

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA**

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO
CINNAMOMUM ZEYLANICUM EM MATRIZ DE HIDROGEL PARA
APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

GISELA MARIA ROSAS HELOU

ITAJUBÁ

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

GISELA MARIA ROSAS HELOU

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO
***CINNAMOMUM ZEYLANICUM* EM MATRIZ DE HIDROGEL PARA**
APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Materiais para Engenharia como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutora em Ciências em
Materiais para Engenharia.

Área de Concentração: Não Metais

Orientador: Profa. Dr^a Maria Elena Leyva González

Co-orientador: Prof. Dr^o Alvaro Antônio A. de Queiroz

ITAJUBÁ

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA**

GISELA MARIA ROSAS HELOU

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO
CINNAMOMUM ZEYLANICUM EM MATRIZ DE HIDROGEL PARA
APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Tese aprovada por Banca Examinadora em 27 de junho de 2018, conferindo a autora o título de Doutor em Ciências em Materiais para Engenharia.

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a Mirta Mir Caraballo

Profa. Dr^a Charlene Aparecida Ribeiro

Profa. Dr^a Andreia Arantes Borges

Profa. Dr^a Geise Ribeiro

Profa. Dr^a Maria Elena Leyva González

Prof. Dr^o Alvaro Antônio Alencar de Queiroz

ITAJUBÁ

2018

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Paulo, engenheiro, formado pela Universidade Federal de Itajubá- Unifei, na turma de 1958. Pelo exemplo de dedicação e brilhantismo à belíssima carreira no setor da siderurgia. À minha mãezinha Cléa, tão dedicada e amada. Com toda a sua simplicidade se faz a fortaleza de toda a família. Meus pais amados, vocês me educaram com amor e se dedicaram à minha formação humana e profissional. Sou profundamente orgulhosa e grata de ter vocês como meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Pai Todo Poderoso, autor do dom da vida, que me sustentou em cada segundo, possibilitando vencer cada momento de dificuldade. A Ele toda Honra e Glória.

A concretização desse estudo só foi possível graças a muitas pessoas que contribuíram gentilmente e de forma decisiva. Assim, nessa parte do trabalho, expressei o meu profundo reconhecimento e agradecimento.

À professora Doutora Maria Elena Leyva González, que me acolheu amavelmente no seu grupo de pesquisa e depositou em mim a confiança necessária para levar adiante esse projeto. Pelo apoio e disponibilidade constantes e acompanhamento científico, no percurso acadêmico. Muito obrigada.

Ao professor Doutor Alvaro Antônio Alencar de Queiroz, exemplo de sabedoria, dedicação e brilhantismo. Muita honra pela sua co-orientação e contribuição efetiva nesse estudo.

Aos técnicos dos laboratórios Tarcísio, Thaianne, Aline, Rodrigo, pela colaboração nas atividades de laboratório. Ao Paulo Marques, pelos testes microbiológicos. Ao Marcos Cirilo, pelas imagens de MEV.

À Roberta, que, identificou as minhas dificuldades e limitações em conteúdo da área das ciências exatas, e com muita paciência e dedicação, me ajudou a superar os desafios. À Charlene e Maria Fernanda, pelo apoio nos assuntos pertinentes às atividades experimentais.

À Rosana e Gilza pelas valiosas contribuições para que a minha pesquisa fosse se refinando. Ao colega Alexandro, pelas preciosas considerações e generosos questionamentos ao presente estudo.

Ao meu marido Herlon Danylo, pelo seu carinho, confiança, respeito e amor e pela sua habilidade na área de Tecnologia da Informação, com a qual me deu suporte na busca de sites de pesquisa, livros, e na formatação final do trabalho, enaltecendo esse estudo.

Aos meus filhos Rafael, engenheiro, pela ajuda com os primeiros conhecimentos sobre assuntos na área da Engenharia de Materiais. André, Tenente da AMAN, que acreditou em mim sempre com orgulho. Lucas, pelo seu estímulo, sua cumplicidade, seu carinho e sua presença sempre comigo. Muito obrigada, meus filhos.

“[...] Combati o bom combate [...]”

Apóstolo Paulo
(2 Timóteo 4: 6-8)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Biossíntese para obtenção de NPsAg.....	18
3.2 Estabilização das NPsAg.....	22
3.3 Ação antimicrobiana das NPsAg.....	25
3.4 Poli (álcool) vinílico para a obtenção de filmes poliméricos.....	28
3.5 Feridas cutâneas e matrizes poliméricas incorporadas com prata.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Materiais e Equipamentos.....	40
4.2 Procedimentos experimentais.....	41
4.2.1 <i>Extração do princípio ativo da Cinnamomum zeylanicum</i>	42
4.2.1.1 <i>Extração do princípio ativo da canela por maceração dinâmica- Procedimento A</i>	42
4.2.1.2 <i>Extração do princípio ativo da canela por decoção - Procedimento B</i>	42
4.2.2 <i>Biossíntese de redução das NPsAg com o extrato de Cinnamomum zeylanicum</i>	43
4.2.3 <i>Preparação da membrana PVA^{EXT}-NPsAg por biossíntese in situ, na presença de PVA</i>	44
4.2.4 <i>Determinação do teor gel do PVA reticulado</i>	46
4.2.5 <i>Estudo do intumescimento das membranas PVA^{EXT}-NPsAg</i>	46
4.2.6 <i>Estudo de liberação de NPsAg das membranas PVA^{EXT}-NPsAg em função do tempo</i>	47
4.2.7 <i>Estudo termodinâmico de liberação das NPsAg</i>	48
4.2.8 <i>Atividade antimicrobiana das membranas PVA^{EXT}-NPsAg</i>	50
4.2.9 <i>Ensaio de citotoxicidade in vitro da membrana PVA^{EXT}-NPsAg</i>	51
4.3 Técnicas de caracterização.....	55
4.3.1 <i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)</i>	55
4.3.2 <i>Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis)</i>	57
4.3.3 <i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	57
4.3.4 <i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	58
4.3.5 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva- EDS</i>	59
4.3.6 <i>Difração de raio X (DRX)</i>	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Extratos obtidos de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	61
5.1.1 <i>Caracterização físico-química do extrato de Cinnamomum zeylanicum</i>	62
5.1.1.1 <i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR</i>	62
5.1.1.2 <i>Análise termogravimétrica- TGA e DTG</i>	64
5.1.1.3 <i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	66
5.2 Biossíntese de redução das NPsAg com o extrato <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	66
5.2.1 <i>Estudo da cinética da biossíntese de redução da Ag⁺ pelo extrato de Cinnamomum zeylanicum</i>	67
5.2.2 <i>Caracterização por microscopia eletrônica de varredura- MEV e espectroscopia de energia dispersiva- EDS do extrato de Cinnamomum zeylanicum e do complexo extrato-NPsAg</i>	71
5.3 Obtenção da membrana PVA ^{EXT} -NPsAg por biossíntese <i>in situ</i> , na presença de PVA.....	74
5.3.1 <i>Caracterização físico-química da membrana PVA^{EXT}- NPsAg</i>	77
5.3.1.1 <i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier- FTIR</i>	77
5.3.1.2 <i>Determinação do teor gel do PVA reticulado</i>	82
5.3.1.3 <i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	83
5.3.1.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva- EDS</i>	87
5.3.1.5 <i>Difração de raio X (DRX)</i>	89
5.4 Estudo de intumescimento da membrana PVA ^{EXT} -NPsAg.....	91

5.4.1 Estudo da cinética do processo de intumescimento da membrana PVA ^{EXT} -NPsAg.....	94
5.5 Preparação da curva de calibração analítica para o estudo de liberação de NPsAg.....	95
5.5.1 Estudo de liberação de NPsAg das membranas PVA ^{EXT} -NPsAg em função do tempo a 37 e 40 °C.....	97
5.6 Estudo termodinâmico de liberação das NPsAg	100
5.7 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas PVA ^{EXT} -NPsAg	103
5.8 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> da membrana PVA ^{EXT} -NPsAg.....	106
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS.....	112

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. LIGAÇÃO GLICOSÍDICA COM A COMBINAÇÃO DA HIDROXILA DE UM CARBONO ANOMÉRICO DE UM MONOSSACARÍDEO COM A HIDROXILA DE OUTRO MONOSSACARÍDEO.....	20
FIGURA 2. ESQUEMA GERAL DAS ETAPAS DE FORMAÇÃO DE NPS POR SÍNTESE VERDE. ADAPTADO, PATAKALVI ET AL., 2007.....	23
FIGURA 3. ESTABILIZAÇÃO ESTÉRICA DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	24
FIGURA 4. ESQUEMA DA DUPLA CAMADA EM UMA SUPERFÍCIE DE CARGA POSITIVA (SHAW, 1992).	24
FIGURA 5. SÍTIOS DE AÇÃO DA PRATA (RAI ET AL., 2012).	26
FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DO POLI (ÁLCOOL) VINÍLICO, COMPOSTA DE GRUPOS HIDROXILA.	28
FIGURA 7. REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO POLI (ÁLCOOL) VINÍLICO (SATOH, 2014).	29
FIGURA 8. VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO.	30
FIGURA 9. PROCESSO DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS (OTTENBRITTE ET AL., 2010).....	32
FIGURA 10. EXTRAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO DA CANELA POR MACERAÇÃO DINÂMICA. ULTRASSOM (A), FILTRAÇÃO A VÁCUO (B).....	42
FIGURA 11. EXTRAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO DA CANELA POR DECOCCÃO. FERVURA (A), FILTRAÇÃO (B).	43
FIGURA 12. SOLUÇÃO DAS MEMBRANAS PVA-NPSAG NOS MOLDES PARA FORMAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS.....	45
FIGURA 13. MEMBRANA PVA-NPSAG PREPARADA POR BIOSÍNTESE <i>IN SITU</i> E RETICULADA COM ÁCIDO CÍTRICO A 2%.	45
FIGURA 14. ENSAIO DE INTUMESCIMENTO EM TRIPLICATA, DA MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG.....	47
FIGURA 15. MECANISMO DE ATUAÇÃO DO CORANTE SUPRAVITAL MTS NA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE UM MATERIAL.....	52
FIGURA 16. IRRADIADOR GAMMACELL DO CENTRO DE TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES DO INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES, CTR-IPEN, SÃO PAULO. O IRRADIADOR UTILIZA O ⁶⁰ Co COMO EMISSOR GAMA.	53
FIGURA 17. ESPECTROFOTÔMETRO SPECTRAMAX 190 UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR NOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DAS MEMBRANAS DE PVA ^{EXT} -NPSAG ATRAVÉS DO MÉTODO DO EXTRATO. (A) VISÃO GERAL DO EQUIPAMENTO, (B) DETALHE PARA INSERÇÃO DA PLACA ELISA E (C) RESULTADO OBSERVADO NAS PLACAS ELISA. A INTENSIDADE DA COR É PROPORCIONAL AO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS.	54
FIGURA 18. ESPECTROS UV-VIS COMPARATIVO DO EXTRATO VEGETAL DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i> E UMA SOLUÇÃO AQUOSA DO CINAMALDEÍDO PURO.	61
FIGURA 19. ESPECTRO FTIR COMPARATIVO DO EXTRATO DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i> E CINAMALDEÍDO PURO 63	63
FIGURA 20. ESTRUTURA QUÍMICA DO CINAMALDEÍDO.....	64
FIGURA 21. CURVAS TGA E DTGA DO EXTRATO DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i>	65
FIGURA 22. CURVA DSC DO EXTRATO LIOFILIZADO DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i>	66
FIGURA 23. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DURANTE O PROCESSO DA BIOSÍNTESE DAS NPSAG.	68
FIGURA 24. VARIAÇÃO DA COLORAÇÃO DA SOLUÇÃO, DURANTE A BIOSÍNTESE DE REDUÇÃO DAS NPSAG.	69
FIGURA 25. CINÉTICA FORMAÇÃO DAS NPSAG NA SOLUÇÃO AQUOSA DO EXTRATO DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i>	71
FIGURA 26. MICROGRAFIA MEV DO EXTRATO DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i> PURO.	72
FIGURA 27. MICROGRAFIA MEV DO COMPLEXO EXTRATO-NPSAG. (A) MAGNIFICAÇÃO 200x, (B) MAGNIFICAÇÃO 500x.	72
FIGURA 28. MAPEAMENTO MEV-EDS DE AG DEPOSITADA NA SUPERFÍCIE DA MATRIZ ORGÂNICA, MAGNIFICAÇÃO 7000x.	73
FIGURA 29. MAPEAMENTO MEV-EDS DE AG DEPOSITADA NA SUPERFÍCIE DA MATRIZ ORGÂNICA, MAGNIFICAÇÃO 15000 x.....	73
FIGURA 30. ESPECTRO DE EDS DO COMPLEXO EXTRATO-NPSAG.	74
FIGURA 31. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DA CINÉTICA DE NPSAG DURANTE A BIOSÍNTESE <i>IN SITU</i> DAS NPSAG.	75
FIGURA 32. AJUSTE DOS DADOS DA BIOSÍNTESE <i>IN SITU</i> DAS NPSAG, À CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM.	76
FIGURA 33. REAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO COM O PVA FORMANDO A RETICULAÇÃO (ÉSTER) ENTRE AS CADEIAS DE PVA.	77
FIGURA 34. ESPECTROS FTIR COMPARATIVOS DO ÁCIDO CÍTRICO PURO (A), PVA 5% (B) E PVA 5% RETICULADO COM ÁCIDO CÍTRICO 2%, ENTRE 4000-800 cm^{-1}	78
FIGURA 35. ESPECTRO FTIR COMPARATIVO DA MEMBRANA PVA PURA, RETICULADA COM ÁCIDO CÍTRICO 2%, E DA MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG, RETICULADA COM ÁCIDO CÍTRICO 2%.....	81
FIGURA 36. CURVAS TG COMPARATIVO DO PVA SEM CURAR E CURADO ENTRE 25 E 800°C.....	83
FIGURA 37. CURVAS TG COMPARATIVO DO PVA SEM CURAR E CURADO ENTRE 25 E 800°C.....	84
FIGURA 38. CURVAS TG COMPARATIVO DAS MEMBRANAS PVA ^{EXT} -NPSAG COM PVA CURADO ENTRE 25 E 800°C.....	85
FIGURA 39. CURVAS TG COMPARATIVO DAS MEMBRANAS PVA ^{EXT} -NPSAG COM PVA CURADO ENTRE 25 E 800°C.....	86
FIGURA 40. MICROGRAFIAS MEV: (A) MEMBRANA DE PVA 5%, (B) MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG.....	87
FIGURA 41. MAPEAMENTO MEV-EDS DE AG DEPOSITADAS NA MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG.....	88
FIGURA 42. FORMAÇÃO COLOIDAL DE NPSAG, COM REGIÕES ESTRUTURAIS HIDROFÍLICA E HIDROFÓBICA.....	88
FIGURA 43. ESPECTRO EDS DA MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG.....	89
FIGURA 44. DIFRATOGRAMA DAS AMOSTRAS COM AgNO_3 0,04M; 0,06M E 0,1M.....	90
FIGURA 45. GRAU DE INTUMESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA A MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG.....	91

FIGURA 46. MECANISMO DE RETICULAÇÃO DO PVA COM O ÁCIDO CÍTRICO.....	92
FIGURA 47. AJUSTE DOS DADOS DE INTUMESCIMENTO DA MEMBRANA PVA-NPsAG A 23 °C.	93
FIGURA 48. AJUSTE DOS DADOS DE INTUMESCIMENTO À CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM À TEMPERATURA DE 23 °C.	94
FIGURA 49. CURVAS UV-VIS DE SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPLEXO EXTRATO-NPsAG.....	95
FIGURA 50. CURVA DE CALIBRAÇÃO LINEAR DA ABSORBÂNCIA X CONCENTRAÇÃO (MG/ML) DO COMPLEXO EXTRATO NPsAG.	96
FIGURA 51. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE NPsAG DA MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPsAG A 37 °C.....	97
FIGURA 52. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE NPsAG DA MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPsAG A 40 °C.....	98
FIGURA 53. CURVAS DE AJUSTE A CINÉTICA DE REAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM DOS DADOS DE LIBERAÇÃO DE NPsAG A 37 °C.	99
FIGURA 54. CURVAS DE AJUSTE A CINÉTICA DE REAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM DOS DADOS DE LIBERAÇÃO DE NPsAG A 40 °C.	100
FIGURA 55. MEDIDAS DOS HALOS INIBITÓRIOS. (A) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , (B) <i>ESCHERICHIA COLI</i>	104
FIGURA 56. HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	104
FIGURA 57. HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	105
FIGURA 58. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVA E GRAM-NEGATIVA.	106
FIGURA 59. CURVAS DE VIABILIDADE CELULAR.	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. EXPOENTE DE DIFUSÃO E MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE SOLUTO PARA DIFERENTES GEOMETRIAS.	34
TABELA 2. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i> POR MACERAÇÃO DINÂMICA.	62
TABELA 3. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA O ESTUDO CINÉTICO DA FORMAÇÃO DAS NPSAG A PARTIR DO AJUSTE DOS DADOS À EQUAÇÃO 29.	70
TABELA 4. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA O ESTUDO CINÉTICO DA FORMAÇÃO DAS NPSAG A PARTIR DO AJUSTE DOS DADOS À EQUAÇÃO 29.	75
TABELA 5. PRINCIPAIS MODOS VIBRACIONAIS CORRESPONDENTES AO (A) ÁCIDO CÍTRICO, (B) PVA 5%, E (C) MEMBRANA DE PVA RETICULADA COM ÁCIDO CÍTRICO 2%.	78
TABELA 6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO CÍTRICO SOBRE O INTUMESCIMENTO E TEOR GEL DAS MEMBRANAS PVA 5%.....	82
TABELA 7. ETAPAS DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA, OBTIDAS DO TERMOGRAMA TGA DO PVA SEM CURAR E CURADO.	84
TABELA 8. ETAPAS DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA, OBTIDAS DAS CURVAS TG DAS MEMBRANAS PVA ^{EXT} -NPSAG.	86
TABELA 9. VALOR MÉDIO DO DIÂMETRO DAS NPSAG, NAS RESPECTIVAS MEMBRANAS, CALCULADO PELA EQUAÇÃO DE SCHERRER. UTILIZOU-SE $k=0,94$, $\lambda=0,1542\text{nm}$ E $\theta = 19,0500^\circ$ (111).	90
TABELA 10. VALORES DE N , k E R^2 OBTIDOS PELA REGRESSÃO LINEAR DO MODELO DE FICK (EQUAÇÃO 5) PARA A MEMBRANA PVA ^{EXT} -NPSAG A 23 °C.....	93
TABELA 11. VALORES DE ABSORBÂNCIA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 423 NM NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPLEXO EXTRATO-NPSAG.	96
TABELA 12. PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICAS ENCONTRADOS NO ESTUDO FÍSICO E QUÍMICO DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO.	103
TABELA 13. MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E <i>ESCHERICHIA COLI</i>	104
TABELA 14. CLASSIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS COM ESTRATIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE VIABILIDADE CELULAR EM PORCENTAGEM DE ACORDO COM A ISO 10993-5.	108

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Reflexão Total Atenuada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMF	Dimetilformida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raio X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTGA	Termogravimetria derivada
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPs	Nanopartículas
NPsAg	Nanopartículas de prata
PCA	Plate Count Agar
PVA	Poli (álcool vinílico)
PVA-NPsAg	Membrana hidrogel formada pelo PVA e NPsAg
PVA ^{EXT} -NPsAg	Membrana hidrogel intumescida no extrato <i>Cinnamomum zeylanicum</i>
RPS	Ressonância de plasmon de superfície
SLC	Sistema de liberação controlada
Tg	Temperatura de transição vitrea
TGA	Análise Termogravimétrica
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV-vis	Ultravioleta visível

RESUMO

HELOU, G.M.R. **Biossíntese de nanopartículas de prata utilizando *Cinnamomum zeylanicum* em matriz de hidrogel para aplicação biomédica.** 2018. Tese de Doutorado-Materiais para Engenharia – Universidade Federal de Itajubá.

A presente tese objetivou realizar o estudo da biossíntese de redução de nanopartículas de prata (NPsAg) *in situ*, na presença do poli (álcool vinílico) (PVA), utilizando extrato aquoso de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) como agente redutor e estabilizante e ácido cítrico, como agente reticulante para obtenção e caracterização da membrana de hidrogel PVA^{EXT}-NPsAg, para aplicação no tratamento de feridas cutâneas. A biossíntese *in situ* de NPsAg na presença de PVA, foi confirmada por espectroscopia UV-vis, a partir da banda RPS observada em 423 nm. O estudo cinético da biossíntese *in situ* das NPsAg a 23 °C mostrou que esta segue uma cinética de primeira ordem, com $k= 0,017\text{min}^{-1}$. A reticulação do PVA com ácido cítrico 2%, foi confirmada por FTIR, a partir da formação da ligação éster, em 1713 cm^{-1} . O estudo termogravimétrico mostrou maior estabilidade térmica das membranas PVA^{EXT}-NPsAg se comparada ao PVA puro. O mapeamento MEV-EDS revelou a presença de agregados de NPsAg distribuídos ao longo da superfície da membrana. O valor médio do diâmetro das NPsAg das membranas PVA^{EXT}-NPsAg a 0,04, 0,06 e 0,1, foi de 12 nm, 11 nm e 9 nm, respectivamente. O estudo do intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg em água destilada a 23 °C revelou um grau de intumescimento no equilíbrio de 130 %. O ajuste dos dados à equação de Fick, mostraram um valor de constante difusional $n \leq 0,5$, e constante de proporcionalidade $k=0,509$. O estudo cinético do intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg, em água destilada a 23°C foi ajustado a uma cinética de primeira ordem, utilizando o modelo de Lagergren. O ajuste linear forneceu o valor de $k= 0,117\text{ min}^{-1}$. Para o estudo da liberação de NPsAg foi construída uma curva analítica de calibração, que obteve a equação da reta por regressão linear $R^2= 0,95$. O estudo cinético e termodinâmico de liberação das NPsAg foi realizado em água destilada a 37 °C e 40 °C. O estudo cinético de liberação de NPsAg para ambas as temperaturas foi ajustado a uma cinética de primeira ordem. A constante de velocidade foi $k= 0,00209\text{ min}^{-1}$ em 37 °C e $k= 0,0742\text{ min}^{-1}$ em 40 °C. A energia de ativação determinada a partir da equação de Arrhenius foi de 959,87 kJ/mol. O estudo termodinâmico foi realizado a partir da equação de Eyring Polanyi e mostrou que o sistema de liberação não é espontâneo, com valores de $\Delta G_0^\ddagger= 91,93\text{ kJ/mol}$ a 37 °C e $\Delta G_0^\ddagger= 83,55\text{ kJ/mol}$ a 40 °C. O sistema de liberação é endotérmico com entalpia de 957,28 kJ/mol. A variação de entropia revela uma desordem, do sistema, sendo $\Delta S_0^\ddagger= 2,76\text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$ a 37 °C e $\Delta S_0^\ddagger= 2,76\text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$ a 40 °C. O estudo da atividade antimicrobiana mostrou que a membrana PVA^{EXT}-NPsAg é eficaz tanto para a bactéria *Staphylococcus aureus* como para a bactéria *Escherichia coli*. A ação antimicrobiana foi eficaz a partir da concentração de 0,02 mol/L de AgNO₃. O ensaio de citotoxicidade da membrana PVA^{EXT}-NPsAg, contra linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO-K1, ATCC CCL 61, American Type Culture Collection) mostrou que a viabilidade celular se manteve > 90%, para todas as concentrações de extratos estudadas, sendo a membrana PVA^{EXT}-NPsAg considerada não citotóxica.

Palavras-chave: Biossíntese *in situ*, nanopartículas de prata, Poli (álcool vinílico), *Cinnamomum zeylanicum*.

ABSTRACT

HELOU, G.M.R. **Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* in hydrogel matrix for biomedical application.** 2018. Thesis -Materials Engineering- Federal University of Itajubá.

The aim of the present thesis was to study the biosynthesis of silver nanoparticles reduction (AgNPs) *in situ* in the presence of polyvinyl alcohol (PVA), using aqueous extract of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) as reducing and stabilizer agent and citric acid, as crosslinking agent in order to obtain and characterize the PVA^{EXT}-AgNPs hydrogel membrane, for application in the treatment of cutaneous wounds. *In situ* biosynthesis of AgNPs in the presence of PVA was confirmed by UV-vis spectroscopy from the RPS band observed at 423 nm. The kinetic study of the *in situ* biosynthesis of AgNPs at 23 °C showed that this follows a first order kinetics, with $k=0.0021 \text{ min}^{-1}$. The thermogravimetric study showed higher thermal stability of PVA^{EXT}-AgNPs membranes compared to pure PVA. The MEV-EDS mapping of the PVA^{EXT}-AgNPs membrane revealed the presence of AgNPs aggregates distributed along the membrane surface. The middle value diameter of nanoparticles of PVA^{EXT}-AgNPs membranes was 0.04, 0.06 e 0.1, was 12 nm, 11 nm e 9 nm, respectively. The study of PVA^{EXT}-AgNPs membrane swelling in distilled water at 23 °C revealed a degree of swelling at equilibrium of 130%. The swelling values adjusted to the beginning of the process, at temperature of 23 °C, by the equation of Fick, diffusional $n \leq 0.5$ constant presented, and proportionality constant $k = 0.509$. The kinetic study of PVA^{EXT}-AgNPs membrane swelling process in distilled water, in the first few minutes, at 23 °C was adjusted to a first-order kinetics, using the model of Lagergren. The linear adjustment provided the value $k = 0.117 \text{ min}^{-1}$. For the study of AgNPs release was built an analytical calibration curve, linear regression $R^2 = 0.95$. The kinetic and thermodynamic study of AgNPs release was carried out in distilled water a 37 °C e 40 °C. The kinetic study of AgNPs release at both temperatures was adjusted to a first order kinetics. The rate constant was $k= 0.00209 \text{ min}^{-1}$ at 37 °C and $k=0.0742 \text{ min}^{-1}$ at 40 °C. The activation energy was determined from the Arrhenius equation of 959.87 kJ/mol. The thermodynamic study was performed from the Eyring equation and presented the non-linear release system, with values of $\Delta G_0^\ddagger=91.93 \text{ kJ/mol}$ at 37 °C and $\Delta G_0^\ddagger=83.55 \text{ kJ/mol}$ at 40 °C. The release system is endothermic with enthalpy of 957.28 kJ/mol. The entropy change reveals a slight increase in the disorder, with $\Delta S_0^\ddagger= 2.76 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$ at 37 °C and $\Delta S_0^\ddagger=2.76 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$ at 40 °C. The study of antimicrobial activity showed that the PVA^{EXT}-AgNPs membrane is effective for both bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antimicrobial action was effective from the concentration of 0.02 mol/L AgNO₃. The PVA^{EXT}-NPsAg membrane cytotoxicity assay against chinese hamster ovary cell lines (CHO-K1, ATCC CCL 61, American Type Culture Collection) showed that cell viability remained > 90% for all concentrations of extracts studied, being the PVA^{EXT}-AgNPs membrane considered non-cytotoxic.

Key words: Biosynthesis *in situ*, Silver nanoparticles, Poly (vinyl alcohol), *Cinnamomum zeylanicum*.

1 INTRODUÇÃO

O uso da química verde para a síntese de nanopartículas metálicas, aliada às propriedades funcionais do poli (álcool vinílico) (PVA), confere aos filmes poliméricos de PVA contendo nanopartículas de prata, potencial aplicação biomédica.

A escolha da síntese verde está relacionada com capacidade das plantas em atuarem na redução, na proteção e na estabilização das nanopartículas metálicas devido aos seus metabólitos secundários, compostos orgânicos elaborados pelos vegetais, para adaptação das espécies e sua sobrevivência. A redução das partículas da prata na escala nanométrica infere mudanças nas suas propriedades, resultando no aumento da razão entre a área superficial e volume, que potencializam suas características em relação à sua forma de *bulk* (macrométrica).

O PVA se tornou um polímero apropriado para a obtenção de filmes poliméricos devido à capacidade de formar hidrogel através de reticulação física ou química, além das propriedades de solubilidade em água, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e resistência mecânica. A vantagem de se utilizar o PVA como matriz polimérica em forma de filme, é a possibilidade de incorporação das nanopartículas de prata (NPsAg) como agente ativo, para atuar diretamente no sítio de ação e na proporção adequada. O interesse pelas NPsAg reside no fato de serem descritas como eficientes agentes contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas resistentes a antibióticos.

A incidência e a prevalência de feridas crônicas vêm crescendo em decorrência da mudança do perfil da população brasileira, acompanhada de hábitos de vida inadequados. O aumento da expectativa de vida constitui-se em um fenômeno mundial e também está associado a um aumento do aparecimento de feridas crônicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) nos próximos 43 anos, o número de pessoas com mais de 60 anos representará um quarto da população mundial, cerca de 2 bilhões de indivíduos, em um total de 9,2 bilhões. A população de idosos da América Latina e Caribe passou de 10 % do total da população em 2010, com previsão de 21% em 2040, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU). O Brasil, tem acompanhado esse crescimento mundial e o número de pessoas idosas com 80 anos ou mais, pode passar de 19 milhões em 2060, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

As feridas crônicas são chamadas de úlceras. São prevalentes e correspondem a 94,74% das lesões, em relação às feridas agudas que representam 5,26% (ROCHA et al., 2013). As úlceras independentemente da etiologia, são recorrentes e incapacitantes, impossibilitando o portador dessas feridas, a realização de suas atividades da vida diária. Requerem longos tratamentos para cicatrização e causam impacto socioeconômico ao sistema de saúde e previdenciário (SOUZA et al., 2013).

Ao longo dos anos a prestação de cuidados em feridas foi evoluindo, assim como a ciência, a tecnologia e a indústria farmacêutica. A competitividade do mercado tornou-se grande, levando ao aparecimento de novos produtos no tratamento das feridas. Na atualidade, a prata reaparece no cenário das pesquisas, reduzida em nanopartículas. Nessa escala nanométrica, a superfície das nanopartículas de prata é maximizada, ampliando seu potencial antimicrobiano. Todo esse benefício pode ser utilizado na forma de curativos com ação no controle da população bacteriana durante o preparo do leito de uma ferida no processo de cicatrização (WILKINSON et al., 2011).

Na escolha de um curativo contendo nanopartículas de prata, deve-se levar em consideração as características de liberação da prata pelo curativo. Um curativo antimicrobiano deve possuir características para promoção de um ambiente úmido para aumentar a cicatrização e um amplo espectro antimicrobiano, com baixo potencial de resistência. Por outro lado, deve ter baixa toxicidade, ação rápida, não provocar irritação ou sensibilização, não promover aderências e ser efetivo mesmo na presença de importante exsudato, saída de líquidos orgânicos através das paredes e membranas celulares, provocada na lesão (RIGO et al., 2012).

Os filmes de hidrogel de PVA com nanopartículas de prata incorporadas, apresentam ação tópica, efeito bactericida e capazes de intumescer, mantendo o ambiente úmido, favorecendo a proteção da lesão, até a reparação tecidual (GAHARWAR et al., 2014). Atualmente estão disponíveis no mercado curativos antimicrobianos baseados em NPsAg. No entanto ainda há a necessidade do desenvolvimento de tecnologia nacional competitiva.

Neste contexto, a presente tese objetivou o estudo cinético da biossíntese de redução de NPsAg *in situ*, na presença do PVA, utilizando extrato aquoso de *Cinnamomum zeylanicum*, como agente redutor e estabilizante e ácido cítrico como agente reticulante, para obtenção e caracterização da membrana de hidrogel PVA^{EXT}-NPsAg, visando contribuir para o tratamento de feridas cutâneas. A membrana PVA^{EXT}-NPsAg desenvolvida neste estudo é capaz de intumescer, liberando de maneira controlada as NPsAg, mantendo o ambiente úmido, favorecendo a proteção da ferida, até a reparação tecidual. Apresenta boa relação

custo-benefício e produção com utilização de equipamentos e técnicas convencionais, visando um tratamento eficaz de feridas sépticas em portadores de comorbidade, com processo de cicatrização comprometido.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar o estudo da biossíntese de redução de nanopartículas de prata (NPsAg) *in situ*, na presença do poli (álcool vinílico) (PVA), utilizando extrato aquoso de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) como agente redutor e estabilizante e ácido cítrico, como agente reticulante para obtenção e caracterização da membrana de hidrogel PVA^{EXT}-NPsAg, para aplicação no tratamento de feridas cutâneas.

2.2 Específicos

- Realizar a extração dos princípios ativos do *Cinnamomum zeylanicum*, por maceração dinâmica e decocção.
- Realizar a caracterização físico-química do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), por análise termogravimétrica (TGA), análise termogravimétrica derivada (DTGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Realizar o estudo da cinética da biossíntese de redução das NPsAg utilizando o extrato de *Cinnamomum zeylanicum*.
- Realizar a caracterização físico-química do complexo extrato-NPsAg, utilizando microscopia eletrônica de varredura - MEV e espectroscopia de energia dispersiva - EDS.
- Realizar a biossíntese *in situ*, na presença de PVA, para obtenção da membrana PVA^{EXT}-NPsAg.
- Realizar a caracterização físico-química da membrana PVA^{EXT}-NPsAg por FTIR, determinação do teor gel, TGA, MEV-EDS e DRX.
- Realizar o estudo do intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg.
- Realizar o estudo de liberação das NPsAg da membrana PVA^{EXT}-NPsAg em função do tempo e o estudo termodinâmico de liberação das NPsAg.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da membrana PVA^{EXT}-NPsAg, utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Realizar o ensaio de citotoxicidade *in vitro* da membrana PVA^{EXT}-NPsAg.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biossíntese para obtenção de NPsAg

A síntese verde ou biossíntese é um método utilizado para a obtenção de NPsAg por meio de organismos biológicos, ou partes deles como órgãos, tecidos, células ou biomoléculas, que atuam como agentes redutores e estabilizadores das nanopartículas, como substituintes de reagentes químicos. Estes agentes são capazes de reduzir íons metálicos (Ag^+) para a sua forma metálica (Ag^0), de forma rápida e em condições normais de temperatura e pressão. Como estabilizantes, recobrem a superfície das nanopartículas, mantendo-as afastadas umas das outras e dispersas no meio, evitando o processo de agregação das nanopartículas sintetizadas (SHARMA, 2009).

Nesse método as NPsAg são sintetizadas em meio aquoso, no qual os átomos de prata dissolvidos na solução se juntam para formar agregados de tamanho nanométrico. Essa rota de síntese utiliza solventes menos tóxicos, e, portanto, de menor impacto ambiental, além do custo de produção ser menor, comparados aos métodos físicos e químicos (IRAVANI, 2011). O solvente a ser utilizado no preparo do extrato de plantas também possui relevância e podem incluir hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e água. No estudo de Zahir e Rahuman (2012), comparando a eficiência do rendimento da síntese verde na atividade biológica das nanopartículas metálicas, observou-se que a fração aquosa apresentou os resultados mais satisfatórios. De um modo geral essa síntese coloidal de nanopartículas baseia-se em quatro componentes: o meio da reação, o precursor, o agente redutor e o estabilizante. O meio é a fase líquida onde a reação irá ocorrer. O precursor é o composto químico que irá fornecer o material para formar as partículas e a ação do agente de redução e estabilização, depende das partes da planta que compõe o extrato (MARCATO, 2012).

Cada parte da planta apresenta um perfil fitoquímico constituído de princípios ativos em diferentes concentrações. A combinação desses constituintes químicos e as condições da parte da planta selecionada podem definir a eficiência do extrato como agente sintetizador das nanopartículas. Estudos relatam o uso de folhas, sementes, raízes, cascas, flores e frutos na obtenção de características variadas das nanopartículas sintetizadas (TRIPATHY, 2010, LUKMAN et al., 2011, GNANADESIGAN et al., 2012, NETHRADEVI et al., 2012, QUELEMES et al., 2013).

O uso do extrato obtido das folhas de *Ocimum sanctum* (manjeriçã) utilizado para sintetizar NPsAg resultou em nanopartículas com diâmetro de 25 a 40 nm (PATIL et al.,

2012). Diferentes resultados foram obtidos em outro estudo utilizando extratos do caule e raiz da mesma planta, com obtenção de NPsAg de 10 nm e 5 nm, respectivamente (AHMAD et al., 2010). O estudo de Kumar et al. (2010) comparou a composição dos extratos de *Syzygium cumini* (jambo) provenientes das folhas e das sementes da planta e foi observado que os extratos levaram à formação de NPsAg esféricas com taxas de formação e diferentes diâmetros, fato que foi atribuído ao conteúdo de polifenóis presentes nos extratos. Esses dados exemplificam as possíveis diferenças nas características do produto final da síntese de acordo com a parte da planta utilizada. Geralmente, nanopartículas biosintetizadas possuem forma esférica (RAI, 2013).

As plantas podem atuar como agentes redutores de sais metálicos e como agentes estabilizantes, evitando o processo de agregação das nanopartículas sintetizadas, devido aos seus numerosos metabólitos secundários. Esses compostos orgânicos, constituem os princípios ativos, moléculas de baixo peso molecular com função de adaptação das plantas aos diferentes ecossistemas e representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (INGALE, 2013).

Os três grupos de metabólitos secundários mais importantes nas plantas incluem os terpenos, composto químico constituinte dos óleos voláteis, presentes em estruturas secretoras especializadas, os compostos fenólicos, os quais são derivados dos carboidratos e que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila e os alcaloides, derivados dos aminoácidos, principais constituintes das proteínas, compostos orgânicos com ao menos um átomo de nitrogênio em seu anel (NWOKEJI et al., 2016). A presença desses constituintes metabólicos pode ter efeito sinérgico benéfico, o que confere aos extratos vegetais certa vantagem sobre os antimicrobianos tradicionais que possuem apenas um princípio ativo. Embora esses compostos de origem vegetal possam atuar na redução, na proteção e na estabilização das nanopartículas, um mecanismo específico da síntese verde mediada por plantas deve ainda ser elucidado (DURAN et al., 2011).

Para a seleção do vegetal a ser utilizado como agente redutor deve-se levar em consideração, além da parte do vegetal, a presença de compostos redutores capazes de sintetizar as nanopartículas. Neste estudo foi utilizada a casca da espécie *Cinnamomum zeylanicum*. Na casca dessa espécie são encontrados compostos químicos, como o aldeído cinâmico na fase oleosa em torno de 65% e uma variedade de polifenóis em torno de 35%.

O isolamento desses constituintes químicos, pode ser realizado a partir da extração vegetal, os quais são extraídos na sua totalidade, sem que nenhum seja especificamente isolado (AKHTAR et al., 2013).

A presença do polissacarídeo é um fator importante, pois na biossíntese de redução da prata este glicídio atua como agente redutor e favorece a estabilização das nanopartículas, evitando a agregação da prata formada durante o processo da biossíntese (LOGESWARI et al., 2015). O polissacarídeo presente no extrato pode estar relacionado com possíveis funções mecânicas e metabólicas nos vegetais (NWOKEJI et al., 2016) e tem origem na mucilagem, substância macromolecular de natureza glicídica, presente em torno de 1,6 a 2,9% da composição química do extrato. A mucilagem é um hidrocoloide vegetal, substância amorfa, capaz de se tornar viscosa na presença de água. É um produto do metabolismo no interior da célula, resultado da polimerização de um monossacarídeo ou mistura de diversos monossacarídeos e pode ser produzida sem prejuízo para as plantas. A mucilagem é frequentemente encontrada, nas células da epiderme das folhas, em cascas, sementes e também em raízes (JANI et al., 2009).

Polissacarídeos são carboidratos compostos por grande quantidade de moléculas de monossacarídeos (açúcares simples). O monossacarídeo presente na formação dos polissacarídeos da mucilagem de *Cinnamomum zeylanicum* é uma glicose e por apresentar um grupamento aldeído ($\text{H}-\text{C}=\text{O}$), caracteriza-se como aldose. Nos monossacarídeos com 5 ou mais átomos de carbono, como é o caso da aldose, a forma cíclica é predominante, porque os grupos hidroxila ($-\text{OH}$) e carbonila ($\text{C}=\text{O}$), de uma mesma molécula, interagem entre si, originando o anel. Esses monossacarídeos cíclicos possuem um carbono anomérico, que está envolvido na ligação glicosídica da molécula. Nesta ligação ocorre a combinação da hidroxila de um carbono anomérico de um monossacarídeo com a hidroxila de outro monossacarídeo, produzindo água, Figura 1.

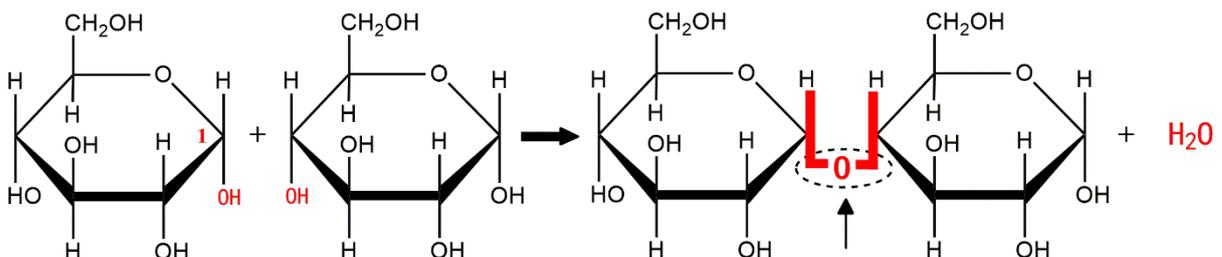


Figura 1. Ligação glicosídica com a combinação da hidroxila de um carbono anomérico de um monossacarídeo com a hidroxila de outro monossacarídeo.

(NELSON; COX, 2011)

A extração vegetal retira de forma mais seletiva as substâncias ou as frações ativas contidas no vegetal. Na escolha de um método extrativo deve-se avaliar o material vegetal, o meio extrator (solvente) e a metodologia de extração. O poder de penetração do solvente depende da textura da parte da planta a ser extraída. Quanto maior o grau de divisão da droga maior será a superfície de contato com o meio extrator e quanto mais rígido o material, menor deve ser a sua granulometria. Com relação ao solvente extrator escolhido, este deve ser o mais seletivo possível. Essa seletividade depende do grau de polaridade das substâncias presentes na planta as quais se deseja extrair. Além dos fatores relacionados à eficiência do processo extrativo, devem ainda ser considerado a toxicidade ou riscos que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas e a disponibilidade e o custo do solvente (VELAYUTHAM et al., 2013).

Na metodologia de extração deve-se considerar fatores como a agitação, que pode abreviar consideravelmente a duração de um processo extrativo devido ao fato de que os processos de extração dependem, em grande parte, de fenômenos de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver desempenha um papel de grande influência na velocidade da dissolução. A temperatura provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que aqueles realizados à temperatura ambiente. Entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas. O tempo é um fator que pode variar em função da rigidez dos tecidos do material vegetal, do seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente e do emprego, ou não, de temperatura e/ou agitação (AZWANIDA et al., 2015).

Dentre os métodos de extração sólido-líquido mais comumente empregados, destacam-se os processos a frio como a maceração e percolação, a quente em sistemas abertos, como a infusão e decocção e a quente em sistemas fechados, utilizando o aparelho de Soxhlet e destilação por arraste a vapor. Os métodos não convencionais incluem a extração por micro-ondas, ultrassom, extração por fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado e microextração em fase sólida (AZMIR et al., 2013).

Neste estudo utilizou-se os processos de maceração dinâmica e decocção. A maceração explora o fenômeno de difusão do solvente através do tecido vegetal. Consiste em colocar a droga em contato com a quantidade de solvente preestabelecida, à temperatura ambiente, em recipiente fechado, durante horas ou dias. Na extração por maceração dinâmica, a mistura em extração é mantida sob agitação por um tempo determinado (KHAN, et al., 2012). Este processo de extração é utilizado para a produção em pequena escala e quando os

princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pelo ar e são solúveis a temperatura ambiente, em um solvente que não deve ser volátil. A velocidade com que se obtém o equilíbrio é função do tamanho de partícula e do grau de inchamento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente. A extração por decocção consiste em manter o material vegetal em contato com um solvente sob aquecimento durante certo período. Normalmente, o solvente utilizado é a água, em ebulição a 100 °C. Este processo de extração pode ser utilizado em materiais vegetais duros e de natureza lenhosa. Ressalta-se que, se o aquecimento for muito prolongado, poderá haver a alteração das substâncias ativas (CHIKEZIE et al., 2015).

O processo da extração implica basicamente duas etapas: a separação dos compostos específicos de partes da planta moída ou não com a utilização de um solvente, e a determinação da concentração, por eliminação dos solventes. A eficiência da atividade biológica dos extratos vegetais depende da espécie utilizada, concentração do princípio ativo presente na planta, a fonte de origem (caule, folhas, sementes), método de obtenção e estabilidade dos componentes. Estudos têm demonstrado que alguns extratos vegetais possuem efeitos muito próximos aos dos antibióticos disponíveis no mercado (CAUERHFF; CASTRO, 2013).

3.2 Estabilização das NPsAg

Na biossíntese, utiliza-se o extrato obtido das plantas, misturado a uma solução aquosa de sal metálico. No caso das NPsAg, em geral, utiliza-se o nitrato de prata (AgNO_3), como sal precursor para ocorrer a biorredução. Com a redução dos sais metálicos inicia-se a precipitação e inúmeros núcleos são inicialmente formados, mas estes tendem a se agregar para formar cristais termodinamicamente mais estáveis, ocorrendo o processo de nucleação. O núcleo pode aumentar por mecanismos de difusão formando as partículas primárias seguido do crescimento, no qual mais átomos colidem formando agregados ou partículas secundárias, Figura 2. A agregação é promovida pela força iônica e alteração do pH, reduzindo a repulsão eletrostática, promovendo a agregação de partículas. Por fim, ocorre a estabilização pelo esgotamento dos íons metálicos na solução ou pelo recobrimento da partícula por compostos presentes no extrato impedindo a aglomeração (PATAKFALVI et al., 2007).

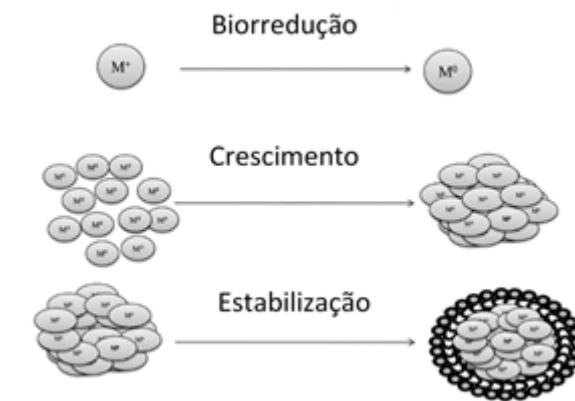


Figura 2. Esquema geral das etapas de formação de NPs por síntese verde. Adaptado, Patakfalvi et al., 2007.

Na etapa de crescimento das partículas coloidais, o principal fator limitante deste processo é a difusão. Sendo assim, a concentração do extrato, o gradiente de concentração do sal metálico, o pH, a temperatura e a ordem em que os reagentes são adicionados à solução são os fatores predominantes que determinam a cinética da reação e que podem afetar o tamanho das partículas e sua distribuição, o teor de cristalinidade, a estrutura cristalina e o grau de dispersão (MITTAL et al., 2013). Para produzir nanopartículas, a etapa de nucleação deve ser relativamente rápida e a de crescimento relativamente lenta (POLTE, 2015).

As nanopartículas recém-sintetizadas, devido à sua escala nanométrica têm uma alta relação de área de superfície e volume, resultando em uma alta reatividade e, portanto, são termodinamicamente instáveis com tendência natural de se agregarem e crescerem. Para ficarem mais estáveis, as partículas menores acabam se juntando, tornando-se maiores e com dimensões que podem exceder os limites nanométricos (YAO et al., 1993). As nanopartículas de metais de transição apresentam essa tendência de agregação, pois são estáveis apenas cineticamente, uma vez que a formação do metal volumoso (*bulk*) corresponde a um ponto mínimo de energia. E embora em alta concentração as nanopartículas possam se agregar mais rapidamente, apenas dispersá-las em uma quantidade maior de líquido não é suficiente para garantir a estabilidade por longos períodos.

A estabilidade das nanopartículas é determinada pelas forças de atração e repulsão entre as partículas, o que depende de suas características físico-químicas e da interface partícula-solvente. A força de atração está sempre presente, devido à tendência das partículas de estarem em contato umas com as outras através da força de van der Waals. A estabilidade é atingida quando as forças repulsivas superaram as forças de atração. Assim, para as nanopartículas permanecerem estabilizadas e manterem-se nesta escala de tamanho sem sofrer decomposição, agregação, crescimento e se apresentarem monodispersas, utiliza-se

basicamente mecanismos de interação repulsiva como a estabilização estérica e a estabilização eletrostática (GADE et al., 2010).

Na estabilização estérica, as nanopartículas são revestidas superficialmente com uma camada de polímero por meio da interação coulombiana, por meio de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals ou pela combinação destas, Figura 3. Esta adsorção de polímeros na superfície das partículas coloidais cria uma barreira mecânica que impede a aproximação entre as nanopartículas. Esse mecanismo de estabilização depende das características superficiais da partícula, da configuração esquemática do polímero adsorvido e da espessura da camada de adsorção. Para uma estabilização estérica efetiva, é necessário um polímero com uma massa molecular maior que 10000 g/mol (POMOGAILO; KESTELMAN, 2005).

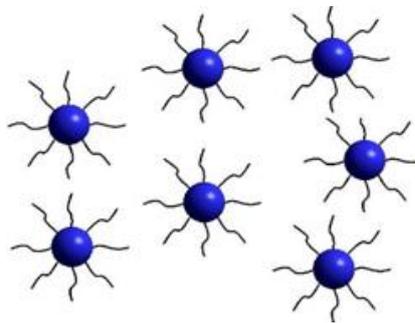


Figura 3. Estabilização estérica das nanopartículas metálicas.

A estabilização eletrostática é o resultado da formação de uma camada dupla de íons adsorvidos em cada nanopartícula metálica carregadas eletricamente, dispersas em um líquido polar, a água ou solvente orgânico. Essa dupla camada consiste de uma camada fixa, mais próxima à superfície, chamada de camada de *Stern*, constituída de íons de carga contrária adsorvidos à superfície da partícula e de uma camada móvel de íons, a camada difusa, conforme Figura 4.

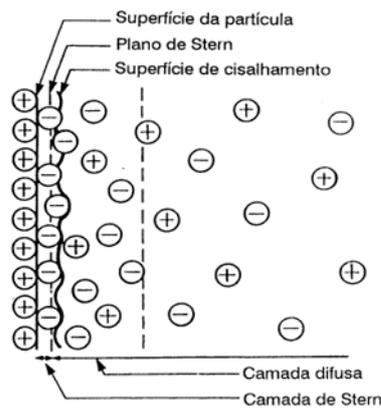


Figura 4. Esquema da dupla camada em uma superfície de carga positiva (SHAW, 1992).

Esta estabilização ocorre quando as forças repulsivas superam as forças atrativas de Van der Waals entre as partículas. Este mecanismo de estabilização está basicamente restrito aos sistemas aquosos, devido à elevada constante dielétrica da água, definida como a capacidade da água de influenciar os campos elétricos dos íons, reduzindo a força de atração entre os íons de carga opostas, diminuindo a força de atração. Em princípio, este mecanismo também funciona em solventes orgânicos, porém as cargas da superfície são muito menores, isto é, a espessura da camada elétrica dupla é consideravelmente reduzida e normalmente não é suficiente para evitar eficazmente a aglomeração das partículas (GOGOTSI, 2006).

3.3 Ação antimicrobiana das NPsAg

A ação antimicrobiana da prata metálica é conhecida e utilizada há milênios por inúmeras civilizações antigas. No entanto, os estudos efetivos dos benefícios da prata no uso medicinal datam aproximadamente do século XIX, tornando-se comum em medicamentos de uso tópico, nos tratamentos de queimaduras, feridas crônicas e para prevenir doenças oculares em recém-nascidos (SINTUBIN et al., 2012).

Com a descoberta da penicilina no início do século XX, foi introduzida a era moderna dos antibióticos, fato que ocasionou a redução do uso da prata como agente bactericida (EDWARDS-JONES, 2009). Porém, com o uso dos antibióticos, surgiram as cepas resistentes, ocasionando um problema de saúde pública, afetando todos os países, desenvolvidos ou não.

Devido à essa crescente resistência bacteriana aos antibióticos, recentemente tem havido um interesse renovado na utilização da prata como alternativa de agente antibacteriano. Nesse novo cenário as NPsAg estão em evidência, pois com o advento da nanotecnologia tem sido possível a manipulação da prata em escala nanométrica. A escala em nanômetros corresponde a 1×10^{-9} do metro, ou seja, um bilionésimo do metro e com dimensões no intervalo de 1-100 nm (KELSALL, 2005).

A redução das partículas da prata nessa escala nanométrica infere mudanças nas suas propriedades, resultantes principalmente do aumento da razão entre a área superficial e volume (PANACEK et al., 2006), que potencializam suas características em relação à sua forma de *bulk* (macrométrica). Como as reações químicas ocorrem na superfície, significa que as nanopartículas são extremamente mais reativas do que uma massa de material feito de partículas maiores (GUOZHONG, 2004).

As NPsAg têm sido descritas como eficientes agentes contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas incluindo cepas resistentes a antibióticos, além da ação fungicida, especialmente sobre fungos do gênero *Aspergillus*, *Candida* e *Saccharomyces*. Os mecanismos de ação das NPsAg ainda são parcialmente elucidados, Figura 5.

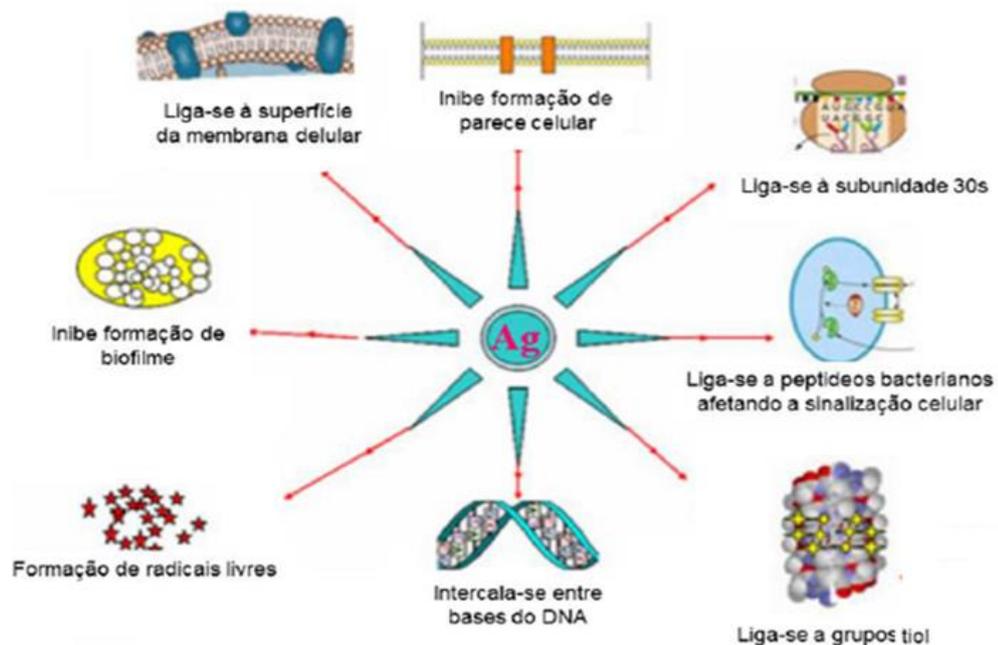


Figura 5. Sítios de ação da prata (RAI et al., 2012).

Segundo Nowack (2011), o potencial biocida de compostos com a prata é diretamente proporcional à capacidade de liberar íons Ag^+ . Nas NPsAg a grande proporção entre a área superficial e o volume das partículas aumenta essa capacidade de liberação de Ag^+ .

Alguns estudos mostram que a prata iônica (Ag^+) dos sais de prata e a sua forma reduzida (Ag^0) apresentam os mesmos efeitos, diferenciando-se apenas as concentrações mínimas de inibição, no caso, da ordem micromolar para o AgNO_3 e nanomolar para as NPsAg de cerca de 10 nm de diâmetro (LOK et al., 2006; KVITEK et al., 2008; RUDEN et al., 2009). Estudo feito por Agnihotri et al. (2014) mostrou que ao introduzir NPsAg em soluções contendo bactérias do tipo *Escherichia coli* e também *Bacillus subtilis*, o crescimento bacteriano diminuiu de acordo com o aumento da concentração de NPsAg.

Por outro lado, o estudo de Mosselhy et al. (2015), apresentaram diferenças nos mecanismos de ação antimicrobiana entre as NPsAg e o AgNO_3 . As NPsAg exibem destruição da parede celular, vazamento do conteúdo intracelular e uma lacuna entre a parede

celular e a membrana citoplasmática, enquanto que o AgNO_3 induz a aglutinação do DNA (ácido desoxirribonucleico) bacteriano, como um mecanismo de defesa bacteriana.

Para Matsumura et al. (2003), dois possíveis processos sucessivos devem estar envolvidos no mecanismo biocida das NPsAg. O primeiro se refere à capacidade da célula bacteriana entrar em contato com o material e capturar os íons de prata, inibindo funções vitais na célula, danificando-a. O segundo trata-se do stress oxidativo com produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, resultado possivelmente da inibição de uma enzima respiratória pelo Ag^+ e consequente morte celular.

O estudo de Morones et al. (2005), registrou por meio de microscopia eletrônica três situações da ação sobre bactérias. Primeiro, ocorre o ataque de NPsAg sobre a superfície da célula bacteriana, causando danos na sua função protetora. Em um segundo momento as NPsAg são capazes de penetrar a célula microbiana para exercer seu efeito no espaço citoplasmático, ligando-se às bases do DNA. Isso faz com que o DNA se condense e perca sua capacidade de replicar, prevenindo assim a reprodução bacteriana, via fissão binária e consequentemente morte bacteriana (FENG et al., 2000). E por fim há a liberação dos íons Ag^+ e o consequente efeito bactericida.

Outros estudos confirmam o mecanismo de ação biocida das NPsAg por meio da interação de três componentes vitais às células: a parede celular peptidoglicana (YAMANAKA, 2005) e a membrana plasmática (JUNG, 2008), o DNA bacteriano (citoplasmático) e as proteínas bacterianas, especialmente as enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons (SHRIVASTAVA, 2007; YANG, 2009). A combinação destes três componentes, potencializa a ação biocida das NPsAg (CHALOUPKA et al., 2010; SCHACHT et al., 2013).

O estudo de Bellantone et al. (2002) demonstrou que é possível que ocorra ligação extracelular e precipitação de íons de prata na parede e na membrana celular. Na parede celular, a matriz peptidoglicana possui ligações químicas com ácidos teicóicos. Esses ácidos contêm um grupo fosfato, o que torna a superfície da célula carregada negativamente e provavelmente irá interagir eletrostaticamente com alguns íons Ag^+ .

Na membrana celular bacteriana, a precipitação de proteínas age diretamente, exercendo ação bactericida imediata e ação bacteriostática residual (KOSTENKO, et al., 2010). No estudo de Sondi e Salopek-Sondi (2004), foi observado o acúmulo de nanopartículas de prata de cerca de 12 nm, após 1 hora de exposição, na região da membrana plasmática de *Escherichia coli*, e após 4 horas de exposição às NPsAg, foi observado um atraso no crescimento das bactérias.

No meio intracelular, o estudo de Dibrov et al. (2002) observou uma redução significativa na etapa em que ocorre a produção de ATP (adenosina trifosfato), molécula indispensável que garante a liberação de energia na organela citoplasmática mitocondrial, para as células bacterianas. Ainda de acordo com este estudo, houve um efeito de dissipação da chamada força motriz de prótons, ou seja, a diferença de potencial químico e elétrico existente entre a parte interna e externa da membrana celular gerada pelo transporte ativo de H^+ , necessária para a síntese de ATP.

Outros estudos sugerem que os íons de prata reagem com o grupo funcional tiol, compostos que apresentam o grupo SH (enxofre e hidrogênio) ligado diretamente a um carbono saturado (KLABUNDE, 2001). O elemento enxofre nas bactérias é indispensável para a integridade estrutural de proteínas. As proteínas são fundamentais para a manutenção e o crescimento celular. A síntese de proteínas ocorre nos ribossomos. As bactérias possuem ribossomos 70S, constituídos de uma subunidade pequena 30S e uma subunidade grande 50S (PENESYAN et al., 2015). A interação de íons de prata com o grupo tiol, inativa as proteínas, diminuindo a permeabilidade da membrana e, eventualmente, causando a morte celular (KLABUNDE, 2001). Enfatizando a presença dos múltiplos mecanismos bactericidas das NPsAg agindo em sinergia, espera-se que não haja mecanismos de resistência antimicrobiana habituais (SILVER, 2003).

3.4 Poli (álcool) vinílico para a obtenção de filmes poliméricos

O poli (álcool) vinílico é um polímero sintético conhecido pela sigla PVA, com estrutura química composta de grupos hidroxila (OH) pendentes, de fórmula molecular $[CH_2CH(OH)]_n$, Figura 6. É solúvel em solventes polares e hidrófilos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), acetamida, glicóis (etilenoglicol, polietilenoglicol, propilenoglicol, polipropilenoglicol), dimetilformamida (DMF), sendo a água o melhor solvente. Apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) de 85 °C e temperatura de fusão de 220 °C (HASSAN; PEPPAS, 2000).

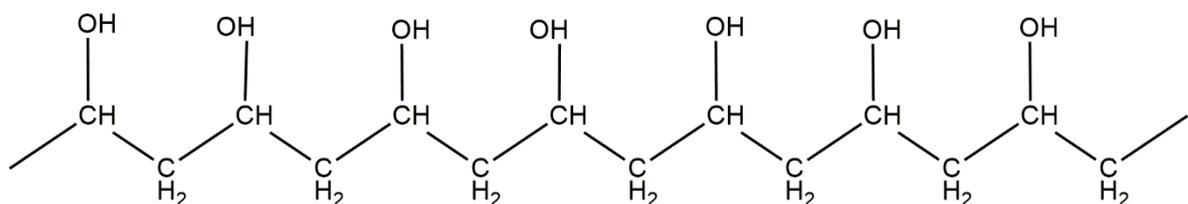


Figura 6. Estrutura química do Poli (álcool) vinílico, composta de grupos hidroxila.

O PVA é obtido pela polimerização de adição, por meio da reação radicalar do monômero de acetato de vinila para poli acetato de vinila (PVAc), seguida pela hidrólise dos grupos acetato para produzir a cadeia polimérica hidroxilada, Figura 7.

A reação de hidrólise não é completa, resultando em polímeros com um certo grau de hidrólise que depende da extensão da reação.

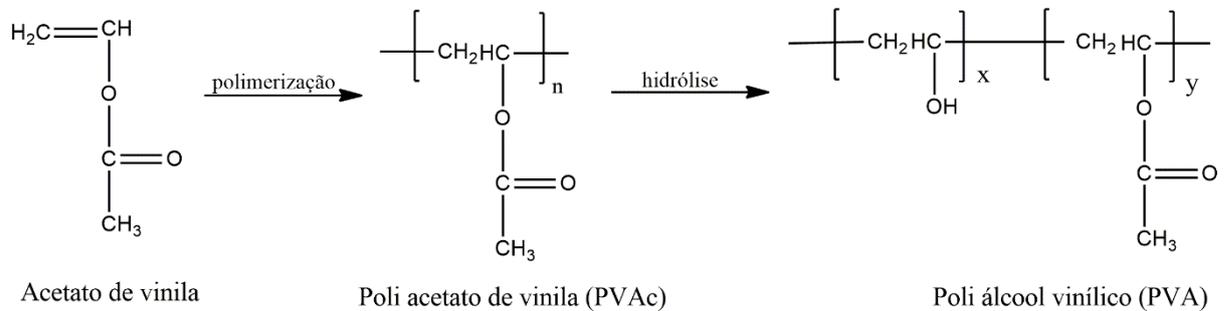


Figura 7. Reação de obtenção do poli (álcool) vinílico (SATO, 2014).

Na polimerização do PVA, o grau de hidrólise, junto com o grupamento acetato nas cadeias, são os responsáveis pelas propriedades do produto final. No PVA completamente hidrolisado, o elevado número de hidroxilas leva à formação de ligações de hidrogênio fortes entre grupos hidroxilas intra e intermoleculares, impedindo sua solubilização em água, sendo por isso, insolúvel a frio. Dessa forma, requer temperaturas altas devido à alta energia associada à dissolução da fase cristalina. Porém, após a dissolução, o PVA mantém-se em solução aquosa mesmo em temperatura ambiente. Por outro lado, no PVA parcialmente hidrolisado, os grupos acetato residuais são essencialmente hidrofóbicos e enfraquecem as ligações intra e intermoleculares dos grupos hidroxila vizinhos e, portanto, facilita a solubilidade em água, a frio (LEWIS, 2013).

O PVA se tornou um polímero apropriado para a obtenção de filmes poliméricos com propriedades mecânicas e funcionais, para aplicação em biomateriais, devido à capacidade de formar hidrogel através de reticulação física ou química, aliada às propriedades de solubilidade em água, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e resistência mecânica (QIAOZHI et al., 2014).

O estudo pioneiro de hidrogéis como uso em biomateriais foi de Wichterle e Lim (1960), que apresentou a síntese do Poli (2-hidroxietil metacrilato), pHEMA. Mais tarde, Yannas et al. (1989) incorporaram polímeros naturais, como colágeno e cartilagem de tubarão em hidrogéis para indução de regeneração parcial de pele de mamífero adulto. Desde então, os hidrogéis baseados em polímeros naturais ou sintéticos têm sido estudados como

biomateriais, para utilização de curativos à base de filmes e em sistemas de liberação controlada (SLC) de agente ativo (moléculas bioativas) ou terapêutico (fármaco ou droga), além de outras aplicações biomédicas. A vantagem de se utilizar um hidrogel como matriz polimérica para curativo em forma de filme é a possibilidade de incorporação do agente ativo, diretamente no sítio de ação, na proporção adequada.

Esse sistema de liberação controlada do hidrogel possibilita manter a concentração do agente ativo incorporado em um nível terapêutico plasmático por um longo período de tempo, abaixo do nível tóxico e acima do nível mínimo efetivo (NIDHI et al, 2016), Figura 8.

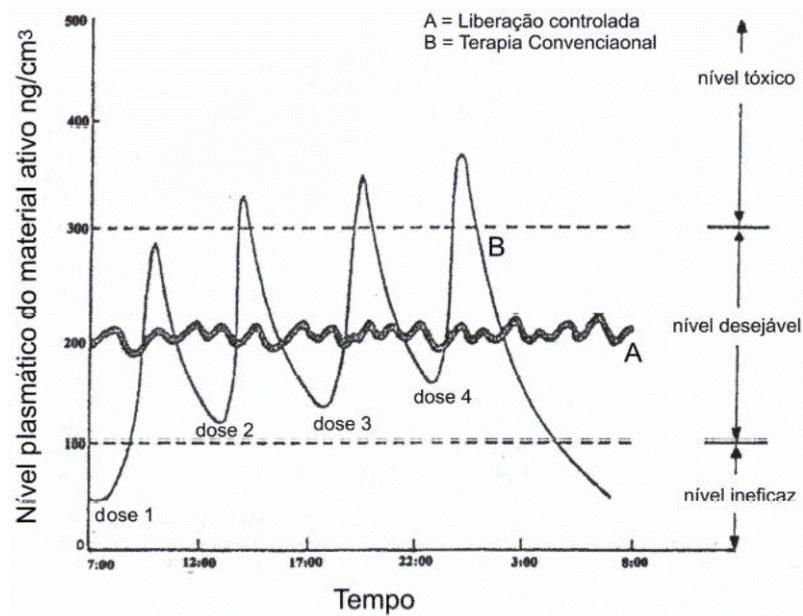


Figura 8. Variação de concentração de fármacos administrados em função do tempo.

Os hidrogéis são sistemas poliméricos hidrofílicos constituídos por redes tridimensionais estruturadas, formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes ou interações físicas, que em condições específicas, podem absorver grande quantidade de água mantendo a integridade estrutural, devido à presença de reticulações (OVIDO, et al., 2008). As reticulações nos hidrogéis influenciam a capacidade de intumescimento (expansão) do hidrogel. Hidrogéis altamente reticulados são mais rígidos e possuem menor capacidade de intumescimento, comparados aos hidrogéis menos reticulados (BAE, et al., 2013). A estrutura química também pode afetar o grau de intumescimento. Hidrogéis com maiores quantidades de grupos hidrofílicos possuem maior grau de expansão comparados aos hidrogéis que possuem maiores quantidades de grupos hidrofóbicos (GANJI e VASHEGHANI-FARAHANI, 2009).

Conforme o método de reticulação empregado, os hidrogéis podem ser classificados em hidrogéis reticulados fisicamente e hidrogéis reticulados quimicamente. Hidrogéis reversíveis ou físicos, também chamados de pseudo hidrogéis, são constituídos por redes tridimensionais contínuas e desordenadas formadas por interações fracas e reversíveis, como ligações de hidrogênio, interação iônica, associação hidrofóbica ou segmento cristalino (MAITRA et al., 2014). Essas interações fazem com que as cadeias poliméricas se associem, e induzam a formação de uma estrutura estável pela formação de uma zona de junção. Nessa estrutura de junção pode ocorrer uma quebra devido a uma mudança na temperatura, no pH ou com a adição de sais (CALÓ et al., 2015). A reversibilidade nesse tipo de reticulação é uma vantagem em aplicações biológicas, porém a sua estabilidade *in vivo*, pode ser afetada por interações tanto com as funções fisiológicas, quanto mecânicas (HOFFMAN, 2012).

Os hidrogéis químicos, também chamados de hidrogéis permanentes são obtidos a partir de ligações químicas covalentes entre as cadeias macromoléculas, geralmente através de agentes reticulantes, com formação de uma rede polimérica. Essa reticulação permite a formação de hidrogéis com resistência mecânica superior e estabilidade fisiológica controlável quando comparados com os hidrogéis preparados por reticulação física (TEIXEIRA et al., 2012). Neste estudo utilizou-se o hidrogel PVA, reticulado quimicamente.

Embora os hidrogéis reticulados com agentes químicos ofereçam propriedades desejáveis, o destino de muitas destas moléculas no corpo ainda não foi estabelecido completamente, o que representa o principal inconveniente dos hidrogéis químicos com utilização em biomateriais (CHOI, 2015). Dessa forma alguns estudos apresentam a utilização de agentes reticulantes com baixa toxicidade, como é o caso do ácido cítrico, que participa do processo de respiração celular sendo, por isso, presente no metabolismo de grande parte dos seres vivos.

No estudo de Taguchi et al. (2004), foi utilizado o ácido cítrico para obter grupos ésteres ativos e assim ser possível a incorporação ao colágeno para obter um novo adesivo tecidual. Aoki et al. (2004) desenvolveram géis de gelatina reticulados com ácido cítrico para obter um novo adesivo tecidual. Thomas et al. (2009), utilizaram o ácido cítrico como agente reticulante, o qual não apresentou toxicidade. E ainda o estudo de Gorgieva e Kokol (2011), que utilizaram o hidrogel termossensível de hidroxietilcelulose e carboximetilcelulose reticulado com ácido cítrico para aplicação na área de tecidos inteligentes.

O controle da quantidade de agente de reticulação e o balanço hidrofílico-hidrofóbico possibilita a obtenção de matrizes poliméricas com propriedades mecânicas e estruturais ajustadas para um grau de intumescimento adequado. Assim, a capacidade de absorção de

água pelos hidrogéis pode ser avaliada pelas medidas do grau de intumescimento em função do tempo (BARBUCCI, 2009). O processo de intumescimento é determinado primeiramente pela taxa à qual a água pode se difundir na estrutura do hidrogel, o que depende principalmente do solvente, da temperatura da solução e da extensão da porosidade. Em seguida, o processo, é determinado pela maneira como as cadeias poliméricas podem relaxar.

Inicialmente no processo de intumescimento, as primeiras moléculas de água hidratam os grupos hidrofílicos. Assim que a hidratação dos grupos hidrofílicos é concluída a força osmótica das cadeias reticuladas permite que a rede absorva mais água e assim a rede inicia o processo de expansão (KOKABI, 2007). Este intumescimento é adicional e opõem-se pela presença de reticulações por meio de força elástica de retração da rede. A elasticidade da rede contrabalança o seu alongamento, estabelecendo-se um nível de equilíbrio do intumescimento, Figura 9.

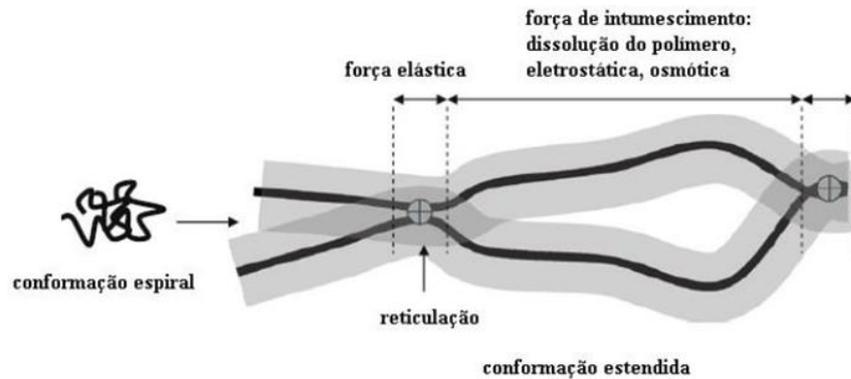


Figura 9. Processo de intumescimento de hidrogéis (OTTENBRITE et al., 2010).

Uma vez que os valores de massa, volume e dimensão dos hidrogéis mudam durante o processo de intumescimento, qualquer um destes fatores pode ser utilizado para caracterizar o grau de intumescimento de hidrogéis (Q). Um método utilizado é a proporção de massa-intumescimento, que pode ser expressa em unidade de massa ou em percentagem, de acordo com a Equação 1.

$$Q_t = \frac{(m_{st} - m_d)}{m_d} \times 100 \text{ (\%)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, Q_t é o grau de intumescimento no tempo t , m_{st} é a massa do hidrogel intumescido em determinado tempo t e m_d é a massa inicial do hidrogel.

Nos sistemas poliméricos para liberação controlada, o agente ativo pode ser liberado no organismo a partir de mecanismos de difusão. O processo de difusão caracteriza-se como um fenômeno de transporte de átomos, em gases, líquidos e sólidos, induzido por agitação térmica, por diferença de potencial químico ou de concentração, até estabelecer um equilíbrio.

Esse processo é lento, exceto quando o gradiente de concentração for muito elevado ou as distâncias percorridas forem curtas (VARSHOSAZ; KOOPAIE, 2002).

O modelo de difusão da matéria pode ser descrito e calculado a partir da lei de Fick, na forma de uma equação diferencial, que descreve o mecanismo de difusão em um meio, no qual inicialmente não existe equilíbrio químico ou térmico. Esta lei foi proposta por Adolf Eugen Fick, que as derivou em 1855 e demonstra que o fluxo de difusão (J) de um soluto, é definido como a quantidade de soluto que passa através de um plano de referência por unidade de tempo e por unidade de área normal na direção do fluxo.

Com relação à difusão no estado estacionário, ou seja, independente do tempo, o fluxo de difusão (J) e a concentração de partículas (c), não variam com o tempo, e pode ser determinada pela Equação 2, referente à primeira Lei de Fick.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde D é o coeficiente de difusão do soluto no meio, (c) é a concentração e (x) é a distância. Dessa forma $\partial c / \partial x$, é o gradiente de concentração, a força motriz para que o processo de difusão ocorra espontaneamente. O coeficiente de difusão D , representa a facilidade para que essa difusão ocorra e depende do soluto em um determinado meio. O sinal negativo nesta primeira lei de Fick, indica que o fluxo se dá de uma região de alta concentração para uma de baixa concentração (PEPPAS; SAHLIN, 1989).

Para os casos em que a difusão depende do tempo, ou seja, em estado não-estacionário, aplica-se a segunda Lei de Fick, onde o fluxo de difusão, e o gradiente de concentração, numa dada posição x , variam com o tempo t , definida pela Equação 3.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial (D \frac{\partial c}{\partial x})}{\partial x} \quad (\text{Eq. 3})$$

Um modelo matemático elaborado por Ritger e Peppas (1987), permite de forma simplificada caracterizar os tipos de mecanismos de liberação de agente ativo, Equação 4.

$$\frac{M_t}{M_e} = kt^n \quad (\text{Eq. 4})$$

Ou, pelo logaritmo natural, na Equação 5:

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_e}\right) = \ln k + n \ln t \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde t é o tempo, k é a constante de difusão e depende do tipo do hidrogel e do meio de intumescimento, n é o expoente difusional, que fornece informação sobre o tipo de mecanismo de transporte que impulsiona a liberação e ou sorção de um dado soluto, M_t e M_e são as massas do hidrogel em um tempo t de intumescimento e no estado de equilíbrio, respectivamente. Os valores da taxa de difusão e os mecanismos de liberação do agente ativo, para diferentes geometrias, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Expoente de difusão e mecanismo de liberação de soluto para diferentes geometrias.

Expoente de difusão (n)			Mecanismo de liberação
Filmes	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
0,5 < n < 1,0	0,5 < n < 0,89	0,5 < n < 0,85	Transporte Anômalo (não-Fickiano)
1,0	0,89	0,85	Caso II de transporte

No mecanismo de difusão Fickiana ou Caso I, ocorre a difusão do soluto através de camadas da matriz. A taxa de difusão é muito inferior que o tempo de relaxação da cadeia polimérica. Este sistema, portanto, é controlado pelo coeficiente de difusão. O tempo de relaxação refere-se ao tempo em que a cadeia leva para acomodar-se, ou seja, entrar em equilíbrio com o solvente ou soluto. Nesse mecanismo de liberação, o relaxamento das cadeias é muito mais rápido do que a difusão do solvente (VARSHNE, 2007). A Equação de Fick aplica-se aos estágios iniciais do intumescimento, até valores de fração menores que 0,60. Considerando que hidrogéis podem absorver água, pode-se inferir que a espessura da amostra não permanece constante e o comportamento Fickiano não é aplicável a todos os estágios de intumescimento, ou seja, até o equilíbrio ser atingido. Assim, para muitos sistemas poliméricos, a difusão não é adequadamente descrita pela lei de Fick. Considera-se que os desvios ao comportamento Fickiano estão associados a taxas finitas de mudança da estrutura polimérica provocadas pela entrada ou saída de moléculas circulantes. No Caso II, a taxa de

difusão é superior à de relaxamento das cadeias poliméricas. E no mecanismo de liberação não-Fickiana ou transporte anômalo, a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente, isto é, independente do tempo (BORTOLIN, 2012).

Nos sistemas poliméricos para liberação controlada deve-se considerar a propriedade de biodegradabilidade, uma vez que é desejável que um material introduzido no organismo seja eliminado depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para a sua retirada. Neste sentido, os hidrogéis de PVA podem cumprir essa propriedade, pois caracterizam-se como biodegradáveis, e, portanto, podem ser degradados *in vivo*, em fragmentos menores, podendo ser excretados pelo corpo (GEHRKE; LEE, 1990). A degradação do polímero envolve a fragmentação da cadeia polimérica e também a quebra da estrutura do retículo cristalino (RAGHAVAN, 1995). Os produtos de degradação não são tóxicos, e não devem criar resposta inflamatória. São metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (NAIR; LAURENCIN, 2007).

A biocompatibilidade também é uma propriedade exigida pelos hidrogéis, definida como a compatibilidade do hidrogel e seus produtos de degradação formados, os que também não devem ser tóxicos. Geralmente, hidrogéis possuem uma boa biocompatibilidade devido a sua superfície hidrofílica apresentar uma baixa energia livre interfacial quando em contato com fluidos corporais, o que resulta em uma baixa adesão de proteínas e células nessas superfícies. Além disso, a natureza viscoelástica dos hidrogéis minimiza a irritação com o tecido envolvente (BAE et al., 2013).

A capacidade de manter água retida em sua rede, sua transparência e propriedades mecânicas adequadas, torna o hidrogel produzido a partir de PVA, biocompatível e biodegradável, e, portanto, um biomaterial, como alternativa para curativos. Filmes de hidrogéis de PVA com nanopartículas de prata incorporadas, intumescem e auxiliam a cura. O PVA reticulado é solúvel em água, bem como o AgNO_3 , e reage com os íons prata em solução formando um quelato-metálico (PVA-Ag^+), associação do íon metálico, a cadeia orgânica do polímero, através de ligações químicas covalentes, que neutralizam a reatividade química do mineral (JONES; VAUGHAND, 2005).

3.5 Feridas cutâneas e matrizes poliméricas incorporadas com prata

A pele, juntamente com as estruturas anexas, como pelos, unhas e glândulas, compõe uma estrutura que reveste todo o organismo, formando uma interface entre o meio interno e fatores extrínsecos. Apresenta uma estrutura com camadas distintas: a epiderme, camada

exterior, constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A derme, situada imediatamente abaixo da epiderme, constituída por tecido conjuntivo, separada da derme pela membrana basal, rica em proteínas de matriz extracelular, que facilita a difusão de nutrientes, e a hipoderme, habitualmente caracterizada por ser muito rica em tecido adiposo (LOWE; ANDERSON, 2015).

Quando ocorre a descontinuidade da barreira cutânea, as funções básicas de proteção são comprometidas, originando a ferida, que pode atingir todas as camadas da pele ou qualquer outra estrutura do corpo (BIELEFELD et al., 2015). A ferida resultante dessa descontinuidade pode ser classificada a partir de sua espessura, etiologia, evolução, presença de infecção e comprometimento tecidual. Com relação à espessura podem ser superficiais, com danos teciduais nas duas primeiras camadas, a epiderme e a derme. Pode ser profunda superficial, quando ocorre a destruição das três camadas da pele e ainda profunda total, quando além das três camadas atingidas apresenta danos em tecido muscular e as estruturas adjacentes, como tendões, cartilagens e ossos (WOLCOTT et al., 2010).

Conforme a etiologia, as feridas podem ser traumáticas, provenientes de situações imprevistas, com objetos cortantes, perfurantes, lacerantes, contundentes ou por inoculações de venenos, mordeduras e queimaduras. Podem ser intencionais ou cirúrgicas, oriundas de intervenção em cirurgias, com intuito terapêutico. Podem ser patológicas, apresentando lesões secundárias, provenientes de doença básica, iatrogênicas, as quais ocorrem por efeitos colaterais de intervenções, procedimentos, tratamentos e medicamentos. E as feridas ulcerativas, formadas por necrose, sequestração do tecido, resultantes de traumatismo ou doenças relacionadas com o impedimento do suprimento sanguíneo. As úlceras representam uma categoria de feridas que incluem úlceras por pressão, de estase venosa, arteriais e diabéticas (KANJ, 1998).

Com relação à evolução, as feridas classificam-se em agudas, caracterizadas por lesões traumáticas que possuem tratamento rápido e respondem facilmente às intervenções terapêuticas. E as feridas crônicas, as quais, permanecem abertas por longa duração, geralmente, superior a seis meses e comumente associadas a complicações advindas de doenças degenerativas, como o pé diabético, as úlceras venosas e aquelas decorrentes de processos neoplásicos (DEMIDOVA-RICE et al., 2012).

As feridas conforme a presença de infecção, podem ser assépticas, feridas que não possuem microorganismos, porém podem apresentar presença de sinais flogísticos como dor, calor e rubor. Feridas limpas contaminadas, aquelas com uma contaminação pouco significativa, onde os tecidos atingidos apresentam pouca colonização de microorganismos,

com ocorrência de tempo menor de 6 horas. As feridas contaminadas em atos cirúrgicos ou pós trauma com tempo superior a 6 horas.

E ainda as feridas sépticas, com contaminação por microorganismos, com evidências de processo infeccioso por presença de tecido desvitalizado, exsudação purulenta e odor característico, forte e muitas vezes fétido (BESSA et al., 2015).

Quando a pele é lesada, inicia-se um processo dinâmico para o restabelecimento tecidual até a cicatrização. Do ponto de vista morfológico, identificam-se no processo de cicatrização, três fases consecutivas: a fase inflamatória, a proliferativa e a fase de maturação. A fase inflamatória é uma reação imediata à injúria tecidual e representa uma tentativa para limitar o dano, caracterizada pela hemostase e inflamação. Durante a injúria tecidual aguda, o dano dos vasos sanguíneos resulta em exposição do colágeno subendotelial às plaquetas, o que leva à agregação plaquetária e ativação da via de coagulação. A vasoconstrição local inicial das arteríolas e capilares é seguida de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A combinação de intensa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular leva ao achado clínico de inflamação, caracterizado por rubor, edema, calor e dor (LI, 2005).

Conforme as respostas agudas de hemostasia e inflamação, é iniciada a fase proliferativa. Nesta fase ocorre o reparo da ferida com formação de tecido granuloso e por angiogênese, caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos, necessários para suportar o ambiente de cicatrização da ferida. Após o leito da ferida estar totalmente preenchido pelo tecido de granulação, com uma rede capilar em regeneração, inicia-se a fase de maturação, caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada. Nessa fase o tecido de granulação vai sendo enriquecido com fibras de colágeno iniciando a remodelagem da matriz extracelular até adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz (XUE; JACKSON, 2015).

O processo de cicatrização de uma ferida depende da quantidade de tecido danificado e da presença ou não de infecção e pode ser classificada em primeira intenção, segunda intenção e terceira intenção. A cicatrização de primeira intenção ocorre quando as bordas são apostas ou aproximadas, havendo perda mínima de tecido, ausência de infecção e mínimo edema. A formação de tecido de granulação não é visível. Na cicatrização de segunda intenção, ocorre perda excessiva de tecido com a presença ou não de infecção. A aproximação primária das bordas não é possível. As feridas são deixadas abertas e se fecharão por meio de contração e epitelização. E na cicatrização por terceira intenção, que ocorre nas feridas profundas não suturadas, ou quando as suturas se romperam; após a ferida ser novamente suturada, as duas superfícies de granulação opostas serão reunidas (VERMEULEN, 2004).

Na reparação das feridas o curativo é o tratamento clínico mais frequentemente utilizado para auxiliar a reparação tecidual e consiste em um meio terapêutico, com o intuito de melhorar as condições do leito da ferida, como forma de auxiliar o processo de cicatrização (CHUNG; GLORI, 2009). A escolha do tipo de curativo a ser utilizado está diretamente relacionada com a sua função, que pode ser de proteção e absorção de umidade, absorção de exsudato e odores, desbridamento (limpeza), prevenção da contaminação exógena, compressão para minimizar acúmulo de fluidos, bem como a imobilização ou proteção contra traumas mecânicos (HARDING, 2002).

Para ser eficaz, o curativo deve incluir qualidades como facilidade de remoção, conforto, trocas pouco frequentes, boa relação custo-benefício, manter o leito da ferida com umidade ideal e áreas periféricas secas e protegidas e facilidade de aplicação e adaptabilidade, conforme as diversas partes do corpo (BROUGHTON, 2006). Para Fan, et al. (2011), os curativos são classificados em curativos passivos, curativos com princípios ativos, curativos inteligentes, curativos biológicos e compostos.

O presente estudo aborda o curativo com princípio ativo, tendo a prata metálica como elemento constituinte. Esse curativo tem ação tópica e pode atuar no controle da população bacteriana durante o preparo do leito de uma ferida séptica para a reparação tecidual (KOSTENKO et al. 2010). Na escolha de um curativo contendo prata, deve-se considerar as características do curativo e a liberação de prata pelo curativo. O curativo antimicrobiano deve promover um ambiente úmido para favorecer a cicatrização e um amplo espectro antimicrobiano, com baixo potencial de resistência. E ainda características como baixa toxicidade, ação rápida, não provocar irritação ou sensibilização, não promover aderências e ser efetivo mesmo na presença de importante exsudato em feridas sépticas (PARSONS, 2005).

A inovação destes produtos reside no fato de que a prata pode ser incorporada em matrizes poliméricas, proporcionando o desenvolvimento de curativos, capazes de prevenir a proliferação de microrganismos no tratamento de feridas (JONES, 2004). Há um crescente interesse no desenvolvimento de patentes direcionadas para a área de nanotecnologia, visando à obtenção de nanopartículas de prata (SPOTNITZ; WANG; RODEHEAVER, 2001), (DICOSMO; BURROWS; DITIZIO, 2001), (BURRELL; WRIGHT; LAM, 2002), (VANGE; NIELSEN, 2002), (SCHERR, 2003).

A vantagem das formulações baseadas em prata nanocristalina, atualmente comercializadas para tratamento de ferida, é a possibilidade de serem projetadas em dispositivos biomédicos de liberação controlada, apresentando-se resistentes a reinfecção,

mostrando-se também eficazes contra um amplo espectro de infecções causadas por bactérias, fungos e cepas resistentes. A variedade de curativos baseados em prata nanocristalina atualmente comercializados diferem entre si na composição, teor de prata liberada, mecanismo de ação e estado de oxidação da prata. As agências internacionais reguladoras, Food and Drug Administration (FDA) e Environmental Protection Agency (EPA), têm aprovados os produtos à base de prata: SilverIon[®] (Argentum Medical LLC), Silvadene[®] (Marion Laboratories), Curad silver[®] (Beiersdorf AG), Actisorb 220[®] (Johnson & Johnson), AgION (Agion Technology, Inc.), Axenohl (Axen 30). Matrizes poliméricas hidrofílicas contendo nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas destinadas ao uso como curativo de feridas têm sido relatadas em patentes de invenção (TOMA et al., 2009), (ZUCOLOTTI; NETO, 2014), porém estes documentos não abordam a formação de um hidrogel contendo agentes terapêuticos de origem vegetal. Especificamente o *Cinnamomum zeylanicum*, espécie vegetal que contém moléculas com ação redox, capazes de reduzir íons prata permitindo a síntese de prata nanocristalina. O potencial antioxidante de *Cinnamomum zeylanicum* tem sido aproveitado em aplicações como conservante de alimentos (AYAPRAKASHA, 2008) e no tratamento de diabetes (PATELL, 2008).

Gauthami et al. (2015) reportaram a biossíntese de nanopartículas de prata usando um extrato aquoso de *Cinnamomum zeylanicum*, preparado a partir da decocção do vegetal, em água destilada. Porém, para a obtenção das nanopartículas de prata os autores precisaram utilizar o dodecilsulfato de sódio, como estabilizante químico e para a redução da prata iônica utilizaram o método físico de radiação ultravioleta e o método químico utilizando substâncias químicas redutoras (SATHISHKUMAR et al, 2009), (FARAHPOUR et al., 2012). E ainda membranas de hidrogel de poli (vinil álcool) contendo nanopartículas de prata obtidas por via química, utilizando borohidreto de sódio como agente redutor, têm sido relatadas na literatura (SHAO et al., 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Equipamentos

Para a extração do princípio ativo de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), o material vegetal da canela em pó foi obtido de origem comercial e utilizado sob a forma de extrato aquoso. Para a preparação dos extratos aquosos da canela utilizou-se balança eletrônica de precisão Marte, modelo AY220, ultrassom digital Sanders modelo SoniClean2, bomba de vácuo Primatec, modelo 131 tipo 2 VC e agitador magnético da Cientec, modelo CT-103. O preparo dos extratos aquosos da canela foi realizado por extração do princípio ativo da canela por sistema de maceração dinâmica (procedimento A) e extração por decocção (procedimento B).

A biossíntese de redução das NPsAg foi realizada a partir da reação de oxirredução com solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3), fornecido pela Merck (99,8%). O acompanhamento cinético da formação das NPsAg e posterior observação da Ressonância de Plasmon de Superfície (RPS) foi com auxílio de um espectrofotômetro Ultravioleta-visível Varian Cary 50 Scan. A transferência das soluções foi feita utilizando-se micropipeta monocal 10 a 100 uL Mod. LM -100 Labmate Pro. A análise qualitativa da composição das amostras por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 Series, abrangendo a região de $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} , e utilizando um acessório de refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente e as amostras liofilizadas previamente em um liofilizador JJ Científica, modelo LJJ04. A morfologia das amostras foi determinada por MEV, no Microscópio eletrônico, marca Carl Zeiss, modelo EVO MA15.

Para a preparação *in situ* da membrana PVA^{EXT}- NPsAg foi utilizado o polímero poli (álcool vinílico) PVA granulado, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, 98-99 % hidrolisado e massa molar de 72000 g/mol. Para a reticulação das membranas foi utilizado o ácido cítrico anidro-Quimisul. Para observação das interações entre as nanopartículas de prata e o polímero PVA foi utilizada a espectroscopia do FTIR. A morfologia das amostras foi determinada por MEV, utilizando o equipamento citado acima.

O estudo de intumescimento da membrana PVA^{EXT}- NPsAg foi realizado através de medidas termogravimétricas de TGA, DTGA e DSC, utilizando o equipamento Shimadzu, modelo TGA-50, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, atmosfera N_2 . O estudo da

liberação de NPsAg foi realizado através de Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis), utilizando cubeta de quartzo.

Para o estudo microbiológico da membrana PVA^{EXT}-NPsAg foi utilizado caldo *Tryptone Soya Broth-Oxoid* (TSB), solução padrão de 0,5 da escala MacFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias UFC/mL), em meio *Plate Count Ágar* (PCA) Merck, multiinoculador Kasvi, fita Parafilm M e estufa de incubação Olidef CZ. Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado um Irradiador Gammacell com ⁶⁰Co como emissor gama. Foram utilizadas linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO- K1, ATCC CCL 61, American Type Culture Collection). A avaliação quantitativa da viabilidade celular das células CHO-K1 frente às membranas PVA^{EXT}-NPsAg foi realizada através do uso do corante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio).

4.2 Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais neste estudo foram realizados no Laboratório de Alta Tensão da Universidade Federal de Itajubá UNIFEI-LAT-EFEI, e incluem: a extração do princípio ativo da *Cinnamomum zeylanicum* pelos processos de maceração dinâmica e decocção, a biossíntese de redução das NPsAg, a preparação *in situ* da membrana PVA^{EXT}- NPsAg, a reticulação da membrana PVA^{EXT}- NPsAg, a determinação do teor gel da membrana PVA^{EXT}- NPsAg, o estudo de intumescimento da membrana PVA^{EXT}- NPsAg, o estudo da cinética de difusão pela lei de Fick, o estudo de liberação *in vitro* de NPsAg, a caracterização térmica por termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a caracterização por espectroscopia no infravermelho (FTIR). O estudo da atividade antimicrobiana da membrana PVA^{EXT}- NPsAg foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNIFEI, utilizando as bactérias Gram positiva, *Staphylococcus aureus* LB25923 e Gram negativa, *Escherichia coli* LB25922. O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CTR-IPEN, São Paulo. As imagens de MEV-EDS foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural da Unifei, a caracterização por espectroscopia na região do UV-vis das amostras foi realizada na Central Analítica do Instituto de Física e Química da UNIFEI.

4.2.1 Extração do princípio ativo da *Cinnamomum zeylanicum*

Dentre os processos utilizados para a extração de princípios ativos do *Cinnamomum zeylanicum*, foram escolhidos os processos de maceração dinâmica e decocção, procedimentos A e B, respectivamente, descritos a seguir.

4.2.1.1 Extração do princípio ativo da canela por maceração dinâmica- Procedimento A

Neste processo de extração por maceração dinâmica foi utilizado o sistema ultrassom. Ao que se refere as extrações em plantas, a utilização do ultrassom pode facilitar a dilatação e hidratação do material da planta e causar alargamento dos poros da parede celular, melhorando a inchaço e a razão de transferência de massa e, ocasionalmente, quebra da parede celular, acarretando no aumento da eficiência e da redução do tempo de extração, assim como aumento da penetração do solvente (TOMA et al., 2001).

Para esse procedimento 1g de canela em pó e 50 mL de água destilada foram colocados em um béquer. Esse béquer foi colocado no sistema de ultrassom durante 60 segundos. Após este tempo a solução foi filtrada a vácuo, Figura 10. O extrato obtido foi utilizado para a redução da prata.



Figura 10. Extração do princípio ativo da canela por maceração dinâmica. Ultrassom (A), filtração a vácuo (B).

4.2.1.2 Extração do princípio ativo da canela por decocção - Procedimento B

Este processo de extração por decocção foi realizado pelo aquecimento concomitante da droga vegetal com o solvente (água), mantendo a fervura durante 10 minutos, ao fim dos quais, a mistura foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada a vácuo. A fase líquida foi

utilizada para o preparo do extrato. A temperatura neste processo de decocção contribui diretamente para a solubilização das substâncias envolvidas na extração e permite o aumento da velocidade de difusão, facilitando a extração dos princípios ativos. Para preparar o extrato aquoso pesou-se 1g de canela em pó, adicionou-se 50 mL de água destilada e ferveu-se durante 10 minutos. Em seguida filtrou-se em papel filtro e a solução foi deixada arrefecer até a temperatura ambiente, conforme Figura 11.

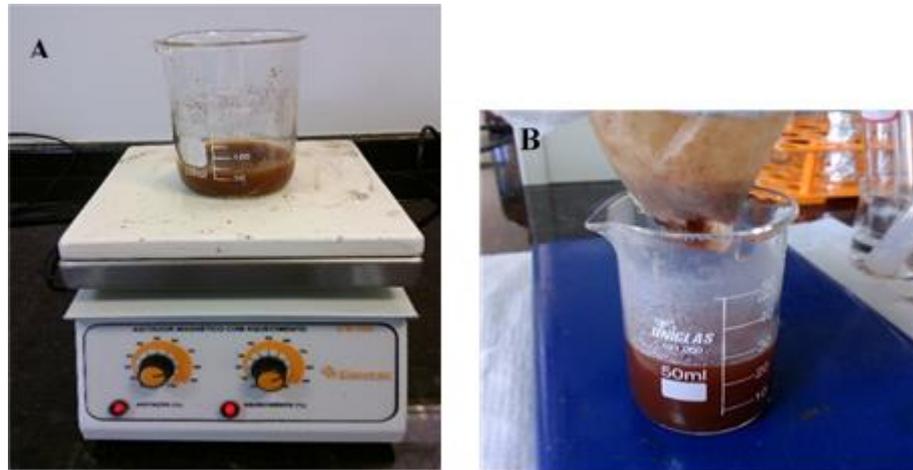


Figura 11. Extração do princípio ativo da canela por decocção. Fervura (A), filtração (B).

O rendimento da extração aquosa de *Cinnamomum zeylanicum* foi calculado, de acordo com a Equação 6.

$$\% \text{ Rend} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

R_e (%) = Percentual do rendimento do extrato.

m_f = Valor da massa da (*Cinnamomum zeylanicum*) obtida após a liofilização.

m_i = Massa de matéria prima (*Cinnamomum zeylanicum*) utilizada na extração.

4.2.2 Biossíntese de redução das NPsAg com o extrato de *Cinnamomum zeylanicum*

Para o estudo da biossíntese de redução das NPsAg utilizou-se o extrato de *Cinnamomum zeylanicum* obtido por maceração dinâmica, no procedimento A. O sistema de biorredução foi preparado utilizando 4 mL da solução de extrato vegetal; 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL da solução aquosa do sal metálico precursor, o AgNO_3 , de concentração final de 3,5 mM. A reação foi realizada a temperatura ambiente (23° C), atmosfera ar, e

agitação durante 12h. O extrato contendo as NPsAg obtido foi liofilizado para o cálculo do rendimento e caracterização físico-química das NPsAg formadas. Para o acompanhamento cinético da formação das NPsAg foram tomadas alíquotas de 10 µl, diluídas em 3 mL de água destilada e medida a absorvância em espectrofotômetro UV-vis.

Os espectros na região do ultravioleta visível foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 900 nm. Esta técnica foi utilizada para observação da banda de ressonância de plasmon da superfície metálica das NPsAg.

4.2.3 Preparação da membrana PVA^{EXT}-NPsAg por biossíntese *in situ*, na presença de PVA

Para a preparação das membranas PVA-NPsAg, foi escolhido o procedimento *in situ*, que consiste na biossíntese das NPsAg na presença do PVA. O sistema de biorredução foi preparado utilizando 4 mL da solução de extrato de *Cinnamomum zeylanicum*; 2,5 mL de solução aquosa de PVA 5% e 2,5 mL da solução aquosa AgNO₃, com concentração final de 3,5 mM. A reação foi realizada a temperatura ambiente (23 °C), atmosfera ar, e agitação durante 12h.

A solução de PVA a 5% foi preparada, utilizando-se 5 g de PVA granulado, o qual foi pesado e dissolvido em 50 mL água destilada a 90 °C, por 12 horas. Essa solução foi deixada arrefecer em temperatura ambiente. A solução arrefecida foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o balão volumétrico com água destilada até a marca de aferição. Em um béquer foram colocados 4 mL da solução aquosa do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, 2,5 mL da solução de PVA 5% homogeneizada e 2,5 mL de AgNO₃, com a concentração final de 3,5 mM. Essa solução foi mantida em temperatura ambiente e sob agitação magnética por cerca de 12 horas. Após esse período foi realizada a reticulação da membrana PVA-NPsAg, com ácido cítrico, descrita a seguir.

Para a reticulação da membrana PVA-NPsAg foi adicionado 2% de ácido cítrico (0,002g) em relação a quantidade de PVA na solução (0,125g). Com o auxílio de uma micropipeta, a solução foi distribuída em moldes, para a formação de filmes poliméricos, Figura 12. Estes filmes foram deixados em um ambiente climatizado (22 °C) para controlar o processo de evaporação da água que, em média, ocorreu durante 12 horas até que os filmes pudessem ser retirados dos moldes. Os filmes foram retirados dos moldes e colocados em estufa a 100 °C, por uma hora, para a reação de reticulação.

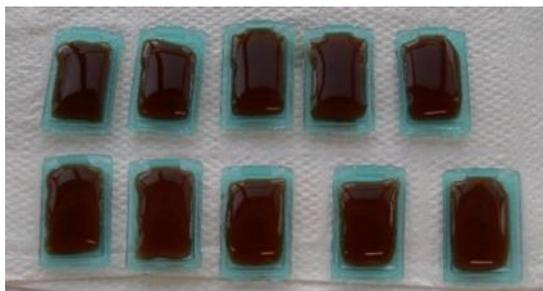


Figura 12. Solução das membranas PVA-NPsAg nos moldes para formação dos filmes poliméricos.

Para a observação da banda de ressonância de plasmon da superfície metálica das nanopartículas de Ag, os espectros na região do ultravioleta visível foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 900 nm. A caracterização físico-química da membrana PVA-NPsAg reticulada foi realizada pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR, pela análise térmica, TGA, DTGA, microscopia eletrônica de varredura (MEV), determinação do teor gel, estudo do intumescimento. Também foi realizado o estudo de liberação das NPsAg e estudo da atividade antimicrobiana.

As membranas PVA-NPsAg preparadas *in situ*, conforme item 4.2.3, apresentaram uma aparência física heterogênea. Visualmente foram observados agregados do extrato, conforme apresentado na Figura 13.

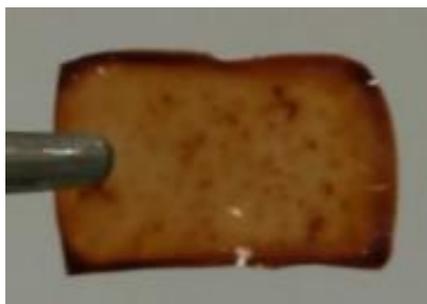


Figura 13. Membrana PVA-NPsAg preparada por biossíntese *in situ* e reticulada com ácido cítrico a 2%.

Em razão desse resultado, o procedimento de preparação das membranas foi modificado. Esse novo procedimento foi realizado em três etapas: preparação da membrana de PVA reticulada como explicado no início deste item (4.2.3), intumescimento das membranas no extrato de *Cinnamomum zeylanicum* (PVA^{EXT}), e biossíntese das nanopartículas de prata (NPsAg) nas membranas de PVA previamente reticuladas.

As membranas de PVA reticuladas foram imersas em 10 mL de extrato *Cinnamomum zeylanicum* por 24h em temperatura ambiente. Após esta etapa, as membranas intumescidas foram transferidas para recipientes de vidro âmbar, e acrescentou-se a cada uma delas, separadamente, 10 mL de solução nas concentrações de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02; 0,008;

0,006; 0,004; 0,0035; 0,002 mol/L de nitrato de prata (AgNO_3). Ao final de 48 horas, as membranas foram lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente, obtendo-se a membrana denominada $\text{PVA}^{\text{EXT}}\text{-NPsAg}$.

4.2.4 Determinação do teor gel do PVA reticulado

A determinação da fração gel do polímero (fração reticulada) é a forma utilizada para avaliar a reticulação de matrizes poliméricas. As membranas de PVA reticuladas foram pesadas e colocadas em água destilada a 90°C , sob refluxo durante 12h. A fração gel retirada da solução foi colocada após secagem, em estufa foram pesadas até obter massa constante. A fração gel foi calculada pelas Equações 7 e 8.

$$F_s = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$F_G = 100\% - F_s \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

m_i = Massa inicial da amostra

m_f = Massa de gel seco

F_s = Fração solúvel

F_G = Fração gel

4.2.5 Estudo do intumescimento das membranas $\text{PVA}^{\text{EXT}}\text{-NPsAg}$

Para esse estudo foi escolhida a membrana $\text{PVA}^{\text{EXT}}\text{-NPsAg}$ preparada utilizando 0,0035 M de AgNO_3 . A membrana obtida na forma de filme, conforme descritas no item 4.2.3 deste capítulo, foram cortadas em três amostras de aproximadamente $1,0 \times 1,0 \text{ cm}^2$. As amostras secas foram imersas em água destilada em temperatura 23°C , as quais eram removidas da solução em intervalos de tempo pré-determinados em 0, 5, 10, 20, 25, 35 minutos, para pesagem. O fluido acumulado na superfície das amostras foi removido com papel filtro. As medidas foram realizadas até o equilíbrio de intumescimento ser atingido. O ensaio foi realizado em triplicata, Figura 14. O grau de intumescimento dos filmes foi calculado a partir das Equação 1 (item 3.4).



Figura 14. Ensaio de intumescimento em triplicata, da membrana PVA^{EXT}-NPsAg

4.2.6 Estudo de liberação de NPsAg das membranas PVA^{EXT}-NPsAg em função do tempo

Para esse estudo foi escolhida a membrana PVA^{EXT}-NPsAg, preparada utilizando 0,0035 M de AgNO₃. Para o estudo de liberação *in vitro* de NPsAg foi construída inicialmente, uma curva de calibração. Foi preparada uma solução-estoque, com uma concentração de 0,16 mg/mL do complexo extrato-NPsAg (conforme item 4.2.2), utilizando como diluente, água destilada. A partir da solução-estoque, foram obtidas diluições volumétricas com as concentrações de 0,022, 0,045, 0,063, 0,067, 0,090 e 0,112 mg/mL. Utilizando a solução-estoque, foi realizada a espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis), de forma a se verificar o valor de máxima absorvância da amostra. A partir das diluições, foram realizadas as medidas de absorvância no comprimento de onda de 423 nm, da solução-estoque, para cada solução, de modo a correlacionar os valores de absorvância com os valores de concentração das NPsAg em solução, para a construção da curva analítica. A equação da reta foi obtida por regressão linear.

No estudo de liberação as amostras foram imersas em 5 mL de água destilada e mantidas em temperaturas de 37 e 40 °C. Essas temperaturas foram escolhidas, porque a temperatura do corpo humano em condições normais, se mantém constante, em torno de 36,8 °C. Porém, nas feridas infectadas, ocorre a inflamação como resposta local do tecido vascularizado agredido. Ocorre uma vasodilatação, com aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, aumento da temperatura local (DHANALAKSHMI et al., 2016).

Em intervalos pré-determinados de tempo, a liberação de NPsAg foi acompanhada por meio da espectroscopia do ultravioleta (UV-vis). Utilizou-se um volume de alíquota de 100 µL em 3 mL água destilada. A cada alíquota retirada foi realizada a reposição do mesmo volume de água destilada. A concentração de NPsAg liberada no tempo foi determinada

utilizando a curva de calibração, previamente preparada. A liberação de NPsAg foi estudada avaliando o ajuste dos dados experimentais a um modelo cinético de primeira ordem, determinando-se o parâmetro cinético e a constante de velocidade às temperaturas estudadas.

4.2.7 Estudo termodinâmico de liberação das NPsAg

A energia de ativação (E_a) do processo de liberação de nanopartículas de prata presentes na membrana PVA^{EXT}-NPsAg foi determinada a partir das temperaturas de 37 e 40 °C. A energia de ativação é a energia mínima para que os reagentes iniciem a reação química, com a consequente formação do complexo ativado (UPADHYAY, 2006).

Para o cálculo da energia de ativação da cinética de liberação das nanopartículas de prata utilizou-se a equação de Arrhenius, Equação 9. Essa equação demonstra a relação entre a energia de ativação e a velocidade em que a reação ocorre.

$$k = A_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde A_0 é o fator pré-exponencial (min^{-1}), R é a constante universal dos gases (8,314J/Kmol) e T é a temperatura absoluta (K).

Utilizou-se a Equação 10 para as temperaturas T_1 (37 °C) e T_2 (40 °C) sendo $T_2 > T_1$.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 10})$$

Através de um rearranjo algébrico, que subtrai a equação com a temperatura mais alta (T_2) pela equação com a temperatura mais baixa T_1 , chegou-se a Equação 11, determinando-se o valor energia de ativação (E_a) necessária para abertura das cadeias poliméricas da membrana PVA^{EXT}- NPsAg, para a liberação de nanopartículas de prata.

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde k_2 e k_1 são as constantes de velocidade nas temperaturas T_2 (40 °C) e T_1 (37 °C), respectivamente.

O parâmetro termodinâmico da entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG) foram utilizados para estudar o processo de liberação de NPsAg da membrana PVA^{EXT}-NPsAg.

A entalpia é a quantidade de energia contida em uma determinada substância que sofre reação, ela calcula o calor de um sistema, é a forma mais usada de expressar o conteúdo calorífico de um componente em uma reação química. A variação da Entalpia está na diferença entre a entalpia dos produtos e a dos reagentes, sendo assim, o calor de uma reação corresponde ao calor liberado ou absorvido em uma reação. Para calcular outros parâmetros termodinâmicos utilizou-se a Equação 12, de Eyring Polanyi.

$$k = \frac{k_B T}{h} K_c^\ddagger \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde k_B é a constante de Boltzman, T temperatura, h a constante de Planck e, K_c^\ddagger a constante de equilíbrio entre o complexo ativado e os reagentes.

A equação de Eyring é a equação fundamental da teoria do estado de transição. Introduzindo algumas grandezas termodinâmicas (correspondentes à etapa de formação do complexo ativado) a equação de Eyring pode ser tratada termodinamicamente. De acordo com a termodinâmica, a energia de Gibbs da reação está relacionada à constante termodinâmica de equilíbrio pela Equação 13.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde ΔG^0 é a energia livre de Gibbs, R é a constante dos gases, T é a temperatura e K_{eq} é a constante de equilíbrio entre produtos e reagentes. Nessa expressão, o estado padrão é definido como sendo um estado de atividade unitária. Se ao invés de atividade unitária, for definido um estado padrão de concentração unitária, pode-se utilizar a Equação 14.

$$\Delta G_c^0 = -RT \ln k_c \quad (\text{Eq. 14})$$

A constante de equilíbrio que aparece na expressão é, agora, a constante estequiométrica de equilíbrio. Se esta expressão for aplicada à etapa de formação do complexo ativado, resulta na Equação 15.

$$(\Delta G)_c^0 = -RT \ln k_c^\ddagger \quad (\text{Eq. 15})$$

Desconsiderando o sub-índice, c, e colocando a expressão sob a forma exponencial, obtém-se a Equação 16:

$$k_c^\ddagger = e^{-\frac{(\Delta G_c^\ddagger)^0}{RT}} \quad (\text{Eq. 16})$$

Substituindo k_C^\ddagger na equação de Eyring, obtém-se a Equação 17:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{(\Delta G^\ddagger)^0}{RT}} \quad (*) \quad (\text{Eq. 17})$$

Lembrando, da termodinâmica, que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, e aplicando esta relação à etapa de formação do complexo ativado, obtém-se a Equação 18:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (\text{Eq. 18})$$

Utilizando este conceito pode-se reescrever a Equação 19 * da seguinte forma:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{(\Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger)^0}{RT}} \quad (\text{Eq. 19})$$

Aqui é importante estabelecer as seguintes grandezas de reação correspondentes à etapa de formação do complexo ativado: $(\Delta G^\ddagger)^0$ energia de Gibbs padrão de ativação, $(\Delta S^\ddagger)^0$ entropia padrão de ativação, $(\Delta H^\ddagger)^0$ entalpia padrão de ativação. Essas grandezas de reação se referem a um estado padrão de concentração unitária (CASTELLAN, 1973; ATKINS, 1999; NETZ; ORTEGA, 2002).

4.2.8 Atividade antimicrobiana das membranas PVA^{EXT}-NPsAg

Foram realizados ensaios microbiológicos por meio do método bioanalítico *in vitro* com linhagens Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* LB25923 e Gram-negativa, *Escherichia coli* LB25922 por meio do teste de inibição de halo. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra. As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio de enriquecimento, caldo TSB em temperatura ambiente por 48 horas. Dessa cultura foram feitas suspensões e padronizada a turvação equivalente a solução padrão de 0,5 da escala MacFarland. Isto significa que há aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias UFC/mL. As cepas bacterianas foram semeadas em placas de Petri de 100 x 40 mm, em meio *plate count* agar (PCA).

O estudo para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) foi realizado utilizando a técnica de disco-difusão em ágar impregnados com 10 μ L da solução aquosa em equilíbrio com a membrana PVA^{EXT}-NPsAg, preparadas nas concentrações de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02; 0,008; 0,006; 0,004; 0,0035; 0,002 mol/L, após a semeadura do inóculo

bacteriano. A análise do potencial bactericida das membranas PVA^{EXT}-NPsAg foi estudada a partir dos diâmetros de halos de inibição, para evidenciar o perfil de sensibilidade das bactérias.

4.2.9 Ensaios de citotoxicidade *in vitro* da membrana PVA^{EXT}-NPsAg

Os ensaios biológicos para avaliação da biocompatibilidade dos materiais candidatos a biomateriais são realizados através de uma grande variedade de testes *in vitro* e *in vivo* e fornecem informações úteis a respeito da interação do material com o ambiente fisiológico (ABRAHAM; CUADRADO, 2004). Nesse caso, os ensaios *in vitro* contribuem para a análise dos possíveis riscos associados à sua aplicação invasiva no corpo humano e identificam os materiais que apresentam as características biológicas adequadas para sua utilização nos estudos clínicos *in vivo*. O teste de compatibilidade *in vivo* envolve a experimentação animal e é fundamental para a identificação de possíveis riscos em potencial que o biomaterial (CANO; PERAIRE, 2004). Nesse caso, a experimental animal é planejada levando-se em consideração os ensaios de triagem *in vitro* baseados na norma ISO 10993-5 (ISO, 2009).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como a possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto.

A norma ISO 10993-5: 2009 contempla como ensaio preliminar de biocompatibilidade o teste de extrato, teste de contato direto e teste de contato indireto. O ensaio do extrato possibilita a avaliação qualitativa e quantitativa da citotoxicidade dos biomateriais através da viabilidade de uma linhagem celular específica quando em contato com os extratos dos materiais candidatos a biomateriais. Nesse caso, o ensaio do extrato avalia se alguma substância nociva para a linhagem celular que está sendo utilizada, a exemplo de resíduos de catalisadores, monômeros ou algum outro resíduo químico são lixiviados do material sintético.

Nesse estudo foi utilizado o ensaio *in vitro* de extrato para a avaliação da citotoxicidade de membranas de PVA^{EXT}-NPsAg contra linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO- K1, ATCC CCL 61, American Type Culture Collection). As células CHO são uma linha celular cultivada em laboratório derivada de células dos ovários de hamsters chineses. A utilização de células CHO deve-se ao fato de que os hamsters chineses são mamíferos de fácil criação em laboratório devido ao seu pequeno tamanho e baixo

número de cromossomos, o que os torna um bom modelo para estudos de cultura de tecidos celulares. As células CHO são modelos celulares amplamente utilizados em biologia, pesquisa médica e farmacêutica. Além disso, são frequentemente utilizados para fins comerciais para fabricar proteínas recombinantes para uso na terapia clínica. O CHO-K1 é considerado uma das linhagens celulares mais sensíveis para os estudos de citotoxicidade de materiais sintéticos candidatos a biomateriais (RUIZ et al., 2006; FERRER et al., 2009; LU et al., 2013).

A avaliação quantitativa da viabilidade celular das células CHO-K1 frente às membranas PVA^{EXT}-NPsAg foi realizada através do uso do corante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio). O MTS é um sal amarelo que é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial resultando em um sal de formazan de cor púrpura. Esta redução ocorre somente nas células vivas. Desta maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura que é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados, solúveis em água. Nesse caso, o MTS foi utilizado em conjunto com um agente acoplador de elétrons, o PMS (fenazina metosulfato). A Figura 15 ilustra o mecanismo de avaliação da citotoxicidade de um material através do ensaio do MTS.

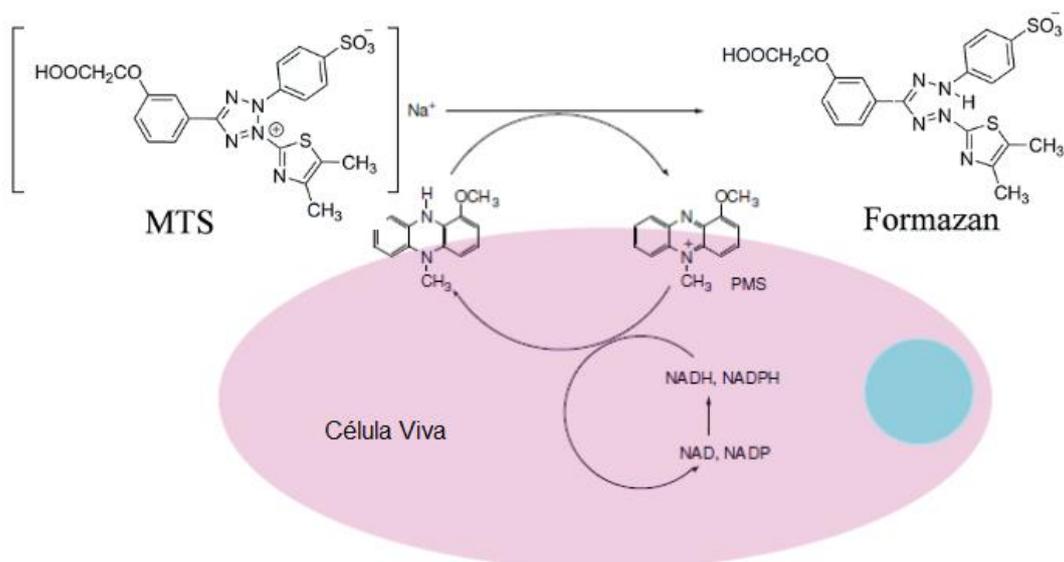


Figura 15. Mecanismo de atuação do corante supravital MTS na avaliação da citotoxicidade de um material.

Para o ensaio de citotoxicidade a membrana PVA^{EXT}-NPsAg foi inicialmente esterilizada com radiação gama na dose de 25kGy à temperatura ambiente em uma fonte tipo Gammacell do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CTR-IPEN, São Paulo, Figura 16.



Figura 16. Irradiador Gammacell do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CTR-IPEN, São Paulo. O irradiador utiliza o ^{60}Co como emissor gama.

Inicialmente as amostras de PVA^{EXT}- NPsAg foram cortadas com área de 1cm^2 em condições estéreis e em seguida foram colocadas em tubos *falcon* com 1mL de meio de cultura RPMI sem soro, por 48 horas, para preparação do extrato. Após este período foi feita a filtração das amostras e as diluições seriadas do extrato para concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25%. Os controles positivo e negativo foram uma solução de fenol 0,4% e polietileno de alta densidade (PEAD), respectivamente. A análise da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o corante vital MTS para a determinação do número de células viáveis em proliferação. Os extratos obtidos da membrana de PVA^{EXT}-NPsAg, do controle positivo e do controle negativo, bem como o branco (apenas meio de cultura RPMI) foram pipetados em placas ELISA de 96 poços, sendo $50\mu\text{L}$ de solução por poço, em quadruplicata. Uma suspensão de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) com 6×10^4 células/mL foi preparada e $50\mu\text{L}$ (3000 células) foram pipetados por poço. Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37°C , por 72h em atmosfera umidificada em atmosfera com 5% de CO_2 .

A viabilidade celular foi medida pela adição de solução MTS com PMS (metasulfato de fenazina), na diluição de 20:1. Em seguida, as placas foram incubadas por 2h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . As microplacas ELISA foram em seguida lidas em espectrofotômetro leitor de placas ELISA da marca SpectraMax 190 a utilizando-se o comprimento de onda de 490 nm, Figura 17.

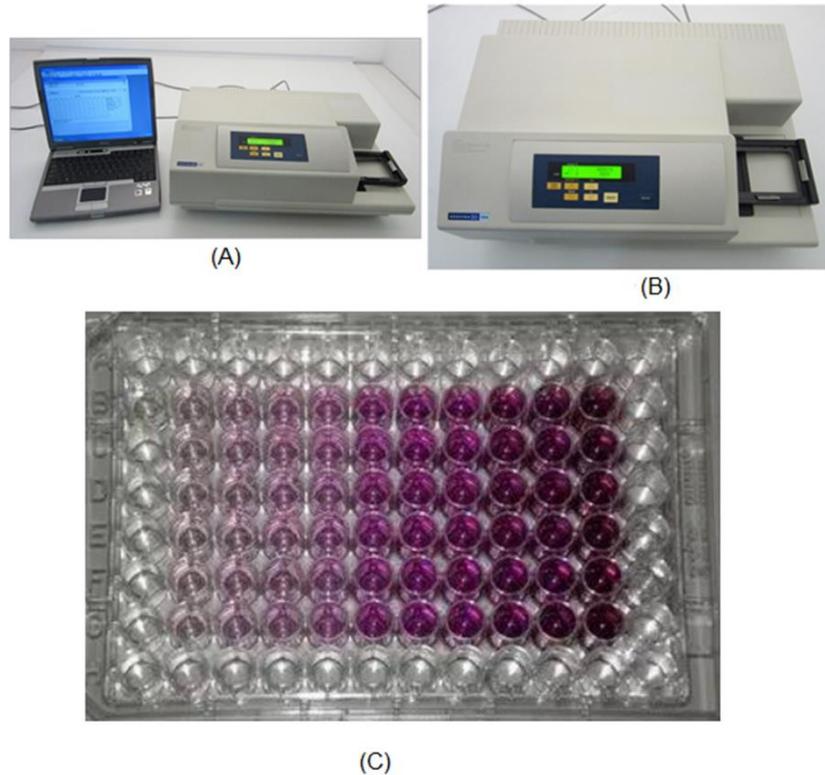


Figura 17. Espectrofotômetro SpectraMax 190 utilizado na determinação da viabilidade celular nos ensaios de citotoxicidade das membranas de PVA^{EXT} NPsAg através do método do extrato. (A) Visão geral do equipamento, (B) Detalhe para inserção da placa ELISA e (C) Resultado observado nas placas ELISA. A intensidade da cor é proporcional ao número de células viáveis.

Uma curva de calibração levando em consideração a concentração de células viáveis foi previamente preparada para determinação da viabilidade celular. O cálculo da viabilidade celular é obtido pela Equação 20:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{DOD}{DOC} \times 100 \quad (Eq. 20)$$

Onde DOD representa a densidade óptica da diluição e DOC a densidade óptica dos controles.

Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%), que foi colocada em função da concentração do extrato em gráfico para obter as curvas de viabilidade celular. Através desta curva pode-se encontrar o índice de citotoxicidade (IC_{50%}) que significa a concentração do extrato que induz 50% de lise ou morte celular e como consequência a inibição de incorporação do corante MTS. A partir dos dados obtidos foi construído o gráfico de viabilidade celular em função da concentração dos extratos da amostra.

4.3 Técnicas de caracterização

As técnicas de caracterização utilizadas neste estudo, incluem a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis), análise térmica por meio da TGA, DTGA e DSC, microscopia eletrônica de varredura-MEV e espectroscopia de energia dispersiva- EDS, explicadas a seguir.

4.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção, em que a energia absorvida se encontra na região do infravermelho, entre as regiões do visível e das micro-ondas. A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico (determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga) da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional. Somente nessas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho (100 a 10000 cm^{-1}) (COATES, 2000).

O termo espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier, do inglês, *Fourier transform infrared* (FTIR) provém do fato de ser necessário recorrer-se às transformadas de Fourier (um processo matemático) para converter os dados recolhidos no espectro de radiação. Para a espectroscopia FTIR utiliza-se um feixe de luz composto, com diversos comprimentos de onda. Após a medição da absorbância, o feixe de luz é modificado, passando a conter uma combinação de comprimentos de onda diferente do feixe anterior, o qual origina um segundo conjunto de dados. Este processo é repetido várias vezes e, no final, os dados são recolhidos por um computador, o qual irá inferir, a partir dos dados referentes a cada conjunto de comprimentos de onda, a absorção para comprimento de onda (SKOOG; HOLLER, 2009).

Na espectroscopia FTIR, a radiação no infravermelho atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro com FTIR, emprega um interferômetro de Michelson, com a finalidade de dividir o feixe da radiação da fonte de infravermelho de tal forma que ele reflita simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo. Os feixes refletidos voltam a se combinar e passam através da amostra para o detector e são reproduzidos na forma de um gráfico de tempo contra a intensidade do sinal denominado de interferograma. Esse processo é quantizado e o espectro vibracional se apresenta como uma série de bandas. A localização dessas bandas no espectro pode ser especificada em unidades relacionadas com a frequência (ν) e pelo seu número de onda ($\bar{\nu}$) utilizando a unidade centímetro inverso, $4000 \text{ cm}^{-1} - 650 \text{ cm}^{-1}$, que é diretamente proporcional à energia.

A frequência vibracional ou comprimento de onda de uma absorção depende da massa relativa dos átomos e da constante de força da ligação através da Equação 21.

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\frac{M_x M_y}{M_x + M_y}}} \quad (\text{Eq. 21})$$

Onde:

ν : frequência vibracional (cm^{-1})

c : velocidade da luz (cm/s)

K : constante de força da ligação (dinas/cm)

M_x e M_y : massa do átomo x e massa do átomo y, respectivamente (g).

A intensidade da banda é medida pela transmitância ou pela absorbância. A transmitância é definida pela razão entre a energia transmitida e a energia incidente na amostra analisada e a absorbância é o logaritmo na base dez do recíproco da transmitância, Equação 22 (SILVERSTEIN, et al., 2007).

$$T = \frac{E_t}{E_i} \quad A = \log 1/T \quad (\text{Eq. 22})$$

Para a caracterização físico-química do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, medidas de espectroscopia de FTIR foram realizadas em amostras liofilizadas dos extratos da canela obtidos pelos procedimentos da extração do princípio ativo da canela. Esta técnica foi utilizada para caracterizar estruturalmente as moléculas presentes nos extratos aquosos da canela obtidos pelos procedimentos de extração. Na biossíntese das NPsAg, a técnica foi utilizada para observar a interação das NPsAg formadas com o extrato *Cinnamomum zeylanicum*. A técnica de FTIR também foi utilizada para confirmar a reticulação dos filmes de PVA com ácido cítrico, assim como a interação das NPsAg com a membrana de hidrogel PVA.

4.3.2 Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis)

A espectroscopia de UV-vis foi utilizada na caracterização do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* obtido, para a identificação dos grupos químicos redutores (aldeído) presentes no componente cinamaldeído, um dos constituintes do extrato. Para a análise por UV-vis foi retirada da solução do extrato, uma alíquota de 100 μ L, diluída em 3 mL de água destilada, utilizando como branco a água destilada.

Esta técnica também foi utilizada para a confirmação da redução das NPsAg pelo extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, através da análise da banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS), na ausência e na presença do PVA (biossíntese *in situ*). O UV-vis foi aplicado também no estudo da liberação de NPsAg da membrana PVA-NPsAg, em água destilada. Para este estudo foi construída uma curva analítica de calibração, numa faixa de concentrações do analito, o complexo extrato-NPsAg. Utilizando a lei de Lambert-Beer ($A=\epsilon bC$) foi relacionada a concentração do analito à medida de absorvância. A partir da equação da reta ajustada à lei de Lambert-Beer, determinou-se a concentração de NPsAg liberada no tempo.

4.3.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise Termogravimétrica (TGA) é uma técnica de análise térmica onde a variação de massa da amostra é analisada em função da temperatura ou tempo de aquecimento, utilizando um programa controlado de temperatura. Essa técnica fornece informação sobre as alterações que o aquecimento ocasiona na amostra analisada, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que se inicia a decomposição térmica, avaliar processos

de desidratação, oxidação, avaliar a presença de reticulação e avaliar o teor de resíduo. Na análise termogravimétrica derivada (DTGA) são obtidas curvas que correspondem à derivada primeira da curva TGA, onde as inflexões apresentadas na curva TGA são substituídas por picos, na curva DTGA, que delimitam áreas proporcionais às modificações de massa ocorridas durante a decomposição do material (IONASHIRO et al, 2014). A análise térmica de TGA foi realizada para caracterizar o extrato de *Cinnamomum zeylanicum* para investigação, a partir da decomposição térmica, dos possíveis produtos do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*. Foi utilizado analisador termogravimétrico TGA-50 da Shimadzu. A faixa de temperatura analisada foi de 25 a 600 °C, realizada a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, utilizando-se atmosfera de nitrogênio e suporte de amostra de alumina.

4.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica termo analítica DSC determina a diferença na quantidade de calor necessária para aumentar a temperatura de uma amostra e da amostra de referência. A partir dos dados é possível identificar transições térmicas no material, como temperatura de fusão, transições vítreas e determinar a entalpia de reações químicas. A temperatura de transição vítrea é a temperatura em que a fase amorfa de um material polimérico muda do estado vítreo (em temperatura baixa) ao estado borrachoso (em temperatura mais alta), como consequência da mobilidade molecular de curto alcance (em torno de átomos de carbono). Abaixo da T_g o material é rígido, sem mobilidade, e acima desta temperatura, o polímero adquire certa mobilidade, com o movimento de segmentos moleculares. Essa mobilidade está limitada pela reticulação ou emaranhamento das cadeias poliméricas, que conduzem à formação de ligações secundárias entre as macromoléculas (HAINES, 1995).

A análise de DSC foi realizada no extrato de *Cinnamomum zeylanicum* para investigação, a partir dos eventos térmicos presentes na amostra, dos possíveis produtos contidos no extrato de *Cinnamomum zeylanicum*. Foi realizada em um equipamento DSC Shimadzu 60 Plus. Foi utilizado cerca de 10 mg do extrato, usando suporte de amostra de alumínio hermeticamente fechado. A amostra foi aquecida entre 25 e 200 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 25 ml min⁻¹.

4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva-EDS

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de caracterização que permite a criação de imagens da superfície de amostras com alta resolução. O princípio de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, por um filamento de tungstênio, mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30kV, para explorar a superfície da amostra e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação.

Esse feixe de elétrons interage com a amostra e produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo. Quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação. Neste volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidas são utilizadas para formar as imagens ou para efetuar análises físico-químicas. A análise por espectroscopia de energia dispersiva- EDS utiliza um detector de energia dispersiva acoplado ao MEV, para análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. A análise é feita através da identificação dos raios X emitidos pela amostra, resultantes da interação com o feixe eletrônico, sendo possível determinar a composição de regiões com até 1 μm de diâmetro.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a confirmação da presença de prata metálica e determinação da estrutura cristalina das nanopartículas de prata na matriz polimérica. A membrana de hidrogel PVA-NPsAg foi submetida à análise de difração de raios X, com radiação de $\text{CuK}\alpha$ com $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$, com medidas em uma faixa de variação de $2\theta=10^\circ$ a 60° . As imagens de Microscópio eletrônico de Varredura (MEV) com detector de energia dispersiva (EDS), foram utilizadas para a análise química da membrana de hidrogel PVA-NPsAg através da identificação dos raios X emitidos pela amostra. As amostras foram sujeitas a vácuo e previamente metalizadas com a deposição de uma fina camada de ouro. No MEV foram obtidas várias imagens para os hidrogéis sintetizados, de resolução de 500 e 1000X e com tensão de 10 kV (CANEVALORO, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para estudar a morfologia da superfície das amostras analisadas e para confirmar a presença de prata metálica, estrutura cristalina das nanopartículas de prata, na matriz polimérica. As amostras analisadas foram o extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, complexo extrato-NPsAg, PVA e membrana PVA-

NPsAg. Todas as amostras foram previamente metalizadas, com a deposição de uma fina camada de ouro. O microscópio eletrônico de varredura (MEV) com detector de energia dispersiva (EDS) utilizado foi o microscópio eletrônico Zeiss Modelo EVO MA15.

4.3.6 Difração de raio X (DRX)

Os difratogramas de raios-x foram realizados no Laboratório de Cristalografia da UNIFAL-MG. As medidas foram realizadas no Difratômetro Modelo IV (Rigaku, Japão), utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. Os difratogramas de raios-x foram realizados no intervalo de angular $2(\theta)$ de $5,00$ a $90,00^\circ$, passo de $0,02^\circ$, com fenda de 5 mm e tempo de 5s/passos .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extratos obtidos de *Cinnamomum zeylanicum*

Os extratos vegetais obtidos por maceração dinâmica, no procedimento A e por decocção, no procedimento B, apresentaram diferenças morfológicas. O extrato obtido por maceração dinâmica se apresentou na forma viscosa com aspecto gelatinoso. O extrato por decocção se apresentou semelhante a uma infusão. Atribuiu-se esta diferença à presença de polissacarídeo, o que foi demonstrado posteriormente na caracterização físico-química do extrato vegetal por maceração dinâmica.

O extrato produzido por maceração dinâmica, foi escolhido para ser utilizado na biossíntese de redução da prata, devido a presença do polissacarídeo, pois este glicídio atua como agente redutor e favorece a estabilização das nanopartículas, evitando a agregação da prata formada no processo de biossíntese. A análise dos espectros UV-vis comparativos entre o extrato obtido por maceração dinâmica e uma solução aquosa do cinamaldeído puro são apresentados na Figura 18.

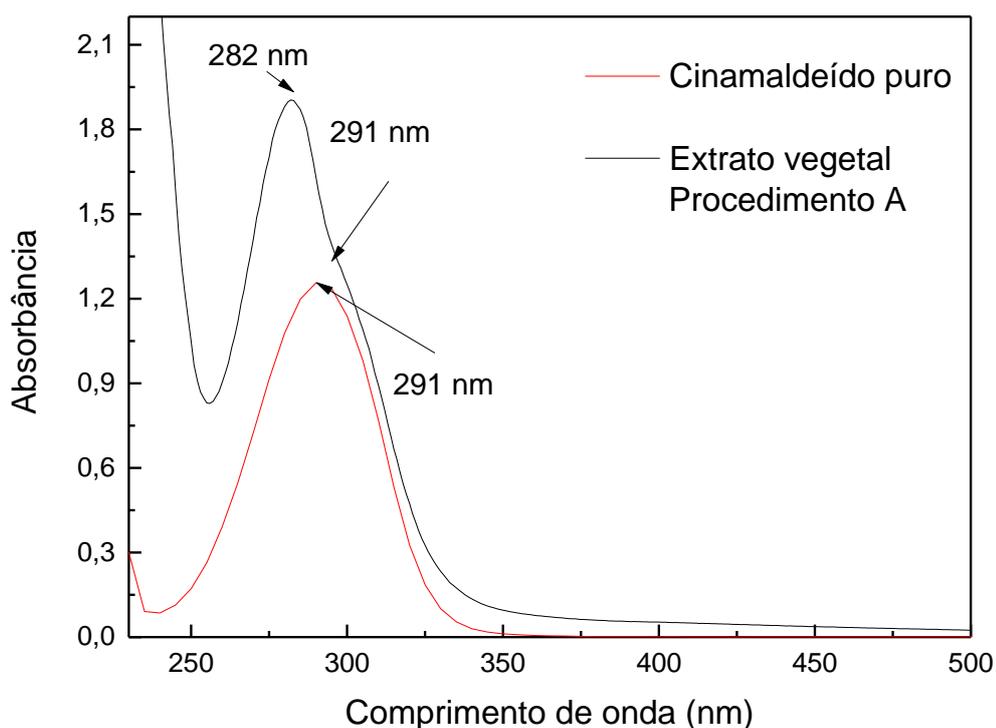


Figura 18. Espectros UV-vis comparativo do extrato vegetal de *Cinnamomum zeylanicum* e uma solução aquosa do cinamaldeído puro.

A solução aquosa do extrato vegetal obtido por maceração dinâmica apresentou uma banda em torno de 282 nm e um ombro em uma banda de absorção em torno de 291 nm, dando um indicativo de absorção durante a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$, característica do grupo funcional carbonila (C=O) do composto orgânico cinamaldeído, presente no *Cinnamomum zeylanicum*. A absorção em 291 nm, é confirmada no espectro da substância pura. Nessa interação da radiação eletromagnética, um elétron é promovido de um estado eletrônico de baixa energia para outro de energia mais elevada (DENNEY; SINCLAIR, 1988).

Para o cálculo do rendimento da extração de *Cinnamomum zeylanicum*, utilizou-se a Equação 6, do item 4.2.1.2 do capítulo de Metodologia. Para esse cálculo, 40 mL do extrato da canela obtido por maceração dinâmica foi liofilizado. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento da extração aquosa de *Cinnamomum zeylanicum* por maceração dinâmica.

Massa de canela (g)	Massa obtida na liofilização (g)	Rendimento (%)
1,0	0,0789	7,89

O extrato utilizado na biossíntese apresenta uma concentração aproximada de 0,002 g/mL. O rendimento obtido é próximo ao encontrado na literatura (WARDATUN et al., 2017).

5.1.1 Caracterização físico-química do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*

A caracterização do extrato obtido por maceração dinâmica foi realizada por meio da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier-FTIR, pela análise termogravimétrica-TGA e DTGA e pela análise de calorimetria exploratória diferencial- DSC.

5.1.1.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

Os espectros FTIR do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* e cinamaldeído puro é apresentado nas Figuras 19A e 19B.

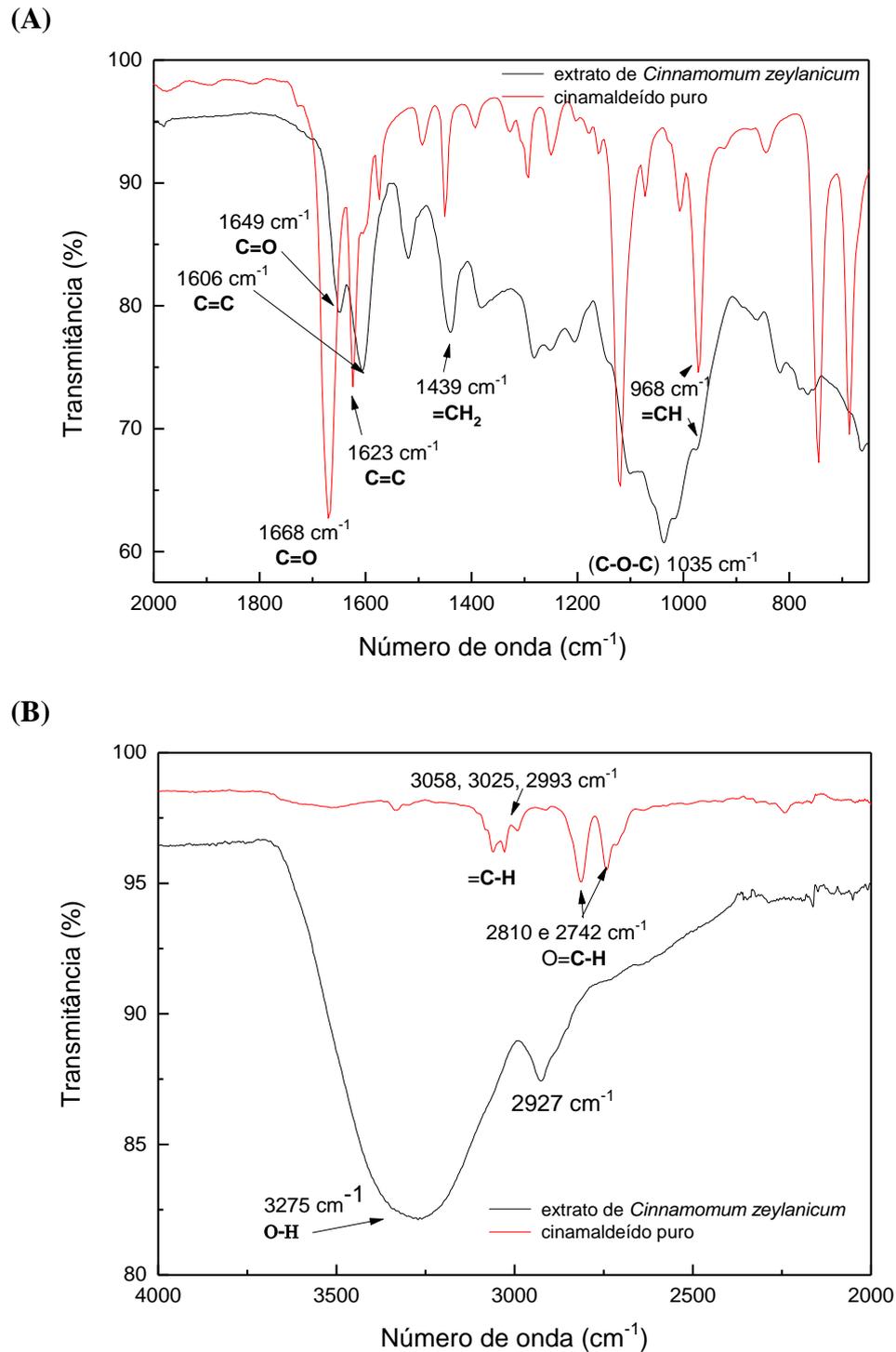


Figura 19. Espectro FTIR comparativo do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* e cinamaldeído puro (A) 2000- 650 cm^{-1} , (B) 4000-2000 cm^{-1} .

Na faixa de 2000 a 650 cm^{-1} observa-se as bandas de estiramento em 1649 cm^{-1} e 1606 cm^{-1} , atribuídas às ligações C=O e C=C respectivamente, estas bandas também são observadas no cinamaldeído puro (SANTIAGO-ADAME et al., 2015). Verifica-se também a banda em 1439 cm^{-1} relativa à vibração de dobramento da ligação =C-H e a banda de vibração da ligação C-O-C em 1035 cm^{-1} .

O espectro de FTIR do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* na faixa entre 4000 e 2000 cm^{-1} apresenta uma banda larga em 3275 cm^{-1} , característica de grupos hidroxílicos (OH), presente na estrutura química dos polissacarídeos. Esta banda não é observada no espectro do cinamaldeído puro, pois este composto não apresenta o grupo funcional O-H em sua estrutura química, como mostra a Figura 20. A banda em 2927 cm^{-1} é uma banda larga o que sugere que ela seja formada pela sobreposição de várias bandas, como observado no espectro do cinamaldeído puro, as bandas em torno de 3000 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação C-H de aromáticos, =C-H, e as bandas em torno de 2810 cm^{-1} , atribuídas a C-H (de carbonila) (AL- BAYATI; MUTHANNA, 2009).

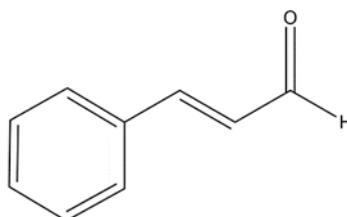


Figura 20. Estrutura química do cinamaldeído.
(SHREAZ et al., 2016)

Os resultados obtidos na caracterização por FTIR indicam que o extrato de *Cinnamomum zeylanicum* obtido por maceração dinâmica contém além do princípio ativo, o cinamaldeído, uma substância de natureza polissacarídea.

5.1.1.2 Análise termogravimétrica- TGA e DTG

A variação da massa do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* em função da temperatura foi estudada por análises das curvas TG e DTG, Figura 21. A partir da curva de TG, foram determinados os parâmetros de faixa de degradação, teor de massa degradada e resíduo não degradado até a temperatura final da análise em 800 °C. A partir da curva de DTGA, foram observadas as temperaturas de máxima velocidade de perdas de massa (IONASHIRO, 2014).

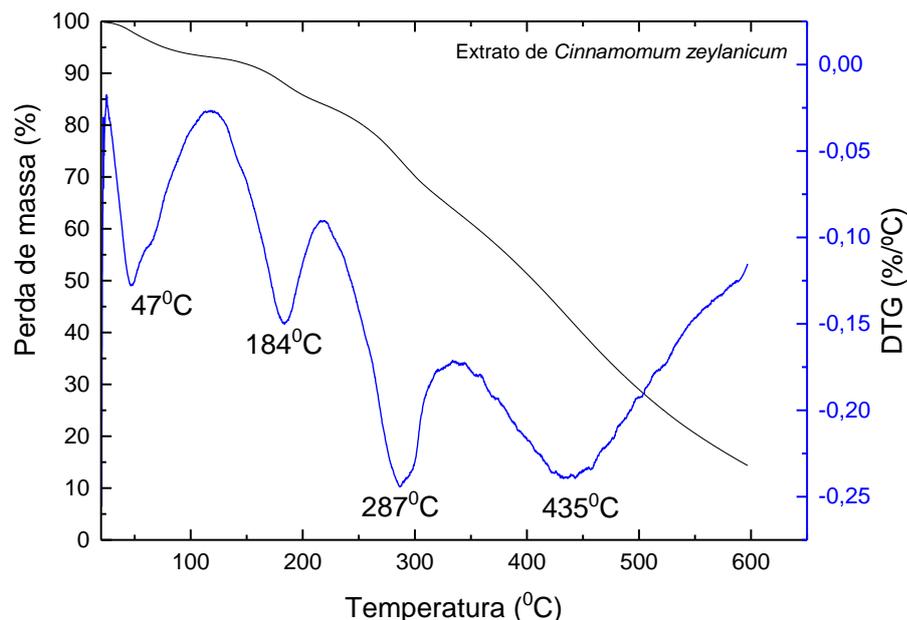


Figura 21. Curvas TGA e DTGA do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*.

De acordo com as curvas TG e DTG do extrato liofilizado, observa-se um primeiro evento térmico no intervalo compreendido entre o início da análise em 28 °C até 100 °C, com perda de massa em torno de 7%, podendo ser atribuída à perda de água superficial ou de umidade do material após liofilização. Finalizado o processo de desidratação, observa-se um processo de decomposição térmica contínua da amostra.

Na curva DTGA verifica-se que a degradação acontece em três etapas com velocidade máxima em 184 °C, 287 °C e 435 °C. A perda de massa com velocidade máxima para a temperatura de 184 °C, pode ser atribuída ao princípio ativo, cinamaldeído, que de acordo com a literatura, inicia a degradação em 100 °C (KUN et al., 2017). Observa-se que esta etapa de degradação corresponde a 10% da massa total do extrato, o que sugere que o teor de cinamaldeído no extrato é em torno de 10%. As perdas de massa com velocidade máxima de 287 °C e 435 °C podem ser atribuídas à decomposição de espécies de natureza orgânica presentes no extrato e carboidratos, respectivamente (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Acima de 600 °C se observa um teor residual de aproximadamente 14% da amostra. Este residual pode ser associado a compostos cíclicos, de maior estabilidade térmica, formados durante as reações de decomposição. A análise de TGA confirma o resultado encontrado no FTIR, mostrando a presença de uma massa considerável de polissacarídeos no extrato de *Cinnamomum zeylanicum*.

5.1.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para caracterizar a variação de energia (fluxo de calor) do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* em função da temperatura foi utilizado o DSC. Os eventos térmicos obtidos desta análise são apresentados na Figura 22.

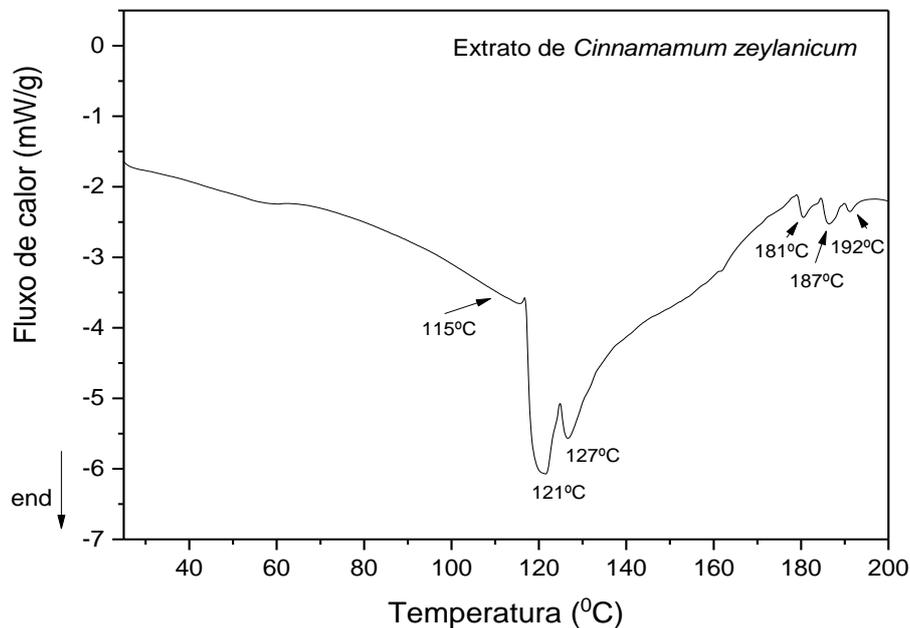


Figura 22. Curva DSC do extrato liofilizado de *Cinnamomum zeylanicum*.

A curva DSC mostra diferentes eventos endotérmicos na faixa de temperatura entre 25-200 °C. O primeiro pico endotérmico, amplo, em 115 °C pode ser atribuído à evaporação de água. Os picos endotérmicos em 121 e 127 °C podem ser atribuídos a temperatura de ebulição do cinamaldeído. A literatura apresenta que o cinamaldeído apresenta uma faixa de temperatura de ebulição, com pico endotérmico em torno de 134 °C (HONGYAN et al., 2010). Este resultado está em conformidade com o resultado obtido no TGA, onde foi observado que o cinamaldeído apresenta uma temperatura máxima de degradação em 184 °C. Os eventos endotérmicos consecutivos observados em 181 °C, 187 °C e 192 °C podem ser atribuídos a reações endotérmicas que acontecem durante a degradação do cinamaldeído.

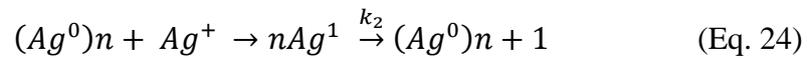
5.2 Biossíntese de redução das NPsAg com o extrato *Cinnamomum zeylanicum*

Antes de iniciar o estudo da biossíntese das NPsAg na presença do poli (álcool vinílico) (PVA) (biossíntese *in situ*) foi realizado um estudo da biossíntese de redução das

NPsAg utilizando apenas o extrato de *Cinnamomum zeylanicum* obtido por maceração dinâmica. A cinética da biossíntese de redução das NPsAg foi acompanhada utilizando o UV-vis. A caracterização físico-química do complexo extrato- NPsAg, foi realizada por FTIR, pela por TG, DTG e MEV.

A biossíntese das NPsAg foi realizada a partir da redução de íons Ag^+ em meio aquoso, a temperatura de $23^\circ C$, utilizando o extrato de *Cinnamomum zeylanicum* como agente redutor e estabilizante e foi acompanhada no tempo, através da espectroscopia UV-vis.

Na biossíntese de redução das NPsAg, o crescimento das nanopartículas se inicia com uma lenta nucleação, seguida do crescimento da superfície das partículas. Esses passos podem ser resumidos segundo as Equações 23 e 24, onde o extrato, utilizado como agente redutor e estabilizante, foi omitido:

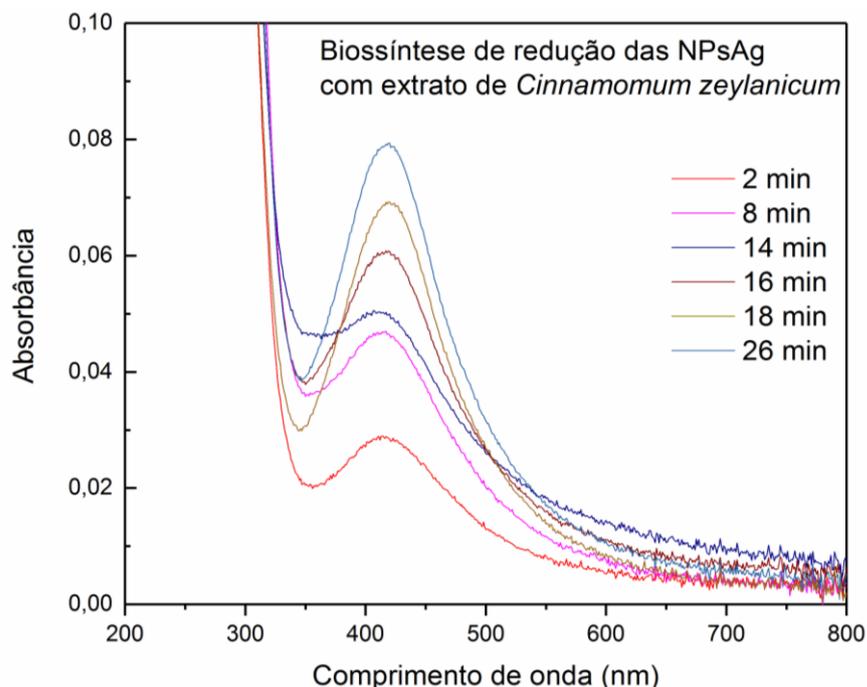


A nucleação ocorre homogeneamente em solução e envolve a redução das espécies Ag^+ em átomos de Ag^0 , seguida pela sua agregação ao tamanho de núcleo crítico $(Ag^0)n$.

Com a formação do núcleo, ocorre uma redução autocatalítica, na superfície das partículas em crescimento, limitando essa razão de crescimento (TATARCHUK; SERGIEVSKAYA, et al., 2013).

5.2.1 Estudo da cinética da biossíntese de redução da Ag^+ pelo extrato de *Cinnamomum zeylanicum*

A evolução gradual de formação das NPsAg foi acompanhada por meio do UV-vis. A Figura 23 apresenta os espectros de absorção no UV-vis em diferentes tempos de reação da cinética de biossíntese de redução da Ag^+ pelo extrato de *Cinnamomum*



zeylanicum.

Figura 23. Espectros de absorção no UV-vis durante o processo da biossíntese das NPsAg.

Os espectros de absorção no UV-vis, apresentam uma banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS) em torno de 415 nm, confirmando a formação das NPsAg. Observa-se no espectro UV-vis que a banda RPS é deslocada a maiores comprimentos de onda, conforme aumento do tempo de reação, até a estabilização em torno de 419 nm. Essa estabilidade pode ser atribuída à presença do polissacarídeo no extrato aquoso de *Cinnamomum zeylanicum* e ocorre, a medida que os grupos hidroxilos (-OH) do polissacarídeo são adsorvidos na superfície das NPsAg, formando uma camada protetora (MOHAN et al., 2014). Como consequência dessa interação física entre as macromoléculas de carboidratos e as NPsAg, conclui-se que os polissacarídeos participam como agente de estabilização estérica.

Nesse tipo de estabilização, com a aproximação das partículas, as camadas adsorvidas se interpenetram e as cadeias macromoleculares de polissacarídeo tendem a se ordenar paralelamente. Desta maneira, no equilíbrio termodinâmico, as partículas permanecem isoladas, formando um complexo extrato-NPsAg estável (DONATI, 2009). Estudos mostram a obtenção eficaz de nanopartículas de prata usando uma diversidade de polissacarídeos como agente estabilizante, como açúcares (DARROUDI et al., 2011, BANKURA, et al., 2012), quitosana (TRAN et al., 2010, REICHA et al., 2012), celulose e seus derivados (CAI et al., 2009), goma arábica (GILS et al., 2010). Uma variação gradual da

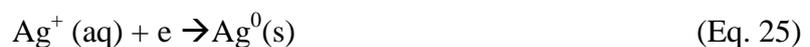
cor de amarelo claro a castanho foi observada durante a reação, Figura 24, fato relacionado à excitação da banda plasmônica (SOLOMON et al., 2007).



Figura 24. Variação da coloração da solução, durante a biossíntese de redução das NPsAg.

Um aumento no tamanho das nanopartículas (NPs) resulta em um deslocamento da banda plasmônica para regiões de maior comprimento de onda. De acordo com a teoria de Mie, apenas uma única banda plasmônica é esperada no espectro de absorção de NPs esféricas, enquanto NPs anisotrópicas podem originar duas ou mais bandas (HERGERT; WRIEDT, 2012). O estudo da biossíntese no tempo mostrou que a largura da banda RPS aumentou no tempo de reação, sendo também observado maior valor da intensidade do pico de absorbância, o que está relacionado à maior quantidade de NPsAg formadas e agregação, existindo, portanto, uma distribuição de tamanho (HAYTHAM, 2015).

O estudo cinético de formação das NPsAg foi realizado no estágio inicial do processo, ou seja, na etapa de nucleação, na temperatura de 23 °C. A cinética de biossíntese das NPsAg pode ser definida a partir da reação química de redox, de acordo com a Equação 25.



A cinética da reação de redox expressa na Equação 25, pode seguir um comportamento de primeira ordem, como apresentado na Equação 26.

$$-\frac{d[\text{Ag}^+]}{dt} = k [\text{Ag}^+] \quad (\text{Eq. 26})$$

Onde $[\text{Ag}^+]$ é a concentração de íons Ag^+ e k é a constante cinética da velocidade da reação.

Resolvendo a integral da Equação 26, tem-se que:

$$\ln \frac{[\text{Ag}^+]_t}{[\text{Ag}^+]_0} = -kt \quad (\text{Eq. 27})$$

Onde $[Ag^+]_t$ e $[Ag^+]_0$ referem-se às concentrações de íons, Ag^+ no tempo (t) e no início do experimento, respectivamente, k é a constante de velocidade e t , o tempo da reação. Considerando que a concentração de íons Ag^+ no tempo siga a Equação 28:

$$[Ag^+]_t = [Ag^+]_0 - [Ag^0]_t \quad (\text{Eq. 28})$$

Onde $[Ag^0]_t$ é a concentração de NPsAg formadas no tempo.

O cálculo da concentração de NPsAg no tempo $[Ag^0]_t$ foi realizado usando a lei de Lambert-Beer ($A=\epsilon bc$), onde os valores de absorvância (A) foram obtidos da Figura 23, (ϵ) é absorvância molar = 4,689 mL/mg*cm, determinada pela curva de calibração, (b) é o caminho óptico da cubeta em cm e (c) é a concentração de NPsAg, $[Ag^0]_t$, em mg/L. Substituindo-se a Equação 28 na Equação 29 tem-se:

$$\ln\left(1 - \frac{[Ag^0]_t}{[Ag^+]_0}\right) = -kt \quad (\text{Eq. 29})$$

A Tabela 3 mostra os valores da absorvância obtidos da Figura 23, para determinar $[Ag^0]_t$ através da lei de Lambert-Beer, assim como os parâmetros da Equação 29. O ajuste destes parâmetros permitiu conferir se a biorredução se ajusta a uma cinética de primeira ordem e também, determinar a constante de velocidade da reação a 23 °C.

Tabela 3. Parâmetros utilizados para o estudo cinético da formação das NPsAg a partir do ajuste dos dados à Equação 29.

Tempo (min)	A	$[Ag^0]_t$ [g/mL*10 ⁻²]	$[Ag^0]_t/[Ag^+]_0*10^{-1}$	$\ln\left[1 - \frac{[Ag^0]_t}{[Ag^+]_0}\right]*10^{-1}$
0	0	0	0	0
2	0,028	0,59	0,57	-0,57
8	0,047	1,00	0,36	-1,00
14	0,06	1,28	1,22	-1,30
16	0,068	1,45	1,38	-1,49
18	0,072	1,53	1,46	-1,58
26	0,079	1,68	1,61	-1,75

O ajuste dos dados, nos tempos iniciais de reação (Tabela 3) à cinética de primeira ordem (Equação 29), para a formação das NPsAg na solução aquosa do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* é apresentada na Figura 25. Foram omitidos os pontos de 8 min e 26 min. para melhor ajuste linear.

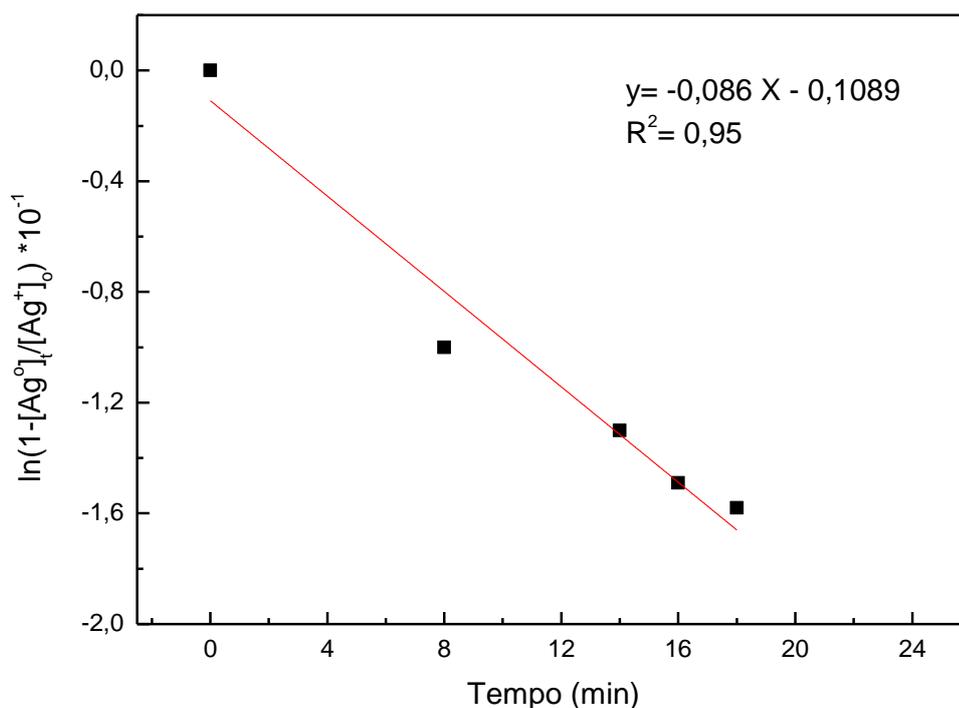


Figura 25. Cinética formação das NPsAg na solução aquosa do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*.

O ajuste dos dados mostra que a biorredução segue uma cinética de primeira ordem, fornecendo os valores da constante de velocidade da reação. A equação da reta é expressa por $y = -0,086 X - 0,1089$ e o coeficiente de regressão linear $R^2 = 0,95$. Portanto, a constante de velocidade da reação (k) é igual a $0,0078 \text{ min}^{-1}$ na temperatura de 23°C . Este valor da constante de velocidade obtido para a biorredução das NPsAg a partir do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* na temperatura estudada é menor que o observado na literatura (ALEKSANDROVA et al., 2015) quando a biorredução é realizada em temperatura a partir de 50°C , mostrando que a velocidade é mais lenta a baixa temperatura, o que sugere a influência da temperatura na velocidade da reação.

5.2.2 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura- MEV e espectroscopia de energia dispersiva- EDS do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* e do complexo extrato-NPsAg

As micrografias do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* puro e do complexo extrato-NPsAg, foram obtidas por MEV e são mostradas nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

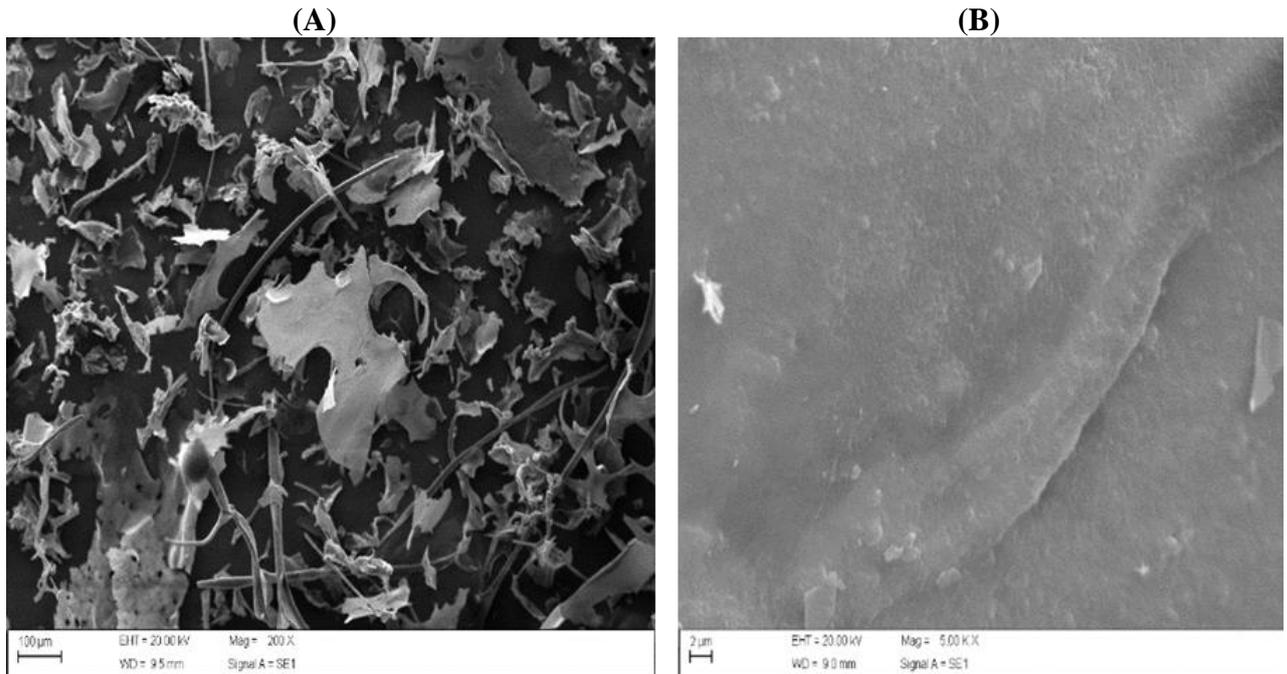


Figura 26. Micrografia MEV do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* puro. (A) magnificação 200x, (B) magnificação 500x.

Na micrografia do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* puro, observa-se uma morfologia heterogênea Figura 26A, com uma superfície compacta, Figura 26B.

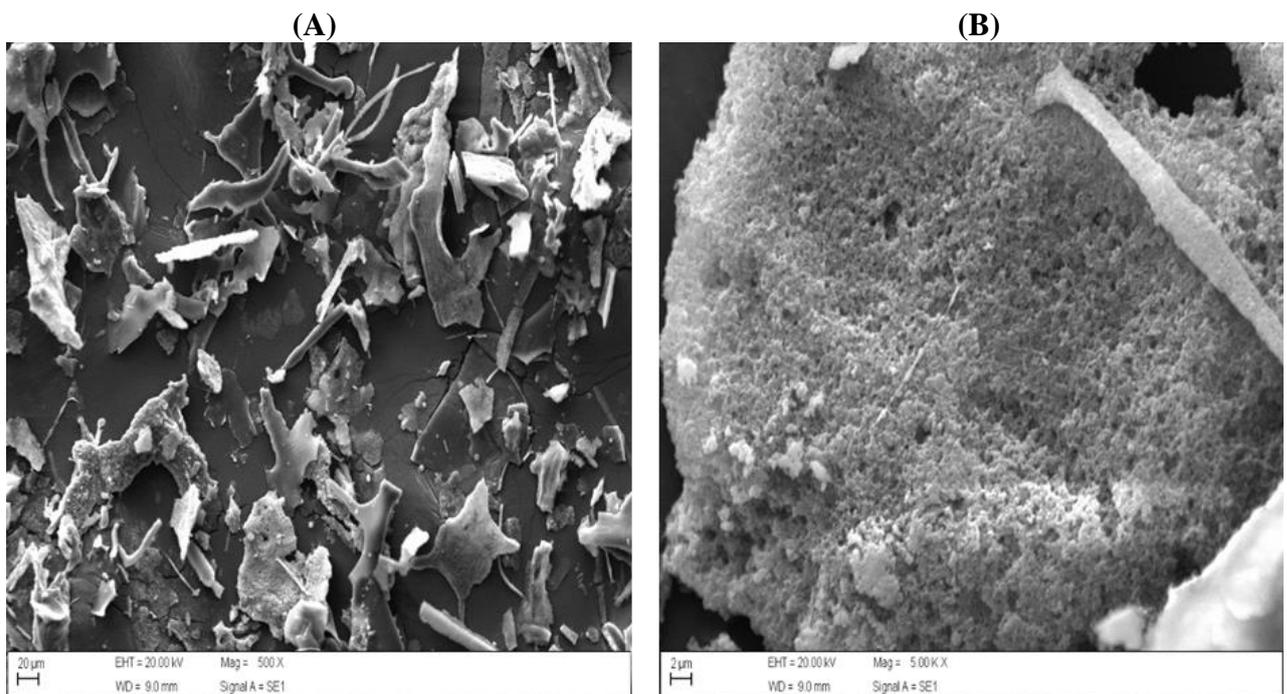


Figura 27. Micrografia MEV do complexo extrato-NPsAg. (A) magnificação 200x, (B) magnificação 500x.

Observa-se na Figura 27A uma morfologia heterogênea semelhante à observada no extrato de *Cinnamomum zeylanicum* puro. Porém, a morfologia da superfície se apresenta

diferente da observada no extrato *Cinnamomum zeylanicum* puro, Figura 27B. Observa-se uma estrutura porosa, apresentando pequenos poros de formatos e tamanhos variados, distribuídos de forma irregular ao longo da estrutura. A morfologia da superfície do complexo extrato-NPsAg sugere que após a reação de biossíntese as NPsAg estabilizadas, pelo material orgânico presente no extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, permanecem adsorvidas na matriz orgânica. A partir dos resultados obtidos por MEV, foi denominado complexo extrato-NPsAg a interação estabelecida entre as NPsAg e a matriz orgânica. Para confirmar a presença de NPsAg na matriz orgânica foi realizada a espectroscopia de energia dispersiva- EDS, associada ao MEV. As Figuras 28 e 29, mostram as micrografias MEV e mapeamento EDS de Ag depositada na superfície da matriz orgânica.

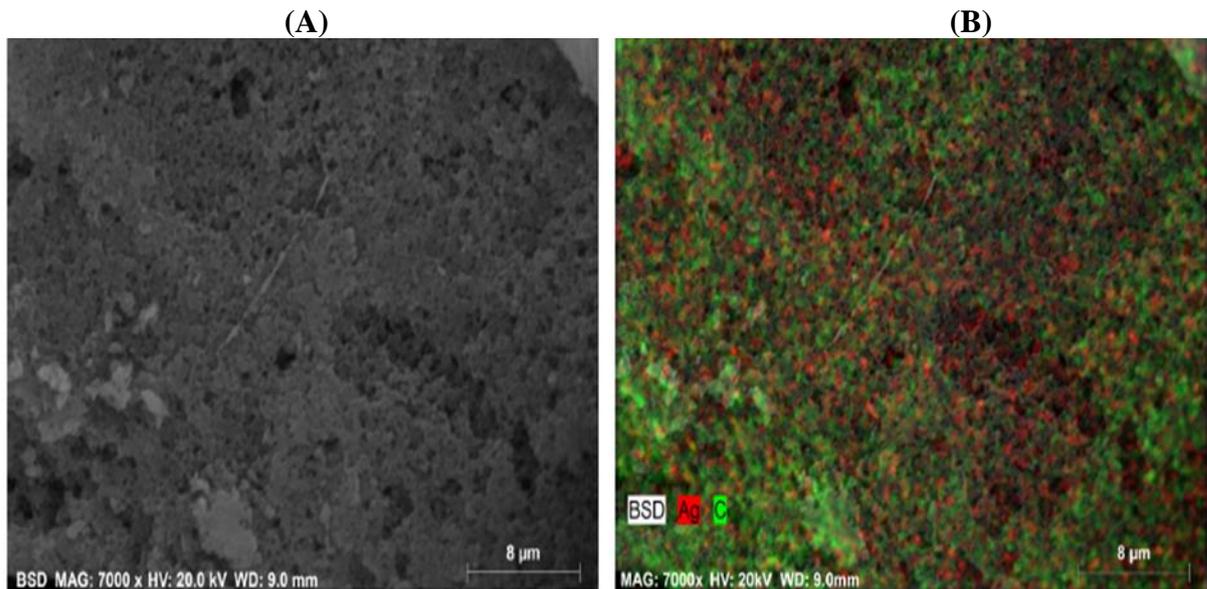


Figura 28. Mapeamento MEV-EDS de Ag depositada na superfície da matriz orgânica, magnificação 7000x.

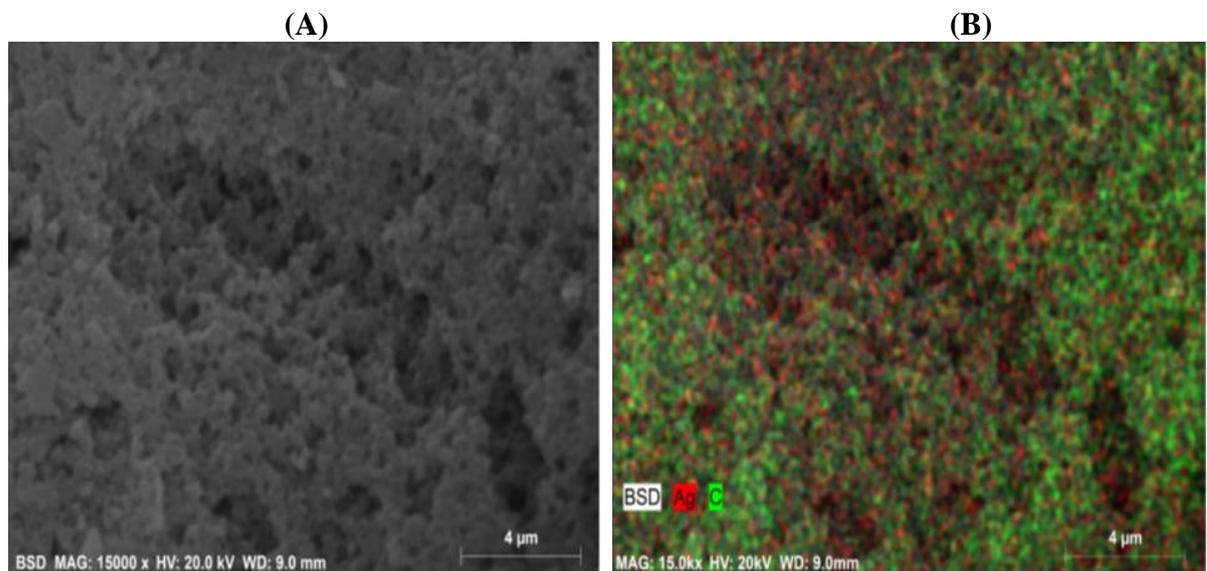


Figura 29. Mapeamento MEV-EDS de Ag depositada na superfície da matriz orgânica, magnificação 15000 x.

Pelo mapeamento MEV- EDS, observa-se aglomerados de NPsAg distribuídos através de toda a superfície da matriz orgânica do extrato. De maneira geral, as nanopartículas metálicas obtidas por síntese verde ao longo da reação e de acordo com o tempo de incubação, podem variar quanto ao tamanho e quanto à forma (KUMAR et al., 2010). O espectro de energia dispersiva- EDS do complexo extrato-NPsAg, é apresentado na Figura 30.

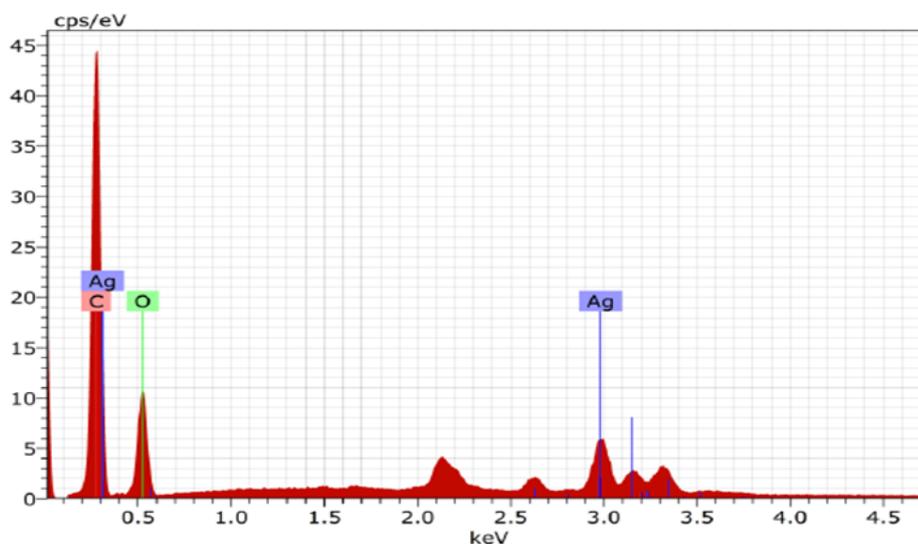


Figura 30. Espectro de EDS do complexo extrato-NPsAg.

Observa-se pelo espectro de EDS do complexo extrato-NPsAg, apresenta um pico de emissão em aproximadamente 3 keV, típico de absorção de prata metálica, sugerindo a redução de íons prata em prata elementar. Esse resultado é confirmado na literatura em estudos que utilizaram a biossíntese na redução de NPsAg (HIREMATH; RATHOD *et al.*, 2014), (SANA et al., 2015), (SINGH; RAWAT, 2016).

5.3 Obtenção da membrana PVA^{EXT}-NPsAg por biossíntese *in situ*, na presença de PVA

O procedimento de biossíntese *in situ* de redução das NPsAg, para a preparação da membrana PVA-NPsAg seguiu os passos da biossíntese de redução das NPsAg com o extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, substituindo-se a água destilada pela solução aquosa de PVA 5%. O estudo da cinética da biossíntese foi realizado na temperatura de 23 °C e acompanhado por meio da espectroscopia na região do UV-vis, Figura 31.

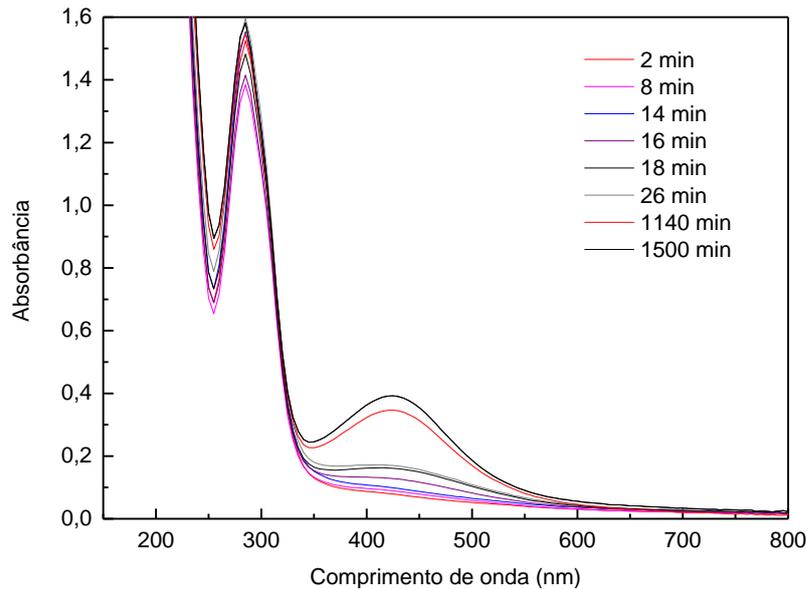


Figura 31. Espectros de absorção no UV-vis da cinética de NPsAg durante a biossíntese *in situ* das NPsAg.

Os espectros de absorção no UV-vis, apresentam uma banda de ressonância de plasmon de superfície em torno de 423 nm, o que sugere a formação da prata nanométrica em forma esférica (NOGUEZ, 2007). O estudo cinético da biossíntese das NPsAg foi realizado nos estágios iniciais do processo, na etapa de nucleação. A cinética de biossíntese das NPsAg pode ser definida a partir da reação química redox, conforme Equação 25, seguindo uma cinética de primeira ordem, com relação a concentração de íons prata $[Ag^+]$ em solução, de acordo com o procedimento matemático descrito no item 5.2.1, referente ao estudo cinético da biossíntese de redução da Ag^+ , pelo extrato de *Cinnamomum zeylanicum*. A Tabela 4 mostra os valores da absorbância obtidos da Figura 31, para determinar $[Ag^0]_t$ através da lei de Lambert-Beer, assim como os parâmetros da Equação 29 (item 5.2.1). O ajuste destes parâmetros permitiu determinar a constante de velocidade da biorredução *in situ* das NPsAg a 23 °C.

Tabela 4. Parâmetros utilizados para o estudo cinético da formação das NPsAg a partir do ajuste dos dados à Equação 29.

Tempo (min)	A	$[Ag^0]_t$ [mg/mL*10 ⁻²]	$[Ag^0]_t/[Ag^+]_0$ *10 ⁻¹	$\ln \left[1 - \frac{[Ag^0]_t}{[Ag^+]_0} \right]$ *10 ⁻¹
0	0	0	0	0
2	0,0083	0,18	0,17	-0,17
8	0,1013	2,16	2,06	-2,31
14	0,1218	2,59	2,48	-2,85
16	0,1264	2,69	2,57	-2,97
18	0,1561	3,33	3,18	-3,82
26	0,1697	3,62	3,45	-4,24

$[Ag^+]_t$ e $[Ag^+]_0$ referem-se às concentrações de íons, Ag^+ no tempo (t) e no início do experimento, respectivamente.

A Figura 32 mostra a regressão linear obtida através do ajuste dos dados da Tabela 4 à Equação 29, para os tempos iniciais de reação.

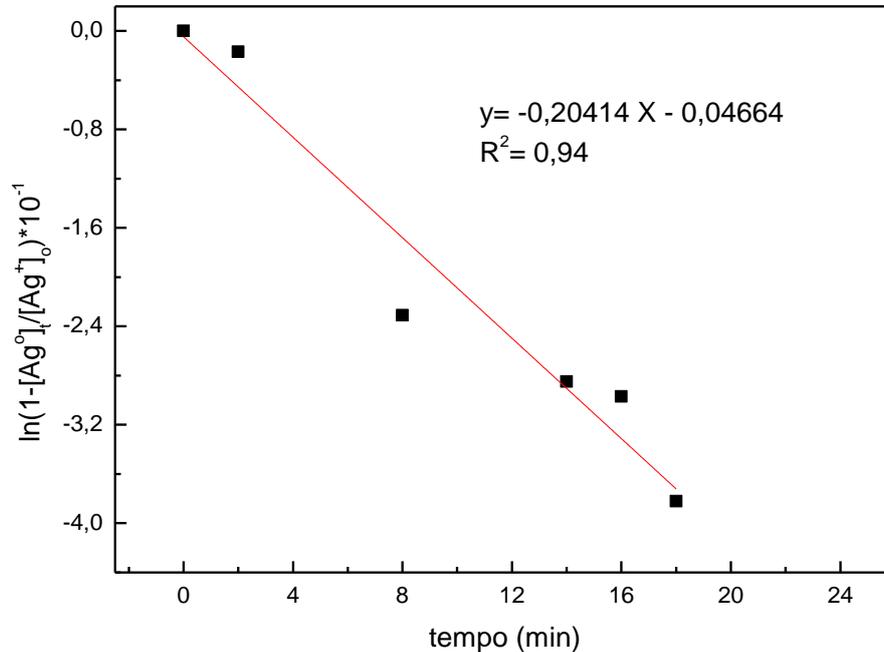


Figura 32. Ajuste dos dados da biossíntese *in situ* das NPsAg, à cinética de primeira ordem.

O ajuste dos dados experimentais à Equação 29 mostra que a biossíntese *in situ* obedece a uma cinética de primeira ordem, da mesma forma que ocorre com a biossíntese de redução das NPsAg com o extrato de *Cinnamomum zeylanicum*. A equação da reta é expressa por $y = -0,20414 X - 0,04664$ e o coeficiente de regressão linear $R^2 = 0,94$. A constante de velocidade da reação (k) é igual a $0,017 \text{ min}^{-1}$ na temperatura de 23°C . Este valor da constante de velocidade é maior que o valor obtido na biorredução utilizando apenas o extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, mantendo a temperatura constante. Este resultado sugere que a presença do PVA favorece a biossíntese de redução das NPsAg. O PVA contém átomos de oxigênio em suas estruturas, que atuam como sítios básicos de Lewis, favorecendo a interação ácido-base entre o polímero e as nanopartículas. A adsorção do polímero nas superfícies das nanopartículas formam uma camada auto-organizada criando um impedimento estérico que impede a coalescência, evitando a agregação das nanopartículas (PENICHEVA et al., 2012).

5.3.1 Caracterização físico-química da membrana PVA^{EXT}- NPsAg

Após as membranas PVA^{EXT}-NPsAg serem preparadas e reticuladas, foi realizada a caracterização físico-química, pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), determinação do teor gel, análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura- MEV e espectroscopia de energia dispersiva- EDS.

5.3.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier- FTIR

A reticulação das membranas de PVA^{EXT}-NPsAg com ácido cítrico foi comprovada através da análise de FTIR das amostras curadas (ácido cítrico 2%) e não curadas. A literatura propõe que a reação de reticulação ocorre através do ataque nucleofílico do grupo OH do PVA à carbonila do ácido carboxílico, formando-se uma ligação éster (CUADRO, 2015), como mostrado na Figura 33.

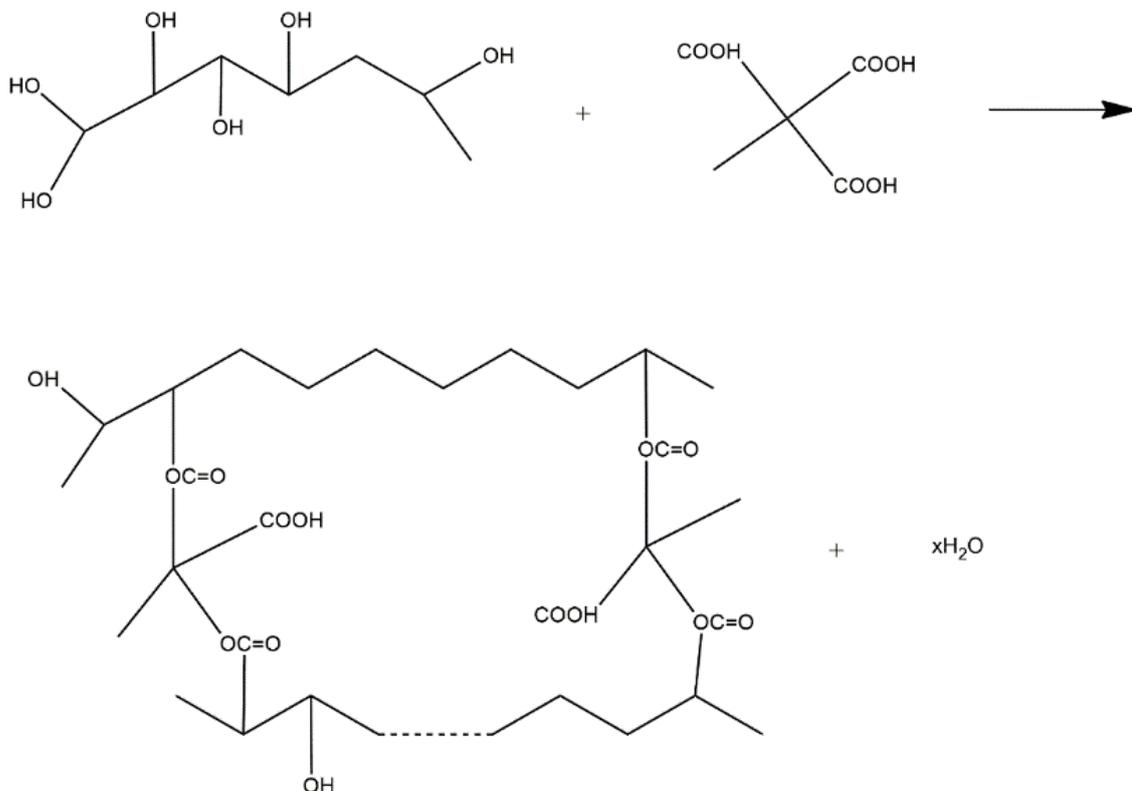


Figura 33. Reação de ácido cítrico com o PVA formando a reticulação (éster) entre as cadeias de PVA.

A Figura 34, mostra comparativamente o espectro FTIR das membranas de PVA 5% sem reticulação e reticuladas (ácido cítrico 2%) e o espectro FTIR do ácido cítrico puro.

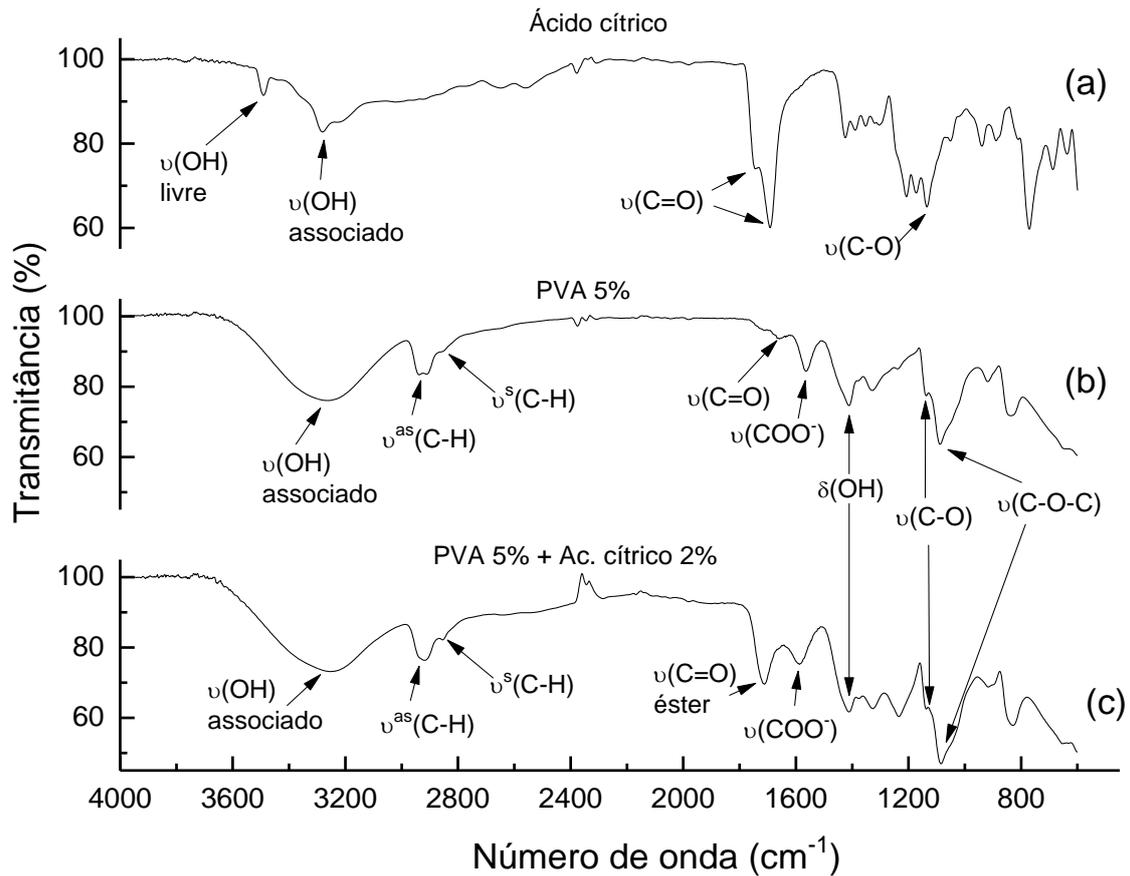


Figura 34. Espectros FTIR comparativos do ácido cítrico puro (a), PVA 5% (b) e PVA 5% reticulado com ácido cítrico 2%, entre 4000-800 cm^{-1} .

A vibração dos grupos químicos característicos, encontrados nos espectros FTIR, e seus respectivos números de onda são apresentados na Tabela 5 (SILVERSTIEN, 2007).

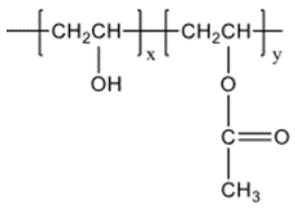
Tabela 5. Principais modos vibracionais correspondentes ao (a) ácido cítrico, (b) PVA 5%, e (c) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico 2%.

(a) Ácido cítrico

Identificação	Grupos característicos	Número de onda (cm^{-1})	Estrutura
Ácido cítrico	ν O-H grupo hidroxila	não associado ν 3493 associado ν 3282	
	ν C=O ácido carboxílico	ν 1743 ν 1692	
	ν C-O	ν 1133	

Os ácidos carboxílicos (-COOH) presentes na molécula de ácido cítrico, possuem o grupo carbonila (C=O). Estes grupos (não ionizados) apresentam duas bandas de absorção características, devido à dimerização (CIRIMINNA et al., 2017). No espectro FTIR as bandas são observadas em 1743 e 1692 cm^{-1}

b) PVA 5%

Identificação	Grupos característicos	Número de onda (cm^{-1})	Estrutura
PVA	v O-H grupo hidroxila	3266	 <p>-OCOCH₃ (acetato) Resíduo da hidrólise do PVAc</p>
	v C-H do grupo alquil	2938 2853	
	v C=O	1660 acetato residual	
	v COO ⁻	1563	
	δ OH	1412	
	v C-O-C	1085	
	v C-O	1138	

No espectro referente ao PVA (puro), observa-se uma banda larga em 3266 cm^{-1} , relacionada ao estiramento O-H das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Uma banda em 1660 cm^{-1} , de baixa intensidade pode ser atribuída ao C=O do grupo acetato, já que o PVA utilizado é hidrolisado ao 98%, apresentando grupos acetatos do poli (acetato de vinila) (PVAc). A banda em 1563 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento do grupo carboxilato COO⁻ que pode se formar como consequência das interações intramoleculares entre o grupo acetato e as hidroxilas do PVA. A banda em 1085 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-O-C, do grupo acetato. Finalmente, a banda 1138 cm^{-1} é relacionada ao estiramento da ligação C-O (FRINGANT et al., 1995).

(c) Membrana de PVA reticulada com ácido cítrico 2%

Identificação	Grupos característicos	Número de onda (cm ⁻¹)	Estrutura
Membrana PVA Reticulada Ácido cítrico 2%	v O-H grupo hidroxila	3266	
	v C-H do grupo alquil	2938 2853	
	v C=O	1713 éster	
	v COO ⁻	1587	
	δ OH	1409	
	v C-O-C	1085	
	v C-O	1138	

No espectro FTIR da membrana de PVA reticulada com ácido cítrico 2%, se observa uma nova banda em 1713 cm⁻¹, atribuída à carbonila do grupo éster, formado entre o ácido cítrico e o OH do PVA, sugerindo a reação de reticulação entre as cadeias de PVA. A banda da ligação carboxilato observada no PVA em 1563 cm⁻¹, desloca-se no PVA reticulado a maior número de onda (~1587 cm⁻¹), o que sugere que a reticulação entre as cadeias de PVA reforça a formação do grupo carboxilato (YANG et al., 1997).

A membrana de PVA contendo nanopartículas de prata (PVA^{EXT}-NPsAg) foi também reticulada com ácido cítrico 2%. A Figura 35, mostra comparativamente o espectro FTIR da membrana de PVA pura e reticulada e a membrana PVA reticulada, contendo NPsAg.

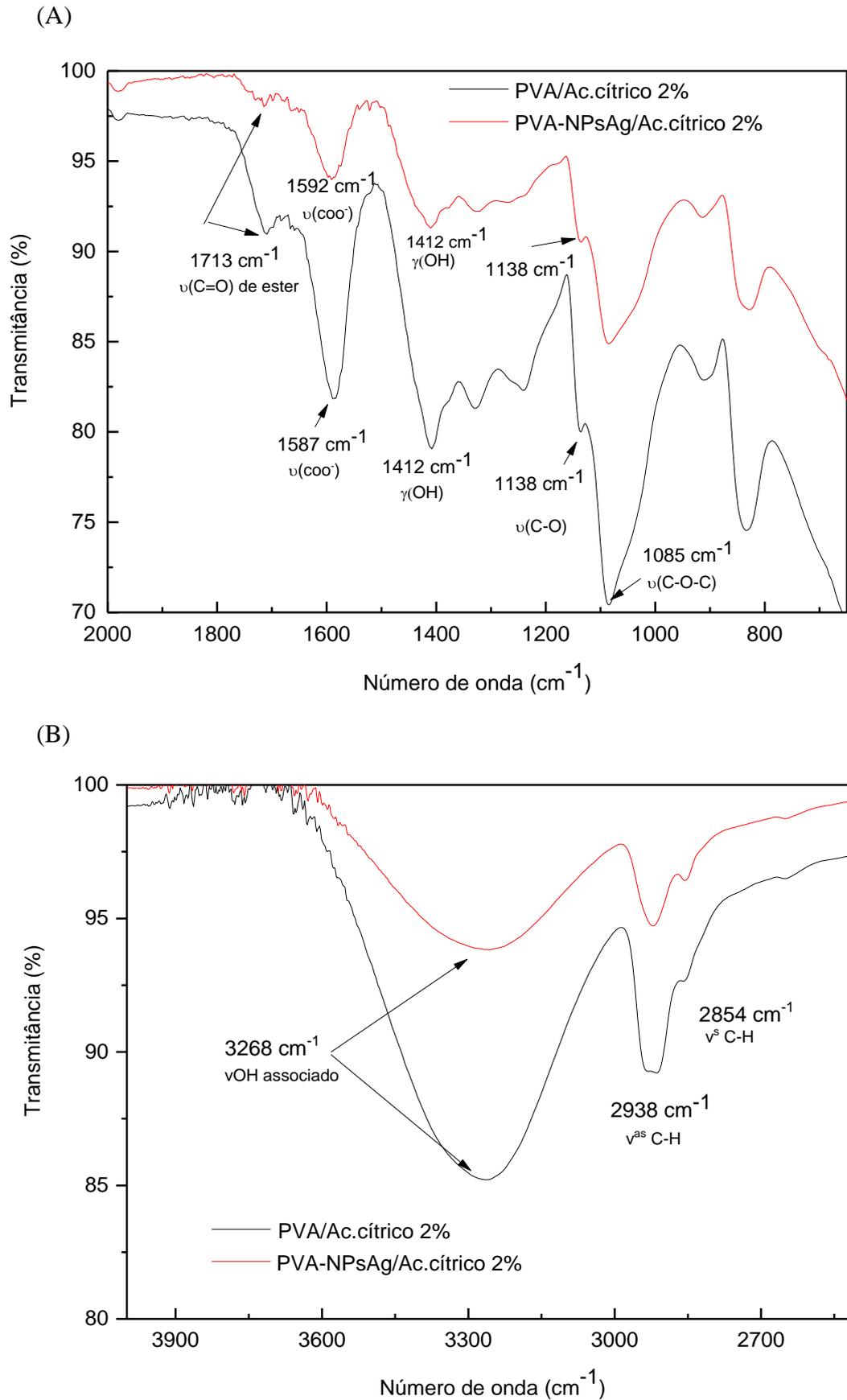


Figura 35. Espectro FTIR comparativo da membrana PVA pura, reticulada com ácido cítrico 2%, e da membrana PVA^{EXT}-NPsAg, reticulada com ácido cítrico 2%.

No espectro de FTIR pode-se distinguir um deslocamento na banda carboxilato, de 1587 cm^{-1} no PVA, para 1592 cm^{-1} , na membrana PVA^{EXT}-NPsAg. É de esperar que a interação da prata seja mais intensa nos grupos acetato e hidroxilas, pela afinidade da prata (Ag) pelos elétrons da camada de valência do oxigênio. O fortalecimento da ligação carboxilato e, portanto, o deslocamento da banda para um maior número de onda, sugere uma interação entre as NPsAg e a matriz de PVA (MA et al., 2009).

5.3.1.2 Determinação do teor gel do PVA reticulado

A reticulação da membrana PVA 5% foi realizada em triplicata, com ácido cítrico a 2 e 10%. A determinação do grau de intumescimento foi realizada em água destilada à temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, após 24 h. O teor gel foi determinado após pesagem das amostras secas (Equação 7 e 8, item 4.2.5). O efeito da concentração do ácido cítrico sobre o intumescimento e o teor gel da membrana PVA, é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito da concentração do ácido cítrico sobre o intumescimento e teor gel das membranas PVA 5%.

Membrana PVA 5%	Intumescimento (%) 23°C (após 24h)	Teor gel (%)
Ácido cítrico 2 %	253,33 ±61	78,00 ± 1,53
Ácido cítrico 10%	150,00 ±26	80,00 ± 1,55

A densidade de reticulação é um fator que influencia a capacidade de absorção de água em um hidrogel, que é inversamente proporcional à densidade de ligações cruzadas. Quanto maior o grau de reticulação da matriz menor é o grau de intumescimento. Em meio aquoso, o intumescimento depende apenas da força elástica do hidrogel. O hidrogel que mais intumesce possui menor força elástica, podendo ser mais deformado e, conseqüentemente, tendo maior capacidade de reter água em sua estrutura (CHUNSHENG et al., 2009).

Observa-se que o aumento da concentração do agente reticulante, o ácido cítrico, provocou um decréscimo na absorção de água na membrana de PVA de 253,33 com teor gel de 78%, para 150,00% com teor gel de 80%. Esses resultados foram relatados nos estudos de Aiji (2005) que preparou um hidrogel reticulado com ácido cítrico, por meio de radiação gama e também no estudo de Stephanie et al. (2013) por meio da reticulação *in situ* de nanofibras de alginato-PVA, utilizando ácido cítrico.

E ainda, no estudo de Birck et al. (2014) que observou essa dependência da quantidade de água absorvida no equilíbrio em filmes a base de PVA reticulados com ácido cítrico a 40% que se apresentaram mais frágeis comparados com os filmes com ácido cítrico a 10% de comportamento mais dúctil.

A partir dos resultados obtidos foi escolhida a membrana de PVA reticulada com ácido cítrico a 2%, por apresentar alto grau de intumescimento e não existir diferenças significativas no valor do teor de gel.

5.3.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As Figuras 36 e 37 mostra o perfil de degradação térmica do PVA sem curar e curado com ácido cítrico ao 2%. As etapas de degradação térmicas são detalhadas na Tabela 7.

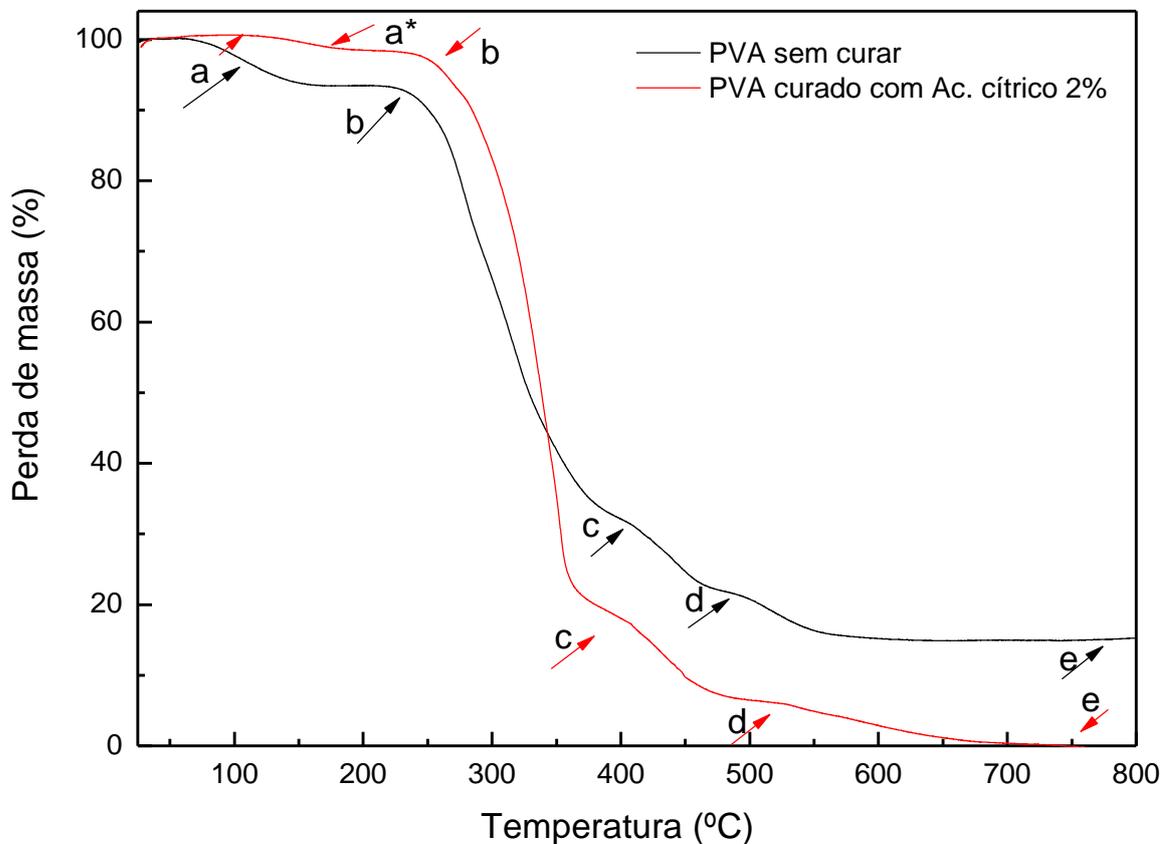


Figura 36. Curvas TG comparativo do PVA sem curar e curado entre 25 e 800°C.

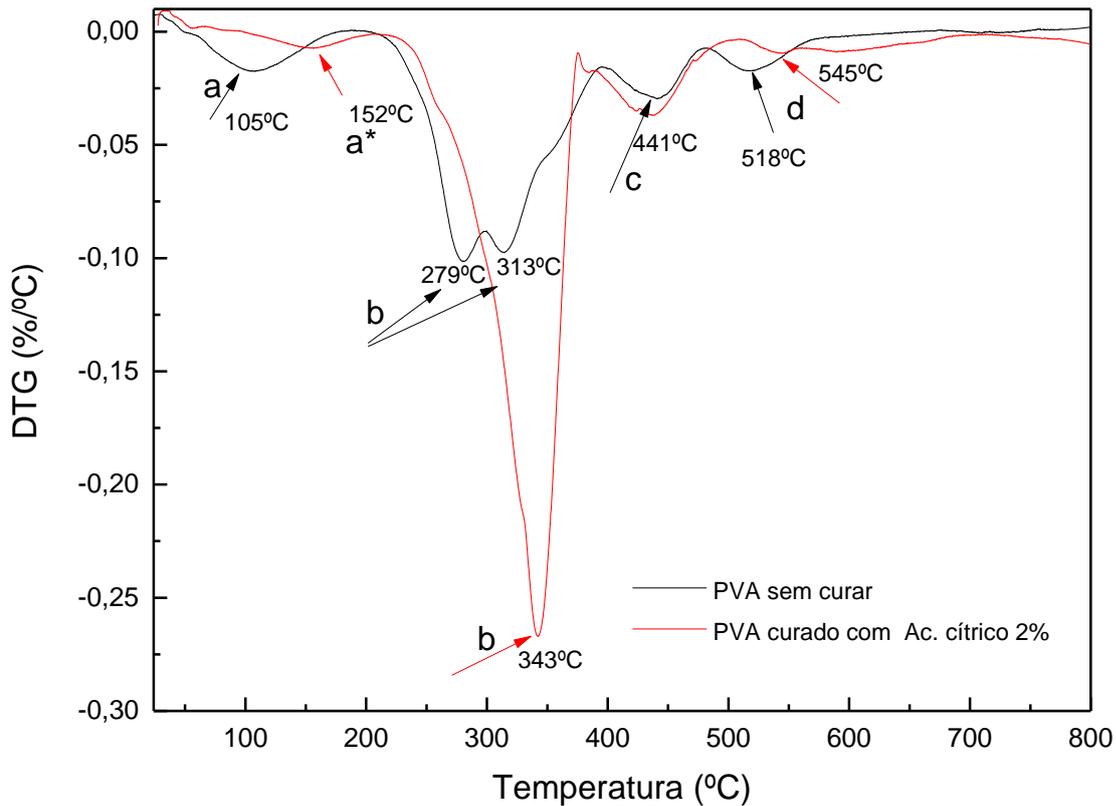


Figura 37. Curvas TG comparativo do PVA sem curar e curado entre 25 e 800°C.

Tabela 7. Etapas de degradação térmica, obtidas do termograma TGA do PVA sem curar e curado.

Amostra	Etapas de degradação (°C) /Perda de massa (%)				
	a	b	c	d	e
PVA sem curar	$\frac{(66 - 110)^{\circ}C}{5,42 \%}$	$\frac{(243 - 389)^{\circ}C}{60,63 \%}$	$\frac{(400 - 482)^{\circ}C}{11,34 \%}$	$\frac{(490 - 569)^{\circ}C}{6,42 \%}$	16,19%
PVA curado	Não se observa	$\frac{(261 - 390)^{\circ}C}{79,00 \%}$	$\frac{(405 - 488,7)^{\circ}C}{12,89 \%}$	$\frac{(538 - 662)^{\circ}C}{6,17 \%}$	0,49%

As etapas de degradação foram nomeadas de a, b, c, d. A etapa e, refere-se ao resíduo em 800 °C. Na curva TGA (Figura 36) observa-se que a etapa da degradação a, é associada à evaporação de água contida na amostra, este valor é elevado pois a amostra não foi previamente seca. A seguir ocorre a degradação da cadeia principal do polímero, com a perda dos grupos laterais da cadeia principal -OH, -H, -OCO(CH₃) e a quebra de ligação C-C da cadeia principal nas etapas b, c, d, da degradação iniciada em 243 °C, 400 °C e 490 °C, respectivamente e um resíduo a 800 °C, em torno de 16,19 % da amostra, sem degradar, o que sugere a formação de compostos cíclicos estáveis durante a degradação do PVA puro.

A curva DTG mostra os picos onde a taxa de perda de massa em relação à temperatura foi máxima para cada etapa de degradação. A área sobre a curva de cada pico, na curva DTG, é proporcional a massa perdida. No PVA curado com ácido cítrico não se observa perda de água, o que pode ser atribuído ao fato destas amostras terem sido curadas a 100 °C. A primeira perda observada na curva TGA e DTG foi denominada de a*, e pode estar relacionada com a perda do reticulante ácido cítrico. Na curva TGA esta perda corresponde a 1,45% da massa do polímero e, na curva DTG observa-se que a velocidade máxima de perda ocorre a 152 °C. Observa-se também que a maior estabilidade da rede polimérica deslocou o início da degradação térmica das etapas de degradação b e d. Também pode se comprovar que a degradação é completa quando a amostra foi reticulada com 2% de ácido cítrico, observando-se apenas 0,49% de resíduo a 800°C.

As curvas termogravimétricas (TGA e DTG) das membranas PVA^{EXT}-NPsAg preparadas com concentração de AgNO₃ 0,004M e 0,1M são mostradas comparativamente à curva de degradação do PVA curado, nas Figuras 38 e 39, respectivamente. As etapas de degradação térmica, obtidas das curvas TG das membranas PVA^{EXT}-NPsAg são detalhadas na tabela 8.

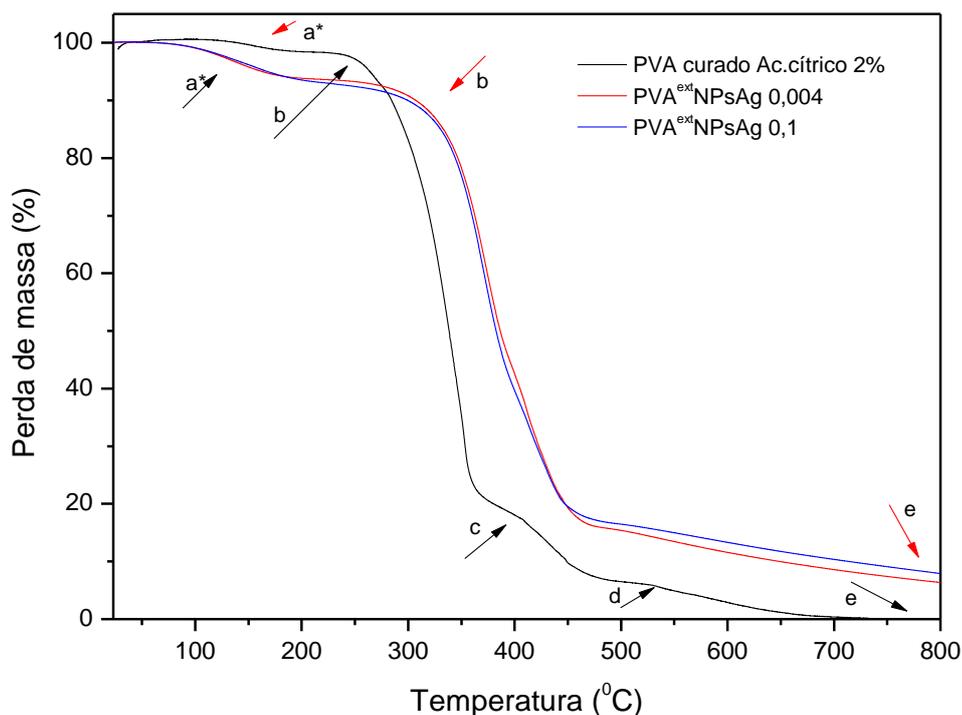


Figura 38. Curvas TG comparativo das membranas PVA^{EXT}-NPsAg com PVA curado entre 25 e 800°C.

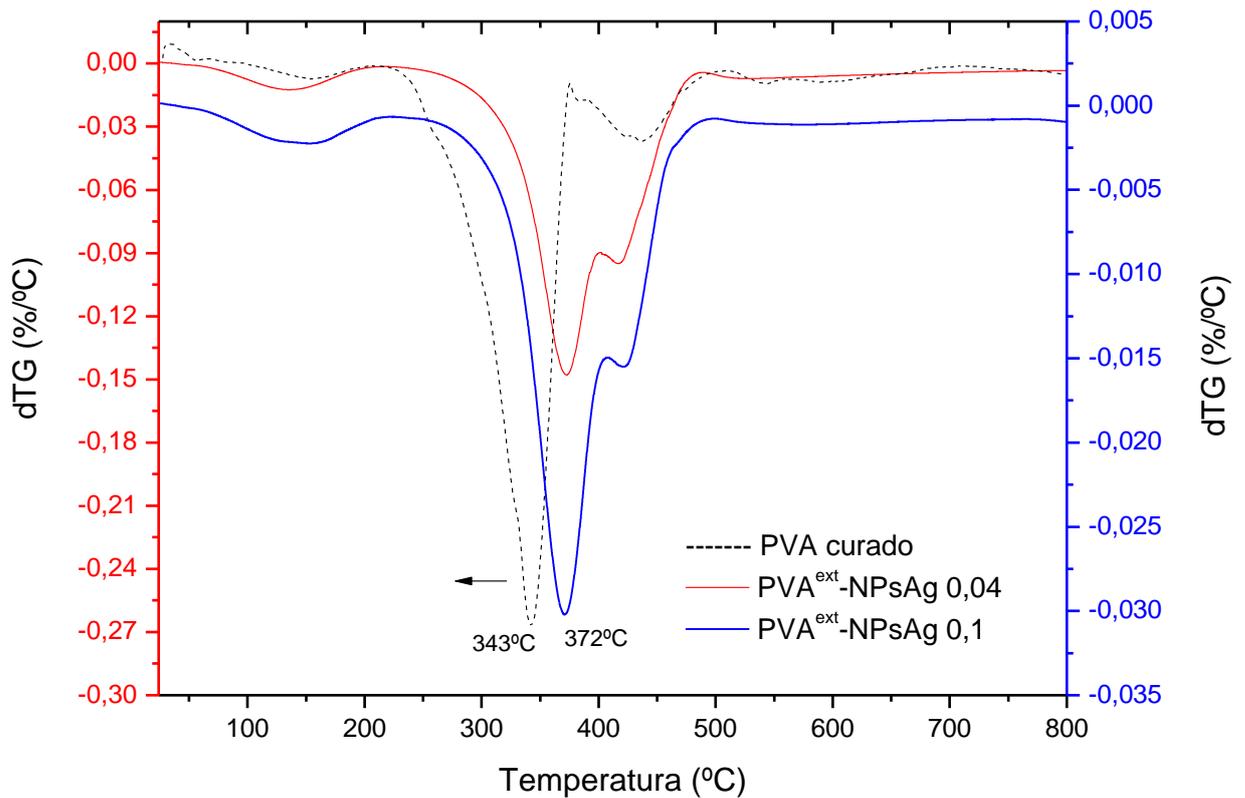


Figura 39. Curvas TG comparativo das membranas PVA^{EXT}-NPsAg com PVA curado entre 25 e 800°C.

Tabela 8. Etapas de degradação térmica, obtidas das curvas TG das membranas PVA^{EXT}-NPsAg

Amostra	Etapas de degradação (°C)/Perda de massa (%)			
	a*	b	c	e
PVA ^{EXT} -NPsAg 0,04	$\frac{(105 - 232)^{\circ}C}{6,90 \%}$	$\frac{(315 - 450)^{\circ}C}{79,10 \%}$	$\frac{(450 - 500)^{\circ}C}{7,31 \%}$	6,69%
PVA ^{EXT} -NPsAg 0,1	$\frac{(100 - 110)^{\circ}C}{7,00 \%}$	$\frac{(315 - 450)^{\circ}C}{78,80 \%}$	$\frac{(450 - 500)^{\circ}C}{6,00 \%}$	8,20%

As membranas PVA^{EXT}-NPsAg apresentam um perfil de degradação diferente ao PVA curado. São observadas apenas 3 etapas de degradação. A primeira, a*, foi atribuída à degradação do reticulante ácido cítrico. A segunda e terceira etapas (b, c) são associadas à degradação da cadeia polimérica e a etapa “e” referente ao resíduo em 800°C. Observa-se, que o início da degradação térmica da cadeia de PVA é deslocado nas membranas de PVA contendo as NPsAg, o que sugere que a interação entre o PVA e as NPsAg estabiliza termicamente a cadeia do polímero e, portanto, retarda a degradação do PVA. Nas membranas PVA^{EXT}-NPsAg se observa um resíduo que pode ser atribuído principalmente à prata metálica.

5.3.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva-EDS

A micrografia da membrana PVA 5% e da membrana PVA^{EXT}-NPsAg obtidas por MEV é apresentada na Figura 40.

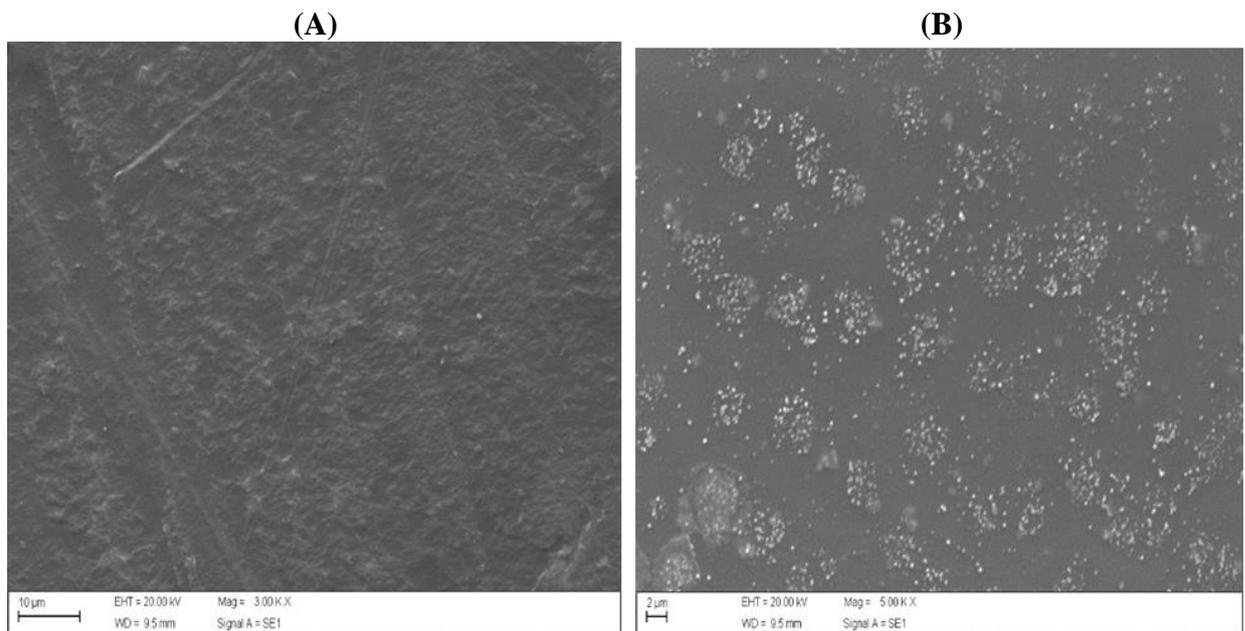


Figura 40. Micrografias MEV: (A) membrana de PVA 5%, (B) membrana PVA^{EXT}-NPsAg.

Através da micrografia observa-se que o filme polimérico de PVA 5% puro, apresenta uma morfologia globular que se estende homogeneamente pela área superficial analisada, Figura 40A. Esta morfologia se difere da micrografia da membrana PVA^{EXT}-NPsAg, Figura 40B, que apresenta regiões irregulares e com formação de grânulos, possivelmente resultado de uma solubilização incompleta e, portanto, com segregação dos componentes do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*.

Para analisar a presença e distribuição da prata na matriz polimérica na preparação *in situ* da membrana PVA^{EXT}-NPsAg foi realizada a espectroscopia de energia dispersiva-EDS, associada à microscopia eletrônica. A Figura 41 mostra a micrografia MEV.

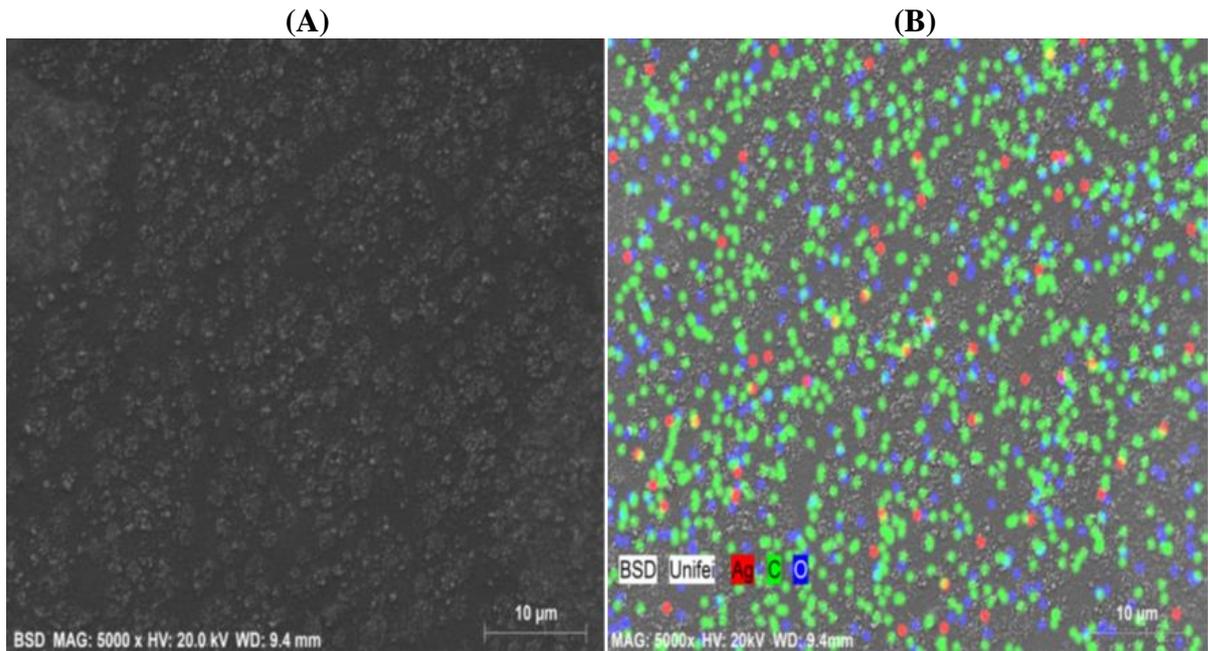


Figura 41. Mapeamento MEV-EDS de Ag depositadas na membrana PVA^{EXI}-NPsAg.

A presença de aglomerados pode ser observada na síntese de NPsAg, devido a elevada área de superfície das nanopartículas, as quais quando estão dispersas na matriz polimérica. Os polímeros constituem um favorável suporte para as nanopartículas, permitindo obter uma boa dispersão das NPs, originando nanocompósitos homogêneos e de fácil processamento (FARAJI; WIPF, 2009). Sugere-se que o PVA tenha promovido a formação de micelas, permitindo a estabilização de partículas coloidais esféricas, com um núcleo hidrofóbico e o exterior hidrofílico, Figura 42 (NISHIYAMA, 2005).

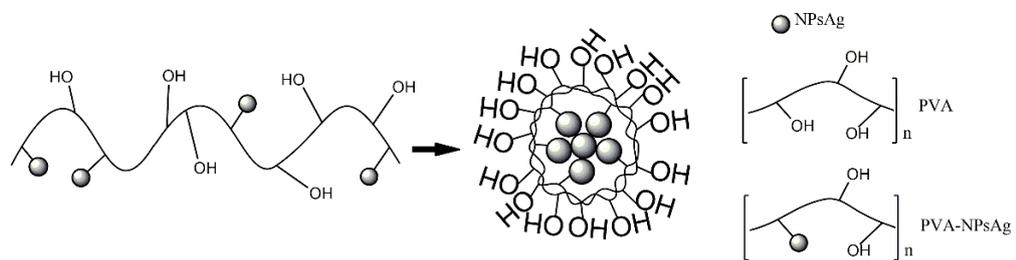


Figura 42. Formação coloidal de NPsAg, com regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica.
Fonte: a autora (2017).

O espectro EDS, referente à membrana PVA^{EXT}- NPsAg é apresentado na Figura 43.

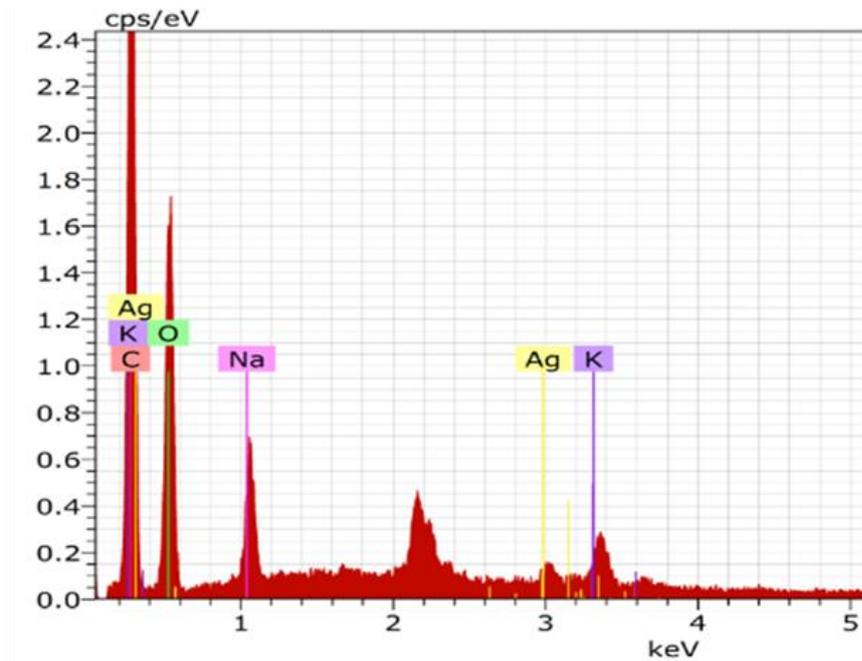


Figura 43. Espectro EDS da membrana PVA^{EXT}- NPsAg.

Observa-se pelo espectro de EDS um pico de emissão em aproximadamente 3 keV, típico de absorção de prata metálica, sugerindo a redução de íons prata em prata elementar.

5.3.1.5 Difração de raio X (DRX)

As membranas PVA-NPsAg foram submetidas à análise de raios-x, a Figura 44 mostra o difratograma das amostras preparadas com AgNO₃ 0,04M; 0,06M e 0,1M. Todas as amostras mostram o padrão de difração de estruturas metálica da prata. Esse perfil de difração representa nos ângulos de difração 2θ os seguintes planos cristalográficos 38,11° (1 1 1); 44,04° (2 0 0), 64,40° (3 1 1) e 77,31° (2 2 2) aos quais correspondem a estrutura cristalina cúbica de face centrada da prata metálica de acordo com o Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS, file no. 04-0783). Os picos não identificados são atribuídos à cristalização da fase bio-orgânica (extrato de *Cinnamomum Zeylanicum*).

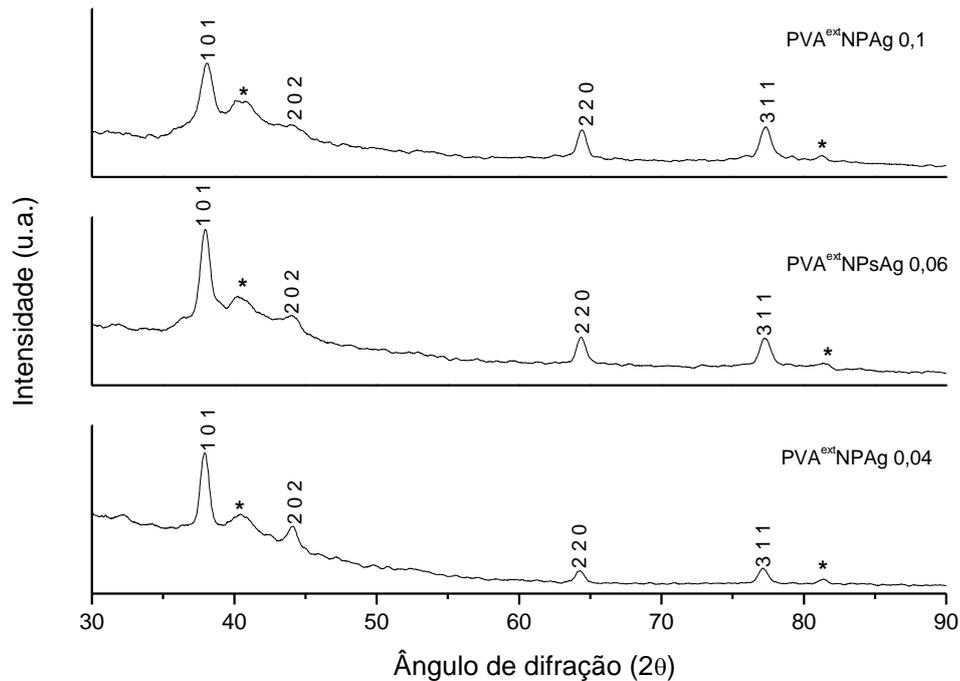


Figura 44. Difratograma das amostras com AgNO_3 0,04M; 0,06M e 0,1M.

Uma das vantagens da difração de raios-x é que por meio da análise do difratograma é possível determinar o tamanho médio das partículas cristalinas presentes na amostra com o auxílio da Equação de Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta(2\theta)\cos\theta} \quad (\text{Eq. 30})$$

Onde, D é o diâmetro da partícula, k é uma constante que depende da morfologia do cristal, para a esfera $k = 0,94$, λ é o comprimento de onda da radiação incidente ($1,5418\text{\AA}$), $\beta(2\theta)$ é a largura na metade da altura do pico de difração de maior intensidade e θ o ângulo de difração de Bragg.

Utilizando a Equação de Scherrer, calculou-se o tamanho das partículas de prata presentes nas amostras analisadas. O valor encontrado para o diâmetro D das partículas de prata está apresentado na Tabela 9. O valor de $\beta(2\theta)$ foi obtido através do *software Origin 8.0*.

Tabela 9. Valor médio do diâmetro das NPsAg, nas respectivas membranas, calculado pela equação de Scherrer. Utilizou-se $k = 0,94$, $\lambda = 0,1542\text{nm}$ e $\theta = 19,0500^\circ$ (111).

Amostras	β (rad)	D(nm)
PVA ^{EXT} NPAg 0,04	0,0125	12,2692
PVA ^{EXT} NPAg 0,06	0,0134	11,4451
PVA ^{EXT} NPAg 0,1	0,0157	9,7685

5.4 Estudo de intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg

O estudo do intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg reticulada com ácido cítrico a 2% foi realizado em triplicata, em água destilada e na temperatura de 23 °C. A Figura 45 apresenta o grau de intumescimento em função do tempo para a membrana PVA^{EXT}-NPsAg.

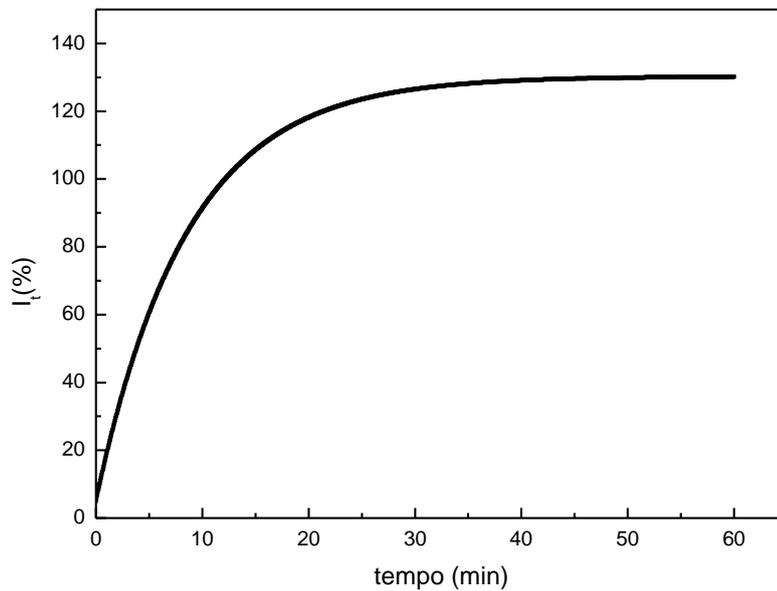


Figura 45. Grau de intumescimento em função do tempo para a membrana PVA^{EXT}-NPsAg.

O grau de intumescimento da membrana PVA 5% reticulada com ácido cítrico 2% e sem a presença de NPsAg, apresentou cerca de 253 % de intumescimento no equilíbrio (Tabela 6). O gráfico, da Figura 45 mostra que a membrana PVA^{EXT}-NPsAg apresenta um teor de intumescimento, no equilíbrio, em torno de 130%. Portanto, a presença de NPsAg dificulta a difusão de água no interior da membrana do hidrogel de PVA, observando-se uma diminuição do intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg com relação à membrana de PVA puro.

Observa-se que a curva apresenta um rápido intumescimento inicial e posteriormente, o hidrogel intumescce de forma mais lenta até atingir o equilíbrio, apresentando um grau de intumescimento no equilíbrio de 130%. No início do processo as amostras intumescem rapidamente pelo elevado volume livre existente em sua estrutura. Após determinado tempo, a água que está se difundindo na estrutura do hidrogel encontra os pontos de reticulação, os quais funcionam como obstáculos, assim a absorção de mais água é regulada pela força osmótica das cadeias reticuladas (OTTENBRITE, 2010). A última etapa é

o equilíbrio, alcançado pela amostra por volta de 40 min. Nessa etapa a rede polimérica está expandida e a força de intumescimento é contrabalanceada pela força de retração imposta pela estrutura reticulada, na resposta elástica (HOSSEINZADEH, 2013). Este resultado corresponde ao encontrado na literatura para membranas de hidrogel PVA utilizando outros agentes reticulantes (SEON, 2003; LIU, 2013; GULENOOR, 2016).

O grau de intumescimento no equilíbrio é uma propriedade importante dos hidrogéis, uma vez que a água em sua estrutura lhe confere novas propriedades, com potencial para aplicações em áreas biomédicas (GIBAS; JANIK, 2010). Quanto maior o grau de intumescimento do filme polimérico, maior é a sua capacidade em absorver fluidos e conservar o ambiente úmido, favorecendo o processo de reparação tecidual em feridas crônicas (JONES, 2005).

O mecanismo de reticulação do PVA, mencionado na caracterização FTIR, envolve o ataque nucleofílico catalisado por ácido. Como mostrado no esquema de reação da Figura 46, o ácido cítrico protonado (1) potencializa o caráter positivo do carbono do grupo carbonila que é atacado pelo átomo de oxigênio do PVA agindo como nucleófilo (com tendência a receber elétrons), formando-se o estado intermediário (2). A deslocalização eletrônica no átomo de oxigênio é estabilizada como consequência da eliminação da molécula de água.

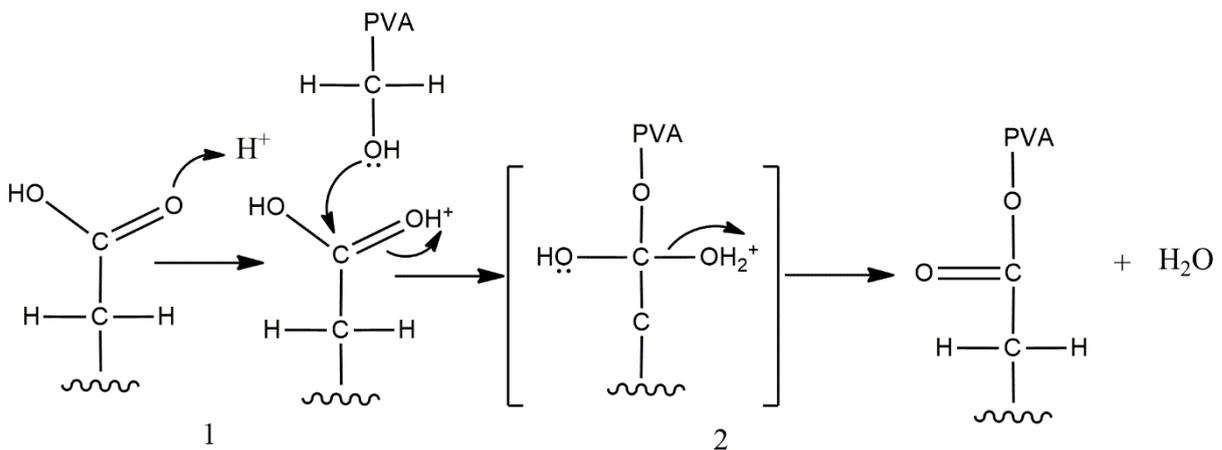


Figura 46. Mecanismo de reticulação do PVA com o ácido cítrico. (RUIZ, 2001)

Aplicando-se a Lei de Fick (Eq. 5, item 3.4) ao estudo de intumescimento, determinou-se os valores da constante difusional n e da constante k .

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_e}\right) = \ln k + n \ln t$$

Onde M_t e M_e representam a massa de solvente absorvidas pelo hidrogel no tempo e no equilíbrio, respectivamente, k , representa a constante de proporcionalidade característica da rede polimérica, relativa à estrutura da rede e denota a rapidez do processo de intumescimento até que o equilíbrio seja atingido, e n , o expoente difusional, que determina o tipo de difusão do solvente na matriz polimérica.

Os valores de intumescimento no tempo ajustados no início do processo (10 min), pela Equação 5, são apresentados na Figura 47. Os valores de n , k , e R^2 obtidos pela regressão linear para a membrana PVA^{EXT}-NPsAg a 23 °C são resumidos na Tabela 10.

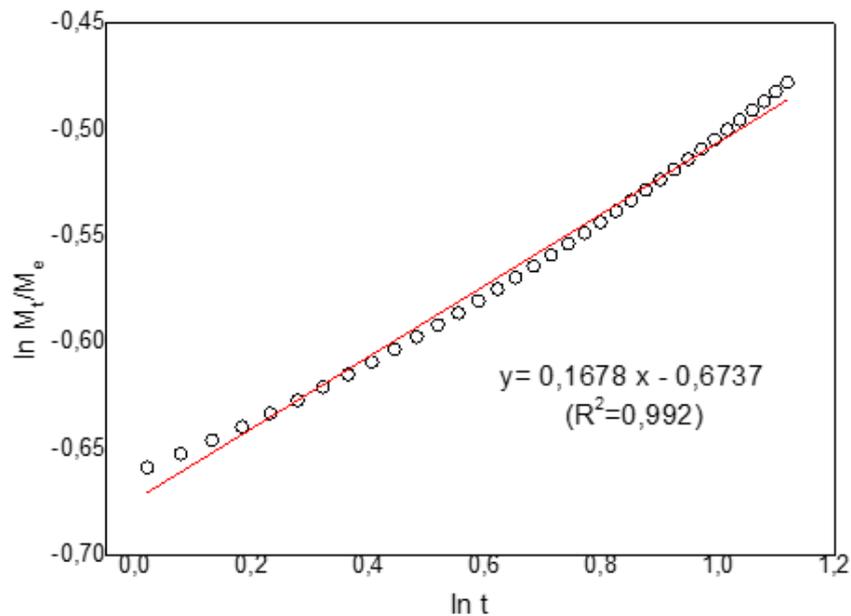


Figura 47. Ajuste dos dados de intumescimento da membrana PVA-NPsAg a 23 °C.

Tabela 10. Valores de n , k e R^2 obtidos pela regressão linear do Modelo de Fick (Equação 5) para a membrana PVA^{EXT}-NPsAg a 23 °C.

	n	k (min⁻¹)	R²
Membranas PVA ^{EXT} -NPsAg	0,17	0,51	0,99

Observa-se que o valor de n é inferior a 0,5, o que denota que o mecanismo de absorção de água da membrana PVA-NPsAg em água destilada, seguiu o modelo de difusão Fickiana, com $n \leq 0,5$ (CAN et al., 2005). Neste mecanismo de difusão Fickiana ou Caso I, ocorre a difusão do soluto através de camadas da matriz. A taxa de difusão é muito inferior que o tempo de relaxação da cadeia polimérica. Este sistema, portanto, é controlado pelo coeficiente de difusão. O tempo de relaxação refere-se ao tempo em que a cadeia leva para acomodar-se, ou seja, entrar em equilíbrio com o solvente ou soluto. Nesse mecanismo de difusão, o relaxamento das cadeias é muito mais rápido do que a difusão do solvente (SALOME et al., 2013).

Considerando que o PVA absorve grandes quantidades de água, e, portanto, a espessura da amostra não permanece constante, o comportamento Fickiano é aplicável até o equilíbrio ser atingido. Assim a Equação de Fick foi aplicada nos estágios iniciais do intumescimento, até valores de fração menores que 0,60. Com relação a constante de proporcionalidade, verifica-se que o valor de k é de $0,51 \text{ min}^{-1}$ e denota a rapidez do processo de intumescimento até que o equilíbrio seja atingido.

5.4.1 Estudo da cinética do processo de intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg

Para o estudo cinético do processo de intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg em água destilada, os dados experimentais nos 10 primeiros minutos foram ajustados a uma cinética de primeira ordem a 23°C , utilizando as equações do modelo de Lagergren (LI; TANAKA, 1990). A forma integrada é representada pela Equação 31:

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_e}\right) = -kt \quad (\text{Eq.31})$$

Onde k é a constante de velocidade do processo de intumescimento, M_t é a quantidade de água absorvida no tempo e M_e é a quantidade de água absorvida no equilíbrio. A Figura 48 mostra os dados experimentais ajustados à Equação 31.

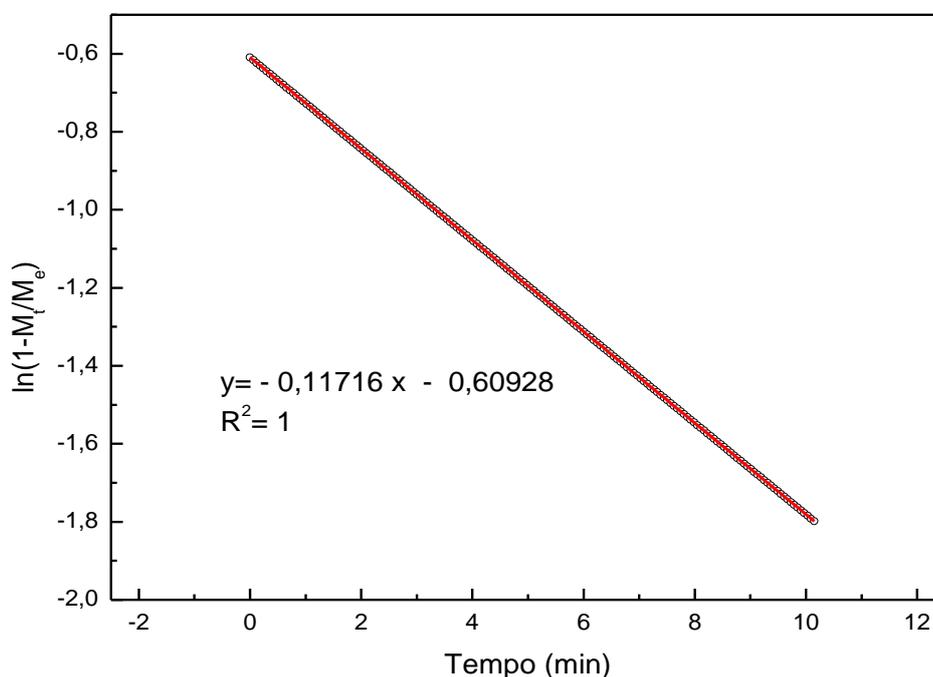


Figura 48. Ajuste dos dados de intumescimento à cinética de primeira ordem à temperatura de 23°C .

O ajuste linear dos dados experimentais, fornece o valor da constante de velocidade do processo de intumescimento a 23 °C, $k = 0,117 \text{ min}^{-1}$. Observa-se a partir da regressão linear obtida no ajuste dos dados experimentais, que o processo de intumescimento obtido pela cinética de primeira ordem depende da quantidade da substância utilizada no intumescimento, no caso em estudo da água destilada.

5.5 Preparação da curva de calibração analítica para o estudo de liberação de NPsAg

Como visto anteriormente, através de espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis), é possível identificar a banda de ressonância de plasmon de superfície, característica das NPsAg em 423 nm. Assim, através do estudo de variação da intensidade da absorção neste comprimento de onda, foi realizado o estudo cinético da liberação do complexo extrato-NPsAg no meio estudado. Para isso, foi construída inicialmente, uma curva de calibração, de forma a converter a resposta de absorbância em seu valor correspondente de concentração do complexo extrato-NPsAg, Figura 49. Os valores de absorbância obtidos em função das concentrações do complexo extrato-NPsAg, foram utilizados para a elaboração da curva de calibração, Tabela 11.

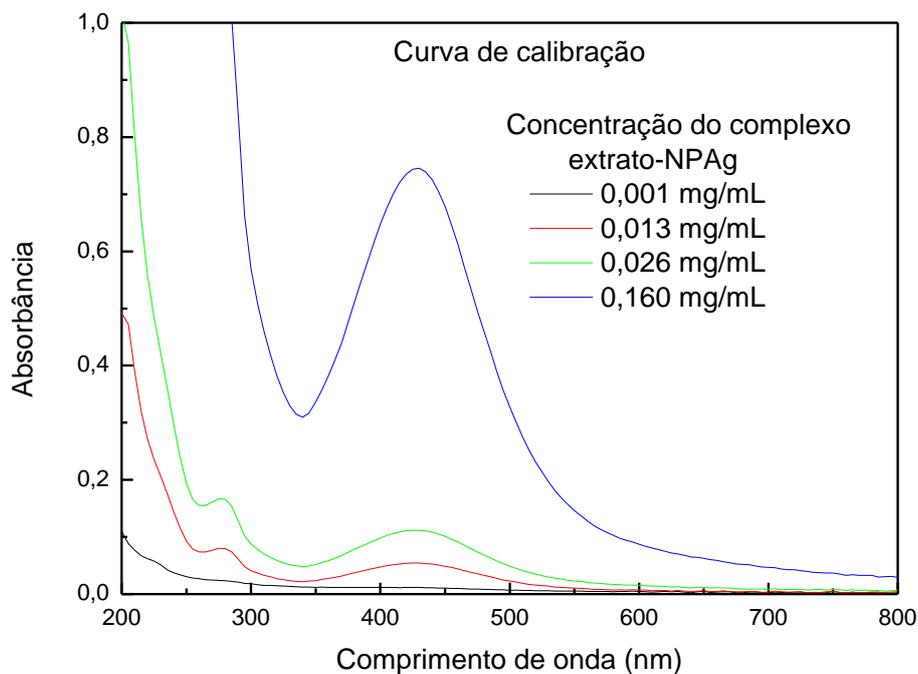


Figura 49. Curvas UV-vis de soluções com diferentes concentrações do complexo extrato-NPsAg

Tabela 11. Valores de absorvância no comprimento de onda de 423 nm nas diferentes concentrações do complexo extrato-NPsAg.

Concentração (mg/mL)	Absorvância
0,001 mg/mL	0,011
0,013 mg/mL	0,060
0,026 mg/mL	0,110
0,160 mg/mL	0,750

Os resultados obtidos na Figura 49 e na Tabela 11, foram relacionados para a construção da curva de calibração analítica, Figura 50.

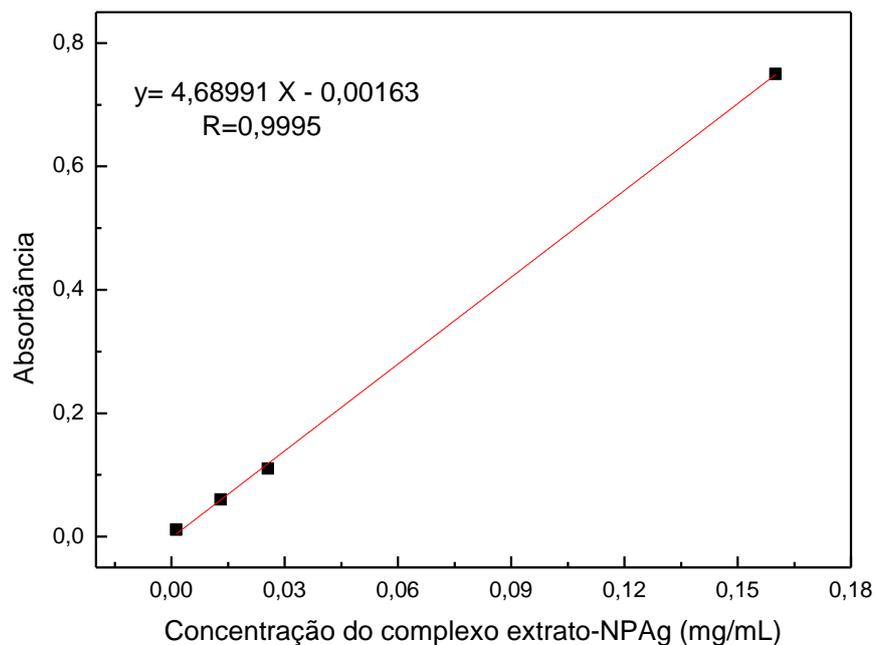


Figura 50. Curva de calibração linear da absorvância x concentração (mg/mL) do complexo extrato NPsAg.

A equação da reta obtida por regressão linear dos dados experimentais, é apresentada na Equação 32.

$$y = 4,68991x - 0,00163 \quad (R^2 = 0,999) \quad (\text{Eq. 32})$$

$$C_{NPsAg} = (A_{NPsAg} + 0,00163)/4,68991$$

A curva de calibração para determinação da concentração complexo extrato-NPsAg, obteve a equação da reta expressa a partir da Equação 32, em que y é a absorvância e x, a concentração do complexo extrato-NPsAg em mg/mL, com $R^2 = 0,999$. A partir da curva de calibração é possível obter os valores de massa liberada do complexo extrato-NPsAg em função do tempo, nas temperaturas de 37 e 40 °C.

5.5.1 Estudo de liberação de NPsAg das membranas PVA^{EXT}-NPsAg em função do tempo a 37 e 40 °C

As curvas de liberação obtidas através dos valores de absorbância em função do tempo, nas temperaturas de 37 e 40 °C, são apresentadas nas Figuras 51 e 52, respectivamente.

Os valores de absorbância obtidos em função do tempo foram convertidos em unidades de concentração, utilizando a curva de calibração previamente obtida, de acordo com a Equação 32.

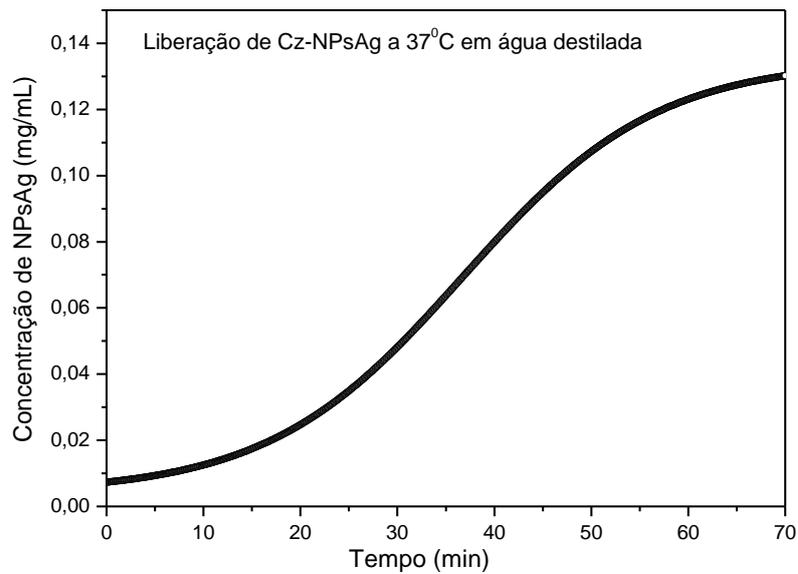


Figura 51. Perfil de liberação de NPsAg da membrana PVA^{EXT}-NPsAg a 37 °C.

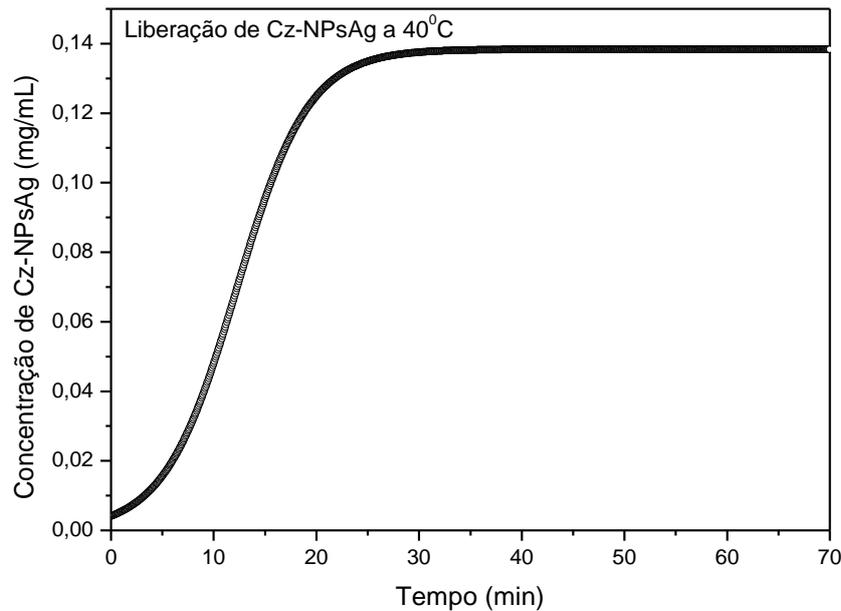
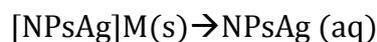


Figura 52. Perfil de liberação de NPsAg da membrana PVA^{EXT}NPsAg a 40 °C.

Observa-se que o equilíbrio de liberação é alcançado mais rapidamente na temperatura de 40 °C em cerca de 20 minutos, em relação à temperatura de 37 °C, que ocorreu por volta de 65 minutos. O estudo da liberação em função da temperatura mostra que a velocidade de liberação do complexo extrato-NPsAg no tempo é influenciada pela temperatura. Observa-se, a 40 °C que em 20 min. a membrana libera cerca de 0,125 mg/mL, que corresponde a 62,5 % da massa inicial do complexo na membrana, aproximadamente igual a 0,2 mg. No sistema de liberação a 37 °C a membrana libera, em 20 min., 0,025 mg/mL, que representa 12,5% da massa inicial. Após a estabilização, o sistema libera de maneira controlada no tempo, cerca de 64,5 % da massa inicial a 37 °C e, cerca de 69 % da massa inicial a 40 °C.

De posse dos valores da massa inicial de NPsAg na membrana $[NPsAg]_o^M$ e, no tempo $[NPsAg]_t^M$ foi realizado o estudo da cinética de liberação das NPsAg (aq) na solução aquosa. As equações utilizadas neste estudo da cinética são mostradas a seguir:



$$-\frac{d[NPsAg]^M}{dt} = k[NPsAg]^M \quad (\text{Eq.33})$$

$$-\frac{d[NPsAg]^M}{[NPsAg]^M} = kdt \quad (\text{Eq. 34})$$

Integrando a Equação 34 entre o tempo 0 e o tempo t, obtém-se a Equação 35:

$$\ln \left[\frac{[NPsAg]_t^M}{[NPsAg]_0^M} \right] = -kt \quad (\text{Eq. 35})$$

Os dados cinéticos da massa de NPsAg na membrana PVA^{EXT}-NPsAg, no tempo zero e durante os cinco primeiros minutos foram ajustados a uma cinética de reação de primeira ordem (Eq. 35), como mostra as Figuras 53 e 54.

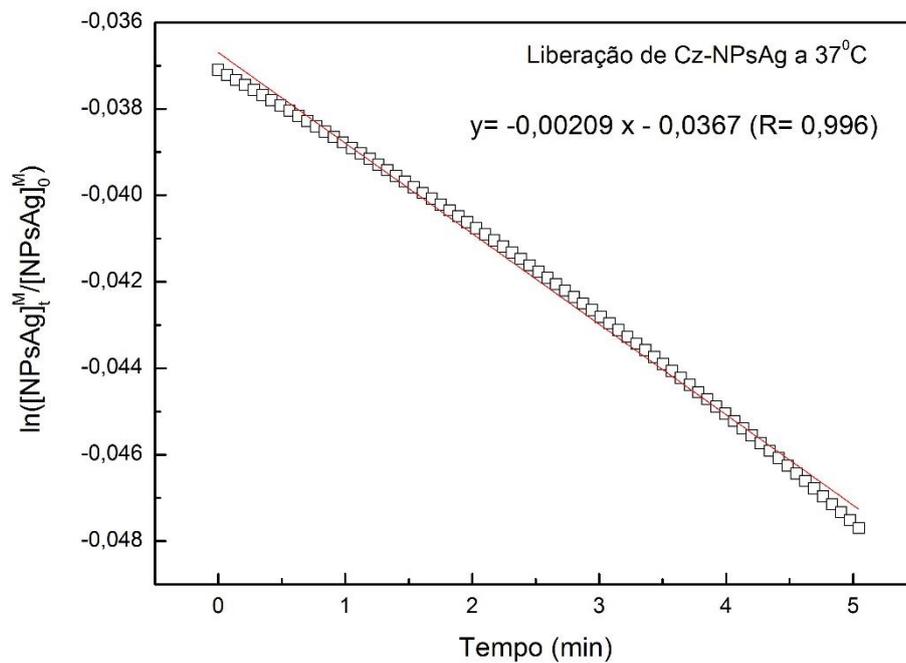


Figura 53. Curvas de ajuste a cinética de reação de primeira ordem dos dados de liberação de NPsAg a 37 °C.

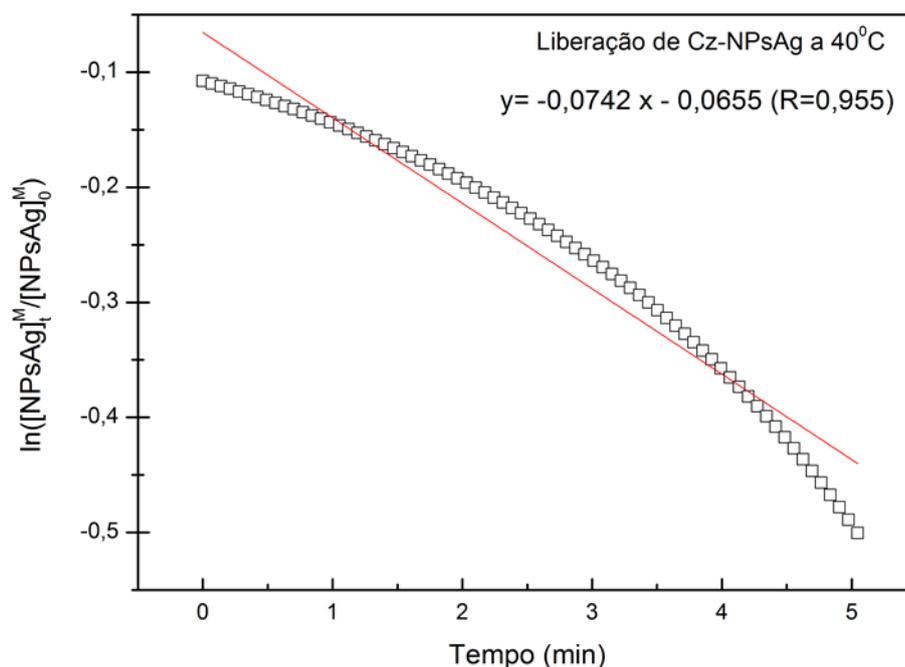


Figura 54. Curvas de ajuste a cinética de reação de primeira ordem dos dados de liberação de NPsAg a 40 °C.

A partir do ajuste dos dados à Equação 27 foi possível determinar a constante de velocidade (k) para o processo de liberação, sendo, $k = 0,00209 \text{ min}^{-1}$ a 37 °C e $k = 0,0742 \text{ min}^{-1}$ a 40 °C. Os valores obtidos mostram que a velocidade de liberação de NPsAg é favorecida pela temperatura.

Na temperatura de 40 °C, observa-se que a membrana perde a estabilidade dimensional, este resultado sugere que a reticulação entre as cadeias é desfeita a partir da hidrólise do grupo éster.

A reticulação entre as cadeias é formada através da reação entre os grupos hidroxilas (OH) do PVA e os grupos de ácido carboxílico ((OH)C=O) do ácido cítrico, formando o grupo éster (O-C=O). A reação de hidrólises dos ésteres é favorecida pela temperatura.

5.6 Estudo termodinâmico de liberação das NPsAg

A análise da liberação da NPsAg nas diferentes temperaturas estudadas permitiu determinar a energia de ativação (E_a) para o processo de liberação. O valor da energia de ativação do processo de liberação fornece a informação relativa à energia necessária para mover as NPsAg da matriz polimérica para o meio de dissolução. Maiores valores de E_a indicam a necessidade de uma quantidade de energia maior para o processo de liberação,

implicando assim que este processo será mais vulnerável à influência da temperatura. Portanto, quanto maior a energia de ativação mais lento é o processo de liberação, aumentando a dificuldade para que o processo ocorra. Quanto menor a energia de ativação o processo transcorre com maior velocidade (CHIEN; LIN, 2007).

A energia de ativação (E_a) de liberação de NPsAg foi determinada utilizando a equação de Arrhenius (Eq. 9) utilizando as constantes cinéticas de velocidade $k=0,00209 \text{ min}^{-1}$ a 37°C (T_1) e $k=0,0742 \text{ min}^{-1}$ a 40°C (T_2), respectivamente (item 4.2.7) obtendo-se o valor de $E_a= 959,87 \text{ kJ/mol}$. Este valor de energia de ativação é elevado se comparado com a literatura para liberação de fármacos de filmes de PVA ($2,032 \text{ kJ/mol}$) e fibras eletrofiadas de PVA ($3,67 \text{ kJ/mol}$) (FREIRE et al., 2017). A diferença na barreira energética deve ser dada pelo diferente grau de reticulação das membranas de PVA, na referência acima o PVA é reticulado usando como agente reticulante glutaraldeído.

Para determinar a constante de estado estacionário (K^\ddagger) foi utilizada a equação de Eyring Polanyi (Eq. 12), apresentada no item 4.2.7. A constante de estado estacionário foi determinada para as temperaturas 37°C (310 K) (T_1) e 40°C (313 K) (T_2).

$$k = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger$$

Onde:

h = constante de Planck ($h = 6,6261 \cdot 10^{-34}$)

k_B = constante de Boltzmann ($k_B = 1,3806 \cdot 10^{-23}$)

k constante cinética de velocidade de liberação

$k = 0,00209 \text{ min}^{-1}$ (310 K)

$k = 0,0742 \text{ min}^{-1}$ (313 K)

Os valores encontrados para a constante do estado estacionário foram:

$$\text{Para } 310 \text{ K} \rightarrow K^\ddagger = 3,24 \cdot 10^{-16}$$

$$\text{Para } 313 \text{ K} \rightarrow K^\ddagger = 1,14 \cdot 10^{-14}$$

Da constante do estado estacionário determinou-se a energia livre de Gibbs para as temperaturas 37°C (310 K) (T_1) e 40°C (313 K) (T_2), de acordo com a Equação 36.

$$\Delta G_0^\ddagger = -RT \ln k^\ddagger \quad (\text{Eq. 36})$$

Os valores encontrados para a a energia livre de Gibbs foram:

$$\text{Para } 310 \text{ K} \rightarrow \Delta G_0^\ddagger = 91,93 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{Para } 313 \text{ K} \rightarrow \Delta G_0^\ddagger = 83,55 \text{ kJ/mol}$$

Em uma transformação espontânea, a temperatura e pressão constantes, a energia livre de Gibbs diminui ($\Delta G < 0$) no sistema. No sistema de liberação estudado obteve-se valores positivos da energia de Gibbs, mostrando assim que a liberação das NPsAg não é um processo naturalmente espontâneo, sob as condições de temperatura e pressão estudadas, apresentando uma energia livre de Gibbs positiva ($\Delta G > 0$). Destaca-se que o sistema que teve maior porcentagem de liberação (313 K) foi aquele que apresentou menor energia livre de Gibbs. Portanto, o estudo termodinâmico corrobora com o relatado na literatura que indica que quanto mais alta for a energia livre de um processo, maior será a dificuldade do sistema em liberar o fármaco da matriz polimérica (WENHUA et al., 2008). Este fato foi confirmado, pois a liberação das NPsAg a 310 K mostra maior energia livre de Gibbs, sendo este sistema o que mostrou um menor valor de constante de velocidade no estudo da cinética de liberação e, menor porcentagem de liberação de NPsAg no tempo.

Para se determinar a entalpia foram utilizadas as temperaturas e correspondentes constantes de velocidades de liberação das NPsAg ($T_1 = 310$ K e $k_1 = 0,00209$ min⁻¹, $T_2 = 313$ K e $k_2 = 0,0742$ min⁻¹), de acordo com a Equação 37:

$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{T_2}{T_1} e^{\frac{\Delta H_0^\ddagger}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right]} \quad (\text{Eq. 37})$$

$$\Delta H_0^\ddagger = 957,28 \text{ kJ/mol}$$

O valor de Entalpia encontrado mostra que o sistema de liberação transcorre com consumo de energia, portanto, um processo endotérmico. Este resultado está em acordo com o observado experimentalmente durante o estudo da liberação, onde um aumento da temperatura favoreceu consideravelmente o processo de liberação (FREIRE et al., 2017).

Para se determinar a entropia foram utilizadas as temperaturas, a energia livre de Gibbs das NPsAg ($T_1 = 310$ K, $\Delta G_0^\ddagger = 91,93$ kJ/mol) e $T_2 = 313$ K, $\Delta G_0^\ddagger = 83,55$ kJ/mol) e o valor da entalpia do processo de liberação $\Delta H_0^\ddagger = 957,28$ kJ/mol de acordo com a Equação 38.

$$\Delta G_0^\ddagger = \Delta H_0^\ddagger - T \Delta S_0^\ddagger \quad (\text{Eq. 38})$$

$$\text{Para } 310 \text{ K} \rightarrow \Delta S_0^\ddagger = 2,76 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{Para } 313 \text{ K} \rightarrow \Delta S_0^\ddagger = 2,76 \text{ kJ/mol}$$

O valor positivo da entropia, ainda que baixo, mostra que o processo de liberação transcorre com um aumento da desordem do sistema. O baixo valor da entropia sugere que as NPsAg liberadas estabelecem um equilíbrio com as NPsAg no interior da membrana. No equilíbrio existe partículas se difundindo da membrana para o meio e vice-versa, ambos os processos acontecem a igual velocidade. Este equilíbrio reduz a entropia do sistema. Existem processos de liberação de fármacos que transcorrem a valores de Entropia negativo, diminuição da desordem, devido ao estabelecimento do equilíbrio anteriormente descrito (XU, W.; YANG, Y., 2010). O fato de obter um valor de entropia positivo no estudo da liberação de NPsAg da membrana PVA^{EXT}-NPsAg seja devido a que neste sistema o equilíbrio se desloca para o processo de liberação. A Tabela 12 apresenta os parâmetros cinéticos e termodinâmicos obtidos no tratamento dos dados a partir da Equação de Eyring Polanyi (item 4.2.7).

Tabela 12. Parâmetros cinéticos e termodinâmicas encontrados no estudo físico e químico do sistema de liberação.

Sistema de liberação	k (min ⁻¹)		Ea	ΔG_o^\ddagger		ΔH_o^\ddagger	ΔS_o^\ddagger	
			(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol*K)	(kJ/mol*K)
PVA ^{EXT} -NPsAg	310K	313K	0,9590	310 K	313 K	145,99	310 K	313 K
	0,0021	0,0742		102,48	28,3		0,14	0,38

Observa-se pela análise cinética e termodinâmica do processo de liberação das NPsAg, que o sistema segue uma cinética de primeira ordem com baixa constante de velocidade, sendo esta influenciada pela temperatura. A energia de ativação do processo é relativamente baixa. O processo é termodinamicamente não espontâneo com $\Delta G > 0$ e, endotérmico com $\Delta H > 0$, com um ligeiro aumento da desordem do sistema $\Delta S > 0$.

5.7 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas PVA^{EXT}-NPsAg

As médias de um total de 12 medidas e o desvio padrão das medidas dos halos de inibição, para as bactérias estudadas, são apresentados na Tabela 13 e na Figura 55, para as concentrações 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 mol/L de AgNO₃, que apresentaram halos de inibição.

Tabela 13. Médias e desvio padrão das medidas dos halos de inibição para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Concentração AgNO ₃ (mol/L)	Halos de inibição (mm) Média ± DP	
	Gram +	Gram -
0,1	11,74 ± 0,75	8,841 ± 0,47
0,08	12,03 ± 0,76	9,40 ± 1,12
0,06	11,03 ± 1,14	9,463 ± 0,71
0,04	11,04 ± 0,86	8,89 ± 0,44
0,02	7,17 ± 0,59	8,13 ± 0,86

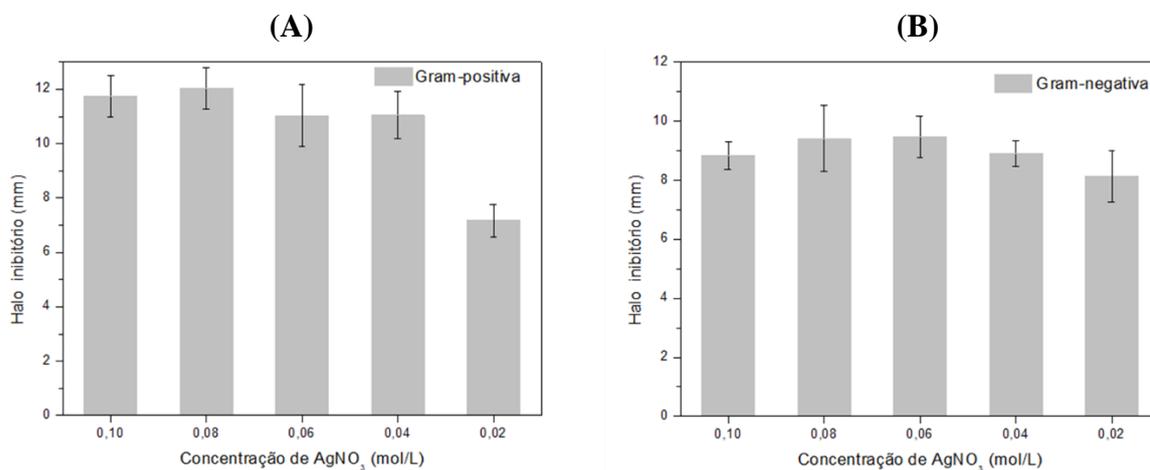


Figura 55. Medidas dos halos inibitórios. (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Escherichia coli*.

Para as imagens dos halos de inibição foram utilizados apenas os resultados das concentrações de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 mol/L de AgNO₃, com formação de halos de inibição para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, conforme Figuras 56 e 57, respectivamente.



Figura 56. Halos de inibição para *Staphylococcus aureus*. Nas concentrações de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 mol/L de AgNO₃.

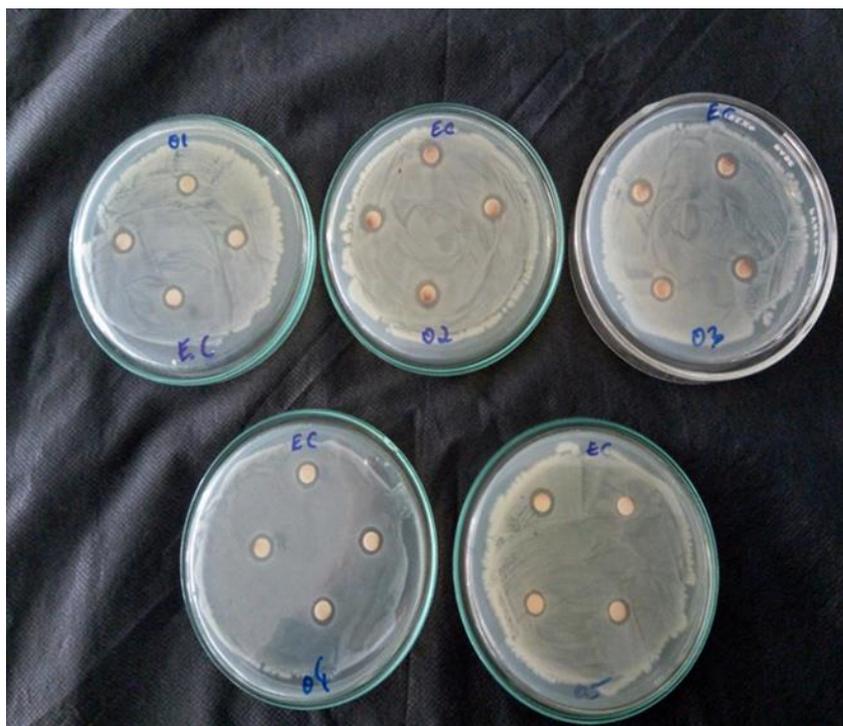


Figura 57. Halos de inibição para *Escherichia coli*.
Nas concentrações de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 mol/L de AgNO_3 .

Os dados mostram que ao aumentar a concentração de AgNO_3 nas amostras, a atividade antimicrobiana das NPsAg é eficaz tanto para a bactéria *Staphylococcus aureus* como para a bactéria *Escherichia coli*. Observa-se que os resultados da ação antimicrobiana se demonstraram eficazes a partir da concentração de 0,02mol/L de AgNO_3 , para as bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Essa concentração foi mais eficaz para a bactéria *Escherichia coli*. Entretanto para todas as outras concentrações de AgNO_3 testadas, a bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou halos de inibição maiores, comparados à bactéria *Escherichia coli*. A diferença observada nos halos de inibição pode estar relacionada com as características morfológicas das cepas utilizadas, principalmente com a superfície externa (BALOUIRI et al., 2016).

A parede celular da bactéria Gram-positiva é única e consiste de uma camada espessa, composta de múltiplas camadas de peptidoglicano responsável pela manutenção da célula e sua rigidez. A característica diferencial da bactéria Gram-negativa é a presença de uma dupla membrana que rodeia a célula bacteriana e apenas uma camada de peptidoglicano, Figura 58 (BRAYNER et al., 2006).

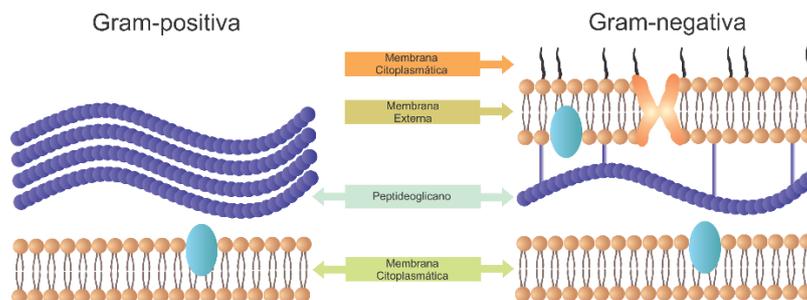


Figura 58. Esquema ilustrativo das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. (KAYSER et al., 2004)

O efeito das nanopartículas de prata na bactéria Gram-positiva pode estar associado à fragmentação da parede de peptidoglicano. As nanopartículas de prata, por apresentarem escala nanométrica, podem ter a capacidade de alcançar espaços intercelulares ou fissuras presentes na superfície bacteriana (MIRZAJANI et al., 2011).

No estudo de Shahverdi et al. (2007) foi observado que o efeito bactericida das NPsAg é influenciado pelas dimensões da partícula, tendo as menores partículas os melhores efeitos. Esse resultado foi diferente do estudo de Yoon et al. (2007), que relacionou a constituição da membrana celular como a causa da maior resistência sobre microrganismos gram-negativos. Porém no estudo de Sondi e Salopek-Sondi (2004) foi sugerido que os diferentes resultados sobre os micro-organismos estão relacionados com as diferentes metodologias empregadas, já que os constituintes do meio de cultura podem influenciar nos efeitos dos íons de prata na ação antimicrobiana. E ainda de acordo com Montanari et al. (2012), o tamanho do halo de inibição pode ser influenciado pela capacidade de difusão de cada antimicrobiano.

O método padronizado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (2003) utilizado nesse estudo, foi desenvolvido para análise de agentes antimicrobianos convencionais como antibióticos. Essas substâncias são, em geral, hidrofílicas e difundem-se mais facilmente em ágar. Entretanto, substâncias viscosas, insolúveis em água ou que possuem uma composição química complexa, podem ter uma difusão comprometida.

5.8 Ensaios de citotoxicidade *in vitro* da membrana PVA^{EXT}-NPsAg

Os ensaios de citotoxicidade segundo a norma ISO 10993-5 através do extrato, devem ser realizados inicialmente para avaliar os materiais e identificar aqueles que apresentam comportamento citotóxico devido à lixiviação de algum componente tóxico, oriundo do processo de síntese, para as células de mamíferos. Desta maneira, é possível

selecionar apenas os materiais mais adequados para a aplicação *in vivo*, o que permite minimizar a experimentação animal. Assim, o material comprovadamente citotóxico é representado por aquele que libera um elemento ou composto químico em quantidade suficiente para causar a morte celular. Nesse caso, a indução da toxicidade pela amostra avaliada é medida em uma faixa de concentrações específica do biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS foi considerada como o parâmetro de toxicidade. A Figura 59 mostra o ensaio de citotoxicidade das membranas de PVA^{EXT}-NPsAg contra as células CHO- k1.

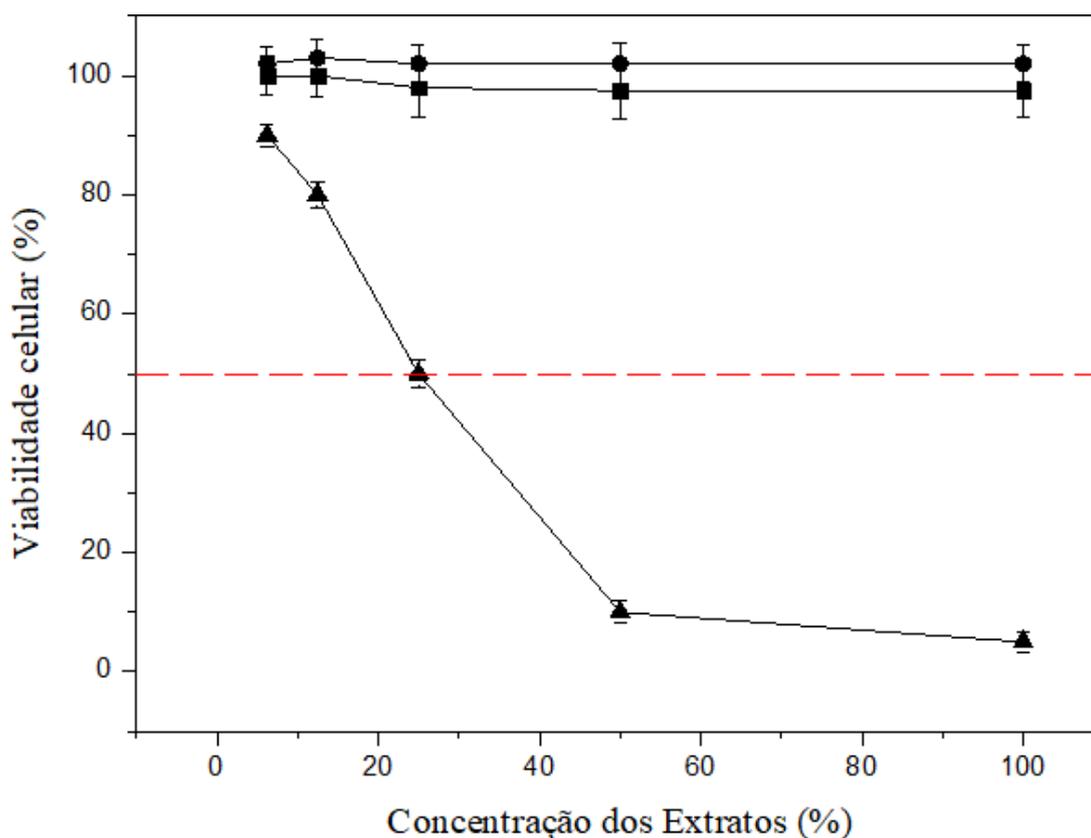


Figura 59. Curvas de viabilidade celular. Em relação às diferentes concentrações de extratos da membrana PVA^{EXT}-NPsAg (●), do controle negativo (PEAD) (■), do controle positivo (fenol) (▲).

Observa-se que as membranas PVA^{EXT}-NPsAg apresentam biocompatibilidade com células de mamíferos, pela ausência de citotoxicidade, evidenciada pela viabilidade celular, que se manteve-se em 100%, para todas as concentrações, conforme Tabela 14, tendo-se o PEAD como controle negativo e o fenol a 0,4% como controle positivo.

Tabela 14. Classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem de acordo com a ISO 10993-5.

	Viabilidade celular (%) [*]
citotoxicidade	faixa
não-citotóxico	> 90
levemente citotóxico	80 a 90
moderadamente citotóxico	50 a 79
severamente citotóxico	< 50

* porcentagem em relação ao controle negativo de toxicidade.

Estes resultados indicam que a membrana PVA^{EXT}-NPsAg testada, pode contribuir para a preservação das células saudáveis quando da sua aplicação como curativos para o tratamento de feridas.

6 CONCLUSÕES

O extrato de *Cinnamomum zeylanicum* utilizado no estudo foi obtido pela técnica de maceração dinâmica, com concentração de 0,002 g/mL. A caracterização físico-química do extrato, por FTIR, TGA, DSC e MEV, mostrou que além do princípio ativo, o cinamaldeído, o extrato também contém, uma substância de natureza polissacarídea, que favoreceu a biorredução da prata e a estabilização das nanopartículas, durante o processo de biossíntese das NPsAg.

A biossíntese de NPsAg a partir do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* foi confirmada por espectroscopia do UV-vis, a partir da banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS) estabilizada em torno de 419 nm. O estudo cinético da biossíntese a 23 °C mostrou que a reação segue uma cinética de primeira ordem, com constante de velocidade igual a 0,0078 min⁻¹. A formação das NPsAg também foi confirmada pelo espectro EDS, mostrando um pico de emissão em aproximadamente 3 keV, típico de absorção de prata metálica. A morfologia do complexo extrato-NPsAg, observada no MEV-EDS, mostrou que as NPsAg se distribuem ao longo de toda a matriz orgânica de forma irregular e que após a reação de biossíntese, as NPsAg formadas são estabilizadas, permanecendo retidas na matriz orgânica.

A matriz de PVA foi reticulada com ácido cítrico 2%. O FTIR confirmou a reticulação do PVA. Esta concentração de agente reticulante permitiu obter uma membrana de PVA com 78% de teor gel e 253,33 % de intumescimento a 23 °C.

A biossíntese *in situ* de NPsAg, na presença de PVA, foi comprovada por espectroscopia UV-vis. A formação de NPsAg foi confirmada pela banda de RPS em 423 nm. O estudo cinético da biossíntese *in situ* a 23 °C mostrou que a reação também segue uma cinética de primeira ordem, e a constante de velocidade encontrada, foi $k=0,017 \text{ min}^{-1}$. Essa constante de velocidade é maior do que foi encontrada para a biossíntese das NPsAg apenas em presença do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*.

A caracterização por FTIR da membrana PVA^{EXT}-NPsAg mostrou o deslocamento da banda carboxilato, devido a interação das NPsAg com a membrana de PVA.

A degradação térmica das membranas PVA^{EXT}-NPsAg apresentou 3 etapas. A primeira, de 105 a 232 °C, atribuída à degradação do reticulante ácido cítrico. A segunda etapa de 315 a 450 °C e a terceira de 450 a 500 °C, associadas à degradação da cadeia polimérica e um resíduo que pode ser atribuído principalmente à prata metálica. Observou-se, que o início da degradação térmica da cadeia de PVA curado é deslocado nas membranas de

PVA contendo as NPsAg, o que sugere que a interação entre o PVA e as NPsAg, estabiliza termicamente a cadeia do polímero e, portanto, retarda a degradação do PVA.

O mapeamento MEV-EDS revelou a presença de NPsAg distribuída ao longo de toda superfície da matriz polimérica da membrana PVA^{EXT}-NPsAg obtida *in situ*. As NPsAg se apresentaram com distribuição uniforme, sem formação de aglomerados, o que sugere que o PVA promove a formação de micelas e, estabilização das NPsAg.

O valor médio do diâmetro das NPsAg, calculado a partir da equação de Scherrer mostrou que as membranas PVA^{ext}NPAg a 0,04, 0,06 e 0,1, apresentam um tamanho de partícula em torno de 12nm, 11nm e 9nm, respectivamente.

O estudo do intumescimento da membrana PVA^{EXT}-NPsAg em água destilada, a 23 °C, mostrou no equilíbrio um grau de intumescimento de 130 %. Os valores de intumescimento no tempo, ajustados para o início do processo (10 min), na temperatura de 23 °C, pela equação de Fick, apresentou valor de constante difusional $n < 0,5$, o que denota que o mecanismo de absorção de água da membrana hidrogel PVA^{EXT}-NPsAg em água destilada, seguiu o modelo de difusão Fickiana e constante de proporcionalidade k , foi de $0,509 \text{ min}^{-1}$. A cinética de intumescimento a 23 °C, seguindo o modelo de Lagergren, se ajustou a uma cinética de primeira ordem, obtendo-se um valor de constante de velocidade $k = 0,117 \text{ min}^{-1}$.

O estudo cinético de liberação de NPsAg, realizado a 37 e 40 °C, seguiu uma cinética de primeira ordem. Foi observado, que a temperatura exerce um efeito significativo na constante de velocidade, sendo $k = 0,00209 \text{ min}^{-1}$, em 37 °C e $k = 0,0742 \text{ min}^{-1}$, em 40 °C. A partir da equação de Arrhenius a energia de ativação do processo de liberação foi $E_a = 959,87 \text{ kJ/mol}$. O estudo termodinâmico, a partir da equação de Eyring Polanyi, do processo de liberação das NPsAg em água destilada, mostrou que o sistema de liberação não é espontâneo, com energia livre de Gibbs de $\Delta G_0^\ddagger = 91,93 \text{ kJ/mol}$ a 37 °C e $\Delta G_0^\ddagger = 83,55 \text{ kJ/mol}$ a 40 °C. O sistema de liberação é endotérmico, com entalpia de $\Delta H_0^\ddagger = 957,28 \text{ kJ/mol}$. A variação de entropia revela um aumento da desordem, sendo $\Delta S_0^\ddagger = 2,76 \text{ kJ/mol} \cdot \text{K}$ a 37 °C e $\Delta S_0^\ddagger = 2,76 \text{ kJ/mol} \cdot \text{K}$ a 40 °C.

O estudo da atividade antimicrobiana mostrou que a membrana PVA^{EXT}-NPsAg é eficaz para ambas as bactérias, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A ação antimicrobiana foi eficaz a partir da concentração de 0,02mol/L de AgNO₃. A bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou halos de inibição maiores, comparados à bactéria *Escherichia coli*. A análise da citotoxicidade *in vitro* revelou que a membrana PVA^{EXT}-NPsAg

apresentou-se não citotóxica, evidenciada pela viabilidade celular, que se manteve-se > 90%, para todas as concentrações testadas, indicando que a membrana PVA^{EXT}-NPsAg testada.

A membrana hidrogel PVA^{EXT}-NPsAg testada, pode contribuir para a preservação das células sadias quando da sua aplicação como curativos para o tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. et al. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **Royal Society of Chemistry Advances**. 4, 3974- 3983, 2014.
- ABRAHAM, G. A.; CUADRADO, T. R. In: **Biomateriales**. ed. Sastre, R.; Aza, S.; Román, J. S. Faenza Editrice Iberica, Faenza. p. 173, 2004.
- AHMAD, N. et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n.1, 81- 86, 2010.
- AJJI, Z. Preparation of poly (vinyl alcohol) hydrogels containing citric or succinic acid using gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 74, 36- 41, 2005.
- AKHTAR, M. S. et al. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, 591- 602, 2013.
- AL-BAYATI, F. A.; MUTHANNA, J. M. Isolation, identification, and purification of cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark oil. An antibacterial study. **Pharmaceutical Biology**. v. 47, n. 1, 61- 66, 2009.
- ALEKSANDROVA, G. et al. Kinetics of silver nanoparticles formation in the biopolymer matrix. Physics, Chemistry and Application of Nanostructures. **World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.**, 2015.
- AOKI, H. et al. Rheological evaluation of gelatin gels prepared with a citric acid derivative as a novel cross-linker. **Materials Science and Engineering C**. v. 24, 787-790, 2004.
- ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico-química**. Rio de Janeiro: LTC, 1999.
- AYAPRAKASHA, G. K. **Use of fraction from Cinnamomum zeylanicum for preserving food**. Council of Scientific and Industrial Research (CSIR). US7431958B2. 2008.
- AZMIR J., et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. v. 117, 426-436, 2013.
- AZWANIDA N. N. et al. A Review on the Extraction Methods Use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**. v. 4, n:3, 196, 2015.
- BAE, K. H. et al. Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. **Journal of Materials Chemistry B**, v.1, 5371-5388, 2013.
- BALOUIRI, M. et al. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 6, 71-79, 2016.
- BANKURA, K. P., et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, 1159, 2012.

- BARBUCCI, R. **Hydrogels - Biological Properties and Applications**. Springer: Milan, 15-20, 2009.
- BELLANTONE, M. et al. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, 940-1945, 2002.
- BESSA, L. J. et al. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. **International Wound Journal**. v.12, 47-52, 2015.
- BIELEFELD, K. A. et al. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 70, 2059- 2081, 2013.
- BIRCK, C. et al. New crosslinked cast films based on poly (vinyl alcohol): Preparation and physico-chemical properties. **eXPRESS Polymer Letters**. v. 8, n. 12, 941-952, 2014.
- BORTOLIN, A. et al. Investigation of Water Absorption Process in Polysaccharide Hydrogels: Effect of Ionic Charge, Presence of Salt, Monomer and Polysaccharide Concentrations. **Polymers**, v. 22, n. 4, 311-317, 2012.
- BRAYNER, R. et al. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultra ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, 866-870, 2006.
- BROUGHTON, G, et al. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 117 (7), 2006.
- BURRELL, R. E.; WRIGHT J. B.; LAM, Kan. NUCRYST PHARMACEUTICALS CORP. **Treatment of hyperproliferative skin disorders and diseases**. WO0209729, 2002.
- CAI, J. et al. Nanoporous cellulose as a metal nanoparticles support, **Biomacromolecules**. v. 10, n. 1, 87- 94, 2009.
- CALÓ, E. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**. v. 65, 252-267, 2015.
- CAN, H. K. et al. A Preparation and swelling studies of biocompatible hydrogel systems by using gamma radiation-induced polymerization. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 72, n. 4, 483- 488, 2005.
- CANEVALORO, S. V, Jr. (coord.). **Técnicas de Caracterização de Polímeros**, Artliber Editora, São Carlos, 2007.
- CANO, J. J. M.; PERAIRE, C. In: **Biomateriales**. Ed. Sastre, R.; Aza, S.; Román, J. S. Faenza Editrice Iberica, Faenza. p. 197, 2004.
- CASTELLAN, G. W. **Físico-química**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A: Rio de Janeiro, 1973.

CAUERHFF, A.; CASTRO, G. R. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013.

CHALOUPKA, K. et al. Nanosilver as a new generation of Nano product in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**. v. 28, n. 11, 580- 588, 2010.

CHIEN, Y. W.; LIN, S. Drug delivery: Controlled release. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 1082–1102, 2007.

CHIKEZIE, P. C, et al. Bioactive Principles from Medicinal Plants. **Research Journal of Phytochemistry**. v. 9, n. 3, 88- 115, 2015.

CHOI, B. et al. Introduction to In Situ Forming Hydrogels for Biomedical Applications. **In Situ Gelling Polymers**. Springer. 5-35, 2015.

CHUNG, K. C, GLORI, A. K. Systematic review of skin graft donor-site dressings. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 124, n. 1, 298- 306, 2009.

CHUNSHENG, X. et al. Recent developments in intelligent biomedical polymers. **Science in China B: Chemistry**. v. 52, n. 2, 117- 130, 2009.

CIRIMINNA, R. et al. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**. v. 11:22, 2-9, 2017.

CLSI. M2- A8. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Oitava Edição. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, a Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry** R.A. Meyers (Ed.) pp. 10815-10837. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.

CUADRO, P. et al. Crosslinking of Cellulose and poly (ethylene glycol) with citric acid. **Reactive and Functional Polymers**. v. 90, 21-24, 2015.

DARROUDI, M. et al. A. Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. International. **Journal of Nanomedicine**. v. 6, 569- 574, 2011.

DEMIDOVA-RICE, T. N. et al. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. **Advances Skin Wound Care**. v. 25, n. 7, 304-314, 2012.

DENNEY, R. C; SINCLAIR, R. **Visible and Ultraviolet Spectroscopy**, John Wiley& Sons: New York, 1988.

DHANALAKSHMI V., et al. Skin and muscle permeating antibacterial nanoparticles for treating Staphylococcus aureus infected wounds. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**. v. 104, 797–807, 2016.

DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in vibrio cholera. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 8, 2668-2670, 2002.

DICOSMO, F.; BURROWS, L.; DITIZIO, V. ONTARIO, INC. **Liposome encapsulated silver salt compositions**. WO0126627. 2001.

DONATI, I. et al. Polyol synthesis of silver nanoparticles: mechanism of reduction by alditol bearing polysaccharides. **Biomacromolecules**. v. 10, n. 2, 210-213, 2009.

DURAN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n.5, p. 1609-24, 2011.

EDWARDS-JONES, V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. **Letters in Applied Microbiology**. v. 49:147–152., 2009.

FAN K, et al. State of the art in topical wound-healing products. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 127, 2011.

FARAHPOUR et al. Evaluation of the wound healing activity of Cinnamomum zeylanicum extract on experimentally induced wounds in rats. **African Journal of Biotechnology**. v. 11(84), 15068-15071, 2012.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 17, 2950-2963, 2009.

FENG, Q. L. et al. A Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.2, 662-668, 2000.

FERRER, E et al. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. **Toxicology in Vitro**. v. 23(8):1504- 9, 2009.

FREIRE, M. C. L. C; et al. Understanding Drug Release Data through Thermodynamic Analysis. **Materials**. v. 10(6): 651, 2017.

FRINGANT, C. et al. Hydration of alpha-maltose and amylose: molecular modelling and thermodynamics study. **Carbohydrate Research**. v. 278, 27–41, 1995.

GADE, A.; GAIKWAD, S. et al. Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: in vitro antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis. **Current Nanoscience**. v. 6, n. 4, 370-375. 2010.

GAHARWAR, A. K. et al. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 111, 441-453, 2014.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Hydrogels in controlled drug delivery systems. **Iranian Polymer Journal**, v. 18, n. 1, 63-88, 2009.

- GAUTHAMI M. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* bark extract and its antioxidant activity. **Nanoscience & Nanotechnology-Asia**. n.5, 2-7, 2015.
- GEHRKE, S. H.; LEE, P. I. Hydrogels for drug delivery systems. In: TYLE, P. **Specialized Drug Delivery Systems**. New York, N. Y.: Marcel Dekker, v. 41, 333-392, 1990.
- GIBAS, I.; JANIK, H. Review: Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. **Chemistry and Chemical Technology**, v. 4, n. 4, 297-304, 2010.
- GILS, P. S., RAY, D., SAHOO, P. K. Designing of Silver Nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, 237, 2010.
- GNANADESIGAN, M. et al. Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using *Avicennia marina mangrove* plant. **Applied Nanoscience**, v. 2, n. 2, 143-147, 2012.
- GOGOTSI, Yuri. **Nanomaterials handbook**. EUA: ISBN 0-8493-2308-8. 12-236, 2006.
- GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Synthesis and application of new temperature-responsive hydrogels based on carboxymethyl and hydroxyethyl cellulose derivatives for the functional finishing of cotton knitwear. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, 664-673, 2011.
- GULENOOR, F. γ -Irradiated Polyvinyl Alcohol (PVA) and citric acid blend. Hydrogels: Swelling and Absorption Properties. **Chemical Sciences Journal**. 7: 125, 2016.
- GUOZHONG, C. **Nanostructures and nanomaterials**. EUA: ISBN 1-86094-4159 Imperial college press, 36- 42, 2004
- HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis: Principles, Applications and Problems**. London: Chapman and Hall, 1995.
- HARDING KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and future: healing chronic wounds. **British Medical Journal**. 324 (7330):160-3, 2002.
- HASSAN, C. M., PEPPAS, N. A. Structure and Applications of Poly (vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. **Advances in Polymer Science** v.153, 37-65, 2000.
- HAYTHAM, M.M.I. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v. 8, 265-275, 2015.
- HERGERT, W.; WRIEDT, T. The Mie Theory. **Springer Series in Optical Sciences**. v. 169. Springer. 4.4.2, 2012
- HIREMATH, J. et al. Studies on biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus* sp. and its antibacterial efficacy on E.coli MDR strains. **International Letters of Natural Sciences**, v. 18, 27-35, 2014.
- HOFFMAN, A. S. **Hydrogels for biomedical applications**. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, 18-35, 2012.

HONGYAN, C. et al. Green synthesis of natural benzaldehyde from cinnamon oil catalyzed by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Tetrahedron**. v. 66, 9888-9893, 2010.

HOSSEINZADEH, H. Synthesis and swelling properties of a poly (vinyl alcohol)-based superabsorbing hydrogel. **Current Chemistry Letters**. v. 2, 153-158, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. O número de idosos com 80 anos ou mais deve crescer 27 vezes de 1980 a 2060.
<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-10/brasil-terá-19-milhões-de-idosos-com-mais-de-80-anos-em-2060-estima-ibge/>

INGALE, A. G. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an ecofriendly approach. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04 (2), 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices- Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Genève, 2009.

IONASHIRO, M. G. et al. **Giolito Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial**. 2ª Ed: Esper, 2014.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, 2638-2650, 2011.

JANI, G. K. et al. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, 2009.

JONES, A.; VAUGHAN, D. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. **Journal of Orthopaedic Nursing**. v. 9, S1-S11, 2005.

JONES, S. A. et al. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. **Wound Repair Regen**: 12(3):288-94, 2004.

JUNG, W. K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, 2171-2178, 2008.

KANJ, L. F, et al. Pressure ulcers. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 38, n. 4, 517-536, 1998.

KELSALL, R. et al. **Nanoscale science and technology**. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO1 9 XSQ, England, 2005.

KHAN, B. A. et al. Investigation of the effects of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of *Cassia fistula* L. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n. 3, 500- 503, 2012.

KLABUNDE, K. J. **Nanoscale materials in chemistry**, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

KOKABI, M. M. PVA clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. **European Polymer Journal**. 43, 773–781, 2007.

KOSTENKO, V. et al. Impact of silver-containing wound dressings on bacterial biofilm viability and susceptibility to antibiotics during prolonged treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 54, n. 12, 5120-5131, 2010.

KUMAR, V. et al. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 85, n. 10, 1301-1309, 2010.

KUN, F. et al. Enhancement of the antimicrobial activity of cinnamon essential oil-loaded electrospun nanofilm by the incorporation of lysozyme. **Royal Society of Chemistry Advances**. 7, 1572-1580, 2017.

KVITEK, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs) **Journal of Physical Chemistry C**. 112, 5825-5834, 2008.

LEWIS, A.; Clare H. Polymeric and Self Assembled Hydrogels: From Fundamental Understanding to Applications. **Royal Society of Chemistry**. 232-252, 2013.

LI, W. et al. Wound-healing perspectives. **Dermatologic Clinics**, 23(2):181-92, 2005.

LI, Y.; TANAKA, T. Kinetics of swelling and shrinking of gels. **The Journal of Chemical Physics**, v. 92, n. 2, 1365-1371, 1990.

LIU, J. et al. Study on the gravimetric measurement of the swelling behaviors of polymer films. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 33, 452-458, 2013.

LOGESWARI, P. et al. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**. v. 19 (3), 311-317, 2015.

LOK, C. N. et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, 916-924, 2006.

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. Stevens & Lowe's **Human Histology**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, 2015.

LUKMAN, A. I. et al. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 353, n. 2, 433-444, 2011

LU, H. et al. Toxicity evaluation of individual and mixed enniatins using an *in vitro* method with cho-k1 cells. **Toxicology in vitro**. 27(2):672-80, 2013.

MA, X. et al. Properties of biodegradable citric acid-modified granular starch/thermoplastic pea starch composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, 1-8, 2009.

MAITRA, J., et al. Cross-linking in Hydrogels- A Review. **American Journal of Polymer Science**. 4(2): 25-31, 2014.

MARCATO, P. D, et al. Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 20, 99-107. 2012.

MATSUMURA, Y. et al. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 69, n. 7, 4278-4281, 2003.

MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. **Research in Microbiology**. v.162, 542-549, 2011.

MITTAL, A. K. et al. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, Issue 2, March–April 2013.

MOHAN, S. et al. Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, 469–474, 2014.

MONTANARI, R.M. et al. Exposure to an acardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, 9728-9740, 2012.

MORONES, J. R, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology** 16(10):2346-53, 2005.

MOSSELHY, D.A. et al. Comparative synthesis and antimicrobial action of silver nanoparticles and silver nitrate. **Journal of Nanoparticle Research**, 17:473, 2015.

NAIR, L. S.; LAURENCIN C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, 762–798, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NETHRADEVI, C. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Datura metel* flower extract and evaluation of their antimicrobial activity **International Journal of Nanomaterials and Biostructures** v. 2, n. 2, 16-21, 2012.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. Fundamentos de Físico-Química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Artmed: Porto Alegre, 2002.

NIDHI, P. et al. Controlled Drug Delivery System: A Review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3(3), 2016.

NISHIYAMA, N. Smart polymeric micelles for gene and drug delivery. **Drug Discov. Today Technologies**, v. 2, p.21, 2005.

NOGUEZ, C. Surface plasmon on metal nanoparticles: the Influence of shape and physical environment. **Journal of Physical Chemistry C**. v. 11, 3806-3819, 2007.

NOWACK B, Krug HF and Height M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science and Technology**. v. 45, 1177-83, 2011.

NWOKEJI P. A. et al. The Chemistry of Natural Product: Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research- IJ TEEE**. v. 4, 2016.

OMS- Organização Mundial de Saúde OMS alerta que número de pessoas com mais de 60 vai dobrar até 2050.

<http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2015/09/oms-alerta-que-numero-de-pessoas-com-mais-de-60-vai-dobrar-ate-2050/#.WZw3atGQzGg/>

ONU- Organização das Nações Unidas. População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU.

<http://www.onu.org.br/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>

OTTENBRITE, R. M. et al. **Biomedical Applications of Hydrogels Handbook**. Springer: 2010.

OVIEDO, I. R. et al. Int. J. Design of a Physical and Nontoxic Crosslinked Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 57, 1095-1103, 2008.

PANACEK, A. et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 110, 16248 –16253, 2006.

PARSONS, D. et al. Silver antimicrobial dressings in wound management: a comparison of antimicrobial, physical, and chemical characteristics. **Wounds**. v. 17(8):222-32, 2005.

PATAKFALVI, R. et al. The Kinetics of homogeneous nucleation of silver nanoparticles stabilized by polymers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, 353-364, 2007.

PATELL, V. M. **Cinnamomum zeylanicum plant extracts for the treatment of diabetes and the extraction process thereof**. Avestha Gengraine Technologies Pvt. Ltd. WO2008041049A1, 2008.

PATIL, R. S. et al. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, 234-238, 2012.

PENCHEVA, D. et al. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/Ag-NPs) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. **Material Science and Engineering: C**, v. 32, 2048-2051, 2012.

PENESYAN, A. et al. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules**. v. 20 (4), 5286-5298, 2015.

PEPPAS N. A.; SAHLIN J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, 169-172, 1989.

POLTE J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. **CrystEngComm**. v. 17, n. 32, 6809-6830, 2015.

POMOGAILO, A. D.; KESTELMAN, V. N. Principles and Mechanisms of Nanoparticle Stabilization by Polymers. In: **Metallopolymer Nanocomposites**. Springer Series in Materials Science. v. 81, 2005.

QIAOZHI, A. et al. Preparation and characterization of thermo-sensitive poly (vinyl alcohol)-based hydrogel as drug carrier. **Journal of Applied Polymer Science** v.131, 2014.

QUELEMES, P. V. et al. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, 4969-4981, 2013.

RAGHAVAN, D. Characterization of biodegradable plastics. Polymer- **Plastics Technology and Engineering**, v. 34, n. 1, 41-63, 1995.

RAI, M. K. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura, São Paulo**. v. 65 n.3, 2013.

RAI, M. K., et al. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug- resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 112, 841–852, 2012.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterial Science: An Introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 346-356, 1996.

REICHA, F. M. et al. Preparation of silver nanoparticles in the presence of chitosan by electrochemical method. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, 236, 2012.

RIGO, C. et al. Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care. **Burns**, v. 38, 8, 1131–1142, 2012.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, 37-42, 1987.

ROCHA, I. C. et al. Pessoas com feridas e as características de sua lesão cutaneomucosa. **Journal of Nursing and Health**, v. 3, n. 1, 3-15, 2013.

RUDEN, S et al. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, 3538-3540, 2009.

RUIZ, J. et al. Synthesis and Swelling Characterization of Acid-containing Poly (vinyl alcohol) Hydrogels, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 81, 1444-1450, 2001.

RUIZ, M. J. et al. Comparison of basal cytotoxicity of seven carbamates in CHO-K1 cells. **Toxicological & Environmental Chemistry**. 88, 345- 354, 2006.

SALOME, et al. Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non-swellable matrices: a review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 2, 97-103, 2013.

SANA, S. S. et al. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Grewia flavescens* and study of their antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 145, 347-350, 2015.

SANTIAGO-ADAME, R. Spray drying-microencapsulation of *cinnamon* infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. **LWT- Food Science and Technology**, v. 64, 571-577, 2015.

SATHISHKUMAR, M. et al. *Cinnamomum zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 73, n. 2, 332-338, 2009.

SATOH, K. Poly (vinyl alcohol) (PVA). **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. 1-6, 2014.

SCAHCHT, V. J, et al. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114(1): 25- 35, 2013.

SCHERR, G. H. **Silver alginate foam compositions**. WO03009810 A2, 2003.

SEON, J. K. Swelling Kinetics of Modified poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, 3310–3313, 2003.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine**. v. 3, n. 2, 168-171, 2007.

SHAO, W. et al., Synthesis, Characterization and Antibacterial Study of Silver Nanoparticle-Loaded Poly (vinyl alcohol) Hydrogels. **Journal of Bionanoscience**. v. 9, n. 6, 448-453, 2015.

SHARMA, V. K. et al. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 145. 83-96, 2009.

SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**. v. 112, 116-131, 2016.

SHRIVASTAVA, S. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology** 18, 225103- 225112, 2007.

SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology, uses, and misuses of silver compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, 341 – 353, 2003.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos**, 7a edição, Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 2007.

SINGH, D.; RAWAT, D. Microwave assisted synthesis of silver nanoparticles from *Organum majorana* and *Citrus sinensis* leaf and their antibacterial activity: a green chemistry approach. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, 14-20, 2016.

SINTUBIN, L. et al. Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. **Biotechnology and Bioengineering**, 109:2422–2436, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. [S.l.]: Bookman Companhia ED, 2009.

SOLOMON, S. D. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Chemical Education**. 84 (2), p. 322, 2007.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n.1, 177-182, 2004.

SOUZA, D. M. S. T. et al. Qualidade de vida e autoestima de pacientes com úlcera crônica. **Acta Paulista de Enfermagem**. v. 26(3), 283-8, 2013.

SPOTNITZ, W. D.; WANG, J.; RODEHEAVER, G. T. UNIV. VIRGINIA PATENT FDN. **Composition and method for treating burns**. WO 2001021195 A1, 2001.

STEPHANIE, A. et al. *In situ* citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers. **Materials Letters**. v. 112, 32-35, 2013.

TAGUCHI, T. et al. Bonding of soft tissues using a novel tissue adhesive consisting of a citric acid derivative and collagen. **Materials Science and Engineering C**, v. 24, 775- 780, 2004.

TATARCHUK, V. V. et al. Kinetic factors in the synthesis of silver nanoparticles by reduction of Ag⁺ with hydrazine in reverse micelles of Triton N-42. **Chemistry of Materials**, v. 25, 3570- 3579, 2013.

TEIXEIRA, L. S. M. et al. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, p. 1281-1290, 2012.

THOMAS, L. et al. A biodegradable and biocompatible PVA–citric acid polyester with potential applications as matrix for vascular tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 259-269, 2009.

TOMA, H. E.; ARAKI, K.; CATALANI, L. H.; SILVA, F.; ZAMARION, V. M. **Membrana de hidrogel e curativo inteligente**. PI0902080-2 A8, 2009.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNKYK, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasoics Sonochemistry**. v.8, 137- 142, 2001.

TRAN, H. V. et al. Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan-based silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspect**, v.360, 32, 2010.

TRIPATHY, A. et al. A. Process variables in biomimetic synthesis of Silver Nanoparticles by Aqueous Extract of *Azadirachta indica* (Neem) Leaves. **Journal of Nanoparticle Research**, v.12, n.1, 237-246, 2010.

UPADHYAY, S. K. **Chemical Kinetics and Reaction Dynamics**. Springer, New York, 2006.

VANGE, J.; NIELSEN, B. COLOPLAST A/S. **Compositions stabilisees possedant une activite antibacterienne**. WO 2002026039 A1, 2002.

VARSHNE, Y. L. Role of natural polysaccharides in radiation formation of PVA-hydrogel wound dressing. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 255(2), 343-349, 2007.

VARSHOSAZ, J.; KOOPAIE, N. Cross-linked Poly (vinyl alcohol) Hydrogel: Study of Swelling and Drug Release Behaviour. **Iranian Polymer Journal**, v. 11, 123-131, 2002.

VELAYUTHAM, K. et al. Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 2, 95-101, 2013.

VERMEULEN, H. et al. Dressings and topical agents for surgical wounds healing by secondary intention. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2004.

WARDATUN, S. et al. Study effect type of extraction method and type of solvent to Cinnamaldehyde and Trans-Cinnamic acid dry extract *Cinnamon (Cinnamomum burmanii* [Nees & T, Nees] Blume). **Journal of Young Pharmacists**, v. 9, 49-51, 2017.

WENHUA, L et al. Size Effect on the Thermodynamic Properties of Silver Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**. v. 112 (7), 2359-2369, 2008.

WICHTERLE, O.; LIM D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, vol.185, 117-118, 1960.

WILKINSON L.J.; WHITE R.J.; CHIPMAN J.K. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: A review of efficacy and safety. **Journal of Wound Care**, v. 20, n. 11, 2011.

WOLCOTT, R. D., et al. Types of wounds and infections. **Microbiology of wounds**. CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC, p. 219, 2010.

XU, W.; YANG, Y. Drug release and its relationship with kinetic and thermodynamic parameters of drug sorption onto starch acetate fibers. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 105, 814-822, 2010.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Advances in Wound Care**. v. 4, n. 3, 119–136, 2015.

YAMANAKA, M, et al. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, 7589–7593, 2005.

YANG, C. Q et al. Ester Crosslinking of Cotton Fabric by Polymeric Carboxylic Acids and Citric Acid. **Textile Research Journal**. 67, n. 5, 334–342, 1997.

YANG, W. J, et al. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. **Nanotechnology** 20, n. 8, 2009.

YANNAS, V. E; LEE, D.P. O. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 86, 933–937, 1989.

YAO, J. H, et al. Theory and simulation of Ostwald ripening. **Physical Review B.**, v. 47, p. 14110-14125, 1993.

YOON, K.Y. et al. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. **Science of the Total Environment**. v.373, 572-575, 2007.

ZAHIR, A. A.; RAHUMAN, A. Evaluation of different extracts and synthesised silver nanoparticles from leaves of Euphorbia prostate against Haemaphysalis bispinosa and Hippobosca maculata. **Veterinary Parasitology**, 187(3-4), 511–520, 2012.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, 575-579, 2004.

ZUCOLOTTO, V.; NETO, E. A. B. **Processo de síntese e incorporação de nanopartículas de prata em matrizes poliméricas hidrofílicas e uso de nanopartículas de prata**. Universidade de São Paulo- USP/Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp. PI 1101028-2 A2, 2014.

Referências dos produtos

Actisorb 220[®] (Johnson & Johnson)
http://www.jnj.com/news/jnj_news/20030325_105204.htm Johnson & Johnson news.

AgION (Agion Technology, Inc.)
<http://www.agion-tech.com/NewsDetail.asp?PressID=56>; <http://www.agion-tech.com/NewsDetail.asp?PressID=63> AgION Tech., Inc: news releases.

Axenohl (Axen 30)
<http://www.sistecam.com/products.htm> Sistecam products.

Curad silver[®] (Beiersdorf AG)
<http://www.beiersdorf.com/controller.aspx?n=6&l=2#>; [http://www.curadusa.com/Beirdorf brands](http://www.curadusa.com/Beirdorf-brands).

Silvadene[®] (Marion Laboratories)
<http://www.silverinstitute.org/news/5b01.html> The Silver Institute.

SilverIon[®] (Argentum Medical LLC)
<http://www.silverlon.com/Silverlon-homepage>.