1% AT- AgNPs.	83
Figura 37 - Teste de viabilidade celular com as membranas de gelatina/quitosana pura (G/Q) e membranas gelatina/quitosana com nanopartículas de prata: G/Q 0,0125% TA-AgNPs, G/Q 0,025% TA-AgNPs, G/Q 0,05% TA-AgNPs e G/Q 0,1% TA-AgNPs.....	87

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AgNPs	Nanopartículas de prata
AT	Ácido tânico
AT-AgNPs	Nanopartículas com adição de ácido tânico
CIM	Concentração inibitória mínima
CS	Citrato de sódio
DRX	Difratometria de Raios X
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
G	Gelatina
G/Q	Gelatina/quitosana
Q	Quitosana
Gta	Glutaraldeído
NPs	Nanopartículas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TK	Turkevich
TK-AgNPs	Nanopartículas obtidas pelo método de Turkevich
UV-vis	Espectroscopia por Luz Ultra Violeta Visível
ET	Engenharia de Tecido

Sumário

1	Introdução.....	21
2	Revisão Bibliográfica	24
3	Objetivos.....	36
3.1	Objetivos específicos	36
4	Materiais e Procedimentos experimentais	36
4.1	Materiais	36
4.1.1	Síntese de TK- AgNPs e AT-AgNPs	36
4.1.2	Obtenção das membranas	37
4.2	Obtenção dos materiais	37
4.2.1	Síntese de nanopartículas de prata (Método Turkevich/ TK-AgNPs).....	37
4.2.2	Síntese de nanopartículas de prata (Método com adição de ácido tânico/ AT-AgNPs).....	37
4.2.3	Purificação da Quitosana	38
4.2.4	Preparo das membranas	38
4.3	Caracterizações Físico-Químicas	41
4.3.1	Difratometria de Raios X.....	41
4.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
4.3.3	Microscopia electronica de transmissão (MET)	42
4.3.4	Microscopia de força atômica (AFM).....	42
4.3.5	Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR).....	43
4.3.6	Espectroscopia na região do UV-Vis.....	43
4.3.7	Teste de liberação por UV-Vis	44
4.3.8	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	44
4.3.9	Ensaio de Intumescimento	44
4.4	Testes biológicos	45
4.4.1	Susceptibilidade bacteriana às membranas	45
4.4.2	Concentração mínima inibitória (<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> , MIC) para AT-AgNPs ..	46
4.4.3	Avaliação da viabilidade celular:	46
5	Resultados e discussão.....	48
5.1	Purificação da quitosana	48
5.2	Sínteses de nanopartículas de prata.....	49

5.2.1	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	50
5.2.2	Espectroscopia no região ultravioleta visível (UV-VIS)	53
5.2.3	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	57
5.3	Aspectos das membranas	58
5.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
5.5	Microscopia de Força Atômica (AFM)	61
5.6	Difratometria de Raios X	63
5.6.1	Membranas com TK-AgNPs.....	63
5.6.2	Membranas com TK-AgNPs reticuladas.....	64
5.6.3	Membranas com AT-AgNPs.....	65
5.7	Espectroscopia por Reflectância Total Atenuada	66
5.8	Ensaio de Intumescimento	70
5.9	Teste de Liberação das suspensões de AT-AgNPs.....	75
5.10	Ensaio Microbiológicos.....	76
5.10.1	Soluções de AT-AgNPs	77
5.10.2	Ensaio Microbiológico em membranas com AT-AgNPs.....	83
5.11	Testes de Viabilidade celular (citotoxicidade).....	85
6	Conclusões	88
	Referências Bibliográficas	90

1 Introdução

A pele, o maior órgão do corpo, tem como principais funções a proteção contra toxinas e microorganismos patogênicos, evitar a desidratação excessiva e realizar detecção, controle de temperatura e a autocura (Clark *et al.*, 2007). Sua perda parcial ou integral devido a lesões ou doenças crônicas pode resultar em desequilíbrio fisiológico, além da dor e desconforto; pode inclusive gerar incapacidade significativa ou mesmo morte (Clark *et al.*, 2007). No Brasil, feridas crônicas que demoram mais de 6 meses para cicatrizar, e cutâneas que são geralmente consequência de um trauma e precisam de período curto de cicatrização (Santos *et al.*, 2014), constituem um sério problema de saúde pública. Embora sejam escassos os registros desses atendimentos, sabe-se que há grande número de pacientes com alterações na pele, principalmente idosos (Duim *et al.*, 2015). Normalmente não recebem o devido tratamento, por questões financeiras ou falta de informação. As causas mais prevalentes das lesões de pele relacionam-se às úlceras por pressão, insuficiência vascular (venosa ou arterial), traumas, restrições na mobilidade (transitória ou permanente) e neuropatias diabéticas (Duim *et al.*, 2015). Feridas superficiais (na epiderme, derme e hipoderme) causadas por agentes químicos, condições patológicas, trauma e fraturas graves, muitas vezes demoram para cicatrizar, ou deixam cicatrizes devido a falta de atenção e escolha do curativo adequado. Curativos como gazes, *bandaid*, ou pomadas cicatrizantes são de baixo custo, mas em sua maioria, não oferecem ação antimicrobiana. Além disso, são oclusivos (dificultam a cicatrização), empregando agentes químicos tóxicos e causam desconforto para serem retirados.

A regeneração tecidual é um tratamento cujo principal objetivo é reconstituir tecidos na área traumatizada. Pode ser alternativa aos curativos, sem os efeitos indesejáveis citados acima. Materiais que induzem regeneração precisam ter bioatividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Oryan *et al.*, 2016). Para uma matriz provisória de cicatrização de feridas, por outro lado, os materiais precisam ser duráveis, com superfície aderente para células e suporte para regeneração de tecidos (Kirsner *et al.*, 2015). A maioria dos produtos disponíveis comercialmente é de natureza estática, o que significa que eles devem ser produzidos exatamente na forma do defeito, permanecendo imóveis no local da ferida e, não

são biodegradáveis (Lonnqvist *et al.*, 2015). Isso pode causar desconforto ao paciente para a sua retirada. Há, portanto, estímulos para o desenvolvimento de um curativo maleável e biodegradável sem resíduos tóxicos, contendo agentes antimicrobianos e que se estabilize quando aplicado na pele. Estes requisitos podem ser atendidos com a aplicação de filmes e membranas. Esse tipo de curativo pode ser fabricado com polímeros e outros materiais de fontes naturais, principalmente combinados a nanomateriais para otimização das propriedades desejadas para a aplicação.

Biomateriais à base de polímeros solúveis em água, por exemplo, são capazes de combinar propriedades antibacterianas e catalíticas das nanopartículas de prata (AgNPs), sem promover a toxicidade para células saudáveis (Sharma *et al.*, 2009). Muitos polímeros têm sido empregados na preparação de filmes (Cheng *et al.*, 2003), membranas (He *et al.*, 2018), blendas (Vimala *et al.*, 2010) e nanocompósitos poliméricos de prata (Bajpai *et al.*, 2007). A quitosana (Q), em particular, é um polímero natural, extraído de fonte renovável, biocompatível, biodegradável, e tem atividade antibacteriana (Vimala *et al.*, 2010). É um polímero encontrado na parede celular de alguns microrganismos como os fungos e de animais como os crustáceos, ou obtido da desacetilação da quitina por hidrólise (Soares, 2012). A quitosana é usada em muitas aplicações, como aditivo em alimentos e cosméticos, e engenharia de tecidos (Wan *et al.*, 2005). Outra de suas vantagens está na possibilidade de complexação com metais, o que permite combiná-la com nanopartículas metálicas.

A gelatina, obtida da desnaturação parcial do colágeno, é uma proteína solúvel que apresenta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, plasticidade, boa aderência e excelente capacidade de crescimento celular. É, assim, ótimo biomaterial para a engenharia de tecidos e produtos farmacêuticos (Chen *et al.*, 2005). Sua disponibilidade, facilidade de acesso e baixo custo facilitam a seletividade e produção em grande escala (Neumann *et al.*, 1981; Lonnqvist *et al.*, 2015). Derivado do colágeno, a gelatina compartilha muitas de suas propriedades biológicas com o benefício de facilidade de modificações moleculares (Lonnqvist *et al.*, 2015). Já há muitas pesquisas sobre gelatina empregada em regeneração de tecido, mas ainda é necessário investigar seu uso em aplicações de cicatrização de feridas cutâneas.

Neste trabalho de doutorado, o objetivo é projetar uma nova “abordagem verde” para a síntese de compósito de quitosana/gelatina/AgNPs. Na engenharia de materiais e

bioengenharia, a quitosana e gelatina são aplicadas na fabricação de membranas e filmes que servem de matriz para tecidos e crescimento celular. A presença de grupos carboxílicos na gelatina permite sua interação com quitosana através de ligações de hidrogênio (Oliveira, 2013). Pode-se, assim, formar um biomaterial não tóxico aos humanos, que pode ser mais vantajoso devido à soma das características dos materiais. A junção desses dois polímeros pode apresentar uma vantagem devido à sua biocompatibilidade (Rana *et al.*, 2010) e baixo custo.

As propriedades das membranas nem sempre são adequadas, o que exige sua modificação estrutural com outros agentes reticuladores. Exemplos desses reticuladores são o glutaraldeído e a genipina ou protoancianidina (Fiamingo, 2013). O glutaraldeído (Gta) é usado na reticulação da gelatina e quitosana, devido ao seu baixo custo e eficiência na estabilização de materiais poliméricos. Por meio de bases de Schiff este reticulante permite à gelatina ter resistência à água, e não apresenta citotoxicidade se utilizado em baixas concentrações (Jayakrishnan e Jameela, 1996) (Sun e Tan, 2013).

A produção de membranas a partir de materiais como quitosana e gelatina pode ser beneficiada com nanotecnologia, tanto no que concerne aos procedimentos de fabricação das membranas, quanto na incorporação de nanomateriais. Nanopartículas (NPs), por exemplo, são usadas em aplicações na saúde, em cosméticos, em indústrias químicas, na liberação controlada de fármacos e em energia. As NPs de prata (AgNPs) são de interesse em aplicações biomédicas, principalmente por ter propriedades antimicrobianas que podem ser incorporadas em biomateriais para evitar infecções com bactérias patogênicas ou não patogênicas. A atividade antimicrobiana da prata já é bem conhecida, atribuída à liberação de íons de prata da superfície do material para o meio (Iravani, *et al* 2014). Sabe-se, entretanto, que a prata também pode ser tóxica para células saudáveis de mamíferos. A vantagem de usar nanopartículas está no aumento considerável da razão superfície-volume de qualquer material (Berté, 2013), em que se pode utilizar mínimas concentrações de prata, tentando conservar efeito tóxico para células, sem prejudicar células saudáveis.

Neste trabalho, obtivemos uma blenda polimérica de gelatina/quitosana com características aprimoradas para regeneração de tecido (RT), utilizando a menor quantidade possível de agentes antimicrobianos, visando a diminuir qualquer toxicidade que possa

impedir seu emprego para RT. As membranas foram produzidas pelo método de *casting*, no qual a solução do polímero é colocada em um molde para a secagem, empregando placas de Petri de poliestireno. Este método foi escolhido para obter membranas autossustentáveis que possam futuramente ser usadas como curativos, auxiliando o crescimento do tecido epitelial danificado e preenchendo espaços, como veículos de entrega de moléculas, e como estruturas que podem promover organização celular e direcionar a formação do tecido desejado (Drury e Mooney, 2003).

Vários trabalhos foram publicados relacionados a biopolímeros e hidrogéis com AgNPs para materiais antibacterianos (Bajpai *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2013; Follmann *et al.*, 2016). No entanto, há uma deficiência de resultados em relação a toxicidade das AgNPs, microrganismos e células saudáveis do corpo humano, requerendo estudos minuciosos especificando concentrações de AgNPs que podem ser utilizadas com biopolímeros com liberação controlada. Para atingir objetivos ambiciosos como os traçados acima, é necessário fazer um estudo sistemático para otimizar o processo de modificação das membranas, a partir das técnicas de caracterização onde o cultivo celular favoreça a adesão e o crescimento de células. Nesta tese, serão apresentados os resultados deste estudo sistemático. Mais especificamente, serão relatados os resultados das síntese e caracterizações físico-químicas das AgNPs, da fabricação de membranas de quitosana, gelatina e blendas entre elas, incluindo a incorporação de AgNPs nessas blendas. Serão também apresentados resultados de intumescimento, ensaios de microbiologia e de citotoxicidade das AgNPs e das membranas.

2 Revisão Bibliográfica

Biomateriais

Define-se biomaterial como qualquer material biocompatível e inerte, ou seja, que gere resposta mínima do tecido, e que interaja com um organismo vivo sem induzir reações adversas na área de contato (Costa *et al.*, 2016). Há registro de sua aplicação no uso de suturas de linho e ouro no Antigo Egito (2000 AC) e de intestino de gatos, na Europa, durante a Idade Média, assim como de dentes artificiais feitos de conchas pelos maias (600 AC), de ferro pelos franceses (200 AC) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas (Pires *et al.*,

2015). Nos últimos 50 anos, cerâmicas, metais e materiais poliméricos têm sido usados para substituir ou reparar diferentes partes do corpo (Hench, 1998). Inicialmente o principal objetivo era que houvesse biocompatibilidade do material que viesse a substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico. Não se esperava resposta biológica do paciente, para aumentar a vida do implante. Atualmente o foco está em materiais bioativos, biodegradáveis e biomiméticos como mostrado na Figura 1. Buscam-se materiais que possam ser incorporados ou absorvidos (após dissolução) pelo tecido hospedeiro, que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica com estimulação em nível celular (Pires *et al.*, 2015). Polímeros naturais e sintéticos são os mais utilizados nas mais diversas aplicações. Podem ser dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos (Pires *et al.*, 2015). Alguns polímeros sintéticos usados incluem o polimetil-metacrilato (PMMA) para lentes (contato e intra-oculares) e cimentos ósseos; o poli(tereftalato de etila) (PET) e politetrafluoretileno (PTFE) para próteses vasculares, e polietileno (PE) para copos e catéteres (Ambrosio, 1998). Os polímeros naturais propiciam características especiais para utilização como biomaterial e, em particular, sua flexibilidade estrutural permite adaptar propriedades para a aplicação desejada (Weil e Barz, 2017). Podem ser utilizados em aplicações biomédicas, incluindo sistemas de liberação de fármacos, terapias e cicatrização de feridas de sistemas coloidais ou hidrogéis para formulações de liberação local (Weil e Barz, 2017). O ácido hialurônico é usado em estética, os elastômeros de poliuretano são empregados em corações artificiais, revestimentos de marcapasso e cateteres. O ácido poliglicólico (PGA) e poli ácido L-láctico (PLLA) são usados como sistemas biodegradáveis para sutura e placas em aplicações ortopédicas e maxilo-faciais (Ozdil e Aydin, 2014). Os polímeros naturais derivados do colágeno como o alginato, a quitosana e a fibroína são usados em regeneração tecidual, por apresentarem compatibilidade com tecido-suporte (Ozdil e Aydin, 2014).

Figura 1: Evolução da funcionalidade e das funções dos biomateriais ao longo de seu desenvolvimento. Fonte : (Pires *et al.*, 2015).

Curativos e novas alternativas

Milhares de pacientes anualmente sofrem com lesões na pele decorrentes de algum trauma, tumor ou doenças degenerativas. Em alguns casos, o procedimento inadequado no tratamento da ferida deixa cicatrizes ou mesmo perda total do tecido original (Santos., *et al* 2014). Curativos biodegradáveis, que restaurem de forma rápida e eficaz o tecido danificado, são portanto necessários do ponto de vista clínico e sócio-econômico (Dum., *et al* 2015). As estratégias de curativos para cicatrização, embora atraentes, ainda não são totalmente eficazes para atividade antimicrobiana. Por isso há uma busca por materiais que impeçam a proliferação de microrganismos patogênicos e auxiliem a regeneração de tecido. Curativos de tecido (gaze) como o apresentado na Figura 2 não apresentam toxicidade em células epiteliais, têm baixo custo e de fácil manuseio. Porém, devido à falta de aderência na pele e falta de absorção, perderam espaço para materiais poliméricos, tais como filmes de poliuretano, espumas, hidrogéis e hidrocolóides, bem como alginatos de cálcio, colágenos, gelatina e quitosana, que são utilizadas desde a década 1980 por especialistas, principalmente para regeneração tecidual guiada (RTG) e regeneração óssea guiada (ROG) (Salamanca *et al.*, 2016). Estes curativos são muitas vezes referidos coletivamente como "retentores de umidade" ou "semi-oclusivos" (Ovington, 2007), ou seja, curativos capazes de absorver fluidos e separarem o novo tecido adjacente. Especial atenção tem sido dada a biopolímeros com gelatina (G) e quitosana (Q) devido principalmente a sua biocompatibilidade e controle

de biodegradabilidade.

Figura 2 - Curativo semi-oclusivo (gaze).

Fonte: Página da internet “Tua Saúde”. (<https://www.tuasaude.com/como-fazer-um-curativo/>)

Para obter biomateriais inteligentes, polímeros naturais têm sido combinados com algum agente antimicrobiano. Entre os principais polímeros estão o colágeno, considerado componente principal em matrizes extracelulares (Itoh *et al.*, 2001; Salamanca *et al.*, 2016), gelatina (G), que como um derivado desnaturado particular do colágeno, tem excelente biocompatibilidade e é biodegradável (Li *et al.*, 2007; Bubalo *et al.*, 2012; Salamanca *et al.*, 2016). Neste contexto, sabemos que membranas devem possuir requisitos indispensáveis para agir como barreira física passiva: biocompatibilidade, propriedades oclusivas, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e facilidade de uso (Costa *et al.*, 2016)..

Tipos de membranas

Membranas não absorvíveis

As membranas não absorvíveis mantêm sua estrutura e formam os tecidos. Porém, sua remoção requer intervenção cirúrgica adicional, o que aumenta custos e pode acarretar trauma adicional ao paciente, com cicatrização prolongada da ferida, além da alta taxa de exposição que pode aumentar o risco de infecção (Machtei, 2001).

Membranas absorvíveis

Alguns autores classificam as membranas absorvíveis em membranas de colágeno e não-colágeno (Rakhmatia *et al.*, 2013). As de colágeno são produzidas com colágeno de

bovinos, suínos, peixes e outros animais. A espessura de uma membrana ideal deve ser acima de 0,5 mm, pois membranas mais grossas são mais eficientes como barreira, mantêm-se por mais tempo no tecido devido à sua biodegradação mais lenta e podem promover melhor ossificação de defeitos ósseos (Bubalo *et al.*, 2012). São membranas que se degradam com o tempo, sem qualquer intervenção cirúrgica. O objetivo final é auxiliar na reconstituição de tecidos lesionados por algum trauma ou infecções. As propriedades das membranas para regeneração devem incluir: biocompatibilidade, capacidade de barreira apropriada (prevenção mecânica da proliferação de tecidos moles), integração tecidual, neutralidade imunológica, e simplicidade de aplicação (Bubalo *et al.*, 2012). Membranas de gelatina/quitosana são consideradas absorvíveis e adequadas por permitirem imitar a matriz extracelular (ECM) para engenharia de tecidos (Li *et al.*, 2007).

Propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana

A quitosana é um polímero natural biodegradável e que pode ter baixa, média e alta massa molar. Pode ser usada em liberação controlada de fármacos, ser degradada por enzimas no corpo humano e auxiliar na reconstrução de componentes da matriz extracelular (Rana *et al.*, 2010). É um polissacarídeo formado por b-1,4-anidroglicosamina quanto a N-acetilb-1,4-anidroglicosamina (Badawy *et al.*, 2017). Pode ser obtida a partir do processo de desacetilação da quitina encontrada em conchas de crustáceos, paredes de células fúngicas ou cutícula de insetos. É particularmente interessante para aplicações biológicas devido à sua baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, boa biocompatibilidade e propriedades antimicrobianas (Badawy e Rabea, 2011). Pode ser incorporada em substâncias funcionais, tais como minerais, vitaminas, óleos, proteínas e produtos naturais biologicamente ativos (Tang *et al.*, 2013). Contém dois grupos reativos, incluindo amino e hidroxila que facilmente se modifica química e fisicamente (Badawy *et al.*, 2017). A combinação de quitosana com outros biopolímeros, como a gelatina, é uma alternativa eficaz para melhorar a resistência mecânica e propriedades físico-químicas. Seus grupos amino podem ser protonados, tornando-a solúvel em soluções com pH ácidos, mas não em água (JANEGITZ *et al.*, 2007; SORLIER *et al.*, 2001). Ácidos como o acético, nítrico, clorídrico, fosfórico, podem dissolvê-la (JANEGITZ *et al.*, 2007; SORLIER *et al.*, 2001). A quitosana pode ser usada como

floculante, clarificador, espessante, fibra, filme, coluna matriz, gás-seletivo, membrana, promotor de resistência a doenças das plantas, agente anticancerígeno, agente promotor de cicatrização e agente antimicrobiano (Shepherd *et al.*, 1997).

Propriedades físicas, químicas e biológicas da gelatina

O colágeno, que pode ser extraído de ossos, órgãos do tecido conjuntivo e alguns intestinos de animais como bois, porcos e cavalos (Rana *et al.*, 2010) pode gerar a gelatina, um proteína obtida a partir da sua hidrólise parcial (Bigi *et al.*, 2001). Esta, por sua vez, apresenta grupos funcionais característicos e alta massa molecular (Kozlov e Burdygina, 1983), além de biodegradabilidade, biocompatibilidade, e resposta não imunogênica. É considerada adequada para aplicações médicas (Ratanavaraporn *et al.*, 2010) (Jeong *et al.*, 2008) com fabricação de cápsulas (Digenis, 2013), microesferas (Esposito *et al.*, 1996), próteses (Khor, 1997), curativos e compressas absorventes para uso cirúrgico e como substrato biológico (*scaffold*) para cultivo celular (Rana *et al.*, 2010). A fabricação da gelatina é realizada por pré-tratamento ácido (gelatina tipo A) ou pré-tratamento alcalino (gelatina tipo B) de fibras de colágeno do osso e da pele de animais (Abrusci *et al.*, 2004). Após o pré-tratamento, o primeiro extrato é obtido na temperatura mais baixa e sempre exibe característica de gel. Este é o parâmetro comum para medir a qualidade da gelatina. A gelatina mais utilizada é do tipo B, obtida a partir de osso de gado pelo processo de calagem, devido a sua qualidade e principalmente baixo custo.

A gelatina ganhou destaque por sua abundância (obtida por térmicas de desnaturação do colágeno), baixo custo, biodegradabilidade e excelentes propriedades de formação de filmes e membranas. Sua principal desvantagem como biomaterial é a instabilidade em temperatura elevada e baixa umidade. Em altas temperaturas ocorre diminuição no grau de helicidade nas macromoléculas da gelatina, resultando em perda de suas propriedades mecânicas e flexibilidade (Kozlov e Burdygina, 1983). Isso pode ser melhorado com uso de outro biopolímero ou de reticulantes, com controle de sua temperatura e pH (Badawy *et al.*, 2017). Em baixas temperaturas a gelatina forma uma estrutura helicoidal tripla não observada em polímeros sintéticos, podendo apresentar maior flexibilidade. Suas longas cadeias de

aminoácidos unidos por uma ligação peptídica e a natureza ácida e básica na cadeia lateral conferem características de polieletrólito. As interações entre as macromoléculas de gelatina e com o solvente afetam a viscosidade. Sua interação com a água pode ser vantajosa para liberação controlada de fármacos, pois a degradação da gelatina pode ser controlada alterando-se sua concentração ou através de reticulação.

Reticulação

A fabricação de membranas poliméricas com propriedades específicas é dificultada pela falta de boas propriedades mecânicas, pouco controle da massa molecular, da configuração da cadeia e cinética de polimerização (Ahmed, 2015). Para melhorar as propriedades mecânicas pode ser feita uma reticulação. A gelatina, por exemplo, é solúvel em solução aquosa, e para aplicações biomédicas de longo prazo deve ser submetida à reticulação, o que melhora tanto a estabilidade térmica quanto a mecânica. O reticulante glutaraldeído (Gta) é um dos mais usados devido à sua eficiência de estabilização dos materiais colágenos e seu baixo custo (Bigi *et al.*, 2001), sendo importante para o sucesso de implantes de próteses nas últimas décadas, apesar dos relatos de citotoxicidade (Edwards *et al.*, 2007). A reticulação do colágeno com Gta envolve a reação de grupos de amina livres, de aminoácidos lisina ou hidroxilisina das cadeias polipeptídicas com os grupos aldeído do reticulante, como mostra a Figura .

Figura 3 – Representação do processo de reticulação de gelatina/quitosana com glutaraldeído.

Fonte: (Ahmed, 2015)

Blendas

Como já citado, curativos para ET podem apresentar morfologias variadas de acordo com a superfície a ser implantada no paciente. Para as aplicações com materiais poliméricos, Canevarolo (Canevarolo, 2010) define em seu livro “Ciência dos poliméricos” os seguintes termos:

- *Adesivo* - substância normalmente polimérica, capaz de manter materiais unidos ou colados por adesão superficial. Pode ser tanto rígido quanto flexível.
- *Placa (chapa)* - forma na qual a espessura é muito menor que as outras duas dimensões (largura e comprimento).
- *Filme* - termo usado para placas com espessura inferior a 0,254 mm.
- *Mistura mecânica ou blenda polimérica* - mistura física de dois ou mais polímeros, sem reação química intencional entre os componentes. A interação molecular entre as cadeias poliméricas é predominantemente do tipo secundária (intermolecular). Pode

ser miscível ou imiscível, dependendo das características termodinâmicas de seus componentes, compatibilizada ou não, dependendo do interesse tecnológico.

A estrutura compacta, propriedades físicas, mecânicas e de transporte de fármacos são propriedades importantes para membranas e filmes poliméricos, aplicados em ET e que podem ser melhorados feitos a partir de misturas de blendas. Além disso, São considerados superiores aos dos filmes baseados em componentes individuais (Benbettaieb *et al.*, 2014; Mohammadi *et al.*, 2018). Filmes feitos a partir de misturas de quitosana e gelatina foram homogêneos devido à miscibilidade entre eles (Elsabee e Abdou, 2013). Isso é elucidado pela formação de complexos polieletrólíticos (PECs) com interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre os grupos carboxilato da gelatina e os grupos amina da quitosana (Benbettaieb *et al.*, 2014).

Há décadas, compósitos de materiais inorgânicos e orgânicos atraem grande interesse pela possibilidade de unir suas propriedades, permitindo obter propriedades elétricas, óticas e mecânicas otimizadas (Balazs *et al.*, 2006). Com nanotecnologia e rotas de síntese com alto controle de tamanho e forma das nanoestruturas, podem-se obter diferentes nanocompósitos (1 - Polymer blends: State of art, 2017). Em materiais poliméricos, por exemplo, nanopartículas inorgânicas podem atuar preenchendo espaços entre suas cadeias, sendo chamados de *nanofillers* (“nanopreechedores”) (1 - Polymer blends: State of art, 2017). As interações entre as partes serão regidas pela estrutura molecular do polímero, e pelas características dos ligantes da superfície das nanopartículas, o que será determinante para que não ocorra agregação. Uma distribuição uniforme dos *nanofillers* é importante para que as propriedades do material sejam homogêneas por toda sua extensão. No caso dos materiais para aplicação em curativos, há interesse em blendas com aditivos que possam melhorar suas propriedades mecânicas e antimicrobianas.

Propriedades físicas, químicas e biológicas das nanopartículas de prata

As nanopartículas metálicas exibem propriedades magnéticas, elétricas, ópticas, mecânicas e químicas para uma gama de aplicações (Li *et al.*, 2014). O uso da prata como medicamento antimicrobiano é bastante conhecido (SOUZA *et al.*, 2013), sendo sua atividade antimicrobiana muito maior do que outros metais, como mercúrio, cobre, chumbo, cromo e

estanho (Vimala *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, entretanto, a prata não tem sido usada em virtude da criação de antibióticos e antifúngicos eficientes para tratamento de infecções e doenças (Aminov, 2010). Mas com o uso crescente de antibióticos e o aparecimento de bactérias super-resistentes (Salvioni *et al.*, 2017), voltou-se a cogitar o emprego de compostos de prata na medicina, principalmente na forma de nanopartículas (AgNPs). Por poderem ser incorporadas a diversos materiais, as AgNPs têm sido usadas em curativos (bandagens) para combater infecções causadas por microorganismos, no interior de refrigeradores de alimentos para retardar deterioração, em palmilhas antimicrobianas para evitar odores, em purificadores de ar, e em instrumentos cirúrgicos para evitar contaminações por bactérias e fungos (Souza *et al.*, 2013). O interesse nas AgNPs advém da necessidade de biomateriais com atividade antibacteriana, sem liberação de substâncias tóxicas.

Os mecanismos da ação antimicrobiana da prata e a melhor forma de aproveitar o material têm sido debatidos. Morones *et al.* estudaram o efeito de nanopartículas de diferentes tamanhos (1 a 100 nm) sobre bactérias Gram-negativas e afirmaram que uma concentração de 75 µg/mL partículas, independentemente do seu tamanho, foi suficiente para inibir o crescimento de todas as cepas testadas (Morones *et al.*, 2005). Em particular, nanopartículas de 1 a 10 nm apresentaram maior capacidade de interagir com membranas celulares, sendo assim mais internalizadas e causando maiores danos às células. Choi e Hu (Choi e Hu, 2008) testaram nanopartículas de 5 a 21 nm e concordaram sobre a maior eficácia das partículas de menor tamanho, corroborado por estudos subsequentes (Rizzello e Pompa, 2014). No entanto, esses e diversos outros estudos não puderam concluir se o efeito antimicrobiano era causado pelas estruturas nanométricas da prata ou pelos íons Ag^+ liberados pelas suas superfícies. Em 2012, Xiu *et al.* (Xiu *et al.*, 2012) sintetizaram nanopartículas de 5 e 11 nm recobertas com polímero PEG (polietilenoglicol) e compararam seu efeito com íons Ag^+ sobre culturas de *E. coli*; os experimentos foram conduzidos sob condições anaeróbicas, nas quais a liberação de íons pelas nanopartículas é evitada, visto que é uma reação mediada pela oxidação da prata elementar. As nanopartículas não mostraram efeito sobre os microorganismos, mesmo em concentrações milhares de vezes superiores em relação à sua própria concentração mínima letal em condições aeróbicas. Os autores indicaram que os diversos aspectos das nanopartículas, como tamanho, forma e carga superficial, interferem na ação antimicrobiana

principalmente ao determinar o local e a taxa de liberação de íons Ag^+ ; por exemplo, partículas menores liberam mais íons devido a sua maior área de superfície (Rizzello e Pompa, 2014). O uso de nanopartículas tem as vantagens de apresentar uma liberação controlada dos íons, que pode ser planejada pelas suas características físico-químicas e de morfologia, que dependem da rota de síntese (Zhang *et al.*, 2018).

Diversas rotas de síntese de AgNPs são descritas na literatura (Zhang *et al.*, 2018). A mais difundida foi desenvolvida a partir da década de 1980 (Dong *et al.*, 2009), com adaptações do método de Turkevich de síntese de nanopartículas de ouro de 1951. Neste método foi utilizado citrato de sódio (CS) como agente redutor (Turkevich *et al.*, 1951). Além do CS, o ácido tânico também é considerado um agente redutor, com a vantagem de agir adicionalmente como estabilizante ideal em síntese de AgNPs. Tem sido estudado por suas propriedades anti-oxidantes, e como agente quelante de vários cátions inorgânicos (Hagerman *et al.*, 1998). Seu pKa está entre sete e oito, sendo parcialmente hidrolisado sob condições ácidas e básicas. A estrutura do ácido tânico é mostrada na Figura , consistindo de um núcleo central de glicose ligado por ligações éster a cadeias de éster de poli galoil. Outros estabilizadores como o ácido gálico e a glicose em pH alcalino reduzem rapidamente o nitrato de prata em nanopartículas de prata à temperatura ambiente, mas as partículas formam agregados em solução (Sivaraman *et al.*, 2009). Neste sentido, a utilização de CS e AT como agentes redutores e estabilizadores é promissora para o controle da morfologia de AgNPs esféricas, como indicado na Figura 5.

Figura 4 - Estrutura química do ácido tânico.

Fonte: (Sivaraman *et al.*, 2009).

Figura 5 – Esquema de reação química para a síntese de AgNPs com o agente estabilizador ácido tânico (AT) e citrato de sódio (CS) como principal agente redutor.

Fonte: (Cheng *et al.*, 2016).

Em relação aos efeitos no nível molecular, os íons Ag^+ em contato com a parede e vacúolo da célula bacteriana inibem sua divisão e consequentemente o crescimento de colônias bacterianas (Jung *et al.*, 2008). Os íons ainda interagem com os grupos tiol (R-S-H) das proteínas na membrana celular. Além disso, estes íons interagem com os ácidos nucleicos, e preferencialmente com as bases nitrogenadas do DNA, ao invés dos seus grupos fosfato (Thurman e Gerba, 1988) inibindo sua capacidade de replicação e afetando sua viabilidade (Vimala *et al.*, 2010).

Obter membranas que apresentem flexibilidade dos *scaffolds* poderia melhorar o contato com o tecido, promovendo penetração das cadeias poliméricas para forte adesão. Neste contexto, há a oportunidade de explorar as propriedades das blendas poliméricas e de AgNPs para curativos, que possam ser mais eficientes para evitar infecções e proporcionando uma melhor qualidade de vida na recuperação de lesões pelos pacientes.

3 Objetivos

Desenvolver, caracterizar e otimizar um biomaterial à base de gelatina/quitosana com AgNPs para engenharia de tecido.

3.1 Objetivos específicos

- Realização e desenvolvimento de sínteses de AgNPs, caracterização e avaliação da melhor rota;
- Produção e otimização de membranas formadas por blendas de gelatina/quitosana;
- Obtenção de membranas com diferentes proporções de AgNPs que apresentem ação antimicrobiana e que não sejam tóxicas;
- Realização de caracterizações físicas e testes biológicos das membranas gelatina/quitosana/AgNPs.

4 Materiais e Procedimentos experimentais

4.1 Materiais

4.1.1 Síntese de TK- AgNPs e AT-AgNPs

As suspensões de prata preparadas na ausência de ácido tânico (TK- AgNPs) e com a presença de ácido tânico (AT- AgNPs) foram preparadas por redução química, através do método de Turkevich com nitrato de prata (AgNO_3) (Qhemis) e citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Sigma Aldrich, UK). Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q. Para a síntese de AT- AgNPs adicionou-se ácido tânico $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ (Sigma Aldrich, UK). Os materiais com pureza de grau analítico foram usados sem purificação adicional.

4.1.2 Obtenção das membranas

Para fabricar as membranas foi utilizada gelatina bovina (Tipo B), quitosana comercial (Galena farmacêutica), glutaraldeído (Gta) 25% (Sigma Aldrich, UK) e ácido acético glacial PA (QHEMIS). O ensaio de intumescimento foi realizado em solução tampão fosfato-salino pH 7,4 (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄).

4.2 Obtenção dos materiais

4.2.1 Síntese de nanopartículas de prata (Método Turkevich/ TK-AgNPs)

A primeira síntese de AgNPs esféricas foi realizada com o método adaptado de Turkevich, em que a redução do sal de prata é feita pelo citrato de sódio com temperatura controlada por ebulição da água. O sistema de aquecimento com óleo de girassol tem um balão interligado a um sistema de refluxo, como ilustrado na

Figura 1. O volume da solução foi 200 mL e a quantidade de solução de sal de prata foi 0,036 g e 1 g de citrato de sódio. Uma solução com 0,036 g de sal de nitrato de prata em 200 mL de água foi aquecida até a ebulição e então adicionados 4 mL da solução de citrato de sódio vagarosamente. A reação permaneceu em ebulição por mais 10 min. após uma brusca mudança de cor. Desligou-se o sistema de aquecimento e manteve-se a suspensão ainda sob agitação por 45 min, que foi então armazenada em temperatura ambiente. A concentração final de TK-AgNPs foi 1,6 mM.

4.2.2 Síntese de nanopartículas de prata (Método com adição de ácido tânico/ AT-AgNPs)

O procedimento adotado foi o mesmo que Bastus e colaboradores (Bastus *et al.*, 2014) utilizaram para sintetizar AgNPs monodispersas. Um volume de 100 mL da solução de 5mM de CS e 0,025 mM de AT foi preparado em balão volumétrico e aquecido num recipiente com óleo de girassol sob agitação constante. Após 30 min foi atingida a temperatura de ebulição e 1 mL da solução de nitrato de prata na concentração de (25 mM) foi injetado. O tempo da síntese foi cronometrado para a retirada de alíquotas nos intervalos de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, durante o processo de ebulição. Esses intervalos foram adotados inicialmente, para que fosse possível determinar por espectroscopia no UV-vis o tempo de reação em que as AgNPs estariam menores e monodispersas.

Figura 1 - Sistema da síntese de nanopartículas esféricas de prata (AgNPs) pelo método de Turkevich (TK-AgNPs) e (AT- AgNPs) com adição de ácido tânico.

4.2.3 Purificação da Quitosana

Foram utilizados 80 g de quitosana comercial (Galena Farmacêutica) dissolvidos vagarosamente em 8 L de solução aquosa ácida com 1,5% de ácido acético glacial, mantidos em agitação constante por 24 h à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada a vácuo, restando assim a massa insolúvel. Após a filtração, a solução foi precipitada, utilizando 800 mL de solução de NaOH, com concentração molar de 1 mol/L. O precipitado foi filtrado e o produto resultante foi lavado com água ultrapura (Milli-Q) até que a água remanescente atingisse pH 7,0. Após o término desta etapa, a quitosana foi lavada com álcool isopropílico 80% para auxiliar na secagem. O produto foi então colocado em estufa a vácuo (FisherScientific) para secagem durante 10 dias, a 30°C, seguido pelo processo de moagem num Micro Moinho de RotorVertical, da marca Marconi, modelo MA048.

4.2.4 Preparo das membranas

O preparo das membranas teve os seguintes passos:

1º Preparação das soluções dos polímeros (gelatina e quitosana);

2º Para molde e secagem, as soluções poliméricas foram colocadas em placas de Petri de poliestireno, com área de 6 cm. Em seguida, foram colocadas em estufa com circulação de

ar, a 35°C, por 48 h.

Foram testadas diferentes composições de membranas, ao variar as proporções de gelatina e quitosana, adicionar AgNPs e realizar processo de reticulação com Gta, cujos procedimentos serão descritos nos próximos tópicos. A Tabela 1 resume as características das membranas.

Tabela 1 – *Composições das membranas obtidas (total de 16), com as concentrações de gelatina, quitosana, AgNPs e reticulante utilizadas para produção de cada uma.*

Membranas	Gelatina (m/v)	Quitosana (m/v)	AgNPs (m/v)	Reticulante (v/v)
G	4%	0%	Não	Não
Q	0%	1%	Não	Não
GQ	1%	1%	Não	Não
4GQ	4%	1%	Não	Não
G/Gta	4%	0%	Não	Gta 0,6%
Q/Gta	0%	1%	Não	Gta 0,6%
4GQ/Gta	4%	1%	Não	Gta 0,6%
G TK-AgNPs	4%	0%	TK 0,009%	Gta 0,6%
Q TK-AgNPs	0%	1%	TK 0,009%	Não
4GQ TK-AgNps	4%	0%	TK 0,009%	Não
G/Gta TK-AgNPs	4%	0%	TK 0,009%	Gta 0,6%
Q/Gta TK-AgNPs	0%	1%	TK 0,009%	Gta 0,6%
GQ 0,0125% AT-AgNPs	1%	1%	AT 0,0125%	Não
GQ 0,025% AT-AgNPs	1%	1%	AT 0,025%	Não
GQ 0,05% AT-AgNPs	1%	1%	AT 0,05%	Não
GQ 0,1 AT-AgNPs	1%	1%	AT 0,1%	Não

4.2.4.1 Membranas de gelatina/quitosana puras (GQ)

As soluções de quitosana foram preparadas em concentrações de 1% (m/v) e 0,25% (v/v) de ácido acético, em água Milli-Q, sob temperatura ambiente, em agitação constante por 24 h. Em seguida, a temperatura da solução foi aquecida até 35°C e então foi adicionada gelatina bovina, a 1% ou 4% (m/v), com solução mantida sob agitação constante por mais 1 h. Após agitação, foram colocados 30 mL da solução em placas de Petri em estufa de circulação de ar com temperatura de 37°C.

4.2.4.2 Membranas de gelatina e de gelatina com TK-AgNPs

Para as membranas de gelatina pura, foram preparadas soluções de gelatina com 4% (m/v) em 50 mL de água Milli-Q a 35°C sob agitação constante por 1 h. Após completa solubilização, as soluções foram vertidas em placas de Petri. Para obter membranas de gelatina com TK-AgNPs, foram preparadas soluções de 8% de gelatina em 50 mL de água e foram adicionados 50 mL da suspensão de TK-AgNPs na concentração de 0,0018%. Após mais 1 h de agitação constante, as soluções foram vertidas em placas de Petri (30 mL por placa) e secas em estufa de circulação forçada, a 35°C, por 48 h. Assim, a concentração final de gelatina foi de 4% e de TK-AgNPs nas membranas foi de 0,009%.

4.2.4.3 Membranas de quitosana e de quitosana com TK-AgNPs

As soluções de quitosana foram preparadas em concentrações de 1% (m/v) e 0,25% de ácido acético (v/v) em 50 mL de água Milli-Q, sob temperatura ambiente, em agitação constante por 24 h e em seguida vertidas em placas de Petri (30 mL por placa). Para produção das membranas de quitosana com TK-AgNPs, foram preparadas soluções de 2% de quitosana e 0,25% de ácido acético em 50 mL de água; após solubilização da quitosana (durante 24 h) foram adicionados 50 mL da suspensão de TK-AgNPs na concentração de 0,0018%. Após 60 min de agitação constante, as soluções foram vertidas em placas de Petri (30 mL por placa). A concentração final de quitosana foi de 1% e de TK-AgNPs nas membranas foi 0,009%.

4.2.4.4 Membranas GQ com AT-AgNPs

As soluções de quitosana foram preparadas em concentrações de 2% (m/v) e 0,25% (v/v) de ácido acético, sob temperatura ambiente, em agitação constante por 24 h, juntamente com suspensões de AT-AgNPs em diferentes concentrações. Após 24 h, a solução foi aquecida até 35°C e então foi adicionada gelatina 2% (m/v). As soluções foram mantidas sob

temperatura e agitação constantes por mais 1 h, e então vertidas em placas de Petri (30 mL por placa). As concentrações finais de gelatina e quitosana foram de 1% cada e de AgNPs foram de: 0,0125%, 0,025%, 0,05% e 0,1%, para cada membrana.

4.2.4.5 Membranas reticuladas

Somente as membranas com TK-AgNPs e com proporção de massa 4/1 de gelatina/quitosana foram reticuladas com glutaraldeído (Gta). Às soluções de quitosana (Q), gelatina (G), quitosana e TK-AgNPs (Q TK-AgNPs), gelatina e TK-AgNPs (G TK-AgNPs) e quitosana/gelatina/TK-AgNPs (GQ TK-AgNPs), foi adicionada solução de reticulante em concentração total de 0,6% (v/v), vagarosamente, sob agitação e temperatura de 35°C. Permaneceram nessas condições por mais 20 min, e então foram colocados 30 mL de cada solução em placas de Petri, para secagem em estufa com circulação de ar e temperatura controlada a 37°C por 24 h.

4.3 Caracterizações Físico-Químicas

Após a secagem e obtenção das membranas, as espessuras de todas elas foram medidas com o micrômetro Mitutoyo MFG M110-25 Japan, em triplicata, em 5 pontos diferentes de cada membrana. A Figura 2 ilustra o procedimento. As medidas foram realizadas no Laboratório de Química- Grupo de Polímeros no IFSC. Então, suas caracterizações foram realizadas pelas técnicas mencionadas abaixo.

Figura 2 - Procedimento para medida de espessuras das membranas.

4.3.1 Difractometria de Raios X

A determinação da estrutura de um cristal ou estrutura cristalina envolve a descrição

da disposição no espaço dos grupos químicos na amostra com difração de raios X (Teixeira, 2014). Esta foi a técnica utilizada para determinar a cristalinidade das membranas puras, reticuladas e na presença de AgNPs. O difratômetro empregado é da Analytical X-Ray Systems, Siemens D5005, com radiação Cu-K α do Departamento de Engenharia de Materiais-UFSCar. O intervalo angular (em 2θ) utilizado foi de 2 a 70° com uma velocidade de varredura de 0,5°/min. As membranas foram cortadas em tamanhos de 3 cm de comprimento e 2cm de largura.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Dedavid et al., 2007) (Kim *et al.*, 1992) foi usada para investigar a morfologia superficial das membranas puras de Gelatina (G), quitosana (Q) e gelatina/quitosana (G/Q) e das membranas com AgNPs, Gelatina/AgNPs (G/AgNPs), quitosana/AgNPs (Q/AgNPs) e gelatina/quitosana/AgNPs (G/Q/AgNPs). Empregou-se um Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG) e sistema de análise química qualitativa e quantitativa OXFORD para detecção de elementos entre boro e urânio, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise (LMEA) do Instituto de Física de São Carlos. Todas as membranas foram recobertas com camada nanométrica de carbono antes da análise. Foi utilizada tensão de 5kV em diferentes aumentos.

4.3.3 Microscopia electronica de transmissão (MET)

A análise das nanopartículas, foi realizada no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), em Campinas – São Paulo JEOL JEM 2100F operando a 200 kV. Em tubos de uma microcentrífuga, as amostras foram preparadas, suspendendo-se a suspensão em isopropanol.

4.3.4 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) permite estudar superfícies e determinar a rugosidade e espessura de filmes e membranas poliméricas. Seu funcionamento é através de uma varredura da superfície por uma sonda, onde a força entre a ponteira e a superfície da amostra promove um movimento proporcional à força de interação (Aparecido., *et al* 2006).

O modo de varredura para microscopia das membranas foi o intermitente, bastante usado para amostras de materiais poliméricos e biológicos, pois o contato físico não danifica a amostra e evita contaminação da sonda (Soares, 2012). Membranas de gelatina/quitosana (GQ) e membranas GQ com AT-AgNPs foram caracterizadas para verificar alterações de rugosidade e topografia, devido à adição de AgNPs. Para isso membranas com dimensões 0,5cm X 0,5cm foram caracterizadas por um microscópio da marca Nanosurf, modelo EasyScan Flex, com força de 0,1 N e taxa de escaneamento de Hz. Para o tratamento das imagens, foi utilizado o software NanoScope Analysis.

4.3.5 Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR)

A espectroscopia por reflectância atenuada mede alterações em um feixe infravermelho (IR) totalmente refletido internamente por uma amostra colocada em contato com um cristal opticamente denso com alto índice de refração em determinado ângulo. Essa reflectância interna cria uma onda evanescente que se estende além da superfície do cristal até a amostra. A onda evanescente se projeta apenas alguns microns ($0,5\ \mu\text{-}5\mu$) além da superfície do cristal e na amostra. Em regiões do espectro infravermelho onde a amostra absorve energia, a onda evanescente será atenuada ou alterada. A energia atenuada de cada onda evanescente é passada de volta para o feixe IR, que então sai da extremidade oposta do cristal e é passada para o detector no espectrômetro de infravermelho. O sistema então gera um espectro infravermelho (Shulzinger e Faber., 2009).

Os espectros de ATR-FTIR das soluções de gelatina e quitosana foram registrados com uma resolução de $4\ \text{cm}^{-1}$ no intervalo de 4000 a $400\ \text{cm}^{-1}$. A aquisição de espectro de cada amostra foi repetida três vezes com membranas de 0,5 cm de comprimento e largura, na mesma condição e um espectro médio foi obtido. O espectrômetro é um Scan 64-128 (Thermo Nicolet Nexux 470, ATR Cristal) do Instituto de Física de São Carlos (USP).

4.3.6 Espectroscopia na região do UV-Vis

A espectroscopia eletrônica (UV-Vis) baseia-se em transições eletrônicas intra-atômicas ou moleculares, responsáveis pela absorção de radiação luminosa na região do ultravioleta (200-400 nm) e no visível (400-800 nm). É um método sensível, baseado nas

propriedades de absorção, espalhamento, difração, refração e reflexão da amostra analisada (Roberts *et al.*, 2018), que serve para monitorar processos de polimerização, biológicos, petroquímicos e farmacêuticos (Trevisan *et al.*, 2006). Em especial para bioprocessos que exigem o conhecimento em tempo real da qualidade, produtividade e estado morfológico da amostra (Faria, 2013), (Rocha e Teixeira, 2004). Neste trabalho, a técnica por UV-vis foi importante para acompanhar a síntese de AgNPs.

As suspensões e soluções de nanopartículas foram caracterizadas com espectroscopia no UV-Vis em cubetas de vidro e quartzo. Para cada medida, 1 mL das suspensões de prata era diluído em 1 mL de água Milli-Q. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro Hitachi U-2001 do Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” do Instituto de Física de São Carlos.

4.3.7 Teste de liberação por UV-Vis

Para comprovar a liberação das AT-AgNPs a partir das membranas GQ, foi realizado um experimento em que as membranas GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs, GQ 0,1% AT-AgNPs, com tamanhos de 2 cm de comprimento, 1 cm de largura e massa de 0,5 g, foram submersas em PBS pH 7,4 e temperatura de 37 °C. Durante os intervalos de 1, 2, 18 e 24 h foi retirado 1 mL da solução de cada recipiente com as membranas e o espectro UV-vis. da solução foi medido. Para comparação, foi realizado primeiramente o UV-vis da solução PBS.

4.3.8 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) é uma técnica útil para verificar a estabilidade das nanopartículas. As medidas de DLS foram realizadas com o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemanha), com um laser de He-Ne de 4 mW em comprimento de onda $\lambda = 633$ nm, a 25°C. A luz espalhada foi detectada com detector a um ângulo de 173°. A amostra estava dispersa em 1 mL de água Milli-Q. Os dados de viscosidade e índice de refração da água a 25°C foram utilizados na análise.

4.3.9 Ensaio de Intumescimento

Todas as membranas foram pesadas nos intervalos quando estavam secas até

intervalo de 48 h. As membranas secas foram pesadas e submersas em solução tampão fosfato, pH= 7,4 e mantidas em estufa a 37°C. A cada intervalo em que as membranas foram pesadas, sua massa foi calculada em porcentagem para inferir o ganho de massa e tempo de permanência da amostra em meio aquoso. Para o cálculo da porcentagem de intumescimento foi empregada a seguinte equação (1):

Equação (1):

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{P_u - P_s}{P_s}$$

Onde P_u e P_s se referem ao peso úmido e ao peso seco da membrana, respectivamente.

4.4 Testes biológicos

4.4.1 Susceptibilidade bacteriana às membranas

Para avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos, foi escolhido o método do teste de disco-difusão. Brevemente, estoques da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25923) mantidas em caldo BHI (*brain-heart infusion*, Acumedia) com 10 % (v/v) de glicerol em -20 °C foram descongelados no dia anterior aos experimentos e colocados para crescer por 18 h em caldo BHI sob agitação (180 rpm) a 37°C. Após o crescimento bacteriano, por análise de turbidez das soluções (utilizando-se a escala de McFarland), foram preparados inóculos contendo 3×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL em caldo BHI. Em placas de Petri de poliestireno contendo ágar BHI, foram semeados 100 µL das suspensões bacterianas, os quais foram espalhados uniformemente pela superfície com auxílio de um *swab* estéril. Após 15 minutos, as membranas foram previamente intumescidas em PBS, para facilitar sua adesão no ágar, e transferidas para as placas de Petri com auxílio de uma pinça esterelizada. A placas foram então mantidas em estufa incubadora Demanda Bioquímica de O₂ por 24 horas a 37°C. Após este período foi medido o diâmetro dos halos de inibição e foi realizado o registro fotográfico dos mesmos.

4.4.2 Concentração mínima inibitória (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) para AT-AgNPs

Para avaliar a ação antimicrobiana das nanopartículas utilizadas na síntese das membranas, foi realizado o ensaio da concentração mínima inibitória, no qual bactérias são expostas a diferentes concentrações das amostras de interesse e busca-se a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Inóculos de *S. aureus* foram preparados como descrito na seção 4.4.1 e 5 mL de caldo BHI foram inoculados com 5×10^5 CFU/mL em tubos de centrífuga. Para o preparo das amostras, foi utilizada uma solução estoque de 0,25 mM das AT-AgNPs para obterem-se as soluções de distintas concentrações em caldo BHI inoculado com *S. aureus*: 0,1; 0,05; 0,031; 0,025; 0,0125 e 0,0063 mM.

Como controle para avaliação do crescimento bacteriano, um tubo contendo inóculo, porém sem conter nanopartículas, foi preparado. Como a metodologia de MIC prevê avaliação visual do crescimento bacteriano, um controle negativo (somente caldo BHI sem ser inoculado ou exposto a nanopartículas) foi preparado para ser utilizado como referência para ausência de crescimento. Para avaliar se a solução de nanopartículas encontrava-se contaminada, um tubo contendo 5 mL de caldo BHI e AgNPs com concentração de 0,031 mM também foi preparado. Por fim, para garantir que a redução na turbidez do meio de cultura das maiores concentrações utilizadas não era devida ao menor volume de caldo BHI, um controle de caldo BHI inoculado foi preparado contendo PBS na mesma proporção do volume utilizado de AgNPs para a preparação das duas maiores concentrações. Para determinar a influência do solventes presentes na solução das nanopartículas de prata, o mesmo volume da solução estoque utilizado para a preparação dos tubos inoculados com 0,1 e 0,025 mM foi centrifugado e tanto a fase líquida (sobrenadante) quanto a fase sólida (precipitado) foram adicionadas a tubos contendo 5 mL de meio inoculado.

Todos os tubos foram mantidos a 37 °C com 180 rpm por 20 h. Após esse intervalo, as soluções foram visualmente avaliadas para determinar qual concentração promovia a inibição completa do crescimento da bactéria avaliada.

4.4.3 Avaliação da viabilidade celular:

O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico que observa a ação metabólica celular,

comumente usado como medida indireta de viabilidade celular, uma vez que este sal, de coloração amarela, é metabolizado por enzimas mitocondriais. Seu produto é um cristal roxo denominado formazan, que é facilmente solubilizado com DMSO. Dessa maneira, é possível correlacionar o valor de viabilidade celular com as quantidades de formazan nas amostras através da comparação dos valores de absorbância medida em 570 nm de uma amostra submetida a um tratamento específico com os valores de amostras que não recebem tratamento algum (grupo controle).

Para o estudo de citotoxicidade das membranas, foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn, Gibco). As culturas foram mantidas em frascos de cultivo com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 0,5 % de antibiótico (solução de penicilina/estreptomicina), em estufa incubadora umidificada a 37°C e atmosfera contendo 5 % de CO₂. Para os experimentos, placas de 96 poços foram preparadas no dia anterior com 5x10³ células por poço, em meio de cultura, e mantidas na incubadora por 24 h. A avaliação da citotoxicidade foi realizada de modo indireto, onde meios de extração foram preparados a partir das membranas através de sua incubação em meio de cultura suplementado com 10 % SFB por 24 h em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera contendo 5 % de CO₂. Após esse intervalo, o meio de extração foi diluído em meio de cultura como, descrito por Neamnark al. al., e esterelizado por filtração (Neamnark et, al. 2007). As diferentes concentrações na quantidade de 100 µl dos meios de extração, foram colocadas em contato com células e as placas foram mantidas em estufa incubadora umidificada por 24 h. Os meios de extração foram removidos e as amostras foram submetidas ao ensaio de MTT, com adição de DMEM sem fenol vermelho com 10 % de MTT (5 mg/mL, Sigma).. Esse ensaio foi realizado utilizando-se um período de 3 h de incubação do reagente, e a leitura da absorbância com o leitor de microplacas MultiskanTM Go (Thermo Fisher Scientific). O valor de viabilidade foi calculado fazendo-se a proporção de cada valor de absorbância dos grupos tratados com a média do valor de absorbância do grupo controle (que não recebeu tratamento), como descrito nas equações (2) e (3), abaixo:

Equação (2):

$$Abs_{amostra} = (Abs_{570} - Abs_{690})$$

Equação (3):

$$Viabilidade_{amostra} = \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{Média do Controle}} \right) \times 100$$

Os resultados foram expressos em gráficos de barra como a média $\pm$ desvio padrão dos grupos, que foram feitos com quintuplicata de cada poço.

5 Resultados e discussão

5.1 Purificação da quitosana

Para se determinar as características de quitosana visando correlacioná-las às propriedades que possam resultar em aplicações e aumentar seu grau de pureza, é necessário que o polissacarídeo seja purificado (Signini e Campana Filho, 1998). A quitosana purificada foi obtida a partir de 80 g de quitosana comercial. A purificação durou 15 dias e resultou em amostras em forma de pó, com cor amarela, solúvel em soluções aquosas ácidas. Foram obtidos 50,4 g de quitosana, portanto com rendimento maior do que 50%. Nota-se que há perda de material inicial do polímero durante a purificação. O rendimento é menor do que o descrito na literatura, provavelmente devido à forma de filtração com embalagens em que há exclusão de agregados e de materiais insolúveis, como cadeias com grau de acetilação acima de 60% e de massas molares elevadas (Signini e Campana Filho, 1998). O uso do tecido TNT pode acarretar maior perda - mas maior eficiência na lavagem e secagem (Soares, 2012). As características principais da quitosana são apresentadas na Tabela 2. Os resultados foram obtidos a partir de medidas realizadas por Soares (Soares, 2012) no Grupo de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

Tabela 2 - Principais características da quitosana utilizada. Adaptado (Soares, 2012).

Características da quitosana	Valores
Grau de acetilação médio	24%
Massa molar numérica média	71.000 g/mol
Massa molar ponderal média	127.000 g/mol
Índice de polidispersividade	1,79

5.2 Sínteses de nanopartículas de prata

As propriedades eletromagnéticas, ópticas e catalíticas das AgNPs são influenciadas pela forma, tamanho, distribuição e área de superfície. Esses fatores são controlados na síntese com agentes redutores e estabilizadores (Cheng *et al.*, 2016) (Dong *et al.*, 2009). O agente redutor perde elétrons durante a síntese, fazendo com que o agente principal de NPs (AgNO_3) ganhe elétrons e reduza sua carga positiva para 0, enquanto o agente estabilizador evita a aglomeração das NPs (AgNPs). A síntese de AgNPs é muitas vezes feita com citrato de sódio (CS) como agente redutor, porém não há controle adequado da morfologia e dispersão das AgNPs, sendo necessário utilizar um agente estabilizador. A redução de precursores de ouro por citrato foi desenvolvida por Turkevich em 1951 (Turkevich *et al.*, 1951), tornando-se um dos métodos mais comuns para sintetizar nanopartículas de ouro. A partir da década de 1980, o método de redução por citrato foi estendido para nanopartículas de prata (Lee e Meisel, 1982). No método de redução de citrato, uma estratégia simples para controlar o tamanho das nanopartículas é alterar a razão molar do citrato e os precursores da prata. O ácido tânico (AT) é considerado vantajoso para síntese de AgNPs porque além das propriedades físico-químicas já citadas, pode ser utilizado como agente estabilizador e redutor, o que auxilia no controle de crescimento e morfologia de NPs.

Neste trabalho, AgNPs foram obtidas com o método de Turkevich (TK-AgNPs) e com esse método modificado com a adição de ácido tânico (AT-AgNPs). A formação das suspensões das TK-AgNPs e AT-AgNPs é comprovada com a imagem da Figura 3, onde se nota uma coloração cinza/marrom escuro para TK-AgNPs (a) e amarela para AT-AgNPs (b) (Cheng *et al.*, 2016), (Bin Ahmad *et al.*, 2011).

Figura 3 - Suspensões de AgNPs obtidas pelo método de Turkevich (TK- AgNPs) (a), e com adição ácido tânico (AT-AgNPs) (b).

5.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Nas imagens das TK-AgNPs na Figura 4 aparecem partículas esféricas, outras semelhantes a bastonetes e em formato triangular ou poligonal com tamanho médio de 59,1 nm, como esperado da literatura (Dong *et al.*, 2009). Portanto, é difícil ter controle sobre a forma das TK-AgNPs devido à falta de equilíbrio entre os processos de nucleação e crescimento na reação de redução de citrato pelo método de Turkevich.

Figura 4 - Micrografias de transmissão (MET) da suspensão de nanopartículas obtidas pelo método de Turkevich (TK-AgNPs) (a,b e c), com tamanho médio de 59,1 nm, e histograma de distribuição de tamanhos (d).

De acordo com o modelo de LaMer (Lamer e Dinegar, 1950), um processo de nucleação rápido seguido por um crescimento lento deve ser benéfico ao controle de forma das nanopartículas. Assim, um método de redução gradual é proposto pela adoção de intervalos menores e maiores em relação do tempo da reação em ebulição. As alíquotas selecionadas para obter imagens de MET foram as de 5 e 30 min. Tais intervalos foram escolhidos pois 5 min. foi o primeiro intervalo no qual se notou a mudança de cor da suspensão, provavelmente devido ao processo de nucleação de nanopartículas. A partir de 30 min. de síntese já não se percebia mudança na cor. Da literatura, o tempo de agitação e controle para obter NPs com 10 nm sem aglomeração é de 15 min. após a injeção da solução de Ag (Bastús, et al. 2014) e (Orlowski, et al. 2016). As AT-AgNPs apresentaram formas esféricas, de tamanhos inferiores às TK-AgNPs. Para as sintetizadas com tempo de 5 min., os tamanhos variaram de aproximadamente 3 nm a 19 nm, com média de 9,6 nm e desvio padrão de 2,3 nm, como mostra a Figura 5. Para a síntese de 30 min., os tamanhos foram de aproximadamente 5 nm a 16 nm, com média de 9,8 nm e desvio padrão de 2,4 nm, segundo a Figura 6. Os resultados indicam que após a nucleação há pequena variação de tamanho pelo processo de crescimento das nanopartículas.

Figura 5 - Micrografias (MET) da suspensão de nanopartículas, obtidas pela adição de ácido tânico (AT-AgNPs), no intervalo de 5 min, com tamanho médio de 9,6 nm.

Figura 6 - Micrografia (MET) da suspensão de nanopartículas obtidas pela adição de ácido tânico (AT-AgNPs), no intervalo de 30 min, com tamanho médio de 9,8 nm.

A maior parte da literatura sobre efeitos bactericidas de AgNPs baseia-se no uso de

NPs sem controle de suas propriedades (por exemplo, polidisperso em termos de tamanho e forma e/ou agregado) (Rizzello e Pompa, 2014). Além disso, vários trabalhos empregam NPs sem caracterizações físico-químicas, levando a discrepâncias nos resultados, principalmente materiais com toxicidade para células saudáveis. O ponto crucial para testes reprodutíveis e padronizados é, portanto, a caracterização de NPs antes de qualquer ensaio antibacteriano e principalmente uma análise detalhada de níveis de concentrações de AgNPs que devem ser empregadas antes de testes de viabilidade celular.

O efeito antibacteriano de amplo espectro de AgNPs é dependente do tamanho. Quanto menor o tamanho das AgNPs, maior a atividade antimicrobiana devido à maior razão área-superfície-volume (Rai *et al.*, 2009) (Morones *et al.*, 2005). Assim, uma distribuição uniforme de tamanhos, e pequenos (10-20 nm), de AgNPs na superfície pode gerar membranas antibacterianas (Dong *et al.*, 2017).

5.2.2 Espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-VIS)

A absorbância da suspensão de TK-AgNPs foi medida após o resfriamento do sistema. No espectro de absorção de luz no UV-Vis da Figura 7 para uma solução de AgNPs com concentração de 0,018%, observa-se uma banda entre 400 a 600 nm e um “ombro” abaixo de 330 nm, correspondente à transição de elétrons entre as bandas de valência (4d) e condução da prata (5sp) (Kreibig, U.1995, apud Berté, R. 2013, p.59). O pico de absorção das TK-AgNPs permaneceu em 456 nm, sendo largo devido à polidispersividade das partículas (Dong *et al.*, 2009). Quanto mais larga a banda, especificamente acima de 410 nm, mais polidispersas são as NPs (Cheng *et al.*, 2016). A polidispersividade pode prejudicar a liberação das nanopartículas a partir das membranas poliméricas, requerendo concentrações maiores da AgNPs para o efeito antimicrobiano, como observado na literatura (Jinga *et al.*, 2013). Além disso, mecanismos de toxicidade de AgNPs com membrana celular bacteriana ocorrem com AgNPs com tamanho próximo de 10 nm (Dobias e Bernier-Latmani, 2013) (Morones *et al.*, 2005).

Figura 7 - Espectroscopia de UV-Vis. da suspensão resultante da síntese TK-AgNPs.

Para determinar a formação de AT-AgNPs, os espectros UV-VIS foram medidos durante o processo de ebulição nos intervalos de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min., após a adição do citrato de sódio. Estes intervalos são semelhantes aos usados por Bástus e Sileikaite para acompanhar as mudanças morfológicas de AgNPs (Sileikaite *et al.*, 2009; Bastus *et al.*, 2014). Durante a ebulição na síntese, os espectros foram medidos em intervalos menores (1, 2 e 5 min.) para encontrar o intervalo exato da formação de nanopartículas de prata. Nos intervalos de 1 e 2 min., a suspensão era quase incolor; ou seja, indicando que ainda não haviam sido formadas AT-AgNPs. A partir de 5 min., a suspensão tem a cor amarela, permanecendo com o mesmo aspecto nos intervalos seguintes até 30 min. Para os intervalos de 10 a 30 min., houve mudança nos espectros como apresentado na Figura 8. Os espectros com absorção entre ~ 394 nm e ~ 398 nm mostram bandas estreitas que indicam monodispersidade. Esses resultados são compatíveis com a literatura, em que uma banda estreita em 395 nm foi observada (Bastus *et al.*, 2014).

Figura 8 - Espectros no UV-Vis. da suspensão resultante da síntese AT-AgNPs nos intervalos de 01, 05, 10 e 15 min. No lado direito é apresentada a imagem das suspensões entre os intervalos 01 a 15 min.

Na Figura 12 observa-se que essas bandas têm intensidade aumentada com o tempo de síntese em consequência do crescimento das partículas (Bastus *et al.*, 2014) e da concentração (Krylova *et al.*, 2005). Picos no início da formação são atribuídos a pequenas partículas. Para tempos maiores as bandas se alargam devido ao aparecimento de aglomerados de íons de prata na solução (Krylova *et al.*, 2005). Empregou-se um tempo de ebulição de até 1 h para descobrir se as AT-AgNPs agregariam ou se ficariam maiores. Neste caso, o deslocamento do pico pode ser observado. Para tempos de ebulição mais longos o pico se torna mais largo, o que significa distribuição mais larga de tamanhos de partículas (Krylova *et al.*, 2005). A alta uniformidade das AT-AgNPs resultante gera bandas de absorção estreitas, em que a intensidade máxima de absorbância depende linearmente do volume de NPs, denotando crescimento uniforme e ausência de nova nucleação (Bastus *et al.*, 2014). O resultado dos espectros no UV-Vis das AT-AgNPs indica que a banda mais estreita é observada para o intervalo de 5 min., com pico em ~ 395 nm. Revela formação de AgNPs menores que 10 nm e monodispersas como as fabricadas por Bástus. O intervalo de 5 min. foi, assim, considerado ideal para este trabalho. Para fins comparativos, a Figura

13 mostra os espectros das suspensões de TK-AgNPs e AT-AgNPs (intervalo de 5 min.), em que é possível observar grande diferença na largura das bandas e intensidade.

Figura 9 - Espectros no UV-Vis. da suspensão resultante da síntese AT-AgNPs nos intervalos de 20, 25, 30 min e 01,03 h. No lado direito é apresentado as imagens das alíquotas com as suspensões dos respectivos intervalos..

Figura 10 - Espectros no UV-Vis. da suspensão resultante da síntese TK- AgNPs e AT-AgNPs.

5.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Uma caracterização importante para suspensões de nanopartículas é o espalhamento de luz dinâmico (DLS), com o qual se pode avaliar a distribuição dos tamanhos hidrodinâmicos das NPs. Com essa técnica obtém-se um valor médio para o tamanho (*Z-average*) e um parâmetro de largura da distribuição de tamanhos, conhecido como Índice de Polidispersividade (PDI) (Malvern, 2013). O índice é considerado baixo se for menor que 0,1, com amostras de características monomodais e de largura estreita. Se $PDI > 0,5$, as amostras apresentam distribuições mais largas e o valor de tamanho hidrodinâmico médio deixa de ser confiável (Malvern, 2013). Uma grande polidispersidade do tamanho de partículas é relacionada a estruturas não homogêneas e pode degenerar enormemente as propriedades dos materiais (Li *et al.*, 2014).

As Figura 11 e Figura 12 mostram os resultados de DLS das TK-AgNPs e AT-AgNPs, respectivamente. As TK-AgNPs apresentam tamanho médio de 10 nm, com índice de polidispersividade (PDI) de 0,405. Ambos valores são maiores do que as NPs obtidas com ácido tânico (AT-AgNPs), que têm tamanhos de 5 a 9 nm, com índice de PDI de 0,232 e potencial Zeta de -51,9 mV. Resultados semelhantes foram relatados por Bástus e colaboradores, que observaram que sínteses de AgNPs usando somente o citrato de sódio como estabilizador resultam em NPs maiores, heterogêneas e polidispersas. Já as sínteses com agentes estabilizadores como o ácido tânico resultam em NPs menores, homogêneas e monodispersas.

Figura 11 – Distribuição de tamanho de partículas a partir de resultados de DLS para a solução da síntese de TK-AgNPs, concentração de 0,009%.

Figura 12 – Distribuição de tamanho de partículas a partir de resultados de DLS para a suspensão resultante da síntese de AT-AgNPs.

5.3 Aspectos das membranas

As Figura 13 e Figura 14 mostram fotografias das membranas puras e membranas com TK-AgNPs e AT-AgNPs após secagem, que ficaram com aspecto transparente quando na ausência de AgNPs e com cor amarela, que tornaram-se cada vez mais escuras após serem reticuladas com glutaraldeído (Gta). Quando são incorporadas AgNPs em membranas reticuladas, além de apresentarem coloração amarela, elas também ficaram mais quebradiças com o aumento da concentração das NPs, com espessura média de 11 μm . A cor amarela das membranas também se deve à cor original da suspensão de AT-AgNPs, como apresentado na Figura 3. Resultados semelhantes foram obtidos por Kumar e colaboradores (Kumar *et al.*, 2018). O reagente de reticulação Gta tem alta eficiência, o que torna a membrana polimérica mais rígida e dura. As membranas reticuladas têm menos capacidade de intumescimento devido à reação com os grupos amino livres (Songchitikupan, *et al* 2008). A mudança de cor das membranas reticuladas com Gta é causada pela formação de ligações aldíminas ($-\text{CH}=\text{N}-$) entre grupos amino livres de lisina e grupos aldeídos do Gta (Rattanuengsrikul., *et al* 2009).

Figura 13 - Fotografias das membranas. Puras: gelatina (G), quitosana (Q), gelatina/quitosana (GQ). Membranas com TK-AgNPs: gelatina (G TK-AgNPs), quitosana (Q TK-AgNPs), gelatina/quitosana (GQ TK-AgNPs). Membranas reticuladas: gelatina (G/Gta), quitosana (Q/Gta), gelatina/quitosana (GQ/Gta). Membranas com TK-AgNPs reticuladas: gelatina (G TK-AgNPs/Gta), quitosana (Q TK-AgNPs/Gta), gelatina/quitosana (GQ TK-AgNPs/Gta).

Figura 14 - Fotografia das membranas com AT-AgNPs.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram analisadas as superfícies das membranas sem AgNPs: gelatina, quitosana, blenda gelatina/quitosana, e das membranas com AgNPs: G TK-AgNPs, Q-TKAgNPs e G-TKAgNPs. A Figura 15 mostra que a membrana de gelatina pura (a) tem aspecto de superfície lisa, homogênea, enquanto na membrana de quitosana pura (c) a superfície contém

aglomerados. Para a blenda de gelatina e quitosana, nota-se mudança na superfície. Com adição de AgNPs nas figuras (b), (d) e (e), notam-se pequenos aglomerados, possivelmente de nanopartículas. Estas imagens podem indicar que as TK-AgNPs geram mudanças na rugosidade do polímero (LUIZ, 2010). Na Figura (f) é mostrada a membrana de GQ TK-AgNPs, onde aparecem pequenos aglomerados, com tamanhos entre 19,04 a 24,05 nm, provavelmente devido às AgNPs na superfície.

Mesmo a técnica do MEV sendo considerada indicada, as imagens não ficaram com qualidade de resolução boa o suficiente para interpretação de superfície das membranas. Assim, não foi possível observar diferença de morfologia entre as membranas com ausência e presença de TK-AgNPs. Podem ter ocorrido variações sutis na condições de operação e tipo de membrana, embora seja mais provavelmente um reflexo das dificuldades em obter observações inequívocas para MEV nesse tipo de biomaterial.

Figura 15 - Micrografias das membranas de gelatina G (a), gelatina com TK-AgNPs (b), quitosana (c), quitosana com TK-AgNPs (d), gelatina/quitosana (e), gelatina/quitosana/AgNPs (f).

5.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A rugosidade da superfície dos materiais é um fator importante para a adesão celular sobre eles, assim como sua molhabilidade e os grupos funcionais (Lee *et al.*, 1994). No que tange à rugosidade, há diversas escalas de tamanho que devem ser consideradas. A macrorrugosidade, que se refere a irregularidades maiores que 100 µm até milímetros (distinguível pelos olhos humanos), parece ser favorável para a adesão celular; a influência da microrrugosidade (de 1 a 100 µm) é considerada controversa, com exemplos positivos e negativos na literatura; na escala sub-micrométrica (100 nm a 1 µm) e nanométrica (1 a 100 nm), a rugosidade em geral é considerada positiva (Bacakova *et al.*, 2011)

As imagens das microscopias de força atômica (AFM) das membranas estão na Figura 19, e as rugosidades na Tabela 3. Os maiores valores de rugosidade são referentes à membrana de maior concentração de nanopartículas 0,1% AT-AgNPs. Os resultados das membranas com concentrações menores são similares. A partir desses resultados, nas escalas empregadas (áreas de no máximo 100 µm², em quadrados de 10 µm de aresta), são analisadas irregularidades de no máximo poucos micrômetros, e principalmente na escala sub-micrométrica. Os maiores valores de rugosidade são referentes à membrana de maior concentração de nanopartículas, indicando que a rugosidade pode aumentar com tais aditivos. Para áreas de 1 µm², foi obtida rugosidade R_{rms} de 1,1 nm para a membrana GQ, enquanto que para as membranas com nanopartículas as R_{rms} foram acima de 2,3 nm. Para área de 100 µm², as rugosidades flutuaram entre as membranas, mas há diferença entre GQ e GQ 0,1% AT-AgNPs, com R_{rms} de aproximadamente 6 e 8 nm, respectivamente. Como comparação, Prasertsung *et al.* obtiveram valores não maiores do que 1 nm de R_{rms} para áreas de 9 µm² de membrana de gelatina produzida por casting mesmo após uso de plasma para

aumentar sua rugosidade (Prasertsung *et al.*, 2010). Em estudos de Nosal *et al.* com filmes de quitosana produzidos por spin-casting, foram obtidos R_{rms} de no máximo 1 nm para diferentes áreas de filme (Nosal *et al.*, 2005).

Em relação à macrorrugosidade, é notável a diferença a olho nu entre as membranas, sendo que esta rugosidade aparente aumenta com a quantidade de AgNPs adicionada. Além disso, a membrana de gelatina pura aparenta ter superfície mais lisa do que as das blendas com quitosana e das membranas com AgNPs.

Figura 16 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) das membranas em diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

Tabela 3 - Rugosidades média (Ra) e RMS (Rq) das membranas sobre diferentes áreas projetadas, obtidas das imagens de microscopia de força atômica, com análise pelo software NanoScope.

Amostra	Área (μm^2)	Ra (nm)	Rq (nm)
GQ	1	1,11	1,4
GQ	25	10,4	16,2
GQ	100	6,05	10,9
GQ 0,0125% AT-AgNPs	1	2,34	2,85
GQ 0,0125% AT-AgNPs	25	3,26	4,59
GQ 0,0125% AT-AgNPs	100	5,02	7,92
GQ 0,025% AT-AgNPs	1	3,35	4,8
GQ 0,025% AT-AgNPs	25	6,35	9,48
GQ 0,025% AT-AgNPs	100	7,04	10,7
GQ 0,05% AT-AgNPs	1	4,24	4,89
GQ 0,05% AT-AgNPs	25	5,4	6,82
GQ 0,05% AT-AgNPs	100	5,84	7,4
GQ 0,1% AT-AgNPs	1	2,44	3,09
GQ 0,1% AT-AgNPs	25	6,6	8,11
GQ 0,1% AT-AgNPs	100	7,99	11,7

5.6 Difractometria de Raios X

5.6.1 Membranas com TK-AgNPs

A técnica de difração de Raios X foi empregada para identificar halos amorfos característicos da membrana de gelatina (G), membrana de quitosana (Q), e possível mudança na cristalinidade com adição das TK-AgNPs e AT-AgNPs. As difrações das membranas puras são apresentadas na Figura 20. O padrão de difração da membrana Q exibiu área amorfa, nos valores 2θ de 11° e 21° , característico de filmes de quitosana obtidos com adição de ácido acético (Soares, A. C., 2012). A membrana G apresenta halo amorfo característico (Kozlov e Burdygina, 1983) no intervalo de 15° a 30° (Kozlov e Burdygina, 1983). Para a blenda da membrana GQ o sinal cristalino na região de 15° da quitosana desapareceu, e uma região amorfa característica da gelatina tornou-se menor (15 - 25°). De acordo com a literatura, isso demonstra interação entre os dois polímeros (Agarwal *et al.*, 2016). Além disso, os difratogramas de quitosana podem variar com o método de obtenção da membrana. Para a

membrana de quitosana Q, os sinais em 15° e 21° indicam que a estrutura polimérica não possui ordenamento cristalino de longo alcance (Fiamingo, 2012). A membrana de gelatina pura (G) apresenta pequenos aumentos de intensidade nessas mesmas regiões, porém a maior largura desses sinais aponta para uma estrutura amorfa. A membrana de gelatina/quitosana (G/Q) apresentou halos com maior intensidade do que os espectros das membranas G e Q, o que indica a compatibilidade dos mesmos (Agarwal *et al.*, 2016). Os halos de GQ são mais largos do que os da membrana Q. A diferença provavelmente se deve a quebras de ligações de hidrogênio entre os grupos amino e hidroxila entre as próprias cadeias de quitosana, e a formação de ligações do mesmo tipo entre os grupos carboxílicos da gelatina e os grupos amino da quitosana. Essa interação entre os polímeros pode explicar o alargamento dos picos e o aparecimento de uma banda entre 2θ de 18° e 20° (Cheng *et al.*, 2003).

Figura 17 - Difratomogramas das membranas puras: gelatina (G), quitosana (Q), membrana de gelatina/quitosana (GQ) e gelatina/quitosana/AgNPs.

5.6.2 Membranas com TK-AgNPs reticuladas

As amostras reticuladas apresentam picos cristalinos mais largos e com intensidade mais baixa, provavelmente em função do Gta, como mostra a Figura 18. Os padrões de DRX também revelam que a introdução das TK-AgNPs modifica a membrana GQ/Gta, como esperado da literatura (Praxedes *et al.*, 2016). Os padrões da membrana de quitosana com AgNPs (Q TK-AgNPs) e das membranas reticuladas G TK-AgNPs/Gta e Q TK-AgNPs/Gta

mostram pico em $2\theta = 38^\circ$. Isso confirma que as TK-AgNPs na membrana têm face centrada cúbica e que ocorreu cristalização na superfície das membranas (Paul., *et al* 2015). Conclui-se que as TK-AgNPs aparecem com picos cristalinos nas membranas de quitosana, mas na membrana de gelatina somente quando reticulada.

Figura 18 - Difratomogramas das membranas reticuladas com Gta: gelatina (G/Gta), quitosana (Q/Gta) e difratometria das membranas reticuladas com Gta e com adição de AgNPs: G TK-AgNPs e Q-TK-AgNPs.

5.6.3 Membranas com AT-AgNPs

Na Figura 19, os padrões de DRX revelam a formação das AT-AgNPs com o pico em $2\theta = 38^\circ$ (Praxedes *et al.*, 2016). Este resultado confirma que as AT-AgNPs têm estrutura cúbica de face centrada (Paul., *et al* 2015). Assim, confirma-se a formação de AT-AgNPs na síntese com ácido tânico e nas membranas com AT-AgNPs. Nota-se um pico mais evidente em 38° nos difratogramas das membranas com maior concentração de NPs (0,05% e 0,1%).

Figura 19 - Difratomogramas das membranas gelatina/quitosana (GQ) com NPs com adição de ácido tânico (AT-AgNPs): GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs.

Com a difratometria das membranas na presença de AT-AgNPs e TK-AgNPs, observamos que o pico característico de AgNPs na região 38° está presente nas membranas G TK-AgNPs e Q TK AgNPs, sendo que para as membranas com AT-AgNPs o pico somente aparece para as membranas com maiores concentrações: GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs. Além disso as nanopartículas de prata (TK-AgNPs e AT-AgNPs) interferem na intensidade da região dos polímeros para 2θ entre 5° e 15° .

5.7 Espectroscopia por Reflectância Total Atenuada

Os espectros ATR-FTIR das Figura 20, 24 e 25 servem para inferir informações sobre as interações entre gelatina e quitosana, incluindo efeitos da presença das AgNPs. O espectro da membrana de Q apresenta bandas principais em 2848 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} , 1548 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} , 1068 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à deformação axial de C-H, deformação axial de C=O de amida I, deformação axial de amida II (C-N) de amida III e deformação angular de C-O, respectivamente (Fiamingo, 2012). O estiramento de NH e as vibrações de alongamento de OH são visíveis no pico largo na região de $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ (Anjum *et al.*, 2016). O

espectro da membrana de gelatina produziu 3 bandas principais nas regiões $1670\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (Amida-I), $1565\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ (Amida-II), $1240\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Amida-III). Faixas espectrais semelhantes foram observadas em gelatina por (Cebi *et al.*, 2016) (Li *et al.*, 2007) e (Nagarajan *et al.*, 2012). A região de 3273 cm^{-1} a 2922 cm^{-1} corresponde à banda de ligação OH (Bin Ahmad *et al.*, 2011). Na membrana GQ a formação da blenda gelatina/quitosana implicou em modificações principalmente no espectro da quitosana, com alteração nas bandas de carbonila e amina (Cheng *et al.*, 2003) (Bin Ahmad *et al.*, 2011). Os espectros das membranas gelatina/quitosana mostraram uma mistura de absorções características dos grupos amina da quitosana e aos grupos ácido carboxílico da gelatina. As bandas do grupo amina para quitosana pura foram deslocados de 1650 e 1544 cm^{-1} para 1630 e 1528 cm^{-1} na membrana GQ, correspondendo à vibração do grupo amina. A gelatina pura foi caracterizada por uma banda amino a 1520 cm^{-1} e uma de carbonila a 1623 cm^{-1} , também deslocada para 1630 e 1528 cm^{-1} . Esse deslocamento das bandas amino e carbonila no espectro da blenda GQ indica a formação de complexo com ligações de hidrogênio entre quitosana e gelatina (Bin Ahmad *et al.*, 2011), como em um complexo polieletrólítico (Yin *et al.*, 1999).

Figura 20 - Espectros no infravermelho por ATR em membrana pura de gelatina (G) e membrana de gelatina com TK-AgNPs (G TK-AgNPs).

Figura 21 - Espectros no infravermelho por ATR em membrana pura de quitosana (Q) e membrana de quitosana com (Q-TK-AgNPs).

Figura 22 - Espectros no infravermelho por ATR em membrana pura de quitosana (Q) e membrana de quitosana com (Q-TK-AgNPs).

A Figura 26 mostra os espectros em ATR das membranas contendo TK-AgNPs e AT-AgNPs. Os espectros das membranas G, Q e GQ não são muito afetados pela presença dos dois tipos de NPs, exceto na intensidade de algumas bandas. No espectro da membrana de GQ TK-AgNPs, as vibrações em 3250 cm^{-1} a 2930 cm^{-1} de O-H permanecem, assim como nas membranas de G TK-AgNPs e Q TK-AgNPs. Como já mencionado, a membrana de GQ TK-AgNPs tem espectro semelhante ao da membrana de gelatina 4GQ. Pandey e colaboradores afirmam que os grupos OH podem se envolver em reação de coordenação com os íons metálicos onde as interações entre as partículas de AgNPs e os átomos de oxigênio dos grupos OH tornam-se mais fortes com o aumento da quantidade dessas NPs. Além disso, pode levar a mudanças nas posições e nas intensidades dos espectros, e assim as bandas de estiramento OH e CO tornam-se gradualmente mais largas (Pandey *et al.*, 2012). O mesmo acontece com a banda de COH a 1350 cm^{-1} , influenciada pelas AgNPs. A banda que parece ser mais predominante na membrana GQ TK-AgNPs na região de 1638 cm^{-1} é a do grupo carbonila

(Kanmani & Rhim, 2014). Observa-se, dessa forma, que a incorporação de Tk-AgNPs e AT-AgNPs não ocasionou deslocamentos significativos das bandas nos espectros de infravermelho. Houve um aumento sensível de intensidades de bandas IR em: 3220 a 2800 cm^{-1} e 1620 a 1018 cm^{-1} , que de acordo com literatura indica a formação de ligações de coordenação entre vários grupos dos polímeros (gelatina/quitosana) com as TK-AgNPs e AT-AgNPs (Kumar *et al.*, 2018).

Figura 23 – Espectros no infravermelho por ATR em membranas com adição de AT- AgNPs.

5.8 Ensaio de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado para verificar o tempo de permanência e grau de inchaço das membranas em meio aquoso. Determinar o efeito da água na estrutura das membranas é relevante, pois está ligado ao total de moléculas de água ocupadas na sua microestrutura matricial (Jamroz *et al.*, 2018), além do fato de a água ter papel importante nas células. O intumescimento depende das ligações cruzadas e das densidades de carga da rede polimérica, e aumenta com o número de grupos iônicos em materiais poliméricos. Tal

aumento se dá pelo maior número de contra-íons no gel, o que produz pressão osmótica adicional que incha o gel (Ahmed, 2015). O grau de intumescimento que se deseja depende do uso que se fará da membrana.

O objetivo neste trabalho é obter uma membrana que possa funcionar como curativo, com tempo de reabsorção de aproximadamente 24 h. Os intervalos e a metodologia foram adotados considerando que o processo de intumescimento mais crítico ocorre nas primeiras 24 h de imersão em solução PBS (Bigi *et al.*, 2001). Ressalte-se que os resultados do ensaio dependem dos procedimentos experimentais, pois as membranas podem ser danificadas durante o manuseio. Os resultados mostram que a quantidade de massa dos polímeros e as TK-AgNPs e AT-AgNPs interferem no intumescimento das membranas. A Figura 24 apresenta os resultados do ensaio de intumescimento das membranas puras, onde a membrana G em curto intervalo de tempo (menos de 15 min) intumesce mais do que as outras, absorvendo até 400% em solução PBS. Esse valor aumenta para cerca de 850%, atingindo seu limite no ensaio e degradando totalmente no intervalo entre 3 e 5 h. Já a membrana GQ intumesce de maneira semelhante à membrana (G); porém, absorve cerca de 620% da solução nos primeiros intervalos, chegando em 1250% no seu tempo final de permanência de 4 h. A membrana de Q tem maior estabilidade, com menos inchaço - absorção de no máximo 200% de solução PBS durante o tempo do ensaio (mais de 24 h). Medidas de intumescimento em tempos mais longos são dificultadas pela solubilidade da membrana.

A reticulação com Gta induz uma redução significativa do inchamento, como observado na Figura 27. Todas as membranas (G/Gta, Q/Gta e G/Q/Gta) permanecem por 24 h, sendo que a membrana GQ/Gta intumesce menos. O Gta contém dois grupos funcionais terminais (aldeído) que reticulam com duas unidades de glucosamina da quitosana, ocasionando pontes de reticulação (Badawy *et al.*, 2017). A reação pode ser considerada menor do Gta com a gelatina, por ela conter menos grupos amino (Badawy *et al.*, 2017). A adição do Gta pode diminuir a taxa de inchamento das membranas, pois a rede de polímeros apresenta alto volume hidrodinâmico livre para acomodar moléculas de solvente (Efentakis e Stamoylis, 2011). Ou seja, a mobilidade e o relaxamento das cadeias poliméricas diminuem, e o espaço livre diminui, o que impede a difusão das moléculas do solvente, diminuindo a grau

de inchamento (Badawy *et al.*, 2017). A capacidade de absorção de gelatina depende do pH e é independente da sua massa molecular (Kozlov e Burdygina, 1983).

Estes resultados mostram que a blenda de GQ demora mais para degradar em meio aquoso do que a membrana de G pura. Além disso, quando reticuladas permanecem no ensaio por 24 h.

Figura 24 - Ensaio de intumescimento das membranas puras (lado esquerdo): G, Q e GQ. Membranas reticuladas com Gta : G/Gta, Q/Gta e GQ/Gta. Membranas com adição de TK-AgNPs: G TK-AgNPs, Q TK-AgNPs, GQ TK-AgNPs e Membranas reticuladas com Gta e adição de TK-AgNPs: G/gta TK-AgNPs, Q/Gta TK-AgNPs e GQ/Gta TK-AgNPs.

A Figura 25 apresenta os resultados do ensaio de intumescimento das membranas contendo AT-AgNPs: GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs, GQ 0,1% AT-AgNPs e GQ sem prata, como comparação. A membrana GQ 0,0125% AT-AgNPs intumescer mais do que a membrana pura GQ, atingindo seu limite em meio aquoso e degradando totalmente entre 2 e 3 h. Já as membranas GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs permanecem no ensaio até 5 h, 24 h e 48 h,

respectivamente. Quanto maior a concentração de AT-AgNPs, maior é o tempo que as membranas permanecem no ensaio, sem se dissolverem.

Figura 25 - Ensaio de intumescimento das membranas na ausência de AT-AgNPs: GQ e das membranas com adição de AT-AgNPs: GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs, AT- GQ 0,1% AgNPs.

À medida que a concentração de TK-AgNPs ou AT-AgNPs foi aumentada, as membranas tornaram-se visivelmente mais espessas a olho nu. Essa característica também pode ser inferida do ensaio de intumescimento nas Figuras 27 e 28, onde as membranas com TK-AgNPs e com AT-AgNPs apresentam maior porcentagem de intumescimento do que as membranas puras. Em trabalhos similares (Jamroz *et al.*, 2018), (Kanmani e Rhim, 2014), observou-se um aumento no conteúdo de água dos filmes de nanocompósitos de gelatina/AgNPs. Esses autores explicam que a adição de nanopartículas aumenta o teor de água dos filmes, o que pode ser devido a uma redução na interação entre as cadeias de gelatina. A conclusão é a de que um aumento na água absorvida advém de maior acessibilidade de grupos hidroxila livres para absorver água.

5.9 Teste de Liberação das suspensões de AT-AgNPs

Materiais à base de prata exibem fraca resistência à lavagem (Vimala *et al.*, 2010), o que pode ser positivo para o processo de liberação. A Figura 26 mostra que o pico próximo de 400 nm, característico de AgNPs, aumenta com a concentração de AT-AgNPs e o intervalo de tempo (18 e 24 h) em que a membrana permanece na solução. Resultados semelhantes para teste de liberação foram obtidos por Vimala com nanocompósitos de quitosana (Vimala *et al.*, 2010).

Figura 26 - Espectros no UV-Vis para membranas: GQ 0,0125% AT-AgNPs, GQ 0,025% AT-AgNPs, GQ 0,05% AT-AgNPs e GQ 0,1% AT-AgNPs em solução PBS (pH 7,4), no período de 24 h.

5.10 Ensaios Microbiológicos

Antes de as AT-AgNPs serem inseridas nas soluções poliméricas, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por diluição de caldo em inóculos da bactéria Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E.coli*. Este teste foi escolhido para avaliação do efeito antimicrobiano da suspensão e para uma pré-determinação de futuras concentrações a serem inseridas nas membranas. Ressalta-se que nesta tese, o maior foco é determinar concentrações mínimas de AgNPs que tenham efeito antimicrobiano e ausência de toxicidade para células humanas saudáveis. A atividade antimicrobiana das membranas - na presença e ausência de TK-

AgNPs e AT-AgNPs - foi avaliada com o método de difusão em disco contra as bactérias *E. coli* e a *S. aureus*. Essas bactérias vivem em simbiose no corpo humano e são encontradas em feridas cirúrgicas.

5.10.1 Soluções de AT-AgNPs

O ensaio das AT-AgNPs em diluição em caldo para determinar a CIM foi realizado com as seguintes concentrações: 0,031 mM; 0,062 mM; 0,0125 mM; 0,025 mM; 0,05 mM e 0,1 mM. Pelas imagens da Figura 27, nota-se inibição ao crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* para 0,1 e 0,05 mM (avaliado pela turbidez no meio, que se torna mais perceptível quando os tubos são posicionados contra uma folha impressa). No intervalo de concentrações estudado, foi possível identificar CIM, sendo necessário aumentar as concentrações das nanopartículas para valores superiores ou iguais a 0,1 mM. Kim e colaboradores sintetizaram nanopartículas de prata mediadas por ácido tânico, testando sua atividade antimicrobiana. Ao avaliar a MIC para diferentes cepas de *S. aureus* e *E. coli*, verificaram que concentrações de TA-AgNPs variando entre 6,7 – 13,5 µg/mL eram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos (Kim et. al., 2016).

Figura 27 - Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória por diluição em caldo das AT-AgNPs nas concentrações de 0,031mM; 0,0062 mM; 0,0125, 0,05 mM e 0,1 mM em contato com a cepa da bactéria Gram-positiva S.aureus.

2) Fase líquida e Fase sólida

O teste por diluição em caldo BHI foi realizado também com a Fase líquida (sobrenadante) e Fase sólida (precipitado) das AT-AgNPs com o objetivo de avaliar se as duas fases poderiam apresentar individualmente efeito antimicrobiano. Além disso, o teste serve para avaliar a necessidade de lavagem da AT-AgNPs, antes de serem inseridas nas membranas. As quantias de precipitado e sobrenadante foram utilizadas na preparação da solução com a concentração original da síntese (0,025 mM) da solução de AT-AgNPs. Observa-se da Figura 28 que nenhuma das fases tem impacto significativo sobre o crescimento de *S. aureus* (ausência de diferenças na turbidez dos meios de cultura, verificada a olho nu).

Figura 28 - Ensaio microbiológico por diluição em caldo da concentração original de AT-AgNPs (0,025 mM) por diluição em caldo, utilizando fase líquida (sobrenadante) e fase sólida (precipitado). Não houve efeito antimicrobiano.

O aumento da concentração para 0,1 mM, como observado na seção anterior, implica na redução da carga bacteriana no meio, indicando inibição no crescimento de *S. aureus*. A separação dos componentes revela que, ao se utilizar a fase líquida, há um efeito mais eficiente de inibição do que na fase sólida. É importante notar que a centrifugação não é capaz de separar totalmente as nanopartículas de seu solvente, como pode ser observado na Figura 32, pela presença de agregados no fundo do tubo contendo apenas fase líquida. Assim, a etapa de centrifugação das AT-AgNPs antes de serem adicionadas nas membranas foi desnecessária. Este resultado pode ser considerado vantajoso, visto que um processo a menos para a fabricação das membranas requer menos tempo e menor custo para a indústria.

Figura 29 - Ensaio microbiológico por diluição em caldo da concentração original de AT-AgNPs (0,1 mM), utilizando fase líquida (sobrenadante) e fase sólida (precipitado). Houve efeito antimicrobiano somente para as duas fases.

O primeiro teste disco-difusão, apresentado na Figura 30, foi realizado com as membranas com proporção de massa de gelatina (4%) e quitosana (1%) na ausência de TK-AgNPs (lado esquerdo): (1) membrana G, (2) membrana Q, (3) membrana GQ, membrana reticulada (4) GQ/Gta. Também foi realizado teste disco-difusão das membranas contendo TK-AgNPs (lado direito): (5) membrana G TK-AgNPs, (6) membrana GQ TK-AgNPs, (7) membranas G TKAgNPs. Todas as membranas foram colocadas em contato com o meio de cultura para crescimento bacteriano, com diâmetro inicial fixado em 0,6 mm. Nenhuma das membranas sem TK-AgNPs apresentou halo de inibição contra a bactéria Gram-positiva *S.aureus*. Já se esperava que as membranas de gelatina não formassem halo, pois a gelatina não tem propriedades antimicrobianas. Nas membranas de blendas, a quantidade de massa de quitosana é 4 vezes menor do que a da gelatina, e portanto a atividade antimicrobiana da quitosana pode não ter aparecido. Porém, as membranas de Q (2), de G/Q (3) também não formaram halo de inibição. Somente foi tóxica para a bactéria Gram-positiva a membrana GQ TK-AgNPs, que formou um halo de inibição 0,2 mm.

Figura 30 - Ensaio microbiológico com as membranas TK-AgNPs em contato na cultura de bactéria Gram negativa S.aureus: (1) membrana G, (2) membrana Q, (3) membrana GQ,(4) membrana GQ/Gta, (5) membrana G/TK-AgNPs,(6) membrana GQ/TK-AgNPs, (7) membranas G/TKAgNPs. Somente a membrana (6) membrana GQ TK-AgNPs formou halo de inibição.

Embora o efeito antimicrobiano da quitosana seja amplamente conhecido, Follmann

e colaboradores relatam que a atividade bactericida e antifúngica de quitosanas pode não ocorrer. A atividade antimicrobiana depende de parâmetros como: massa molecular, densidade de carga positiva, grau de desacetilação e quaternização, disponibilidade de grupos carregados (sítios N-quaternizados), tipo de grupo de derivatização (Follmann *et al.*, 2016).

Para os testes disco difusão, alguns trabalhos com filmes de gelatina/quitosana da literatura (Romero *et al.*, 2009) utilizam papel de filtro, que é imerso na solução do polímero e em seguida colocado na placas para visualização do halo de inibição. Este método foi usado como alternativa neste trabalho, devido às dificuldades de manuseio das membranas, pois algumas apresentam fragilidade ao corte, dificultando que fiquem em forma de discos padronizados. Assim, o ensaio foi realizado novamente com as membranas de gelatina e quitosana com TK-AgNPs. A Figura 34 mostra o teste com papel de filtro no tamanho de 0,5 mm de diâmetro e imerso nas soluções de G/Ag, Q/Ag, Q/Ag/Gta e G/Ag/Gta. As amostras G Tk-AgNPs, G TK-AgNPs/Gta e Q TK-AgNPs não formaram halo de inibição. A amostra Q TK-AgNPs apresentou halo de inibição de 0,2 mm contra a bactéria Gram positiva *S.aureus*. Este resultado foi diferente daquele com o método mostrado na Figura 30 onde as membranas estão em contato direto no meio de cultura e a membrana GQ TK-AgNPs na ausência de Gta mostrou toxicidade contra a bactéria Gram positiva. As Figuras 34 e 35 mostram os resultados do ensaio microbiológico por disco-difusão com a cultura de bactéria Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E.coli*, respectivamente.

O fato de a membrana de GQ TK-AgNPs e da solução Q/Ag/Gta ser tóxica somente para a cepa da bactéria *S.aureus* pode ser explicado pela diferença entre as membranas celulares das Gram-negativas e Gram-positivas. Embora as bactérias Gram-positivas tenham uma camada de peptidoglicano mais espessa na sua parede celular, elas são mais susceptíveis aos antibióticos do que as Gram-negativas, pois nestas últimas há uma barreira externa que é difícil ser ultrapassada (Shariatnia e Fazli, 2015). Essa parede externa é composta principalmente de lipopolissacarídeos, que serve de barreira de permeabilidade e proteção da célula (Umadevi *et al.*, 2011). A membrana citoplasmática das bactérias Gram-negativas é essencial na manutenção da viabilidade das suas células.

Figura 31 - Ensaio Microbiológico por disco difusão com discos de papel filtro imersos em soluções de G TK-AgNPs, G TK-AgNPs/Gta, Q TK-AgNPs, Q TK-AgNPs /Gta, GQ TK-AgNPs e GQ TK-AgNPs, em cultura de bactéria gram-positiva *S.aureus*.

Figura 32 - Ensaio Microbiológico com a cultura de bactéria gram-negativa *E.coli* com discos de papel filtro imersos em soluções de gelatina/AgNPs (G/Ag), gelatina/AgNPs/gta (G/Ag/Gta), quitosana/AgNPs (Q/Ag) e quitosana/AgNPs /glutaraldeído(Q/AgNPs/Gta).

5.10.2 Ensaio Microbiológico em membranas com AT-AgNPs

O ensaio disco-difusão das membranas GQ 1/1, G/Q 0,0125% AT-AgNPs, 0,025% AT-AgNPs, 0,05% AT AgNPs, com AT-AgNPs também foi realizado com bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E. coli*. Somente apresentou toxicidade a membrana GQ 0,1% AT-AgNPs contra a bactéria *S.aureus*, como apresentado na Figura 36.

Figura 33 - Ensaio Microbiológico com a cultura de bactéria Gram-positiva *S. aureus* com as membranas: GQ, GQ 0,0125% AT- AgNPs, GQ 0,025% AT- AgNPs, GQ 0,05% AT- AgNPs, GQ 0,1% AT- AgNPs.

Tabela 4 - Membranas que formaram halo de inibição.

Membranas	Halo de inibição
GQ TK-AgNPs	2 mm
GQ 0,025% AT-AgNPs	2 mm
GQ 0,05% AT-AgNPs	2 mm
GQ 0,1% AT-AgNPs	2 mm

Os resultados dos ensaios mostraram que membranas GQ não são tóxicas para nenhum tipo de bactéria. Isso já era esperado dos resultados anteriores, em que mesmo a membrana de quitosana sozinha não foi tóxica para nenhuma bactéria. As membranas de quitosana só foram tóxicas na presença de AT-AgNPs. Esta toxicidade ocorre, de acordo com a literatura, porque as AT-AgNPs degradam o peptidoglicano da parede celular e provocam lise celular nas bactérias. Além disso, os íons podem desnaturar os ribossomos inibindo a síntese proteica, causando degradação do plasma celular, e podem se vincular à base do DNA, impedindo que se reproduzam por fissão binária (Chaloupka *et al.*, 2010). As AgNPs aderem diretamente às células bacterianas, liberando íons Ag^+ e nelas penetrando. Com isso afetam a permeabilidade e respiração, interrompendo a replicação do DNA e a produção de trifosfato de adenosina (ATP), podendo levar à morte celular (Dong *et al.*, 2017).

As atuais terapias antimicrobianas, que cobrem uma ampla gama de alvos, se dividem em duas categorias gerais: drogas bactericidas, que matam as bactérias com uma eficiência > 99,9%, e drogas bacteriostáticas, que inibem o crescimento (Pankey e Sabath, 2004). Interações medicamentosas-alvo antibacterianas são bem estudadas e predominantemente se dividem em três classes: inibição da replicação e reparo do DNA, inibição da síntese de proteínas e inibição da renovação da parede celular (Walsh, 2000). Pankey e Sabath (Pankey e Sabath, 2004) definem como atividade bacteriostática a situação em que o agente previne o crescimento de bactérias (isto é, as mantém na fase estacionária de crescimento). Já a atividade bactericida ocorre quando o agente mata as bactérias. Há ainda duas categorias de agentes antimicrobianos, ou seja, um que mata exclusivamente bactérias e outro que apenas inibe o crescimento. No entanto, os agentes chamados “bactericidas” geralmente não matam todos os organismos, e a maioria dos chamados agentes “bacteriostáticos” mata algumas bactérias dentro do organismo, sendo geralmente mais de 90% –99% do inóculo, mas não o suficiente (> 99,9%) para ser chamado de “bactericida” (Pankey e Sabath, 2004).

Com esses resultados observamos que as membranas com AT-AgNPs inibem o crescimento de bactérias ao redor do disco, ou seja, tem efeito bacteriostático como observado a partir da zona de inibição. O tamanho da zona de inibição não aumenta significativamente

com a quantidade de AT-AgNPs nas membranas. Resultados semelhantes foram obtidos por (Socrates *et al.*, 2015).

5.11 Testes de Viabilidade celular (citotoxicidade)

Os fibroblastos são células não-vasculares, não epiteliais e não-inflamatórias do tecido conjuntivo e seu principal componente. Eles estão mergulhados na matriz fibrilar do tecido conjuntivo, e são, em grande parte, responsáveis pela sua síntese (Campos, 2010). As funções dos fibroblastos incluem composição da matriz extracelular, regulação da diferenciação do epitélio, regulação da inflamação e envolvimento no processo de cicatrização de feridas (Campos, 2010) (Kalluri e Zeisberg, 2006). São considerados fundamentais para manter a homeostasia do tecido epitelial adjacente através da secreção de fatores de crescimento e de interação direta com a célula epitelial (Kalluri e Zeisberg, 2006). Devido a essas razões, os fibroblastos são amplamente utilizados para testes de viabilidade celular em estudos de ET (Chen *et al.*, 2006; Moscato *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2012).

Para o teste de viabilidade celular os resultados foram expressos em gráficos de barra como a média $\pm$ desvio padrão dos grupos, obtidos com quintuplicata em cada poço, como mostra a Figura 34. Observa-se que os meios de extração das membranas, tanto as compostas apenas por GQ quanto aquelas com AT-AgNPs, no geral não apresentaram redução da viabilidade celular dos fibroblastos. Apenas as membranas com 0,05 e 0,0125 % de nanopartículas apresentaram valores de viabilidade próximos a 90% nas condições de 0.5 mg/mL (membrana de menor concentração de nanopartícula) e 1 e 2 mg/mL. Orlowski e colaboradores estudaram o impacto da exposição de queratinócitos humanos a diferentes concentrações de nanopartículas de prata modificadas com ácido tânico por um período de 24 h. Verificaram o impacto dependente da concentração de nanopartículas sobre a viabilidade das células saudáveis, com EC50 (concentração do composto avaliado para a qual 50 % de seu efeito é observado) entre 19 e 26 $\mu\text{g/mL}$ (Orlowski *et al.*, 2016). Nesta tese, no entanto, mesmo variando-se as concentrações de nanopartículas nas amostras em até 10 vezes, não foi observada toxicidade para os fibroblastos. Isso sugere que as concentrações de nanopartículas nos meios de extração, após um período de 24 h, foram baixas, não interferindo no

metabolismo mitocondrial das células.

Figura 34 – Teste de viabilidade celular com as membranas de gelatina/quitosana pura (G/Q) e membranas gelatina/quitosana com nanopartículas de prata: G/Q 0,0125% TA-AgNPs, G/Q 0,025% TA-AgNPs, G/Q 0,05% TA-AgNPs e G/Q 0,1% TA-AgNPs.

6 Conclusões

A metodologia empregada para fabricar membranas foi bem sucedida, sendo possível obter membranas de gelatina e quitosana puras, e de blendas com esses dois materiais. A incorporação nas membranas de nanopartículas de prata, obtidas com duas rotas distintas, também foi comprovada. Um dos principais objetivos da tese foi alcançado, qual seja o de caracterizar as membranas com várias técnicas para não só encontrar uma formulação otimizada para o emprego em engenharia de tecidos, mas também para gerar resultados que possam ser contrastados com outros da literatura com condições bem controladas. Isso é relevante porque as propriedades das membranas, principalmente as de toxicidade e de inchamento, são dependentes das condições de fabricação. Dos resultados podem ser feitas observações visando à otimização dos processos de obtenção de membranas biocompatíveis, bactericidas e com propriedades físicas adequadas para aplicações biológicas.

A síntese de nanopartículas de prata pelo método de TK adaptado inicialmente apresentou partículas de tamanhos grandes, de larga distribuição de tamanho. O uso de AT como agente redutor e estabilizante na síntese permitiu a obtenção de partículas da ordem de 10 nm, mais apropriadas para o uso como agente antimicrobiano a ser inserido às membranas. A membrana de gelatina aparenta ter superfície mais lisa em relação às blendas com quitosana; o mesmo ocorre com a incorporação de AgNPs, as membranas apresentam aspecto de superfície maior rugosidade aparente, o que é confirmado pelas medidas de AFM. Modificações físicas também são perceptíveis com a introdução de AgNPs nos resultados de ATR e DRX. Dos ensaios de intumescimento, observa-se que a blenda de gelatina/quitosana tem maior durabilidade em solução tampão fosfato do que a membrana de gelatina pura. Isso indica ser possível aumentar a durabilidade de membranas de gelatina em meio aquoso, sem necessidade de agentes reticulantes tóxicos. Basta o uso combinado de polímeros com propriedades sinérgicas.

Com o ensaio microbiológico, verificou-se que as membranas de gelatina/quitosana e gelatina com TK-AgNPs e AT-AgNPs, em concentrações a partir de 0,025%, são capazes de formar halo de inibição para bactérias Gram-positivas. Não apresentaram toxicidade para as bactérias Gram-negativas, possivelmente porque a concentração de NPs não foi suficiente

para superar a barreira de proteção representada pela camada externa da membrana celular. No entanto, uma prioridade durante os estudos foi obter membranas que não fossem tóxicas para células humanas, o que foi bem sucedido, visto que os testes de citotoxicidade apresentaram viabilidade próxima de 100% (mínimo de 90%) em relação a fibroblastos.

Para trabalhos futuros, sugere-se realizar testes mecânicos e de adesão celular para verificar a viabilidade do uso das membranas em curativos. Os resultados apresentados aqui, de toda forma, mostram que as membranas otimizadas têm grande potencial para aplicações como curativo para regeneração tecidual, ao evitar possíveis infecções mas ainda sendo consideradas biocompatíveis.

Referências Bibliográficas

1 - Polymer blends: State of art. p. 1 - 15, 2017. ISSN 978-0-08-100408-1. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081004081000017> >.

ABRUSCI, C. et al. Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, v. 163, n. 3, p. 537-546, MAY 21 2004 2004. ISSN 1010-6030.

AGARWAL, P. et al. Aspergillus niger PA2 Tyrosinase Covalently Immobilized on a Novel Eco-Friendly Bio-Composite of Chitosan-Gelatin and Its Evaluation for L-DOPA Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, DEC 22 2016 2016. ISSN 1664-302X.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015/03/01/ 2015. ISSN 2090-1232. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969> >.

AMBROSIO, L. Polymers for biomedical applications. **Polymer International**, v. 46, n. 3, p. 161-162, JUL 1998 1998. ISSN 0959-8103.

AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, 2010 2010. ISSN 1664-302X.

ANJUM, S. et al. Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 508, n. 1-2, p. 92-101, JUL 11 2016 2016. ISSN 0378-5173.

BACAKOVA, L. et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 739-767, NOV-DEC 2011 2011. ISSN 0734-9750.

BADAWY, M. et al. Preparation and Characterization of Biopolymers Chitosan/Alginate/Gelatin Gel Spheres Crosslinked by Glutaraldehyde. **Journal of Macromolecular Science Part B-Physics**, v. 56, n. 6, p. 359-372, 2017 2017. ISSN 0022-2348.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection %J International Journal of Carbohydrate Chemistry. v. 2011, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/460381> >.

BAJPAI, S. et al. Synthesis of polymer stabilized silver and gold nanostructures. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 9, p. 2994-3010, SEP 2007 2007. ISSN 1533-4880.

BALAZS, A.; EMRICK, T.; RUSSELL, T. Nanoparticle polymer composites: Where two small worlds meet. **Science**, v. 314, n. 5802, p. 1107-1110, NOV 17 2006 2006. ISSN 0036-8075.

BASTUS, N. et al. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm:

Kinetic Control and Catalytic Properties. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 9, p. 2836-2846, MAY 13 2014 2014. ISSN 0897-4756.

BENBETTAIEB, N. et al. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2409-2419, SEP 2014 2014. ISSN 0022-5142.

BIGI, A. et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763-768, APR 2001 2001. ISSN 0142-9612.

BIN AHMAD, M. et al. Synthesis of Silver Nanoparticles in Chitosan, Gelatin and Chitosan/Gelatin Bionanocomposites by a Chemical Reducing Agent and Their Characterization. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7237-7248, SEP 2011 2011. ISSN 1420-3049.

BUBALO, M. et al. The impact of thickness of resorbable membrane of human origin on the ossification of bone defects: a pathohistologic study. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 69, n. 12, p. 1076-1083, DEC 2012 2012. ISSN 0042-8450.

CEBI, N. et al. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1109-1115, JAN 1 2016 2016. ISSN 0308-8146.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580-588, NOV 2010 2010. ISSN 0167-7799.

CHEN, P. et al. Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6579-6587, NOV 2005 2005. ISSN 0142-9612.

CHEN, Y. et al. Using gelatin scaffold with coated basic fibroblast growth factor as a transfer system for transplantation of human neural stem cells. **Transplantation Proceedings**, v. 38, n. 5, p. 1616-1617, JUN 2006 2006. ISSN 0041-1345.

CHENG, M. et al. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2871-2880, AUG 2003 2003. ISSN 0142-9612.

CHENG, Y. et al. Preparation and characterization of size and morphology controllable silver nanoparticles by citrate and tannic acid combined reduction at a low temperature. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 658, p. 684-688, FEB 15 2016 2016. ISSN 0925-8388.

CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 12, p. 4583-4588, JUN 15 2008 2008. ISSN 0013-936X.

CLARK, R.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018-1029, MAY 2007 2007. ISSN 0022-202X.

DIGENIS, G. CROSS-LINKING OF GELATIN CAPSULES AND ITS RELEVANCE TO THEIR IN VITRO AND IN VIVO PERFORMANCE. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. E11-E11, SEP 30 2013 2013. ISSN 0928-0987.

DOBIAS, J.; BERNIER-LATMANI, R. Silver Release from Silver Nanoparticles in Natural Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 9, p. 4140-4146, MAY 7 2013 2013. ISSN 0013-936X.

DONG, C. et al. A green strategy to immobilize silver nanoparticles onto reverse osmosis membrane for enhanced anti-biofouling property. **Desalination**, v. 401, p. 32-41, JAN 2 2017 2017. ISSN 0011-9164.

DONG, X. et al. Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 16, p. 6573-6576, APR 23 2009 2009. ISSN 1932-7447.

DRURY, J.; MOONEY, D. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, NOV 2003 2003. ISSN 0142-9612.

EDWARDS, F.; DI, Y.; DYE, J. In vitro assessment of the cytotoxicity and inflammatory potential of glutaraldehyde as a crosslinking agent for protein scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 7, p. 1711-1712, JUL 2007 2007. ISSN 1076-3279.

EFENTAKIS, M.; STAMOYLIS, K. A Study of Dimensional, Swelling, and Gel Changes in Hydrophilic and Hydrophobic Polymer Mixtures of Chitosan and Their Possible Use as Carriers for Sustained Release Drug Delivery. **Advances in Polymer Technology**, v. 30, n. 2, p. 110-121, SUM 2011 2011. ISSN 0730-6679.

ELSABEE, M.; ABDOU, E. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, MAY 1 2013 2013. ISSN 0928-4931.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Gelatin microspheres: Influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. **Biomaterials**, v. 17, n. 20, p. 2009-2020, OCT 1996 1996. ISSN 0142-9612.

FOLLMANN, H. et al. Extent of shielding by counterions determines the bactericidal activity of N,N,N-trimethyl chitosan salts. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 418-425, FEB 10 2016 2016. ISSN 0144-8617.

HAGERMAN, A. et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1887-1892, MAY 1998 1998. ISSN 0021-8561.

HE, Y. Z. et al. An Antimicrobial Peptide-Loaded Gelatin/Chitosan Nanofibrous Membrane Fabricated by Sequential Layer-by-Layer Electrospinning and Electrospaying Techniques. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, May 2018. ISSN 2079-4991. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000435198300058 >.

HENCH, L. Bioactive materials: The potential for tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 41, n. 4, p. 511-518, SEP 15 1998 1998. ISSN 0021-9304.

ITOH, S. et al. The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 54, n. 3, p. 445-453, MAR 5 2001 2001. ISSN 0021-9304.

JAMROZ, E. et al. Development and characterisation of furcellaran-gelatin films containing SeNPs and AgNPs that have antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 9-16, OCT 2018 2018. ISSN 0268-005X.

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v. 17, n. 5, p. 471-484, MAR 1996 1996. ISSN 0142-9612.

JEONG, S.; LEE, Y.; SHIN, H. Tissue engineering using a cyclic strain bioreactor and gelatin/PLCL scaffolds. **Macromolecular Research**, v. 16, n. 6, p. 567-569, AUG 2008 2008. ISSN 1598-5032.

JINGA, S. et al. SILVER GREEN SYNTHESIS ON BACTERIAL CELLULOSE MEMBRANES USING TANNIC ACID. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 8, n. 4, p. 1711-1717, OCT-DEC 2013 2013. ISSN 1842-3582.

JUNG, W. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2171-2178, APR 2008 2008. ISSN 0099-2240.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, MAY 2006 2006. ISSN 1474-175X.

KANMANI, P.; RHIM, J. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. **Food Chemistry**, v. 148, p. 162-169, APR 1 2014 2014. ISSN 0308-8146.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. **Biomaterials**, v. 18, n. 2, p. 95-105, JAN 1997 1997. ISSN 0142-9612.

KIM, K. et al. APPLICATIONS OF FIELD-EMISSION SCANNING ELECTRON-MICROSCOPY TO POLYMER MEMBRANE RESEARCH. **Micron and Microscopica Acta**, v. 23, n. 3, p. 259-271, SEP 1992 1992. ISSN 0739-6260.

KIRSNER, R. et al. Human acellular dermal wound matrix: evidence and experience. **International Wound Journal**, v. 12, n. 6, p. 646-654, DEC 2015 2015. ISSN 1742-4801.

KOZLOV, P.; BURDYGINA, G. THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF SOLID GELATIN AND THE PRINCIPLES OF THEIR MODIFICATION. **Polymer**, v. 24, n. 6, p. 651-666, 1983 1983. ISSN 0032-3861.

KRYLOVA, G. et al. Structure and spectra of photochemically obtained nanosized silver particles in presence of modified porous silica. **International Journal of Photoenergy**, v. 7, n. 4, p. 193-198, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/S1110662X05000292> >.

KUMAR, S. et al. Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 178-184, JUN 2018 2018. ISSN 2214-2894.

LAMER, V.; DINEGAR, R. THEORY, PRODUCTION AND MECHANISM OF FORMATION OF MONODISPERSED HYDROSOLS. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, 1950 1950. ISSN 0002-7863.

LEE, J. et al. CELL BEHAVIOR ON POLYMER SURFACES WITH DIFFERENT FUNCTIONAL-GROUPS. **Biomaterials**, v. 15, n. 9, p. 705-711, JUL 1994 1994. ISSN 0142-9612.

LEE, P.; MEISEL, D. ADSORPTION AND SURFACE-ENHANCED RAMAN OF DYES ON SILVER AND GOLD SOLS. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982 1982. ISSN 0022-3654.

LI, J. et al. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 781-790, FEB 2007 2007. ISSN 0142-9612.

LI, Y. et al. Cu nanoparticles of low polydispersity synthesized by a double-template method and their stability. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 3, p. 715-722, MAR 2014 2014. ISSN 0303-402X.

LONNQVIST, S. et al. Biodegradable Gelatin Microcarriers Facilitate Re-Epithelialization of Human Cutaneous Wounds - An In Vitro Study in Human Skin. **Plos One**, v. 10, n. 6, JUN 10 2015 2015. ISSN 1932-6203.

MACHTEI, E. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: A meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 4, p. 512-516, APR 2001 2001. ISSN 0022-3492.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Zetasizer Nano Series – User Manual. 1.1. ed. Worcestershire, 2013.

MOHAMMADI, R. et al. Physico-mechanical and structural properties of eggshell membrane gelatin- chitosan blend edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 406-412, FEB 2018 2018. ISSN 0141-8130.

MORONES, J. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, OCT 2005 2005. ISSN 0957-4484.

MOSCATO, S. et al. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 569-579, JUL 2008 2008. ISSN 0968-4328.

NAGARAJAN, M. et al. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 389-397, DEC 2012 2012. ISSN 0268-005X.

NEUMANN, P.; ZUR, B.; EHRENREICH, Y. GELATIN-BASED SPRAYABLE FOAM AS A SKIN SUBSTITUTE. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 15, n. 1, p. 9-18, 1981 1981. ISSN 0021-9304.

NOSAL, W. et al. UV-vis-infrared optical and AFM study of spin-cast chitosan films. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 43, n. 3-4, p. 131-137, JUL 10 2005 2005. ISSN 0927-7765.

ORYAN, A. et al. Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 27, n. 10, OCT 2016 2016. ISSN 0957-4530.

OVINGTON, L. Advances in wound dressings. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 33-38, JAN-FEB 2007 2007. ISSN 0738-081X.

OZDIL, D.; AYDIN, H. Polymers for medical and tissue engineering applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 12, p. 1793-1810, DEC 2014 2014. ISSN 0268-2575.

PANDEY, S.; GOSWAMI, G.; NANDA, K. Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 583-589, NOV 2012 2012. ISSN 0141-8130.

PANKEY, G.; SABATH, L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, MAR 15 2004 2004. ISSN 1058-4838.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Química Nova**, v. 38, p. 957-971, 2015. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000700957&nrm=iso >.

PRASERTSUNG, I. et al. The effects of pulsed inductively coupled plasma (PICP) on physical properties and biocompatibility of crosslinked gelatin films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 72-78, JAN 1 2010 2010. ISSN 0141-8130.

PRAXEDES, A. et al. Non-monotonic wetting behavior of chitosan films induced by silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 25-31, MAY 1 2016 2016. ISSN 0169-4332.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83, JAN-FEB 2009 2009. ISSN 0734-9750.

RAKHMATIA, Y. et al. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 57, n. 1, p. 3-14, JAN 2013 2013. ISSN 1883-1958.

RANA, V. et al. Tensile properties, cell adhesion, and drug release behavior of chitosan-silver-gelatin nanohybrid films and scaffolds. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 9, p. 845-852, SEP 2010 2010. ISSN 1598-5032.

RATANAVARAPORN, J. et al. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type

A and B gelatin fiber mats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 431-438, NOV 1 2010 2010. ISSN 0141-8130.

RIZZELLO, L.; POMPA, P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 5, p. 1501-1518, 2014 2014. ISSN 0306-0012.

ROBERTS, J. et al. The Use of UV-Vis Spectroscopy in Bioprocess and Fermentation Monitoring. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 18, 2018. ISSN 2311-5637. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2311-5637/4/1/18> >.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500021&nrm=iso >.

ROMERO, I. et al. Antibacterial properties of cyanoacrylate tissue adhesive: Does the polymerization reaction play a role. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 57, n. 5, p. 341-344, SEP-OCT 2009 2009. ISSN 0301-4738.

SALAMANCA, E. et al. In Vitro and In Vivo Study of a Novel Porcine Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration. **Materials**, v. 9, n. 11, NOV 2016 2016. ISSN 1996-1944.

SALVIONI, L. et al. Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2517-2530, 2017 2017. ISSN 1178-2013.

SHARIATINIA, Z.; FAZLI, M. Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 112-124, APR 2015 2015. ISSN 0268-005X.

SHARMA, V.; YNGARD, R.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, JAN 30 2009 2009. ISSN 0001-8686.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, n. 4, p. 535-542, JUN 1997 1997. ISSN 0282-0080.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, p. 63-68, 1998. ISSN 0104-1428. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14281998000400009&nrm=iso >.

SILEIKAITE, A. et al. Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. **Materials Science-Medziagotyra**, v. 15, n. 1, p. 21-27, 2009 2009. ISSN 1392-1320.

SIVARAMAN, S. et al. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. **Current Science**, v. 97, n. 7, p. 1055-1059, OCT 10 2009 2009. ISSN 0011-3891.

SOCRATES, R. et al. Novel fibrillar collagen-hydroxyapatite matrices loaded with silver nanoparticles for

orthopedic application. **Materials Letters**, v. 161, p. 759-762, DEC 15 2015 2015. ISSN 0167-577X.

SRIVASTAVA, S. et al. Development of a Novel Polygalacturonic Acid-Gelatin Blend Scaffold Fabrication and Biocompatibility Studies for Tissue-Engineering Applications. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 61, n. 9, p. 679-698, 2012 2012. ISSN 0091-4037.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1285-1309, APR 2013 2013. ISSN 1996-1944.

TANG, D. et al. Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and an edible polypeptide. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 33-41, JAN 2013 2013. ISSN 0268-005X.

THURMAN, R.; GERBA, C. THE MOLECULAR MECHANISMS OF COPPER AND SILVER ION DISINFECTION OF BACTERIA AND VIRUSES. **Crc Critical Reviews in Environmental Control**, v. 18, n. 4, p. 295-315, 1988 1988. ISSN 0007-8999.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.; HILLIER, J. A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES IN THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD. **Discussions of the Faraday Society**, n. 11, p. 55-&, 1951 1951.

UMADEVI, M. et al. **Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Prepared Under an Ultrasonic Field**. 2011.

VIMALA, K. et al. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 248-258, MAR 1 2010 2010. ISSN 0927-7765.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-781, AUG 17 2000 2000. ISSN 0028-0836.

WAN, D.; NACAMULI, R.; LONGAKER, M. Re: Cho BC, Kim TG, Yang JD, Chung HY, Park JW, Kwon IC, Roh KH, Chung HS, Lee DS, Park NU, Kim IS. Effect of calchon sulfate-chitosan coinposite pellet on bone forination in bone defect. *J Craniofac Surg* 2005;16 : 213-224. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 2, p. 225-227, MAR 2005 2005. ISSN 1049-2275.

WEIL, T.; BARZ, M. From Polymers to Functional Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 10, OCT 2017 2017. ISSN 1616-5187.

XIU, Z. et al. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, n. 8, p. 4271-4275, AUG 2012 2012. ISSN 1530-6984.

YIN, Y. et al. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. **Polymer International**, v. 48, n. 6, p. 429-432, JUN 1999 1999. ISSN 0959-8103.

ZHANG, Z. et al. Recent advances in synthetic methods and applications of silver nanostructures. **Nanoscale**