Lorena Oliveira de Sousa

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE GELATINA E
MEMBRANA DE GELATINA COM PRATA PARA USO EM REGENERAÇÃO
TECIDUAL GUIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia-Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Dr^a Eliana Cristina da Silva Rigo

São Carlos
2013

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

Oliveira de Sousa, Lorena
Obtenção e Caracterização de membrana e membrana de
087250 gelatina com prata para regeneração tecidual guiada /
Lorena Oliveira de Sousa; orientador Eliana Cristina
da Silva Rigo. São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2013.

1. Membrana. 2. Gelatina. 3. Regeneração Tecidual.
4. Prata. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

LORENA OLIVEIRA DE SOUSA

TÍTULO: "OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE GELATINA E MEMBRANA DE GELATINA COM PRATA PARA USO EM REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

APROVADA EM: 26/08/2013

PROF^a. DR^a. ELIANA CRISTINA DA SILVA
RIGO
(ORIENTADORA)

FACULDADE DE ZOOTECNIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - USP

RESULTADO: aprovada

ASSINATURA: EC Rigo

DR^a. LUCI CRISTINA DE OLIVEIRA VERCIK

FACULDADE DE ZOOTECNIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - USP

RESULTADO: Aprovada

ASSINATURA: Luci Vercik

PROF^a. DR^a. ANA MARIA MINARELLI
GASPAR

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

RESULTADO: APROVADA

ASSINATURA: Amg

Aos meus grandes amores: Mãe - Lucia Helena, irmãs - Lázara Aline e Loane e aos meus
sobrinhos, Lázaro Felipe e Lázara Letícia.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e irmãs, que me deram o primeiro e último empurrão para que finalmente eu corresse atrás de meus sonhos, me ouvem, brigam, dão risadas e nunca me deixaram desistir. A minha sobrinha Lazara Letícia por sempre me devolver o gosto do doce quando o caminho estava amargo. Aos meus avós que mesmo sem entenderem muito bem porque serviria ir morar longe pra estudar, sabiam que se este era o objetivo eu tinha que ir atrás.

A professora Eliana (Lica), que acreditou, me disse sim, apostou, ouviu desabafos, me acolheu, aturou desesperos e o melhor de tudo, que é o que vou levar por toda minha vida: me ensinou que Engenharia de Materiais é difícil para quem é Biólogo, porém, apaixonante.

Aos velhos amigos que mesmo a quilômetros de distância sempre estiveram do meu lado dando força: Keyla, Lizyane, Pedro e Bianca. Aos novos que me ajudaram de uma forma ou outra: Uziel, Rafaela, Lucas, Maura, Lívia, Rita, Washington, Fabi, e especialmente ao Jonas que me suportou por dias, dias e mais dias em toda sua paciência. Aos amigos que fiz em Pirassununga, especialmente: German, Leticia e Kamila, quanta coisa me ajudaram que não daria para citar aqui.

Ao apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa cedida.

Aos professores e alunos do Laboratório de Nanotecnologia, Biossensores e Dispositivos – NANOBIDIV- Principalmente ao professor Andrés pela confiança e por ceder o espaço do laboratório, imprescindível para a realização do trabalho. Especialmente a técnica Luci, pelo apoio profissional, pessoal e mais ainda pelas conversas e risadas gostosas tomando café (sentirei falta).

Ao laboratório de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara (SP), em especial à Profa. Dra. Carla Fontana e à Dra. Elaine Miranda que ofereceram tempo e disposição para ajudarem a fazer os ensaios bactericidas. Ao Instituto de Física de São Carlos - Escola de Engenharia de São Carlos, especialmente professora Débora, aos técnicos Bruno, Augusto e ao Grupo de Polímeros.

Blowin' In The Wind

Bob Dylan

How many roads must a man walk down
Before you can call him a man?
How many seas must a white dove sail
Before she can sleep in the sand?
Yes and how many times must cannonballs fly
Before they're forever banned?

The answer, my friend, is blowin' in the wind
The answer is blowin' in the wind

Yes and how many years can a mountain exist
Before it's washed to the sea (sea)
Yes and how many years can some people exist
Before they're allowed to be free?
Yes and how many times can a man turn his head
Pretend that he just doesn't see?

The answer, my friend, is blowin' in the wind
The answer is blowin' in the wind

Yeah and how many times must a man look up
Before he can see the sky?
Yes and how many ears must one man have
Before he can hear people cry?
Yes and how many deaths will it take till he knows
That too many people have died

The answer, my friend, is blowin' in the wind
The answer is blowin' in the wind?

RESUMO

SOUSA, L. O. **Obtenção e caracterização de membrana de gelatina e membrana de gelatina com prata para regeneração tecidual guiada 2013**. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O estudo de biomateriais aplicados à cicatrização levou à modalidade do tratamento chamada de regeneração tecidual guiada (RTG). A RTG reconstitui novos tecidos usando membranas como barreira de proteção da área defeituosa, impedindo a invasão de outros tecidos, especialmente dos tecidos conjuntivos fibrosos. Em outras palavras, a RTG é uma forma de isolar o tecido ósseo do tecido mole, resultando dessa forma em uma ótima condição para a formação óssea. Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de polímeros são usados em aplicações biomédicas, e entre eles está o colágeno, polímero ao qual, pela sua hidrólise parcial pode-se obter a gelatina. A gelatina é um polipeptídeo biodegradável, biocompatível, que apresenta anti-genicidade, plasticidade e elasticidade. A prata tem seu efeito antimicrobiano bem conhecido, com utilidade em diferentes campos da medicina, odontologia e biomateriais. Nesse contexto, este trabalho desenvolve e estuda o comportamento das membranas de gelatina e membranas de gelatina com prata para aplicações em RTG. As Membranas de gelatina foram obtidas com concentração de 4% em massa e as membranas de gelatina com prata foram obtidas nas concentrações de 0,01%, 0,05% e 0,1% da solução. Na etapa de reticulação, as membranas secas foram imersas em solução tampão de fosfato de sódio com concentrações de glutaraldeído (GTA) a 0,5%, 1% e 2%, 24 horas. O ensaio de intumescimento foi realizado em membranas reticuladas e não reticuladas, pesadas e imersas em solução tampão de fosfato pH 7,4 por períodos de 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 22 horas e 24 horas e durante 8 semanas. Obteve-se membranas de gelatina com prata mediante a metodologia de adição da solução de Ag comprovada pelas técnicas de DRX, FTIR, MEV e pelo teste de halo de inibição. As membranas reticuladas apresentaram menor valor de porcentagem de intumescimento quanto maior foi a concentração do agente reticulante, com exceção das amostras com concentração de 0,1M de prata. Além da atuação do GTA a prata também interfere no processo de intumescimento, aspecto e comportamento das membranas de gelatina. O efeito bactericida foi avaliado utilizando ensaio de cultura de bactérias - Teste de halo de inibição, onde as membranas de gelatina com Ag apresentaram efeito bacteriostático contra bactéria Gram positiva e Gram negativa.

Palavras – chaves: Membranas. Gelatina. Regeneração tecidual. Prata.

ABSTRACT

SOUSA, L.O. Preparation and characterization of membrane and membrane gelatin gelatin silver for guided tissue regeneration 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The study of biomaterials applied to healing led to the treatment modality called guided tissue regeneration (GTR). The RTG reconstruct new tissue using the membranes as a barrier to protect the defective area, preventing the invasion of other tissues, especially connective tissue fibers. In other words, the RTG is a way of isolating the bone tissue of the soft tissue, thereby resulting in an excellent condition for bone formation. Currently, more than 20 different types of polymers are used in biomedical applications, and among them is the collagen polymer to which, by its partial hydrolysis can get the gelatin. Gelatin is a polypeptide biodegradable, which has antigenicity, plasticity and elasticity. Silver has antimicrobial effect well known, are useful in different fields of medicine, dentistry and biomaterials. In this context, this paper develops and studies the behavior of membranes of gelatin and gelatin silver membranes for applications in RTG. Membranes were obtained with gelatin concentration of 4% by weight and gelatin silver membranes were obtained at concentrations of 0.01%, 0.05% and 0.1% of the solution. In the crosslinking step, the dried membranes were immersed in sodium phosphate buffer to concentrations of glutaraldehyde (GTA) at 0.5%, 1% and 2% 24 hours. The swelling test was performed on crosslinked and uncrosslinked membranes, weighed and immersed in phosphate buffer pH 7.4 for a period of 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 3 hours 22 hours and 24 hours, and for 8 weeks. Obtained gelatin membranes with silver by the method of adding the solution of Ag proven by XRD techniques, FTIR, SEM and the zone of inhibition test. The crosslinked membranes had lower percentage of swelling the higher the concentration of crosslinking agent, except for the samples with a concentration of 0.1 M silver. In addition to operating the GTA silver also interferes with the process of swelling, appearance and behavior of gelatin membranes. The bactericidal effect was evaluated by bacterial culture test - Test of inhibition zone, where the gelatin membrane with Ag Ag exhibited bacteriostatic effect exhibited against Gram positive and Gram negative.

Key - words: Membranes. Gelatin. Tissue regeneration. Silver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uso de uma membrana de etileno para RTG (Adaptada de CRIADO MONTTOYA, et al 2000).....	26
Figura 2: Estrutura polipeptídica do colágeno. (Adaptada de http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/colageno/colageno4.php).....	29
Figura 3: Estrutura química de uma proteína. (Adaptada de http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_micror/proteinas.htm).....	30
Figura 4: Representação esquemática de ligações cruzadas.....	34
Figura 5: Mecanismo de reação entre grupos amino de lisina e grupos carboxilas de GTA, formando bases de Schiff. Adaptada (FARRIS et al, 2009).....	35
Figura 6: Estrutura Nitrato de prata.....	36
Figura 7: Fluxograma da metodologia para obtenção da membrana de gelatina sem e com Ag.....	39
Figura 8: Fluxograma com a metodologia do Teste de halo de inibição.....	43
Figura 9: Membranas de gelatina e membranas de gelatina com adição de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M secas, após reticulação com glutaraldeído nas concentrações de: 0,5%, 1% e 2%.....	45
Figura 10: Ensaio de Intumescimento das membranas de gelatinas reticuladas por imersão em GTA por 24 horas, nas concentrações de: 0,5% (v/v), 1% (v/v) e 2% (v/v).	47
Figura 11: Ensaio de Intumescimento das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 0,5% (v/v) GTA.....	49
Figura 12: Ensaio de Intumescimento semanais das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 0,5% (v/v) GTA, em um intervalo de tempo de 24 horas.....	50
Figura 13: Ensaio de Intumescimento das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 1% GTA, em um intervalo de tempo de 24 horas.....	51

Figura 14: Ensaio de Intumescimento semanais das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 1% (v/v) GTA.....	52
Figura 15: Ensaio de Intumescimento das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 2% (v/v) GTA, em um intervalo de tempo de 24 horas.....	53
Figura 16: Ensaio de Intumescimento semanais das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 2% (v/v) GTA.....	54
Figura 17: Resultados do ensaio de difração de raios X (DRX): membrana de gelatina pura (G4); membranas de gelatina reticuladas com 0,5% (v/v), de GTA (G4 0,5% GTA); reticuladas com 1% (v/v) de GTA (G4 1% (v/v) GTA) e reticuladas com 2% (v/v) de GTA (G4 2% (v/v) GTA).....	55
Figura 18: Difractometria em membranas de gelatina reticuladas com 0,5% (v/v) de GTA com prata em concentrações de 0,01M Ag (G4 0,01M Ag 0,5% GTA), 0,05M Ag (G4 0,05M Ag 0,5 % GTA) e 0,1M Ag (G4 0,1M Ag 0,5% (v/v) GTA).....	56
Figura 19: Difractometria em membranas de gelatina reticuladas com 1% (v/v), de GTA com prata em concentrações de 0,01M Ag (G4 0,01M 1% (v/v) GTA), 0,05M Ag (G4 0,05M Ag 1 % (v/v) GTA) e 0,1% Ag (G4 0,1M Ag 1% (v/v) GTA).....	58
Figura 20: Difractometria em membranas de gelatina de gelatina reticuladas com 2%, de GTA com prata em concentrações de 0,01% Ag (G4 0,01M Ag 2% GTA), 0,05% Ag (G4 0,05M Ag 2 % GTA) e 0,1% Ag (G4 0,1M Ag 2% GTA).....	59
Figura 21: Espectroscopia por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 0,5%, de GTA (G4 0,5% GTA), 1% de GTA (G4 1% GTA) e 2% de GTA (G4 2% GTA).....	60
Figura 22: Espectroscopia por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 0,5% (v/v) de GTA com prata em concentrações de 0,01M Ag (G4 0,01M Ag 0,5% (v/v) GTA), 0,05M Ag (G4 0,05M Ag 0,5% (v/v) GTA) e 0,1M Ag (G4 0,1M Ag 0,5% (v/v) GTA).....	62
Figura 23: Espectroscopia por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 1% (v/v) de GTA com prata em concentrações de 0,01M Ag (G4 0,01M Ag 1M GTA), 0,05M Ag (G4 0,05M Ag 1% (v/v) GTA) e 0,1% Ag (G4 0,1M Ag 1% (v/v) GTA).....	64
Figura 24: Espectroscopia por ATR em membrana em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 2% (v/v) de GTA com prata em concentrações de 0,01% Ag (G4 0,01M Ag 2% (v/v) GTA), 0,05% Ag (G4 0,05M Ag 2% (v/v) GTA) e 0,1M Ag (G4 0,1M Ag 2% (v/v) GTA).....	66
Figura 25: Micrografia da membrana de gelatina: pura (a) e (b) membrana membrana de gelatina reticulada G4 2% (v/v) GTA.....	68

Figura 26: Micrografia das membranas de gelatina com adição de prata reticuladas: G4 0,05M Ag 2 % (v/v) GTA (a) (c) e G4 0,1M Ag 2% (v/v) GTA (b) (d).....	69
Figura 27: Micrografia das membranas de gelatina com adição de prata reticulada: G4 0,1M Ag 2% (v/v) GTA	70
Figura 28: Espectroscopia por dispersão da membrana de gelatina G4 0,05M Ag 2% (v/v) GTA.....	70
Figura 29: Espectroscopia por dispersão da membrana de gelatina reticulada a 2% (v/v) GTA e 0,1M Ag.....	71
Figura 30: Ensaio bactericida com a bactéria gram negativa <i>Escherichia coli</i> , (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 0,5% (G4 0,5% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01% Ag reticulada com GTA 0,5% (G4 0,01% Ag 0,5% GTA) , (d) gelatina com adição 0,05% Ag e reticulada com GTA 0,5% (G4 0,05% Ag 0,5% GTA, gelatina com adição 0,1% Ag reticulada com GTA 0,5% (G4 0,1% Ag 0,5% GTA).....	73
Figura 31: Ensaio bactericida com a bactéria gram negativa <i>Escherichia coli</i> , (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 1% (v/v) (G4 0,5% (v/v) GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag reticulada com GTA 1% (v/v) (G4 0,01M Ag 1% (v/v) GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag reticulada com 1% (v/v) GTA (G4 0,05M Ag 1% (v/v) GTA, gelatina com adição 0,1M Ag reticulada com GTA 1% (v/v) (G4 0,1M Ag 1% (v/v) GTA).....	74
Figura 32: Ensaio bactericida com a bactéria gram negativa <i>Escherichia coli</i> , (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 2% (v/v) (G4 0,5% (v/v) GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag reticulada com GTA 2% (G4 0,01% Ag 2% GTA) , (d) gelatina.....	74
Figura 33: Ensaio bactericida com a bactéria gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i> , (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 0,5% (v/v) (G4 0,5% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag reticulada com GTA 0,5% (v/v) (G4 0,01M Ag 0,5% (v/v) GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag reticulada com GTA 0,5% (v/v) (G4 0,05M Ag 0,5% (v/v) GTA, gelatina com adição 0,1M Ag reticulada com GTA 0,5% (v/v) (G4 0,1M Ag 0,5% (v/v) GTA).....	75
Figura 34: Ensaio bactericida com a bactéria gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i> . (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 1% (v/v) (G4 0,5% (v/v) GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag reticulada com GTA 1% (v/v) (G4 0,01M Ag 1% (v/v) GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag reticulada com 1% (v/v) GTA (G4 0,05M Ag 1% (v/v) GTA), gelatina com adição 0,1M Ag reticulada com GTA 1% (v/v) (G4 0,1M Ag 1% (v/v) GTA).....	76
Figura 35: Ensaio bactericida com a bactéria gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i> , (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 2% (v/v) (G4 0,5% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag reticulada com GTA 2% (v/v) (G4 0,01M Ag 2% (v/v)GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag reticulada com 2% (v/v) GTA (G4 0,05M Ag 2% (v/v) GTA, gelatina com adição 0,1M Ag reticulada com GTA 2% (v/v) (G4 0,1M Ag 2% (v/v) GTA).....	77

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Composição de aminoácidos da gelatina (S-J. Lee et al, 2012).....	25
--	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AgNO ₃	Nitrato de prata
ATR	Espectroscopia no infravermelho com Reflectância Total Atenuada – (<i>Attenuated Total Reflectance – ATR</i>)
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia
G4	Gelatina pura
GTA	Glutaraldeído
IV	Espectroscopia no infravermelho
DRX	Difração de raios X
RTG	Regeneração tecidual guiada
ROG	Regeneração óssea guiada

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.OBJETIVO	18
2.1. Objetivos Específicos	18
3.REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. Regeneração Tecidual Guiada	19
3.2. Gelatina	22
3.3. Glutaraldeído	27
3.4. Agente Antimicrobiano	30
4.PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1 Materiais	31
4.2. Métodos	31
4.3.Caracterização físico-química	33
4.3.1. Ensaio de Intumescimento	33
4.3.2. Difração de Raios X	34
4.3.3. Espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada (ATR)	34
4.3.4.Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
4.4. Caracterização in vitro	35
4.4.1. Ensaio de cultura de bactérias – Teste de halo de inibição	35
4.4.2.Inoculação, aplicação dos discos e leitura das placas	36
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1 Ensaio de Intumescimento	39
5.2 Difração de Raios - X	48
5.2 Espectroscopia no Infra Vermelho com Reflexão Atenuada (ATR)	54
5.3Teste de Halo de Inibição	65
6. CONCLUSÕES	73
7.REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 80, a pesquisa em biomateriais vêm ampliando o leque no tratamento em lesão periodontal. O estudo destes materiais aplicado à cicatrização levou à modalidade de tratamento chamado de regeneração tecidual guiada (RTG).

A RTG é um dos tratamentos que reconstitui novos tecidos usando uma membrana como barreira de proteção da área lesada impedindo a invasão de outros tecidos, especialmente dos tecidos conjuntivos fibrosos. Este tratamento seletivo determina que tipo de células preenche o espaço, induzindo a formação de osso novo no corpo alveolar, cemento novo e novas fibras de inserção à custa de células-tronco existentes no ligamento periodontal (BERNALES et al., 2004).

Desde os anos 50 e 60 já surgiam na literatura científica alguns trabalhos questionando a capacidade de regeneração do tecido ósseo. Segundo os mesmos, o osso pode ser regenerado de modo mais previsível quando isolado do tecido conjuntivo adjacente. A migração destes tecidos moles pode atrapalhar ou impedir totalmente a osteogênese no defeito ou na área cirúrgica. Um dos fatores prejudiciais ao desenvolvimento ósseo, relacionado a essa migração, é a produção pelos fibroblastos de fatores solúveis inibitórios da diferenciação celular óssea e da osteogênese. O princípio de selar fisicamente um sítio anatômico para melhorar a cicatrização de certo tipo de tecido e direcionar a regeneração tecidual tem sido realizado através da utilização de uma barreira mecânica, sendo assim, é necessário que ocorra a regeneração óssea guiada (ROG) que tem como principal meta, a utilização de um meio físico temporário que promova uma adequação no ambiente, necessário para que o organismo possa utilizar o seu potencial de regeneração natural e recuperar os tecidos perdidos e lesados VILELA, E.M.; WERNTHALER, A.T. (2002). Em outras palavras é uma forma de isolar o tecido ósseo, do tecido mole, resultando dessa forma em uma ótima condição para a formação óssea.

A maioria das membranas não são reabsorvíveis, requerendo uma segunda intervenção cirúrgica para sua retirada, a qual aumenta o risco de infecção do paciente e de outros efeitos não desejáveis, não podendo ser usadas em reconstrução de grandes defeitos ósseos devido, sua propriedade bioinerte. De acordo com os autores VILELA, E.M.; WERNTHALER, A.T. (2002), a permanência da membrana por um longo período de tempo, ou melhor, com taxa de dissolução lenta e controlada é necessária para a

completa população de células osteogênicas no defeito, sendo assim, eles concluem que para conseguir a formação e amadurecimento do novo osso, a utilização de membranas reabsorvíveis em associação com materiais osteocondutores é promissora, pois a integridade destas membranas não seria perdida em curto prazo.

Atualmente os polímeros sintéticos reabsorvíveis utilizados como membranas para barreiras mecânicas oferecem controle das propriedades tais como estrutura física e química, cristalinidade, condições hidrofílicas e hidrofóbicas e propriedades mecânicas adequadas (TANGERINO M. B., 2006). Alguns autores (JIANGI, H. et al. 2002) concordam que estes materiais apresentam praticamente a mesma eficiência que as membranas não-reabsorvíveis. As desvantagens mais preocupantes de se utilizar membranas reabsorvíveis são: sua degradação, a qual não deve interferir na regeneração óssea e a sua dissolução, a qual deve ocorrer em um tempo compatível com o processo de regeneração; entretanto, a taxa de dissolução deve ser previsível.

A gelatina, que é obtida da desnaturação parcial do colágeno, é uma proteína solúvel e suas propriedades atrativas, tais como, excelente biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, plasticidade, boa aderência e excelente crescimento celular, faz desta um primoroso biomaterial para a engenharia de tecido (CHEN, P.R. et al. 2005). (AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A. 1997) consideram que a gelatina é usada atualmente em produtos farmacêuticos, devido a sua excelente viabilidade celular e falta de antigenicidade. Além disso, devemos considerar que sua disponibilidade pelo fato de ser fabricada no Brasil e baixo custo, facilitam a seletividade e produção em grande escala (D'AVILA, V. D. L. 2010).

A prevenção eficaz das infecções associadas ao implante para evitar revisões cirúrgicas que são caras e a longa permanência em hospital que contribuem para aumentar a morbidade do paciente é de extrema importância. Uma estratégia comum e aceita para tratar e prevenir infecções associadas a implantes ortopédicos é entregar antibióticos de forma controlada no local de implantação para administrar altas doses no local, sem, contudo exceder a toxicidade sistêmica desses fármacos.

Dessa forma, a capacidade de determinadas cepas de bactérias desenvolverem resistência a antibióticos tem despertado um interesse crescente para o fornecimento controlado de outros agentes antimicrobianos com ampla atividade e baixa incidência de resistência, tais como prata, zinco, sendo uma estratégia alternativa para evitar a formação de filmes adesivos bacterianos (ZHAO G, STEVENS SE JR. 1998).

Apesar da toxicidade da prata e seus potenciais efeitos à saúde como: ter efeito destrutivo dos tecidos da mucosa e trato respiratório superior, causar sintomas de tosse, queimaduras, laringite, dor de cabeça e vômitos. Os autores (SHAHID, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y.J. 1999) afirmam que as propriedades antibacterianas da prata em baixas concentrações em uma variedade de patógenos, incluindo a estirpes bacterianas comuns envolvidas em infecções associadas aos implantes, são bastante conhecidas e citada pela literatura como a ausência de toxicidade para as células de mamíferos.

A maioria dos biomateriais com função bactericida são constituídos de sais de prata ou complexos de prata incorporada em polímeros, biovidros e hidroxiapatita. Seu efeito antimicrobiano é bem conhecido e tem sido utilizado em diferentes campos da medicina, odontologia. Embora a atividade antimicrobiana *in vitro* de polímeros (poliamida, poliuretano e polimetilmetacrilato) e biovidros contendo prata sejam extensivamente estudadas (KUMAR, M.N.V.R. 2000), a ação antimicrobiana da gelatina com prata tem sido relatada em menor extensão (LIU et al. 2010) .

Dessa forma, o presente trabalho se insere no conjunto de estudos voltados para a produção de uma membrana que possa ser utilizada na RTG com princípios bactericidas.

2. OBJETIVO

Desenvolver, caracterizar e estudar o comportamento de membranas de gelatina e membranas de gelatina com prata para aplicações em RTG.

2.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver membranas de gelatina,
- Avaliar o comportamento dessas membranas,
- Caracterizar as membranas, com e sem a prata,
- Analisar o efeito antimicrobiano da membrana de gelatina com prata.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Regeneração Tecidual Guiada

Durante séculos, a única forma de tratar grandes lesões teciduais originadas normalmente de traumas mecânicos ou de doenças degenerativas, eram realizadas de forma que toda a porção danificada era retirada. Situações como essas ocorriam devido aos poucos recursos terapêuticos disponíveis, o que na maioria das vezes limitava a qualidade de vida do indivíduo (SIMAS, M.P.; SANTOS JR.; 2010). Com o conhecimento dessas complicações, novas metodologias foram pesquisadas para aprimoramento do tratamento de lesões teciduais, entre elas, a Regeneração Tecidual Guiada (RTG).

Para que ocorra regeneração tecidual e a regeneração óssea, são necessárias condições ideais, como:

- o fechamento primário da ferida, fornecimento de sangue necessário;
- células mesenquimais indiferenciadas;
- criação de espaço para facilitar a manutenção do osso em crescimento e estabilidade da ferida para induzir a formação de coágulos de sangue.

Dessa forma é possível a cicatrização sem complicações, proporcionando um meio adequado considerável para o tratamento.

A RTG e a Regeneração Óssea Guiada (ROG), podem ser consideradas como procedimentos cirúrgicos semelhantes, os quais são necessários empregar membranas como barreira oclusiva, com o objetivo de direcionar o crescimento do tecido gengival e células do novo osso no local desejado. Assim é possível que ocorra a restauração no local onde há uma má formação do dente ou a necessidade de uma prótese.

Figura 1 - Uso de uma membrana de etileno para RTG
Fonte: CRIADO MONTOYA et al. (2000)

O primeiro estudo sobre a utilização de membranas como barreiras para regeneração, foi realizado na década de 50 por HURLEY et al (1959) , em uma pesquisa ortopédica sobre o papel dos tecidos moles em regeneração óssea, onde os autores concluíram que era necessário separar tecidos das áreas de formação ativa, da área de formação do osso. Na mesma década, CAMPBELL & BASSETT (1956) realizaram uma pesquisa com filtros de acetato de celulose microporosos para a regeneração de tendões e nervos em que foi observado vantagens em se utilizar a RTG.

Para estudos mais específicos sobre RTG, MELCHER (1976) confirma a necessidade de excluir tecidos indesejáveis dos locais de restauração para permitir o crescimento de novos tecidos que não prejudiquem a regeneração óssea.

Na década de 80 DAHLIN et al. (1988) realizaram uma experiência com ratos criando um defeito transósseo nos ângulos da mandíbula bilateralmente, onde em um dos lados da mandíbula, o defeito foi coberto com uma membrana de teflon. Exames histológicos, realizados após o período de três semanas, mostraram que houve

regeneração no local coberto pela membrana e em seis semanas, 100% destas amostras tinham sofrido uma regeneração óssea completa.

Em uma pesquisa realizada por MELCHER em 1976, observou-se que além dos tecidos do osso alveolar, há outros que induzem a formação de nova inserção, como cemento alveolar e tecidos do ligamento periodontal, além disso, concluíram que se os tecido gengivais conjuntivo e epitelial fossem excluídos da ferida periodontal por uma barreira física colocada entre a raiz e o retalho, a cicatrização poderia ocorrer.

A partir destes estudos foi então desenvolvida a técnica de RTG, que pode ser considerada de uma forma mais simples como um método que promove o reparo da região desejada, de uma forma induzida, através da síntese do tecido original (SIMAS, M.P.; SANTOS JR.; 2010). O termo regeneração é utilizado para definir a restauração completa da morfologia e função dos tecidos originais (MORAES, 2002).

Este tipo de tratamento é realizado por meio de barreiras físicas, ou veículo, podendo ocasionar também a Regeneração Óssea (COTRAN et al, 2002). Essas barreiras têm a função de formar um espaço entre a membrana e a superfície radicular no qual células do ligamento periodontal possam repovoar.

O emprego dessas membranas pode ser feito de materiais reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, para isso devem possuir alguns requisitos indispensáveis para agir, como: biocompatibilidade, propriedades oclusivas, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e ser clinicamente manuseável (SERRA e SILVA et al, 2005).

O politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), foi um dos primeiros polímeros a ser empregado para obtenção de membranas, por apresentar uma alta previsibilidade de regeneração. Porém, com a sua utilização foi observado que tal exposição pode causar contaminação bacteriana, e essa reação inflamatória da área pode levar à necessidade da remoção precoce da membrana (BECKER et al, 1994). Além disso, é um material que não é reabsorvível, o que faz ter a necessidade de uma segunda cirurgia para retirar a membrana expondo novamente o paciente ao desconforto da cirurgia além de ocasionar um novo risco de infecção.

Além das membranas feitas somente de e-PTFE, outras foram obtidas e aprimoradas para o uso odontológico. Exemplo delas são as membranas de e-PTFE reforçadas com malhas de titânio que foram usadas para tratamento de defeitos ósseos associados a implantes. Segundo autores JOVANOVIĆ; NEVINS (1995) esse tipo de

membrana é de fácil manipulação, não apresenta nenhuma reação adversa ao tecido mole ou duro.

Os riscos e os benefícios dessas membranas são bem documentados, tendo como vantagens a biocompatibilidade, previsibilidade, a capacidade de criação de espaço e a experiência de uso clínico de mais de 20 anos. As principais desvantagens são os altos índices de complicação, como deiscência da ferida cirúrgica, acúmulo de placa e infecção, além disso, as membranas de e-PTFE têm um custo relativamente alto, (SERRA e SILVA et al, 2005).

Na procura de uma solução que eliminasse a necessidade de uma segunda cirurgia, a pesquisa com membranas bioreabsorvíveis vem sendo ampliada. Entre elas estão as mais citadas na literatura como as membranas de colágeno, as constituídas de copolímero de polilático e poliglicólico de ácido polilático (SCHMITZ et al, 2000).

Em geral, os materiais poliméricos mais comuns, propostos para uso, como membranas para RTG degradam-se pelo processo de hidrólise, com o produto final sendo substâncias químicas comuns para os processos metabólicos normais. A natureza física e a quantidade dos fragmentos produzidos durante sua degradação podem ter um efeito significativo na resposta tecidual local, podendo conduzir a uma reabsorção óssea (HARDWICK et al, 1996).

ZITZMANN et al. (1997), utilizando membranas de colágeno com enxerto ósseo bovino mineralizado inorgânico, observaram um preenchimento ósseo do defeito de 92%, e quando utilizaram membranas de e-PTFE, o preenchimento ósseo foi reduzido para 78% do defeito.

Em síntese tanto as membranas reabsorvíveis como as não absorvíveis são efetivas no processo de regeneração tecidual guiada, porém as membranas reabsorvíveis se sobressaem na vantagem de não ter a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, o que minimiza possíveis complicações.

3.2. Gelatina

A gelatina é um biopolímero extraído por hidrólise controlada do colágeno, proteína insolúvel encontrada especialmente na pele e cartilagem de bovinos, suínos e peixes, contendo uma série de fragmentos protéicos que quando absorvidas pelo

organismo são parcialmente digeridas fornecendo aminoácidos, fundamentais para a manutenção de ossos e reconstituição ou regeneração de algumas articulações (CHEN et al., 2005).

Figura 2 - Estrutura polipeptídica do colágeno. Adaptada de <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/colageno/colageno-4.php>

A superposição de vários helicóides triplos produz as fibras de colágeno que são estabilizadas por meio de ligações cruzadas e formam uma estrutura de rede tridimensional. Esta estrutura é a responsável pela insolubilidade do colágeno, que através de uma hidrólise parcial bastante forte é transformado em colágeno solúvel, resultando ou em gelatina, ou em colágeno hidrolisado (TAN, S.X et al, 2002).

Existem dois tipos deste biopolímero: tipo A e tipo B, a gelatina classificada como tipo A é derivada de um precursor ácido, enquanto que a gelatina do tipo B o precursor

é alcalino-tratado. Sua molécula estrutural apresenta vários grupos funcionais e vários tipos de aminoácidos que fazem com que suas propriedades químicas sejam adequadamente moduladas (CHOI, et al 1999).

Como todas as proteínas, a gelatina é composta de L-aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Numa proteína os aminoácidos unem-se entre si através de ligações peptídicas que resultam da reação do grupo amina (H_2N) de um aminoácido com o grupo carboxílico (COOH) de outro aminoácido [ARMSTRONG, 1983], [CONN *et al*, 1980],[LEHNINGER, 1986].

Na Figura 3 temos uma ilustração desse processo, onde se vê a cadeia carbônica principal, os radicais H_2N e COOH e os carbonos $\text{C}\alpha$, que são carbonos ligados ao grupamento COOH .

Figura 3 - Estrutura química de uma proteína. Adaptada de http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/proteinas.htm

A gelatina contém quantidades específicas de 18 aminoácidos distintos, entre eles estão praticamente todos os aminoácidos considerados essenciais para o funcionamento do organismo humano, sendo eles: metionina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano, lisina, treonina, histidina e arginina, que se unem em seqüência para formar cadeias polipeptídicas de aproximadamente 1.050 aminoácidos; é o que se chama, em linguagem científica, de estrutura de 27% de glicina, 16% de prolina e 14% de hidroxiprolina; os 43% restantes são compostos por outros 18 aminoácidos (S.-J. LEE et al, 2012).

Tabela 1: Composição de aminoácidos da gelatina

Aminoácidos presentes na gelatina (100 gramas)
Ácido aspartico
Ácido glutâmico
Alanina
<i>Arginina</i>
Cisteína
<i>Fenilalanina</i>
Glicina
Hidroxiprolina
Histidina
<i>Isoleucina</i>
<i>Leucina</i>
<i>Lisina</i>
<i>Metionina</i>
Prolina
Serina
Tirosina
<i>Trionina</i>
<i>Valina</i>

Fonte: Lee et al. (2012)

A pele suína é, normalmente, a matéria-prima da gelatina do tipo B (ácido). Os suínos são abatidos em idade relativamente jovem, se comparados ao gado. Uma vez que a pele de animais mais jovens não possui tantas ligações químicas, não há necessidade de um pré-tratamento alcalino intensivo e longo: um dia de tratamento ácido é suficiente para que o colágeno da pele suína possa ser diluído em água quente, condição determinante para o processo de extração subsequente. Após esse

tratamento, o excesso de ácido é parcialmente neutralizado e os sais são eliminados através das diversas trocas de água.

A gelatina é a única proteína de mamífero que contém grandes quantidades de hidroxiprolina, e o ácido amino total (prolina e hidroxiprolina) em grande concentração. A composição de aminoácidos da gelatina é muito próxima da do colágeno, e é caracterizada por uma sequência de repetição de tripletos de Gly-X-Y, onde X é principalmente prolina e Y é principalmente hidroxiprolina (YAAKOB, C. M., et al 2011).

Gelatinas comestíveis disponíveis comercialmente possuem em sua composição 84 à 90% de proteína, 8 à 12% de água e 2 à 4% de sais minerais.

A gelatina exibe uma excelente versatilidade, devido aos aminoácidos em sua composição; a presença de ambos carregado positivamente (arginina, lisina, histidina) e carregado negativamente (ácido glutâmico e ácido aspártico) permite a formação do complexo com polímeros carregados opostamente a valores de pH específicos (FARRIS et al, 2009). Alguns pesquisadores relataram que tanto a gelatina de pele bovina quanto a de pele suína contém quantidades elevadas de glicina, seguido de prolina e arginina, no entanto, a gelatina à base de pele suína contém maior quantidade de glicina, prolina e arginina em relação à de pele bovina (YAAKOB, C. M., et al 2011).

Além disso, essa proteína é comumente utilizada no campo farmacêutico e biomédico por ser um material de fácil acesso devido ao seu baixo custo, biodegradável, biocompatível, apresentando plasticidade e elasticidade (FARRIS et al, 2009) todas estas características fazem com que este biopolímero seja atraente na concepção e desenvolvimento de novos materiais funcionais.

De acordo com o fabricante da gelatina *Gelita*®, para obter o pó comestível ou farmacêutico, é necessário as seguintes etapas: pré-tratamento, extração, purificação, concentração; secagem, moagem, peneiramento e mistura. Ao final deste processo a gelatina está livre de carboidratos, gorduras, colesterol ou purina e são livres de qualquer tipo de conservantes (GELITA Do Brasil Ltda).

Uma das principais justificativas para a utilização da gelatina como biopolímero é em decorrência de suas propriedades gelificantes próxima da temperatura de 35°C (AGRAWAL; ATHANASIOU, 1997), nessa temperatura a gelatina se encontra completamente dissolvida. Em temperaturas mais elevadas, devido a presença de tripla

hélice, a concentração de colágeno, a presença de outras moléculas, e pH podem variar (ROSS-MURPHY, 1991).

É possível manipular as características do gel, como a capacidade de intumescimento e força, pela quantidade do agente reticulador usado durante a reticulação. A solubilidade dos polímeros em água deve-se à presença de grupos funcionais principalmente OH, COOH, N₂H que reagem no momento da formação do gel. Ligações covalentes entre as cadeias poliméricas podem ser restabelecidas pela reação do grupo funcional com um reativo complementar (ROSS-MURPHY, 1991).

A gelificação da solução de gelatina é inicialmente determinada pela quantidade dos aminoácidos prolina, hidroxiprolina e glicina. A estabilidade de sua estrutura é dependente da ligação de aminoácidos provenientes do colágeno que quando desnaturado, a tríplice-hélice é separada em três moléculas de gelatina. Em solução aquosa e em temperatura elevadas de desnaturação, as moléculas de gelatina estão enroladas, já com o resfriamento a temperaturas mais baixas, aparece uma transição em forma de hélice reversível. Porém há formação de um número relativamente pequeno dessas hélices triplas, o resultado é a formação de uma rede tridimensional com a reticulação helicoidal tripla (NIJENHUIS, 2007).

Devido às suas seqüências de ácidos e numerosos grupos funcionais, a gelatina é bem adequada produzindo hidrogéis químicos na forma de folhas, filmes ou membranas, por reação com pequenas moléculas contendo grupos funcionais, tais como o grupo aldeído (ROSS-MURPHY, 1991).

3.3. Glutaraldeído

Apesar da gelatina ter várias vantagens para ser utilizada como um biomaterial, alguns inconvenientes ainda podem dificultar as suas aplicações. Entre eles, está a deficiência em propriedades mecânicas e sensibilidade à água que são geralmente reconhecidos como sendo os mais limitantes. Embora abordagens diferentes possam ser seguidas para ultrapassar estas dificuldades, o mais utilizado entre os pesquisadores com maior eficiência é a opção por um produto químico de ligações cruzadas que modifique suas propriedades através do seu grupo amino, carboxilo, ou grupos de

hidroxila como uma técnica para melhorar a propriedade térmica, mecânica e a sensibilidade à água (FARRIS, et al 2009).

A gelatina pode ser reticulada com vários agentes químicos como: genipina, gliceraldeído, formaldeído, proantocianidina entre outros. Mais especificamente, o primeiro passo da reticulação envolve a adição nucleofílica dos grupos $\epsilon\text{-N}_2\text{H}$ aos grupos carbonilo do aldeído para formar um instável tetraédrico intermediário chamado carbinolamina (FARRIS, 2009).

Figura 4 - Representação esquemática de ligações cruzadas. Quanto mais ligações cruzadas menos flexível será o polímero (Adaptada de CANDELORIO, PD 2011).

Sendo assim o glutaraldeído (GTA) é amplamente utilizado para reticulação da gelatina, devido ao seu baixo custo e excelente eficiência na estabilização de materiais derivados do colágeno, que permite a gelatina alcançar e ter resistência à água, além do que, este aldeído de acordo com a literatura quando utilizado em baixas concentrações não apresenta citotoxicidade (JAYAKRISHNAN; JAMEELA; 1996).

O GTA foi introduzido inicialmente na área biológica, como agente de fixação de tecidos, para a sua observação através de microscopia eletrônica de transmissão. Por meio de bases de Schiff, o GTA reage com grupos lisina da proteína (Figura 5). Bases de Schiff é um grupo funcional que contém uma ligação dupla carbono-nitrogênio com o átomo de nitrogênio, que por sua vez, está conectado a um grupo arila ou alquila. Resumidamente são substâncias cristalinas ou oleosas que são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (FARRIS, 2009).

Figura 5 - Mecanismo de reação entre grupos amino de lisina e grupos carboxilas de GTA, formando bases de Schiff. Adaptada do artigo Fonte: FARRIS et al., 2009.

Uma das vantagens na utilização do GTA é sua resistência a extremos de pH. Este fator ocorre devido a protonação, do grupo OH seguido por perda molécula da água que produz os conjugados bases de Schiff's (FARRIS, 2009) além da ligação covalente irreversível formada entre o grupo amina da gelatina e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído que é irreversível (BEPPU et al., 1999).

3.4. Agente Antimicrobiano

A prata (Ag) tem atividade antibacteriana conhecida desde a época da Grécia Antiga (PANÁCEK et al., 2006). Há vários anos as propriedades deste metal vêm sendo amplamente pesquisadas e utilizadas na área médica e seu uso se tornou mais evidente desde que houve o aumento de bactérias que adquiriram resistência aos antibióticos (ROCHA, 2011).

Figura 6: Estrutura nitrato de prata

A atividade antibacteriana dos materiais contendo prata pode ser usado na medicina para reduzir infecções em tratamento de queimaduras (ULKUR, E. et al., 2005), bem como para prevenir colonização de bactérias em próteses, cateteres, enxertos vasculares, materiais dentários, materiais de aço inoxidável (PANÁCEK et al., 2006), além disso os materiais com este tipo de agente pode ser utilizado para eliminar microrganismos sobre tecidos têxteis, ou até mesmo para o tratamento de água (YURANOVA et al., 2004).

É necessário enfatizar que o efeito bactericida da Ag são resultantes não só na inibição ao crescimento bacteriano, mas também para matar bactérias. A inibição do crescimento bacteriano é desejável para evitar a colonização bacteriana em dispositivos médicos, (RUPP, M. E, et al, 2005) assim como para evitar crescimento de flora bacteriana em locais do corpo humano em que possam proporcionar infecções .

Atualmente, o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos coloca um problema sério para o tratamento de doenças infecciosas. Para solucionar problemas relacionados a doenças causadas por microrganismos, ainda há a necessidade de novos

bactericidas como alternativas aos antibióticos que podem levar a precauções e tratamento como prevenção do surgimento e propagação de cepas multiresistentes (NEU, H. C. 1992). A escolha e uso inadequado de antibióticos, pode levar ao aumento das taxas de resistência portanto, é necessário que além do uso racional dos antibióticos, tenha opções de agentes que proporcionem resistência aos antimicrobianos com o objetivo de minimizar infecções causadas por microrganismos .

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Parte experimental

4.1 Materiais

Utilizou-se gelatina do tipo B, suína (bloom=260), da Gelita South America (São Paulo, Brasil). Nitrato de prata (AgNO_3), glutaraldeído (GTA) 25% e demais reagentes todos de grau analítico.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção das membranas de gelatina e de gelatina com Ag

Preparou-se soluções de 4% de gelatina a 40°C sob agitação constante, após completa solubilização, as soluções foram vertidas em placas de petri. Para obtenção das membranas de gelatina com prata, após solubilização da solução de gelatina foram adicionadas soluções de Ag nas concentrações de 0,01M, 0,05M e 0,1M. Após 15 minutos de agitação constante, as soluções foram vertidas em placas de petri e secas em estufa de circulação forçada, à 30°C, por aproximadamente 48 horas.

4.2.2. Etapa de reticulação das membranas de gelatina e de gelatina com Ag

As membranas secas, foram imersas em solução tamponada pH7,4 com GTA nas concentrações de 0,5%(v/v); 1%(v/v) e 2%(v/v) por 24 horas. Após o tempo determinado

foram retiradas e lavadas diversas vezes com água destilada, para retirada do excesso de GTA e secas em temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas.

A metodologia está apresentada no fluxograma da Figura 7.

Figura 7: Fluxograma da metodologia para obtenção das membranas de gelatina e membranas de gelatina com Ag.

4.3. Caracterizações físico-químicas

4.3.1. Ensaio de Intumescimento

Realizou-se ensaio de intumescimento, para verificar o grau de inchamento das membranas em meio aquoso, bem como para verificar de maneira indireta a durabilidade dessas membranas. Para o ensaio as membranas secas foram pesadas e submersas em solução tampão fosfato, pH= 7,4 e mantidas em estufa à 37°C. A determinados intervalos de tempo, as amostras eram retiradas das soluções para a pesagem utilizando-se papel filtro para remover o excesso de meio sobre a sua superfície e imediatamente pesadas para determinar o peso da amostra no seu estado intumescido. Os intervalos de tempo adotados foram: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 22 horas e 24 horas.

A cada intervalo em que as membranas foram pesadas, seu peso foi calculado em porcentagem com o objetivo de saber o ganho de massa e durabilidade da amostra.

Para o cálculo da porcentagem de intumescimento foi empregada a seguinte fórmula:

$$\text{Intumescimento}(\%) = \frac{(P_u - P_s)}{P_s} \times 100$$

Onde:

P_u : peso úmido

P_s : peso seco

4.3.2. Difração de raios X

Para análise das fases presentes nas membranas empregou-se a técnica de difração de raios X. O que se observa através desta técnica é que se um feixe de raios X incidir com uma dada frequência sobre um átomo isolado, elétrons desse átomo serão excitados e vibrarão com a frequência do feixe incidente. Em outras palavras, o átomo isolado espalha o feixe incidente de raios X em todas as direções. Quando átomos estão regularmente espaçados em uma rede cristalina e a radiação incidente tem um comprimento de onda da ordem desse espaçamento, ocorrerá interferência construtiva em certas direções e interferência destrutiva em outras (SILVA. R.S., 2006).

As membranas foram caracterizadas por difração de raios X (DRX) (Difratômetro Analytical X-Ray Systems, Siemens D5005, com radiação Cu-K α), o ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização Estrutural - LCE - do Departamento de Engenharia de Materiais - DEMa - da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

4.3.3. Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR)

A espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR) é uma técnica que tem como base a absorção de luz de frequência ressonante com a de vibrações de dipolos moleculares do material, as medidas podem ser realizadas no modo de transmissão e reflexão.

Para todas as membranas foram realizada varreduras com resolução de 4cm⁻¹, Scan 64-128 (Espectrofômetro Thermo Nicolet Nexux 470, ATR Cristal) no Instituto de Física de São Carlos - IFSC - da Universidade de São Paulo - USP.

4.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional. Este microscópio fornece rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em Biologia, Odontologia, Farmácia, Engenharia, Química, Metalurgia, Física, Medicina e Geologia. É considerado um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é

a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (DEDAVID, 2007).

A morfologia superficial e os elementos químicos presentes nas membranas de gelatina e nas membranas de gelatina com Ag foram analisadas com um Microscópio Eletrônico de Varredura, equipamento Hitachi modelo TM 3000 equipado com um espectrômetro por energia dispersiva (EDS) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos - da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA - da Universidade de São Paulo.

4.4. Caracterização *in vitro*

4.4.1. Ensaio de cultura de bactérias – Teste de halo de inibição

O meio de cultivo foi preparado e esterilizado conforme as instruções do fabricante (BioBrás Diagnósticos) e distribuído em placas de Petri. Para a obtenção da bactéria utilizada, 100µL da solução estoque (armazenada em glicerol 10% e mantido sob congelamento) foram incubados em 10mL de caldo de triptona de soja e ficaram sob agitação lenta e constante por 18 horas à 37° C. A cultura foi diluída para 3 x 10⁸ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL) e 100 µL desta suspensão foram inoculados em superfície de agar *Mueller-Hinton* e espalhadas com o auxílio de uma alça de *Drigalsky* até a secagem do mesmo. Sobre o material semeado foram depositados 5 discos com 7 mm de diâmetro de diferentes composições. Também, como parâmetro, foi usado um disco contendo antibiótico Gentamicina 10 µg (CEFAR). As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição com o auxílio de uma régua. Os resultados foram comparados com os halos de inibição formados pelos discos da gentamicina (10 µL). Foi realizado o registro fotográfico dos mesmos.

4.4.2. Inoculação, aplicação dos discos e leitura das placas

Na Figura 8 está representado o fluxograma com a metodologia para o ensaio de halo de inibição que foi adaptado pela norma global consensual M2-A8 do NCCLS (2003).

Após as membranas terem permanecido no período de incubação em placas Petri a 37°C, por 24 horas, foram registradas imagens fotográficas dos halos de inibição.

Figura 8 –Fluxograma com a metodologia do Teste de halo de inibição.

Os ensaios foram realizados no Departamento de Análises Clínicas - na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, campus Araraquara e no Laboratório de Química Biológica- da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA - da Universidade de São Paulo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a etapa de reticulação e secagem as membranas G4 e G4Ag, ficaram com o seguinte aspecto:

Figura 9: Membranas de gelatina e membranas de gelatina com adição de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M secas, após reticulação com glutaraldeído nas concentrações de: 0,5%(v/v); 1%(v/v) e 2%(v/v).

Na Figura 9 observa-se que a concentração de íons Ag atuam na coloração da membrana tornando-as escuras enquanto que a reticulação com GTA intensifica o tom de amarelo dessas membranas, porém com a maior concentração de íons Ag adotada nesse trabalho somada a maior concentração de solução reticulante a membrana além de apresentar uma coloração mais escura também ficou quebradiça.

Segundo os autores, (RATTANARUENGSRUKUL., et al 2009) sem a reticulação um filme de gelatina pode sofrer processo de degradação muito rápido em meio aquoso.

Neste trabalho o agente de reticulação utilizado foi o GTA, devido à sua eficiência como um agente de ligação cruzada que torna a membrana de gelatina mais rígida e dura, além disso, com o aumento da concentração, o grau de intumescimento tende a diminuir, devido à menor disponibilidade dos grupos amina livres (SONGCHITIKUPAN., et al 2008). A maior eficiência do glutaraldeído, provavelmente, está relacionada à sua cadeia mais longa e às formas de reticulação (Marconi., et al 1999).

A mudança de cor das membranas quando reticuladas com GTA é causada pela formação de ligações aldíminas ($-CH=N-$) entre grupos amino livres de lisina e grupos aldeídos do GTA (RATTANARUENGSRUKUL., et al 2009). A cor escurecida das membranas quando contém Ag depende do tipo da proteína utilizada e a da disposição da amostra a luz (FUJITA, T, et al 1983).

5.1 Ensaio de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado com todas as membranas secas, sendo elas: membrana de gelatina pura, membranas de gelatina reticuladas e membranas de gelatina com adição de prata. Nos intervalos de : 0 minutos (quando estavam secas), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 22 horas e 24 horas. Estes intervalos foram adotados pois o processo de intumescimento mais crítico ocorre na 1ª hora de imersão na solução tampão (BIGI et al., 2000).

A Figura 10 apresenta o ensaio de intumescimento das membranas de gelatina e das membranas de gelatina reticuladas com GTA sem a adição da prata.

Figura 10 - Ensaio de Intumescimento das membranas de gelatinas e das membranas de gelatinas reticuladas em GTA nas concentrações de: 0,5%(v/v); 1%(v/v) e 2%(v/v) em um intervalo de tempo de 24 horas..

Observa-se na Figura 10 que, a absorção de água diminui com o aumento da porcentagem de concentração do agente reticulante. Todas as membranas tiveram um aumento na porcentagem de intumescimento, ou seja, ganharam peso a partir do momento em que foram imersas na solução de tampão fosfato.

A membrana de gelatina pura (G4) apresenta uma grande diferença na porcentagem de intumescimento em relação as membranas de gelatina reticuladas (G40,5% (v/v); G41% (v/v) e G42% (v/v)), pode-se observar na Figura 10 que para o primeiro intervalo de 5 minutos em que a membrana foi pesada após a imersão, já foi possível notar o aumento de peso quando comparada com as demais, e ainda continua a absorver mais água potencialmente até o intervalo de 3 horas, a partir desse tempo, a membrana começa a degradar.

Além disso, é possível notar que, a porcentagem de intumescimento das membranas de gelatina reticuladas, têm valores próximos uma da outra, com uma notável diferença para a membrana G4 0,5 % (v/v) GTA, em alguns pontos nítidos como nos intervalos de tempo de 15 minutos, 22 e 24 horas, que apresenta uma porcentagem de intumescimento maior em relação as outras membranas com menores concentrações de GTA (Figura 10).

As membranas de gelatina sem e com adição de Ag e reticuladas, serão analisadas nas próximas Figuras de 11 a 14, para isso adotou-se para uma melhor compreensão, que cada Figura apresentará os resultados do ensaio de intumescimento fixando-se uma concentração de GTA e avaliando a adição da Ag.

Na Figura 11 são apresentados os resultados do ensaio de intumescimento das membranas reticuladas na menor concentração de GTA (0,5% (v/v)), com as 3 concentrações de prata utilizadas.

As membranas de gelatina com adição de Ag e reticuladas, estão nas próximas figuras 11 à, onde para melhor compreensão, estabelecemos todas as variáveis de concentrações de prata utilizadas, com uma concentração de GTA para cada Figura.

Figura 11 - Ensaio de Intumescimento da membrana de gelatina reticulada e das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M reticuladas por imersão em solução de 0,5%(v/v) GTA, em um intervalo de tempo de 24 horas.

Figura 12: Ensaio de Intumescimento semanais das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M reticuladas por imersão em solução de 0,5% (v/v)GTA.

Mediante os resultados apresentados na Figura 11 para membranas reticuladas com 0,5% de GTA foi possível observar que a Ag interferiu no processo de intumescimento e provavelmente existe um valor limite para esse comportamento, pois para a concentração de 0,1% Ag, maior valor utilizado neste trabalho, observa-se que houve aumento na porcentagem de intumescimento, para as demais concentrações utilizadas as membranas comportam-se de maneira muito similar. Esse comportamento se mantém para um período de ensaio mais longo (Figuras 12).

Esse mesmo comportamento foi observado para as demais condições de reticulação com maiores concentrações de GTA (1% e 2%) (Figuras 11 a 16).

Figura 13: Ensaio de Intumescimento da membrana de gelatina e das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M reticuladas por imersão em solução de 1%(v/v)GTA, em um intervalo de tempo de 24 horas.

Na Figura 13 são apresentados os resultados do ensaio de intumescimento das membranas que foram reticuladas na concentração intermediária de GTA (1% (v/v)). Assim como o gráfico da Figura 11, nota-se claramente que além da membrana com maior concentração de prata reter mais água, as membranas com menores concentrações de Ag (0,01M e 0,05M) apresentam um comportamento de absorção de água semelhantes, incluindo a membrana de gelatina reticulada com GTA 1% (v/v) sem adição da Ag.

É possível observar o mesmo comportamento das membranas da Figura 13 na Figura 14 com as membranas que foram reticuladas na concentração máxima de GTA utilizada (2% (v/v)).

Figura 14: Ensaio de Intumescimento semanais da membrana de gelatina reticulada e das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M reticuladas por imersão em solução de 1% (v/v) GTA.

Figura 15: Ensaio de Intumescimento da membrana de gelatina reticulada e das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 2%(v/v) GTA, em um intervalo de tempo de 24 horas.

É possível observar que o mesmo comportamento das membranas das Figuras 13 à 14 com menores concentrações de GTA, ocorreram também nas Figuras 15 e 16 com as membranas que foram reticuladas na concentração máxima de GTA utilizada (2% (v/v)).

Figura 16: Ensaio de Intumescimento semanais da membrana de gelatina reticulada e das membranas de gelatinas com adição de solução de prata nas concentrações de: 0,01M, 0,05M e 0,1M, reticuladas por imersão em solução de 2%(v/v) GTA.

5.2 Difração de Raios X

Os resultados por análise de difração de raios X das membranas de gelatina e das membranas de gelatina reticuladas nas concentrações 0,5%(v/v) , 1%(v/v) e 2%(v/v) de GTA, respectivamente, estão apresentados na Figura 17.

Figura 17: Resultados do ensaio de difração de raios X (DRX): membrana de gelatina pura(G4); membranas de gelatina reticuladas com 0,5%(v/v) de GTA (G4 0,5%); reticuladas com 1% (v/v) de GTA (G4 1%) e reticuladas com 2% (v/v) de GTA (G4 2%).

Todas as membranas de gelatina, reticuladas ou não, apresentaram bandas amorfas nas regiões de $2\theta=8^\circ$ e 20° características da gelatina. A reticulação e o aumento nas concentrações de GTA parecem não interferir na estrutura padrão deste polímero.

Na Figura 18, são apresentados os resultados de DRX das membranas de gelatina reticuladas com GTA 0,5% (v/v) e com Ag. Observa-se a presença do pico na região de $2\theta=20^\circ$ característico da gelatina tornando-se mais definido com o aumento da concentração da Ag. O pico $2\theta=28^\circ$ presente nas amostras G4 0,01M Ag e G4 0,05M Ag fica menos definido a medida que aumenta a concentração da Ag e com isso há o surgimento do pico $2\theta=34^\circ$ (para a membrana G4 0,1M Ag) mais incidente. Alguns trabalhos na literatura com gelatina e Ag (LIU, et al; 2006 e DARROUDI, et al; 2011) atribuíram a fase de Ag de face cúbica centrada para os picos incidentes entre $2\theta=30^\circ$ e $2\theta=38^\circ$.

Esse comportamento se mantém para as demais concentrações de agente reticulante (Figuras 19 e 20). Pode-se dizer que, quando a Ag é misturada com um composto rico em oxigênio, como a gelatina, seus íons positivos podem ser ligados a cadeias do polímero via eletrostáticas (por exemplo, ion-dipolo), além disso, pode-se esperar que o elétron de átomos de oxigênio de hidroxilas polares e grupos de éter façam interações eletropositivas com cations da Ag, formando uma ligação complexa entre a gelatina e a Ag (HUANG; YUAN; YANG, 2004).

Figura 18: Difractometria das membranas de gelatina reticuladas com 0,5% (v/v) de GTA com prata nas concentrações de 0,01M Ag, 0,05M Ag e 0,1M Ag.

Todas as membranas com Ag têm perfis de difração semelhantes, sendo que, os picos de DRX 2θ próximos de 30(°), 40(°), 60(°) podem ser atribuídos à planos cristalográficos de fase cúbica face cúbica centrada (CFC) de cristais de prata.

Após a dispersão dos íons de prata na gelatina, há a formação de um complexo estável gelatinoso $[\text{Ag}(\text{gel})]^+$, que reage com OH para formar prata metálica, devido à redução de íons de prata através da oxidação da glicose em ácido glucônico.

A caracterização por DRX das membranas de gelatina contendo Ag, apresentada nas Figuras 18 a 20 pode-se observar os picos em $2\theta=20^\circ$, 30° , 34° e 36° são referentes ao fosfato de prata, (Ag_3PO_4) (ficha 06-0505), além dos picos referentes a fase da gelatina. É interessante observar que o aumento na concentração da Ag interfere no padrão de DRX da gelatina, dando característica cristalina em decorrência da presença do íon Ag na cadeia polimérica.

Figura 19: Difractometria das membranas de gelatina reticuladas com 1% (v/v) de GTA com prata nas concentrações de 0,01M Ag, 0,05M Ag e 0,1M Ag.

O mecanismo da formação de fases de Ag em membranas de gelatina ainda não é completamente esclarecido pela literatura. O que alguns autores também consideram é que a gelatina pode controlar a difusão dos íons de Ag e assim, limitar a concentração desses íons na estrutura, além disso, a Ag tem demonstrado ter uma afinidade para a arginina, cisteína, lisina e metionina, que são comuns na gelatina, interferindo dessa forma em suas características físico-químicas. (S. LIU et al, 2006).

Figura 20: Difratometria das membranas de gelatina reticuladas com 2% (v/v) de GTA com prata nas concentrações de 0,01M Ag, 0,05M Ag e 0,1M Ag.

Os padrões de difração de raios X (DRX) das membranas de gelatina mostram que a adição da solução de nitrato de prata (AgNO_3) em diferentes concentrações podem ter interferido no espectro amorfo característico da gelatina.

Observa-se que o aumento na concentração de Ag, ocasionou uma cristalinidade das membranas sendo caracterizadas pelo aumento na intensidade dos picos presentes e esse comportamento se manteve independentemente do aumento da concentração do agente reticulante. O que nos faz considerar como uma evidência de que a intensidade dos picos está diretamente relacionada com a quantidade de Ag utilizada nesse trabalho.

Em concentrações menores de Ag, a quantidade de matéria orgânica da gelatina absorve muito o feixe de raios X, assim a fase da Ag pode ter ficado encoberta.

5.2 Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (ATR)

A Figura 21 apresenta os resultados de ATR das membranas de gelatina reticuladas nas concentrações de 0,5% (v/v), 1% (v/v) e 2% (v/v) de GTA e a membrana de gelatina G4.

Figura 21 - Espectroscopia no infravermelho por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 0,5% (v/v) de GTA (G4 0,5% GTA), 1% (v/v)de GTA (G4 1% GTA) e 2% (v/v) de GTA (G4 2% GTA).

Verifica-se que a amostra G4, na ausência do agente de reticulação, apresenta uma banda larga na região de 3200 cm^{-1} , que segundo os autores REIS, et al (2012) corresponde à banda não ligada OH. De acordo com o aumento da concentração de GTA pode-se observar que essa banda torna-se mais discreta, o que faz considerar que pode estar havendo uma ligação dos grupos de OH não ligados da gelatina com grupos aldeídos do GTA.

Nota-se que, para todas as membranas, a banda na região de 1550 cm^{-1} não sofre nenhuma alteração, este resultado sugere que os grupos carboxila de aminoácidos, tais como ácido glutâmico e ácido aspártico, provavelmente não estão envolvidos na reticulação química com glutaraldeído, caso contrário, uma mudança na posição da banda teria sido detectada (REIS et al, 2012).

A absorbância na região de 1444 cm^{-1} é devido à banda II de amida, origina a vibração de flexão N-H e a vibração C-N, originando as depressões em torno dessas bandas (CHITTUR, K. K., 1998).

Para as bandas na região de 1358 cm^{-1} , que indicam ser flexão entre C-N e C-O (AHMED et al, 2011), os autores MANSUR et al. (2008), estudando filmes de gelatina com álcool polivinílico (PVA) reticulados com GTA, consideraram o deslocamento destas bandas e também a mudança na intensidade como uma possível consequência das interações entre o GTA, o que pode resultar em uma significativa alteração nas bandas em relação aos grupos OH, normalmente associados com a formação de moléculas que apresentam o átomo de carbono ligado a átomos de oxigênio.

É válido lembrar que essa explicação deve ser considerada com cautela, uma vez que existem também estudos relacionados com um possível alongamento dos grupos OH das moléculas de água absorvida na região da banda 3293 cm^{-1} (YAKIMETS et al., 2007, 2005) e também relacionados ao excesso de glutaraldeído (MANSUR et al., 2008) uma vez que, quando a gelatina entra em contato com o GTA há uma mudança nas bandas de OH presentes, devido a uma possível ligação entre este grupo e o aldeído.

Figura 22 - Espectroscopia no infravermelho por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 0,5% (v/v) de GTA com prata nas concentrações de 0,01M Ag, 0,05M Ag e 0,1M Ag.

Para os espectros das membranas de gelatina com adição de Ag e reticuladas em concentração de 0,5% GTA, observa-se Figura 22 que há uma variação para todos os espectros na intensidade das bandas características da gelatina: as amidas primária 1620 cm^{-1} e secundária 1520 cm^{-1} . Por exemplo, as bandas de OH da gelatina em 3279 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} gelatina pura G4 tornaram-se mais discretas com a maior concentração da solução de Ag. De acordo com a literatura este fator ocorre possivelmente devido a ligação química entre a Ag e os grupos de metionina da gelatina e os átomos de oxigênios (YAKIMETS et al., 2007, 2005). Esses resultados são reforçados, mediante os resultados obtidos por DRX (Figuras 26 a 27) e foi possível observar que o aumento da concentração da Ag interfere na cristalinidade da gelatina, resultando na presença de picos cristalinos bem definidos, relacionados a uma fase de Ag.

Figura 23 - Espectroscopia no infravermelho por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 1% (v/v) de GTA com prata nas concentrações de 0,01M Ag, 0,05M Ag e 0,1M Ag.

As membranas de gelatina com adição de Ag e reticuladas na concentração de 1% GTA (Figura 23), além da variação na intensidade da banda característica da gelatina para todos os espectros, observa-se uma deformação entre o comprimento de onda 900^{-1} a 1000 cm^{-1} em todas as membranas reticuladas e com adição de Ag.

Em um estudo recente Ahmed (2012), sobre filmes de gelatinas de prata utilizados para fotografias, atribuem a essas bandas adicionais ao SO_4 , provavelmente formado pela ligação da Ag com os aminoácidos da gelatina como já citado.

Figura 24 - Espectroscopia no infravermelho por ATR em membrana de gelatina pura (G4) e membranas de gelatina reticuladas com 2% (v/v) de GTA com prata nas concentrações de 0,01M Ag, 0,05M Ag e 0,1M Ag.

Na Figura 24, as membranas reticuladas com 2% GTA além da variação na intensidade da banda característica da gelatina para todos os espectros, observa-se uma deformação entre o comprimento de onda 900^{-1} a 1000 cm^{-1} nas membranas reticuladas e com concentrações maiores de Ag (0,05M e 0,1M).

Pode-se considerar ainda de acordo com AHMED (2012), onde ele relaciona essas deformações próximas de 900^{-1} a 1000 cm^{-1} , pelo fato dos grupos reativos nas cadeias laterais dos aminoácidos serem capazes de uma vasta gama de alterações, levando a várias formas de degradação. As reações comuns de aminoácidos são desaminação (que indica a perda do grupo amina) descarboxilação (que indica a perda de grupo carboxilo), desidrogenação (que envolve a eliminação de hidrogênio) e transaminação (que envolve a conversão de um amino ácido para o outro) o que acabam ocasionando tais alterações.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da morfologia superficial das membranas de gelatina pura G4, reticulada com G4 2% GTA e com prata foram realizadas mediante a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 25 - Micrografia das membranas de gelatina com adição de prata reticuladas: G4 0,05 Ag 2 % GTA (a) (c) e G4 0,1% Ag 2% GTA (b) (d).

Na figura 25 é possível observar a diferença da morfologia de superfície entre as membranas G4 0,05M Ag 2% (v/v) GTA (Figura 29 a) e G4 0,1M Ag 2% (v/v) GTA (Figura 25 b), onde os pontos mais claros dispersos aleatoriamente correspondem a aglomerados de Ag em ambas as membranas, sendo que para a análise de superfície quando a membrana de gelatina foi obtida com uma concentração menor de Ag (0,05M) poucos aglomerados de partículas de Ag foram observados, o que para uma

concentração maior de Ag (0,1M) é possível observar claramente esses aglomerados (Figura 36).

Figura 26- Micrografia das membranas de gelatina com adição de prata reticulada: G4 0,1M Ag 2 % GTA .

Na Figura 26 a membrana G4 0,1M Ag 2% (v/v) GTA é possível observar os aglomerados da prata. Esta imagem indica que a combinação da gelatina e Ag é capaz de controlar o crescimento e morfologia das partículas de prata como afirma os autores LUIZ et al. (2010).

6. Teste de Halo de Inibição

A Ag foi testada como agente antimicrobiano. As concentrações e as amostras de controle contra bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - *S. aureus*) e bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* - *E. coli*) foram resumidas como valores mínimos (0,01M Ag), intermediários (0,05M Ag) e máximo (0,1% Ag), de acordo com estudos relacionados a gelatina e solução de prata (RUJITANAROJ; PIMPHA; SUPAPHOL, 2008), (RATTANARUENGSRikul., et al 2009)

A Ag é conhecida como um composto iônico, sua carga positiva quando em contato com membranas celulares de microrganismos negativamente carregados, pode levar ao vazamento de conteúdos protéicos e outros componentes intracelulares, pois ao entrar em contato com a superfície da membrana das células, pode danificar suas principais funções, penetrando no interior das bactérias causando danos ao interagir com fósforo e compostos contendo enxofre tais como o DNA (PANÁCEK. A, et al 2006).

A Ag pode causar acentuada inibição do crescimento bacteriano, devido aos íons de que são depositados no vacúolo e parede celular na forma de grânulos, como consequência há uma inibição da divisão celular e envelope celular é danificado (WOO KYUNG JUNG et al., 2008). As células bacterianas aumentam de tamanho, e a membrana citoplasmática com seus componentes citoplasmáticos e camadas de células exteriores todos exibem anomalias estruturais. Os íons de Ag interagem com os ácidos nucleicos, eles interagem preferencialmente com as bases no DNA, ao invés do grupos fosfato, embora o significado desta interação em termos da sua ação letal não seja claro (THURMAM et al., 1989)

O potencial para a utilização das membranas de gelatina com prata e sem prata foi avaliado através da observação da sua atividade antibacteriana (com base no método de difusão em disco) contra duas bactérias comuns, que vivem em simbiose do corpo humano e são encontradas em feridas cirúrgicas: *E. coli* e *S. aureus*. Deve-se notar que o diâmetro inicial de todas as amostras foi fixada em 6 mm. No entanto, como o ensaio é realizado em meio úmido, as membranas podem ter intumescido, resultando na mudança dimensional observada.

As placas utilizadas para a cultura das bactérias com as membranas com e sem a adição da Ag, apresentaram uma atividade antimicrobiana para as membranas

contendo Ag, isso provavelmente se explica em decorrência à presença de íons de Ag livres, que são tóxicos (WOO KYUNG JUNG et al., 2008; THURMAM et al., 1989), esses efeitos para as diferentes concentrações de Ag contra *S. aureus* e *E. coli*, são apresentados nas Figuras de 27 a 38.

Figura 27 - Ensaio bactericida com a cultura de bactéria *E. coli*, (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 0,5% (G4 0,5% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag (G4 0,01 Ag 0,5% GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag (G4 0,05Ag 0,5% GTA), (e) gelatina com adição 0,1M Ag (G4 0,1 Ag 0,5% GTA).

Como era de se esperar a membrana de gelatina (G4) e membrana de gelatina reticulada (G4 0,5% GTA) não apresentaram halo de difusão, esse comportamento foi observado apenas para as membranas que continham Ag (Figura 27). Isso se repetiu para as demais concentrações de agente reticulante, porém para a maior concentração de GTA (Figura 29) observa-se que existe um halo mínimo ao redor da amostra G4 2% (v/v) GTA, esse fato pode ser explicado uma vez que o glutaraldeído é utilizado como um desinfetante hospitalar provavelmente a membrana reticulada com GTA 2% (v/v) deve

liberar GTA em quantidade suficiente para que possa ter tido uma reação contra a *E. coli*.

Figura 28 - Ensaio bactericida com a cultura de bactéria *E. coli*, (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 1% (G4 1% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag (G4 0,01 Ag 1% GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag (G4 0,05Ag 1% GTA), (e) gelatina com adição 0,1M Ag (G4 0,1 Ag 1% GTA).

Figura 29 - Ensaio bactericida com a cultura de bactéria *E. coli*, (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 2% (G4 2% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag (G4 0,01 Ag 2% GTA), (d) gelatina com adição 0,05M Ag (G4 0,05Ag 2% GTA), (e) gelatina com adição 0,1M Ag (G4 0,1 Ag 2% GTA).

Todas as membranas com Ag, independentes do valor da concentração de GTA, apresentaram durante o ensaio de difusão por disco halos de inibição tanto para a cepa *S. aureus* (Figuras 30 a 32) como para a cepa *E.coli* (Figuras 27 a 29) aparentemente mantendo o mesmo diâmetro para o halo. Segundo, FEITOR (2010), em seu trabalho com filme de Ag, foi possível constatar que o mesmo apresentou propriedades bacteriostáticas contra as cepas de *S. aureus* e *E.coli*, ou seja, efeito advindo da Ag.

Figura 30 - Ensaio bactericida com a cultura de bactéria *S. aureus*, (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 0,5% (G4 0,5% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag (G4 0,01 Ag 0,5% GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag (G4 0,05Ag 0,5% GTA), (e) gelatina com adição 0,1M Ag (G4 0,1 Ag 0,5% GTA).

Figura 31 - Ensaio bactericida com a cultura de bactéria *S. aureus*, (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 1% (G4 1% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag (G4 0,01 Ag 1% GTA) , (d) gelatina com adição 0,05M Ag (G4 0,05Ag 1% GTA), (e) gelatina com adição 0,1M Ag (G4 0,1 Ag 1% GTA).

Figura 32 - Ensaio bactericida com a cultura de bactéria *S. aureus*, (a) gelatina pura (G4), (b) gelatina reticulada com GTA 2% (G4 2% GTA), (c) gelatina com adição de 0,01M Ag (G4 0,01 Ag 2% GTA), (d) gelatina com adição 0,05M Ag (G4 0,05Ag 2% GTA), (e) gelatina com adição 0,1M Ag (G4 0,1 Ag 2% GTA).

Embora para ambas as bactérias quando em contato com a Ag seja notável nitidamente o halo de inibição entre as membranas, não é possível confirmar que os íons de Ag tenha eliminado as bactérias, pois o ensaio realizada trata-se de um ensaio qualitativo o qual avalia o efeito inibitório para o crescimento da cultura. Um agente antimicrobiano é considerado bactericida quando tem a propriedade de destruir bactérias na sua forma vegetativa, eliminando sua capacidade de reprodução, e pode ser considerado bacteriostático quando inibe o crescimento dos microorganismos (MELO, DUARTE, SOARE.; 2012).

Já é conhecido na literatura que compostos como o cobre e a prata tem a propriedade de interferir na permeabilidade da parede celular e causar a absorção de nutrientes que possam interferir nas funções das bactérias (WOO KYUNG JUNG et al.,

2008); podemos considerar que essa interferência ocorre pela eficácia da Ag devido à sua capacidade de interferir com a produção de DNA e de acelerar a fase da morte bacteriana. As ligações dos íons de prata para várias partes da célula, tais como o DNA, RNA, proteínas celulares e enzimas respiratórias, fazem com que todos os sistemas de suporte de vida na célula possa ser mobilizado, como resultado, não há crescimento ou divisão celular, fazendo com que as bactérias não se multipliquem e eventualmente morram (FAIRBAIRN et al.,1995).

Os resultados deste estudo demonstraram que a prata inibiu o crescimento e multiplicação das bactérias multirresistentes testadas: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos durante a realização deste trabalho pode-se concluir que:

Obteve-se membranas de gelatina com Ag mediante a metodologia de adição de solução de Ag comprovada pelas técnicas de DRX, FTIR, MEV e pelo teste de halo de inibição.

As membranas reticuladas apresentaram menor porcentagem de intumescimento quanto maior foi a concentração do agente reticulante, com exceção das amostras com concentração de 0,1M de Ag.

Além da atuação do GTA a prata também interfere no processo de intumescimento, aspecto e comportamento das membranas de gelatina.

As amostras contendo Ag apresentaram características bacteriostáticas sendo efetivas nessas concentrações para os dois tipos de bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).

8. REFERÊNCIAS¹

- AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A. (1997). Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA–PGA implants. *Journal Biomedical Materials Research*, v.38, n.2, p.105-114.
- AHMED, A.M. et al. (2012). Investigations on the chemical degradation of silver gelatine prints. *International Journal of Conservation Science*, v.3, p.93-106, June.
- ANDRADE-ACEVEDO, R. et al. (2004). Bases clínicas e biológicas da ROG associadas a barreiras ou membranas. *Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre implante*, v.11, n.43, p.251-257.
- BECKER, W. et al. (1994). The Use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v.9, n.1, p.31-40, Jan./Feb.
- BEPPU, M.M.; ARRUDA, J.E.; SANTANA, C.C. (1999). Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. *Polímero*, v.9, n.4, p.163-169, out./dez.
- BERNALES, D.M. et al. (2004). Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v.23, n.2, p.65-74, abr./jun.
- BIGI, A. et al. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, v.22, n.8, p.763-768, Apr.
- BONIATTI, D.C.R. (2012). *Processo de fabricação da gelatina*. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAANpQAD/processo-fabricacao-gelatina#ixzz20tdFMFmi>>. Acesso em: 15 jul. 2012.
- BRITO, R.M. et al. (2012). *Caracterização mecânica de biofilmes elaborados com amido de mandioca, gelatina, PBAT e óleo essencial de alfafa (Ocimum Officinale) ou de funcho (Foeniculum Vulgaris)*. Disponível em: <[http://www.sei.utfpr.edu.br/sei_anais/trabalhos/comunicacao_oral/Sala%20B/CARACTERIZA%C3%87%C3%83O%20MEC%C3%82NICA%20DE%20BIOFILMES%20ELABORADOS%20COM%20AMIDO%20DE%20MANDIOCA,%20GELATINA,%20PBAT%20E%20%C3%93LEO%20ESSENCIAL%20DE%20ALFAVACA%C3%83O%20\(Ocimum%20officinale\)%20OU%20DE%20FUNCHO%20\(Foeniculum%20vulgaris\).pdf](http://www.sei.utfpr.edu.br/sei_anais/trabalhos/comunicacao_oral/Sala%20B/CARACTERIZA%C3%87%C3%83O%20MEC%C3%82NICA%20DE%20BIOFILMES%20ELABORADOS%20COM%20AMIDO%20DE%20MANDIOCA,%20GELATINA,%20PBAT%20E%20%C3%93LEO%20ESSENCIAL%20DE%20ALFAVACA%C3%83O%20(Ocimum%20officinale)%20OU%20DE%20FUNCHO%20(Foeniculum%20vulgaris).pdf)>. Acesso em: 21 ago. 2012.
- CHEN, P.R. et al. (2005). Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors. *Biomaterials*, v.26, n.33, p.6579-6587, Nov.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- CHITTUR, K.K. (1998). FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, v.19, n.4/5, p.357-369, Mar.
- CHOI, Y.S. et al. (1999). Studies on gelatin-containing artificial skin: II. preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.48, n.5, p.631-639.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, Y.; COLLINS, T. (2000). Patologia celular I : lesão e morte da célula. In: _____. *Patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1- 25.
- CRIADO MONTOYA, V.E.; MENDEZ RODULFO, M.A. (2000). Uso de materiales de ultima generación en odontología para el tratamiento de una resorción radicular externa: (reporte de un caso). I Parte. *Acta odontológica Venezolana* [online], v.38, n.1, p.69-74. Disponível em:<http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652000000100012&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 15 jun. 2012.
- D'AVILA, V. D. L. Biofilmes à base de gelatina, aplicados na conservação de frutos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). 2010. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de PósGraduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2010
- DAHLIN, C. et al. (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.81, n.5, p.672-676, May.
- DARROUDI, M. et al. (2011). Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under UV- light. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, n.9, p.6346-6356.
- DUNFORD, C. (1997). Methicillin resistant staphylococcus aureus. *Nursing Standard*, v.11, n.25, p. 58–62, Mar.
- ESCHERICHIA coli. Disponível em:<<http://www.brasilecola.com/biologia/escherichia-coli.htm>>. Acesso em : 18 jul. 2012.
- FARRIS, S. et al. (2009). Alternative reaction mechanism for the crosslinking of gelatin with glutaraldehyde. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. V.58, n.2, p.998-1003, Jan.
- FEITOR, M.C. *Efeito antibacterianos de tecidos têxteis revestidos por prata através da técnica de deposição por plasma*. 116p. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.
- FENG, Q.L. et al. (2000). A Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on escherichia coli and staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.52, n.4, p.662-668, Dec.

- FUJITA, T.; TODA, T.; OHASHI, M. (1984). Silver stain for proteins on a cellulose acetate membrane. *Analytical Biochemistry*, v.139, n.2, p.463-467.
- GINANI, M.F. et al. (1999). Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. *Nova Química*, v.22, n.6, p.801-804.
- HARDWICK, R. et al. (1996). Parâmetros utilizados no formato da membrana para regeneração óssea guiada da crista alveolar. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. (Ed.). *Regeneração óssea guiada na implantodontia*. São Paulo: Quintessence, 1996. p.101-136.
- HURLEY, L.A. et al. (1959). The Role of soft tissues in osteogenesis an experimental study of canine spine fusions. *Journal of Bone Joint Surgery*, v.41-A, n.7, p.1243-1254.
- JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S.R. (1996). Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, v.17, n.5, p.471-484, Mar.
- JIANGI, H. et al. (2002). Comparison of calcium alginate film with collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rabbits. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v.60, n.12, p.1449-1454, Dec.
- JOVANOVIĆ, S.A.; SPIEKERMANN, H.; RICHTER, E.J. (1992). Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v.7, n.2, p.233-245, Summer.
- KUMAR, M.N.V.R. (2000). A Review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v.46, n.1, p.1-27, Nov. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1381514800000389/1-s2.0-S1381514800000389-main.pdf?_tid=a49c26d2-fa14-11e2-96ec-00000aabb0f27&acdnat=1375297914_7e18311d10745d0edee7bf7dd6c2f881>. Acesso em: 8 July 2012.
- LEE, S.J. et al (2012). Biological activity from the gelatin hydrolysates of duck skin by-products. *Process Biochemistry*, v.47, n.7, p.1150-1154.
- LEVY, S.B. (1992). *The Antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*. New York: Plenum Press.
- LIU, S. et al. (2006). Room temperature synthesis of silver nanowires from tabular silver bromide crystals in the presence of gelatin. *Journal of Solid State Chemistry*, v.179, n.3, p.696-701.
- LIU, Y. et al. (2010). Gelatina-g- (Poly methacrylate)/ silver nanoparticle hybrid films and the evaluation of theirs antibacterial activity. *Journal of Applied Polymer Science*. V.116, n.5, p.2617-2625, June.

LUIZ, C.S. et al. (2010). Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles impregnated in bacterial cellulose. *Polímeros: ciência e tecnologia*, v.20, n.1, p.72-77.

MANSUR, H.S. et al. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C*, v.28, n.4, p.539-548, May.

MELCHER, A.H. (1976). On The repair potencial of periodontal tissues. *Journal of Periodontology*, v.47, n.5, p.256-260, May.

METCALFE, A.D.; FERGUSON, M.W.J. (2007). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J.R. Society Interface*, v.4, n.14, p.413-437, June.

MIGNEAULT, I. et al. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, v.37, n.5, p.790-802.

MORAES, G.F. (2002). *Regeneração tecidual guiada*. 53f. Monografia (Especialização em Periodontia) - Curso de Especialização em Periodontia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

NIJENHUIS, K. (2007). On The nature of crosslink in the thermoreversible gels. *Polymer Bulletin*, v.57, p.27-42.

NIMNI, M.E. et al. (1987). Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.21, n.6, p.741-771.

RAJA MOHD HAIDZ, R.N. et al. (2011). Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*, v.18, n.2, p.813-817.

RATTANARUENGSRIKUL, V.; PIMPHA, N.; SUPAPHOL, P. (2009). Development of gelatin hydrogel pads as antibacterial wound dressings. *Macromolecular Bioscience*, v.9, n.10, p.1004-1015, Oct.

REIS, E.F. (2006). Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. *Materials Research*, v.9, n.2, p.185-191, Apr./June. Disponível em:<www.scielo.com.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=51516-143920060002000014>. Acesso em: 9 Aug. 2012.

MELO, Vivianne Vieira; DUARTE, Izabel de Paula; SOARES, Amanda Queiroz Guia Antimicrobianos / Vivianne Vieira de Melo; Izabel de Paula Duarte; Amanda Queiroz – 1.ed. - Goiânia, 2012.57f. Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) 1. Farmácia. 2. Antimicrobianos.

- ROCHA, D.P. (2011). Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, v.34, n.1, p.111-118.
- ROSS-MURPHY, S.B. (1991). Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer*, v.33, n.12, p.2622-2627.
- RUJITANAROJ, P.; PIMPHA, N.; SUPAPHOL, P. (2008). Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. *Polymer*, v.49, n.21, p.4723-4732.
- SARMENTO, A.L.S.C. (1999). Elaboração e caracterização de biofilmes a partir de gelatina reticulada. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- SCHMITZ, J.P. et al. (2000). Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a guidor membrane for guided bone regeneration: case report. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v.58, n.8, p.888-893, Aug.
- SCHWARZ, S. et al. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Review*, v.28, n.5, p.519-542, Nov.
- SHAHID, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p.37-51.
- SILVA, D.P. et al. (2000). Comparison of bioabsorbable and nonabsorbable membranes in the treatment of dehiscence-type defects. A histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology*, Chicago, v.71, n.8, p.1306-1314, Aug.
- SIMAS, M.P.; SANTOS JR., A.R. [200-?]. *Regeneração tecidual guiada*. Santo André: Centro de Ciências Naturais e Humanas; Universidade Federal do ABC.
- SONGCHITIKUPAN, P.; TATTIYAKUL, J.; SUPAPHOL, P. (2008). Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal Biological Macromolecules*, v.43, n.3, p.247-255, Apr.
- TAN, S.X. et al. (2002). Characterization of AgBr nanoparticles prepared in fish gelatin. *Journal of Imaging Science and Technology*, v.46, n.2, p.112-116, 2002.
- TANGERINO, M.B. (2006). *Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol*. 172p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006. Disponível em: <<http://adm-net-a.unifei.edu.br/phl/pdf/0032068.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2012.
- VILELA, E.M.; WERNTHALER, A.T. (2002). *Regeneração guiada em defeitos ósseos induzidos usando uma membrana totalmente oclusiva (AL₂O₃): estudo experimental em ratos*. Juiz de Fora. Projeto de Pesquisa. Disponível em: <<http://www.clinestpq.com.br/documents/Wher202.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2012.

WRIGHT, J.; KAN, L.; BURREL, R. (1998). Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *American Journal Infection Control*, v.26, n.6, p.572-577, Dec.

YAKIMETS, N. et al. (2005). Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*, v.46, n.26, p.12577-12585, Dec.

YAKIMETS, S.S. et al. (2007). Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: a comparative study. *Biomacromolecules*, v.8, n.5, p.1710–1722, Apr.

ZHAO G, STEVENS SE JR. (1998). Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals*. 1998 Jan;11(1):27-32.

ZAVADINACK NETTO, M. et al. (2001). *Staphylococcus aureus* incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. *Acta Scientiarum*, v.23, n.3, p.709-712, June.

ZITZMANN, N.U.; NAEL, R.; SCHÄRER, P. (1997). Resorbable versus non-resorbable membranes in combination with bio-oss for guided bone regeneration. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v.12, n.6, p.844-852, Nov./Dec.

MELO, Vivianne Vieira; DUARTE, Izabel de Paula; SOARES, Amanda Queiroz Guia Antimicrobianos / Vivianne Vieira de Melo; Izabel de Paula Duarte; Amanda Queiroz – 1.ed. - Goiânia, 2012.57f. Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) 1. Farmácia. 2. Antimicrobianos.