

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS
COM AGENTES ANTIMICROBIANOS NANOESTRUTURADOS

SUELEN GONÇALVES DE SOUZA

JOINVILLE/SC

2017

SUELEN GONÇALVES DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS
COM AGENTES ANTIMICROBIANOS NANOESTRUTURADOS**

Trabalho apresentado para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos do Curso de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Testa Pezzin. Co-orientador: Prof^o André Nogueira.

JOINVILLE/SC

2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

S729d Souza, Suelen Gonçalves de
Desenvolvimento de membranas de PLGA funcionalizadas com agentes antimicrobianos nanoestruturados/ Suelen Gonçalves de Souza; orientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin, coorientador André Nogueira. – Joinville: UNIVILLE, 2017.

66 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Gengivas – Doenças. 2. Periodontite – Tratamento. 3. Regeneração tecidual guiada. I. Pezzin, Ana Paula Testa (orient.). II. Nogueira, André. (coorient.). III. Título.

CDD 617.63

Termo de Aprovação

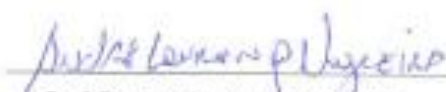
“Desenvolvimento de Membranas de PLGA funcionalizadas com Agentes Antimicrobianos Nanoestruturados”

por

Suelen Gonçalves de Souza

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dr. André Lourenço Nogueira
Coorientador (UNIVILLE)


Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck
Vice-Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dr. André Lourenço Nogueira
Coorientador (UNIVILLE)


Prof. Dra. Maria Margarete Meier
(UDESC)


Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
(UNIVILLE)

Joinville, 30 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Admir Antônio Gonçalves de Souza e Estefania Rosa Basi, que foram à base de tudo para mim, apoiando-me nos momentos difíceis com força, confiança e amor, ensinando-me a persistir nos meus sonhos e ajudando-me a alcançá-los.

Às minhas irmãs Carine Juliana Gonçalves de Souza e Katelin Gonçalves de Souza, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu companheiro Andrei Miranda Leite, pelo amor, carinho e compreensão que me mantiveram firmes nesta caminhada.

Aos meus orientadores Dra. Ana Paula Testa Pezzin e Dr. André Lourenço Nogueira, pela orientação, confiança, ensinamentos e por todo apoio dispensados a mim durante todos os momentos do mestrado.

À aluna de iniciação científica da UNIVILLE Maria Luiza Molin, por toda a ajuda nas atividades experimentais.

À professora Dra. Andrea Schneider da UNIVILLE, por toda ajuda com as análises antibacterianas.

À professora Dra. Márcia Meier da UDESC, pela realização das análises de RMN.

Às técnicas de laboratório da UNIVILLE, Aline Scheller Coan e Cláudia H. G. Correia, por toda a ajuda durante a realização dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem avaliar este trabalho.

Agradeço aos meus colegas, familiares e todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

A periodontite é uma doença que afeta os tecidos de suporte dental, causando perda da inserção óssea. Ela se inicia a partir da gengivite, que quando não tratada, progride para periodontite. Um dos tratamentos possíveis para a periodontite é por meio da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG), que consiste em inserir uma membrana biocompatível que possibilita a regeneração do periodonto. Atualmente, uma variedade de membranas reabsorvíveis encontram-se disponíveis comercialmente como alternativa às membranas convencionais não reabsorvíveis, como as membranas de poli(ácido-láctico-coglicólico)(PLGA). Essas membranas não necessitam de uma intervenção cirúrgica secundária para sua remoção, uma vez que o polímero que as constitui é biocompatível e bioreabsorvível. Para inibir processos infecciosos que podem ocorrer devido a intervenção cirúrgica, são prescritos antibióticos, porém as bactérias possuem potencial para desenvolver resistência contra os mesmos. Desta forma, novas estratégias são necessárias para identificar e desenvolver medicamentos ou agentes para inibir infecções bacterianas em tratamentos por RTG. Algumas nanopartículas são uma alternativa eficaz no combate às bactérias patogênicas, dentre elas podemos citar as nanopartículas de prata (NpAg) e nanopartículas de óxido de zinco (NpZnO). Neste contexto, o presente trabalho objetivou produzir membranas biopoliméricas que fossem biocompatíveis e bioreabsorvíveis, eliminando assim a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, funcionalizadas com agentes antibacterianos nanoestruturados visando inibir a formação de biofilme na região tratada com a técnica de RTG. Para a produção das membranas foi utilizado o PLGA como matriz polimérica, sendo preparados filmes pelo método de evaporação utilizando clorofórmio como solvente. As NpAg foram sintetizadas e utilizadas nas concentrações: 5, 7, 8 e 10 ppm, enquanto que as concentrações utilizadas para as NpZnO foram: 10, 50, 100 e 150 ppm. A caracterização das NpAg foi realizada por UV-Vis, MET e espectroscopia de absorção atômica. As NpZnO não se dispersam bem em clorofórmio sendo necessário fazer uma modificação de superfície, utilizando-se o 1-dodecanotiol como ligante. Para verificar a eficiência da modificação analisou-se as nanopartículas de ZnO por FTIR. As membranas obtidas foram caracterizadas por TGA, DSC, RMN, MEV-FEG e a ação antibacteriana foi avaliada utilizando-se a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que a modificação de superfície foi eficiente, sendo possível incorporar as nanopartículas nas membranas. As análises de TGA demonstraram que a adição de NpAg acima de 7 ppm aumenta a estabilidade térmica do material, já a adição de NpZnO diminui a estabilidade com adições a partir de 50 ppm. Além disso, as membranas contendo as nanopartículas de prata se mostraram eficientes no combate à bactéria testada, o que indica que as mesmas possuem forte potencial de aplicação na técnica de regeneração tecidual guiada em pacientes que sofrem com a periodontite.

Palavras chave: PLGA, nanopartícula de prata, nanopartícula de óxido de zinco

ABSTRACT

Periodontitis is a disease that affects the tissues of dental support, causing loss of insertion. It is started from gingivitis, which is not treated, progresses to periodontitis. One of the possible treatments for a periodontitis is through the technique of guided tissue regeneration (RTG), which consists of inserting a biocompatible membrane that enables a periodontal regeneration. Actually, a variety of resorbable membranes are a product commercially used as poly (lactic-co-glycolic acid) membranes (PLGA). Such membranes do not require a secondary surgical intervention for their removal, since the polymer which it constitutes is biocompatible and bioreabsorbable. To inhibit infectious processes that may result from a surgical intervention, antibiotics are prescribed, but as bacteria they have potential for the development of resistance against them. In this way, new strategies are to identify and develop drugs or agents to inhibit bacterial infections in RTG treatments. (Nanoparticles of silver) and nanoparticles of zinc oxide (NpZnO) are silver nanoparticles (NpAg) and nanoparticles of zinc oxide. In this context, the present work aimed to produce biopolymer membranes that were biocompatible and bioreabsorbable, thus eliminating a need for a second surgical intervention, functionalized with nanostructured antibacterial agents aimed at inhibiting a biofilm formation in the region treated with a GTR technique. For a production of membranes for the use of PLGA as polymer matrix, which is necessary for the production of chloroform as solvent. NpAg were synthesized and used at the concentrations: 5, 7, 8 and 10 ppm, as concentrations used for NpZnO were: 10, 50, 100 and 150 ppm. The characterization of NpAg was performed by UV-Vis, MET and atomic absorption spectroscopy. To the extent that NpZnO does not disperse well in chloroform, a surface modification is required using 1-dodecanethiol as a binder. To verify the efficiency of the modulation was analyzed as nanoparticles of ZnO by FTIR. As membranes obtained were characterized by TGA, DSC, RMN, MEV-FEG and the antibacterial action was evaluated using a bacterium *Staphylococcus aureus*. The obtained results demonstrated that a surface modification was efficient, being possible to incorporate as nanoparticles in the membranes. As TGA analyzes have shown that the addition of NpAg above 7 ppm increases the thermal stability of the material, since an addition of NpZnO decreases stability with additions starting at 50 ppm. In addition, as membranes containing silver nanoparticles were shown to be efficient without the tested bacterial test, indicating that as the same strong potential application in the technique of tissue regeneration in patients suffering from periodontitis.

Keywords: PLGA, silver nanoparticle, zinc oxide nanoparticle

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura periodontal de um dente saudável e com doença periodontal	6
Figura 2. Ilustrações da progressão da doença periodontal a) gengiva saudável; b) gengivite grave (lesão estável); c) periodontite crônica (lesão progressiva).....	8
Figura 3. Membrana polimérica suturada para tratamento de periodontite.....	9
Figura 4. Representação da estrutura de nanoreforço disperso em matriz polimérica.....	15
Figura 5. Mecanismos de atividades antimicrobianas exercidas por nanomateriais.....	17
Figura 6. Síntese de PLGA a partir da abertura dos anéis dos monômeros de lactídeo e glicolídeo.....	20
Figura 7. Estrutura química da oleilamina.....	25
Figura 8. Esquema do processo de preparação dos nanocompósitos.....	28
Figura 9. Espectros RMN-1H do PLGA na região de 4 a 6 ppm a) lote 1; b) lote 2.....	33
Figura 10. Espectro de RMN-1H para o PLGA na razão 80/20, possuindo picos pouco intensos na região de 4,8 ppm.....	34
Figura 11. Espectros RMN-1H do PLGA na região de 4 a 7 ppm a) Lote 1; b) lote 2.....	35
Figura 12. Comparação entre os espectros RMN-1H do PLGA a) Lote 1; b) lote 2.....	37
Figura 13. a) variação da absorbância máxima das nanopartículas de prata em fase aquosa ao longo do tempo; b) Espectros de absorbância das nanopartículas dispersas na fase aquosa e na fase orgânica.....	39
Figura 14. Imagens de MET das nanopartículas de prata: a) em fase aquosa, após a síntese; b) em clorofórmio, após a transferência de fases.....	40
Figura 15. Espectros de FTIR das NpZnO modificadas.....	41
Figura 16. Espectros de FTIR de NpZnO encontrado na literatura.....	42
Figura 17. Detalhe dos picos referente ao estiramento Zn-S.....	43
Figura 18. Curvas TG e DTG (termogravimetria derivada) do PLGA puro (lote 1) e dos nanocompósitos com NpAg.....	44

Figura 19. Curvas de TGA e DTG (termogravimetria derivada) do PLGA puro, e dos nanocompósitos usando NpZnO.....	46
Figura 20. Curvas de DSC para as membranas de PLGA com NpAg: a) 1º aquecimento; b) 2º aquecimento.....	47
Figura 21. Curvas de DSC para as membranas de PLGA funcionalizadas com NpZnO: a) 1º aquecimento; b) 2º aquecimento.....	49
Figura 22. Micrografia da superfície do PLGA puro.....	50
Figura 23. Gráfico do diâmetro das nanopartículas pela frequência relativa dos materiais contendo NpAg, quantidade de aglomerados de nanopartículas contados (n) e moda (valor que mais aparece - Xc): a) NpAg 5 ppm; b) NpAg 7 ppm; c) NpAg 8 ppm; d) NpAg 10 ppm.....	51
Figura 24. Gráfico do diâmetro das nanopartículas pela frequência relativa dos materiais contendo NpZnO, quantidade de aglomerados de nanopartículas contados (n) e moda (valor que mais aparece - Xc): a) NpZnO 10 ppm; b) NpZnO 50 ppm; c) NpZnO 100 ppm; d) NpZnO 150 ppm.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes do periodonto e suas características.....	5
Tabela 2. Descrição dos experimentos realizados para modificação das NpZnO.....	26
Tabela 3. Dados da análise de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando NpAg.....	44
Tabela 4. Dados da análise de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando NpZnO.....	46
Tabela 5. Dados de temperatura de transição (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m) obtidos das curvas DSC para as membranas de PLGA e membranas de PLGA funcionalizadas com NpAg.....	47
Tabela 6. Dados de temperatura de transição (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m) obtidos das curvas DSC para as membranas de PLGA e membranas de PLGA funcionalizadas com NpZnO.....	50
Tabela 7. Percentual de redução das bactérias Gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i> pelas membranas de PLGA funcionalizadas com distintas concentrações de NpAg ou NpZnO.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos realizados por alguns autores na obtenção e/ou incorporação de membranas reabsorvíveis na técnica de RTG.....	11
Quadro 2. Estudos realizados por alguns autores na incorporação de NpAg ou NpZnO em materiais poliméricos.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Análise termogravimétrica – TGA

Borohidreto de sódio - NaBH_4

Brometo de potássio – KBr

Calorimetria exploratória diferencial – DSC

Dióxido de titânio - TiO_2

Dodecanotiol – DDT

Entalpia de fusão – ΔH_m

Espectroscopia de absorção atômica – AAS

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada Fourier – FTIR

Grau de cristalinidade – X_c

Hidroxiapatita – HAP

Índice de polidispersividade – I_p

Junção cimento-esmalte – JCE

Massa molar numérica média - M_n

Massa molar ponderal média - M_w

Microscopia eletrônica de transmissão – MET

Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução – HRTEM

Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo – MEV-FEG

Nanohidroxiapatita – NCHAC

Nanopartículas de óxido de zinco – NpZnO

Nanopartículas de prata – NpAg

Óxido de cobre – CuO

Óxido de ferro - Fe_2O_3

Óxido de zinco – ZnO

Temperatura na qual a degradação é máxima – $T_{\text{máx}}$

Poli(ácido glicólico) – PGA

Poli(ácido láctico) – PLA

Poli(ácido-láctico-coglicólico) – PLGA

Poli(caprolactona) – PCL

Poli(hidroxibutirato) – PHB

Poli(L-ácido láctico) – PLLA

Politetrafluoretileno – PTFE

Politetrafluoretileno expandido - e-PTFE

Poli(vinil)pirrolidona – PVP

Regeneração tecidual guiada – RTG

Ressonância Magnética Nuclear - RMN-¹H

Sociedade Americana para Testes e Materiais – ASTM

Temperatura de início de degradação extrapolada – T_{onset}

Temperatura de fusão – T_m

Temperatura de transição vítrea – T_g

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. OBJETIVOS	4
1.1 OBJETIVO GERAL.....	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 PERIODONTITE.....	5
2.2 REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA	9
2.2.1 Estado da Arte na utilização de membranas reabsorvíveis na RTG....	10
2.3 NANOCOMPÓSITOS.....	14
2.4 AGENTES ANTIBACTERIANOS NANOESTRUTURADOS.....	15
2.5 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE.....	17
2.6 BIOMATERIAIS	19
2.7 PLGA.....	20
2.8 UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Ag E ZnO EM MATERIAIS POLIMÉRICOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. MATERIAIS	24
3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE PLGA.....	24
3.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ¹ H)	24
3.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	24
3.4. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DAS NpZnO.....	26
3.5. PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS	27
3.6. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	28
3.6.1. Espectrofotometria de UV-Visível	28
3.6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
3.6.3. Espectroscopia de absorção atômica	29
3.7. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS	29

3.7.1.	Análise termogravimétrica (TGA).....	29
3.7.2.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	30
3.7.3.	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	30
3.7.4.	Atividade antibacteriana	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE PLGA.....	32
4.1.1.	Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹ H)	32
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	38
4.2.1.	Espectrofotometria de UV-Visível	38
4.2.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	39
4.2.3.	Espectroscopia de Absorção Atômica	40
4.3.	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DAS NpZnO	41
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS	43
4.4.1.	Análise termogravimétrica (TGA).....	43
4.4.2.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	46
4.4.3.	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	50
4.4.4.	Atividade Antibacteriana	53
	CONCLUSÃO	55
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56
	REFERÊNCIAS.....	57

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença que afeta os tecidos de suporte dental, causando perda da inserção óssea. Ela se inicia a partir da gengivite, que quando não tratada, progride e a inflamação se torna mais grave (BRAGA *et al.*, 2007; BOTTINO *et al.*, 2011). Apresenta também risco de efeitos sistêmicos, já que o biofilme formado no local da inflamação é fonte de bactérias que podem entrar na corrente sanguínea e afetar órgãos como coração, pulmão, articulações, rins e fígado (MARRETA, 2001; MENDES, 2012; BRAGA *et al.*, 2007).

Um dos tratamentos possíveis para a periodontite é por meio da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG), que consiste em inserir uma membrana biocompatível que faz uma oclusão, permitindo que se forme um coágulo sanguíneo que vai maturar e possibilitar a regeneração do periodonto. A membrana também obstrui a área, protegendo a lesão de possíveis contaminações bacterianas. Usualmente o tratamento é composto de uma cirurgia para inserção da membrana não reabsorvível, outra para a retirada da mesma e a prescrição de antibióticos para inibir processos infecciosos (DELIBERADOR *et al.*, 2008; BOTTINO *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2005).

Atualmente, uma variedade de membranas reabsorvíveis está disponível como alternativa às membranas convencionais não reabsorvíveis. Essas membranas não necessitam de uma intervenção cirúrgica secundária para sua remoção e normalmente são de poliésteres como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL) e seus copolímeros ou ainda derivadas de colágeno. As membranas à base de poliéster são biodegradáveis, permitem a integração do tecido e são mais fáceis de manusear cirurgicamente em comparação com as membranas convencionais. As propriedades mecânicas e físicas devem ser suficientes para evitar a ruptura da membrana e permitir sua colocação *in vivo*. Além disso, as taxas de degradação das membranas devem coincidir com as taxas de formação do tecido novo (BOTTINO *et al.*, 2010; BEHRING *et al.*, 2008; LIAO *et al.*, 2005). O copolímero poli(ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA) é constituído por unidades provenientes do ácido láctico e do ácido glicólico. Sua vantagem sobre outros polímeros bioreabsorvíveis, como o

poli(L-ácido láctico) (PLLA), é o fato do copolímero PLGA requerer um menor tempo para sua completa degradação, implicando em uma menor probabilidade de reações adversas, as quais decorrem, muitas vezes, de fragmentos cristalinos liberados por polímeros, com tempo de degradação excessivamente longo (MOTTA *et al.*, 2006). O grande interesse nesse copolímero vem do fato de suas propriedades mecânicas e tempo de degradação poderem ser controlados através da relação que se emprega dos monômeros (MOTTA, 2002).

Para inibir processos infecciosos que podem ocorrer devido a intervenção cirúrgica, são prescritos antibióticos, porém as bactérias possuem potencial para desenvolver resistência contra os mesmos. Desta forma, novas estratégias são necessárias para identificar e desenvolver medicamentos ou agentes para inibir infecções bacterianas em tratamentos por RTG. Algumas nanopartículas são uma alternativa eficaz no combate às bactérias patogênicas. Dentre as nanopartículas com função bactericida podemos citar as nanopartículas de prata (NpAg), de óxido de cobre (CuO), de dióxido de titânio (TiO₂), de óxido de ferro (Fe₂O₃) e nanopartículas de óxido de zinco (NpZnO) (CHACRABORTI *et al.*, 2014).

A prata é a nanopartícula mais utilizada contra bactérias e pode ser utilizada contra uma ampla gama de patógenos, especialmente patógenos multirresistentes que são difíceis de tratar com os antibióticos disponíveis (LARA *et al.*, 2011). Por outro lado, sua utilização (dependendo da concentração) é limitada uma vez que possui efeitos secundários, que podem inclusive ser tóxicos. A utilização de nanopartículas de ZnO como alternativa à prata vêm ganhando destaque devido à sua biocompatibilidade. Além disso, essas nanopartículas apresentam efeitos mínimos relacionadas às células humanas e possuem atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (CHACRABORTI *et al.*, 2014).

A incorporação de nanopartículas de prata e zinco nas membranas, representa um avanço tecnológico para a técnica de RTG, pois atualmente não existe no mercado um produto que ofereça proteção contra bactérias nem pela presença de antibióticos na membrana, tampouco pelo uso de nanoestruturas com propriedades antibacterianas.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo produzir membranas biopoliméricas que sejam biocompatíveis e bioreabsorvíveis, eliminando assim a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, funcionalizadas com agentes antibacterianos nanoestruturados para impedir a formação de biofilme na região tratada com a técnica de RTG. Como o mecanismo de ação antibacteriano destas nanopartículas metálicas é diferente dos mecanismos de ação dos antibióticos, espera-se que não haja o desenvolvimento de resistência bacteriana, trazendo benefícios ao paciente.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver membranas biopoliméricas de PLGA com propriedades antibacterianas, mediante a incorporação de nanopartículas de ZnO ou Ag, para aplicação no tratamento de periodontite.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a modificação química da superfície das nanopartículas de ZnO hidrofílicas para incorporação em matriz polimérica orgânica (lipofílica).
- b) Preparar membranas biocompósitas de PLGA, com distintas concentrações de nanopartículas de prata ou com nanopartículas de óxido de zinco.
- c) Caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar a atividade bactericida das membranas produzidas utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus*, comparando a eficiência dos agentes antibacterianos nanoestruturados utilizados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PERIODONTITE

O periodonto abrange o conjunto de tecidos que envolve os dentes, sendo dividido em periodonto de inserção (ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar) e periodonto de proteção (gengiva). A principal função do periodonto é a inserção do dente ao tecido ósseo dos maxilares e conservar a superfície da mucosa mastigatória da cavidade bucal (BRAGA *et al.*, 2007). Os principais constituintes do periodonto e suas características estão descritos na Tabela 1.

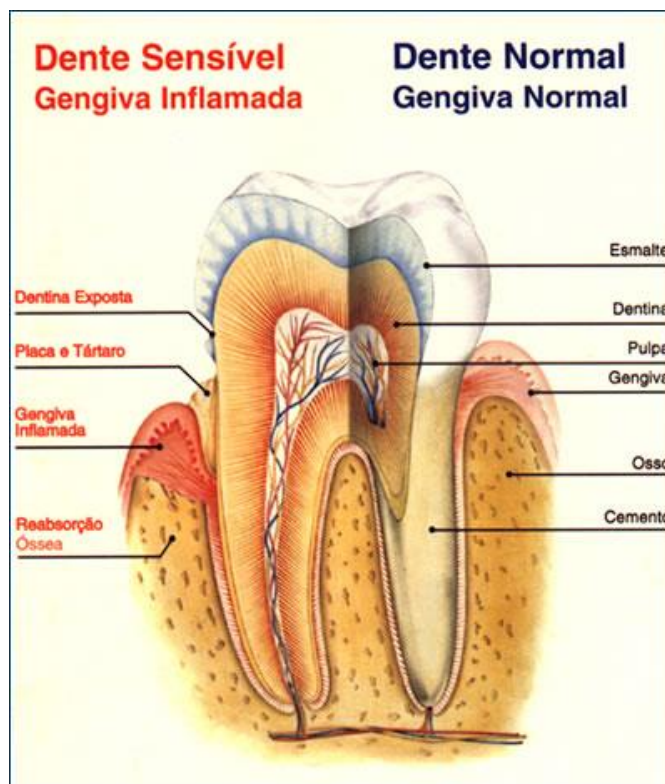
Tabela 1 - Constituintes do periodonto e suas características

Constituintes do periodonto	Características
Gengiva aderida	Tecido epitelial de elevada taxa proliferativa
Cemento radicular	Tecido mineralizado especializado que reveste a superfície radicular do dente
Ligamento periodontal	Tecido conjuntivo especializado fibroso; Liga a superfície radicular do dente ao sulco gengival; Muito vascularizado; Ajuda o dente a suportar as forças compressivas que ocorrem durante a mastigação e, ajudam-no a permanecer embutido no osso.
Ossos alveolares	O principal constituinte é a hidroxiapatita.

Fonte: MARTINS, 2011.

A doença periodontal é causada pela acumulação de bactérias na forma de placa na superfície dos dentes, o que resulta em inflamação gengival e se não for tratada pode levar à destruição dos tecidos periodontais que pode resultar em problemas locais e sistêmicos clinicamente significativos (MARRETA, 2001). A Figura 1 apresenta a estrutura periodontal de um dente com doença periodontal e de um dente saudável.

Figura 1. Estrutura periodontal de um dente saudável e com doença periodontal.



Fonte: SITE MACHADO E MIRANDA, 2015

A doença periodontal ocorre em duas formas: gengivite e periodontite. A gengivite é uma inflamação reversível da gengiva, que ocorre no periodonto de proteção. Clinicamente é caracterizada por mudanças na coloração do tecido gengival, presença de sangramento à sondagem e pode ser associada à presença de placa bacteriana no sulco gengival ((BRAGA *et al.*, 2007; MARRETA, 2001).

O dano que o periodonto apresenta num dado momento pode ser medido por uma sonda graduada em milímetros (sonda periodontal). Esse instrumento permite medir a profundidade do sulco gengival e o nível de inserção. Além disso, sítios que apresentam inflamação sangram no momento da sondagem, gerando um indicador de inflamação periodontal denominado sangramento à sondagem (BRAGA *et al.*, 2007).

A bolsa periodontal ou sulco, ocorre da perda dos tecidos de inserção periodontal. O nível de inserção periodontal é estabelecido clinicamente como a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e o fundo da bolsa. Uma vez

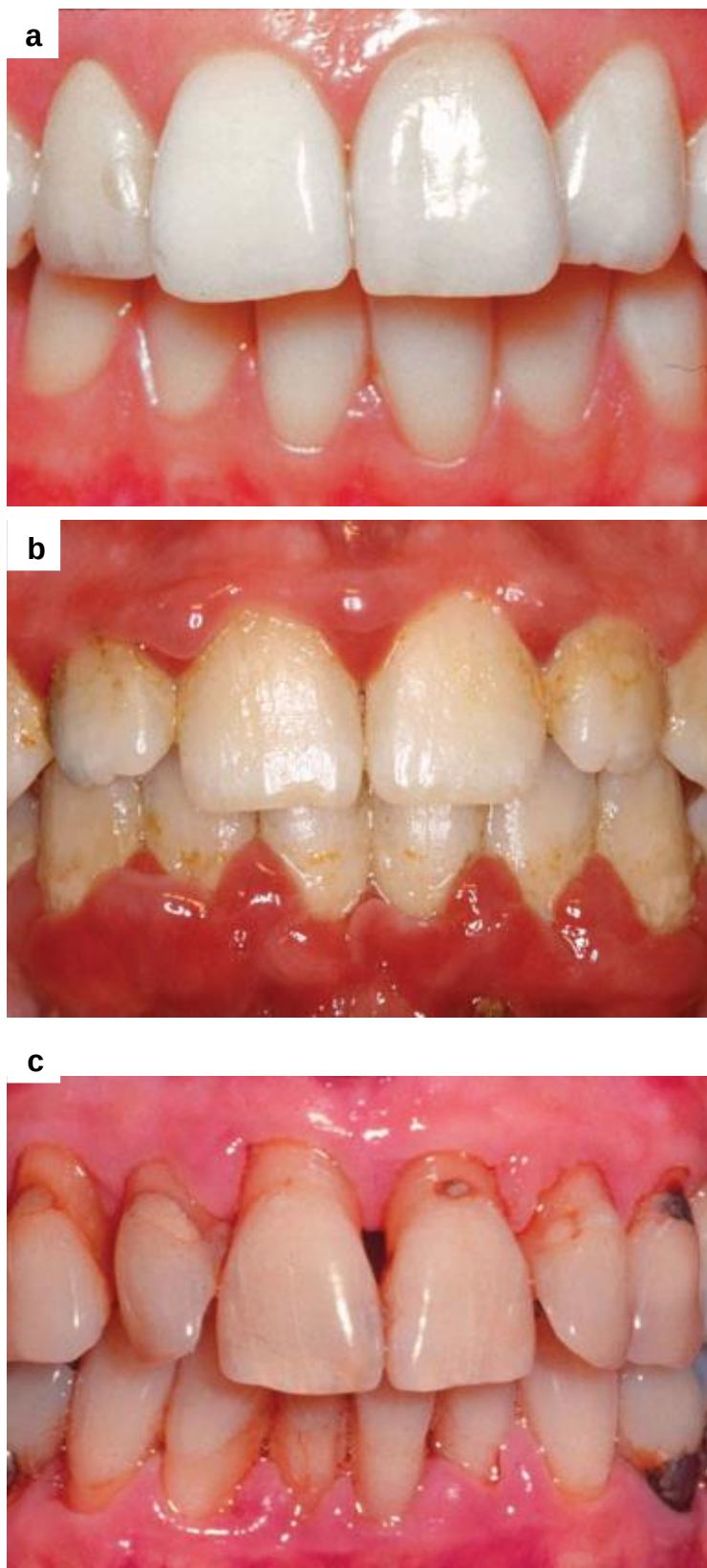
que a gengiva está inserida no dente no ponto da JCE, o nível de inserção clínica onde não ocorreu perda tecidual é zero (BRAGA *et al.*, 2007).

Se não houver interferência na formação continuada da placa bacteriana, pode desenvolver-se um quadro de periodontite em indivíduos suscetíveis. Essa progressão pode ser verificada na Figura 2. A periodontite consiste em uma inflamação mais profunda, com perda de apoio do dente e danos permanentes (BRAGA *et al.*, 2007; MARRETA, 2001).

Grandes quantidades de bactérias na junção do dente com a gengiva iniciam a doença periodontal. A retenção prolongada dessas bactérias resulta na mudança da microbiota predominante de bactérias aeróbias gram-positiva para bactérias com maior mobilidade anaeróbias gram-negativa, persistindo a inflamação e liberação de citosinas e enzimas que levam à destruição dos tecidos periodontais, ocorre o desencadeamento da doença periodontal (MARRETA, 2001; REIS *et al.*, 2011).

A periodontite é uma inflamação que vai além da gengiva, alcança o ligamento periodontal, tecido ósseo subjacente e o cimento radicular, levando à formação da bolsa periodontal por meio de um processo de perda de tecidos periodontais, conjuntivo e osso alveolar (BRAGA *et al.*, 2007; WIGGS *et al.*, 1998).

Figura 2. Ilustrações da progressão da doença periodontal a) gengiva saudável; b) gengivite grave (lesão estável); c) periodontite crônica (lesão progressiva)



Fonte: OHLRICH *et al.*, 2009.

2.2 REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA

A regeneração tecidual guiada (RTG) é a técnica mais utilizada no tratamento periodontal, visando separar as células dos tecidos epitelial e conjuntivo gengival com a superfície radicular nos estágios iniciais de regeneração do periodonto, pois elas não possuem a capacidade de regenerar os tecidos perdidos. Esse procedimento consiste na utilização de uma membrana de origem natural ou sintética que atua como uma barreira mecânica. A membrana é colocada internamente entre o retalho gengival e o defeito periodontal (Figura 3), permitindo que as células provenientes do ligamento periodontal repovoem e se proliferem na área da superfície radicular, pois são essas as células capazes de formar cemento e ligamento periodontal (DELIBERADOR *et al.*, 2008; TAKEISHI *et al.*, 2001).

Existe um grande número de membranas oclusivas no mercado atualmente. Estas se dividem em não reabsorvíveis e bioabsorvíveis. O politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) é o material utilizado para a fabricação das membranas não reabsorvíveis. No que diz respeito às membranas biodegradáveis, estas são fabricadas majoritariamente com poliésteres e seus copolímeros e colágeno (MARTINS, 2011).

Figura 3. Membrana polimérica suturada para tratamento de periodontite



Fonte: BALATA *et al.*, 2011.

As características físico-químicas das membranas devem promover uma junção estável do epitélio com o tecido conjuntivo e a membrana durante a cicatrização, para não interferir nos requisitos funcionais gerais do processo de regeneração (SCHENK *et al.*,1994).

2.2.1 Estado da Arte na utilização de membranas reabsorvíveis na RTG

Diferentes tipos de membranas utilizadas para a regeneração tecidual guiada (RTG) bioabsorvíveis e não reabsorvíveis foram testadas por Kasaj *et al.* (2008) com o propósito de avaliar os efeitos biológicos em culturas de fibroblastos primários gengivais humanos, fibroblastos de ligamentos periodontais e células humanas semelhantes a osteoblastos *in vitro*. Três membranas de colágeno disponíveis comercialmente e três de politetrafluoretileno (PTFE) não reabsorvíveis foram testados. Os resultados do estudo demonstraram que entre as membranas examinadas, as membranas bioabsorvíveis demonstraram ser mais adequadas para estimular a proliferação celular em comparação com as membranas de PTFE não reabsorvíveis. A desvantagem das membranas de PTFE é a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção.

O quadro 1 apresenta uma síntese dos principais resultados obtidos por alguns autores que estudaram a obtenção e/ou incorporação de membranas reabsorvíveis na técnica de RTG, fazendo uso de medicamentos ou incorporação nas membranas para a inibição de agentes antibacterianos.

Quadro 1. Estudos realizados por alguns autores na obtenção e/ou incorporação de membranas reabsorvíveis na técnica de RTG.

Autor	Título	Membrana	Medicamento Utilizado	Observações
ROBERT & FRANK, 1994	Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane	Foram testadas três membranas de poli(ácido DL-lático) (PLA 50) de alta massa molecular contendo 0, 10 e 30% de oligômero	<u>Cefalosporina</u> (adicionado à alimentação dos cães). Escovação com <u>clorhexidina</u>	Verificou-se que as membranas de PLA podem ser utilizadas como uma alternativa interessante para RTG em lesões periodontais avançadas.
CIRELLI <i>et al.</i> , 1997	Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs	Foi testado uma membrana de colágeno aniônico produzido com tendão bovino	Uso tópico de <u>benzetacil</u> e <u>clorhexidina</u>	O estudo avaliou a eficácia desta membrana na técnica RTG para o tratamento de bifurcação classe II em cães.
LIAO <i>et al.</i> , 2005	A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration	Foi desenvolvido uma membrana com tripla camada de PLGA/colágeno mineralizado/ <u>nanohidroxiapatita</u>	Não foi utilizado	A membrana desenvolvida possui três camadas, uma apenas com PLGA, as outras duas com PLGA e concentrações diferentes de colágeno mineralizado e <u>nanohidroxiapatita (nCHAC)</u> para estimulação do crescimento ósseo
HORBYLON, 2008	Estudo <i>in vitro</i> da cinética de <u>desorção</u> de <u>doxiciclina</u> e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local	Foram avaliadas duas membranas de colágeno (produzido a partir do osso bovino), uma impregnada com <u>doxiciclina</u> e outra com tetraciclina	<u>Doxiciclina</u> e tetraciclina (incorporados nas membranas de colágeno)	As membranas de colágeno foram utilizadas como dispositivos de liberação local medicamentosa na terapia periodontal.
MARTINS, 2011	Membranas compósitas de <u>policaprolactona/hidroxiapatite</u> para aplicação <u>estomatológica</u>	Foram produzidas membranas contendo <u>policaprolactona</u> e <u>hidroxiapatita</u>	Não foi utilizado	Foram produzidos quatro tipos de membranas compósitas incorporando diferentes percentagens do <u>biocerâmico</u> em relação ao <u>biopolímero</u> desde 0 até 30%
REIS <i>et al.</i> , 2012	Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, <u>osteocondutoras</u> e reabsorvíveis de <u>polihidroxibutirato</u> e <u>hidroxiapatita</u> para regeneração periodontal	Foram fabricadas membranas de <u>polihidroxibutirato (PHB)</u> e <u>hidroxiapatita (HAP)</u>	Não foi utilizado	A <u>hidroxiapatita (HAP)</u> e o <u>polihidroxibutirato (PHB)</u> , foram utilizados para fabricar membranas rígidas para RTG, contendo 25, 35 ou 50% de HAP em matriz de PHB pelo método de moldagem por injeção.

Três tipos de membranas de poli(ácido DL-láctico) (PDLLA) de alta massa molecular contendo 0, 10 e 30% de oligômeros foram estudadas sem adição de medicamento à mesma. O propósito do estudo foi avaliar a eficácia das membranas para a RTG em cães adultos da raça Beagle. No estudo *in vivo*, cefalosporina (antibiótico) foi adicionado à alimentação dos cães, além de escovação com clorexidina (antibacteriano). As membranas foram bem toleradas e envolvidas por um tecido conjuntivo fibroso, desprovido de células inflamatórias. Foi observado no estudo que todas as membranas promoveram regeneração dos tecidos periodontais e apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle em relação à adesão epitelial, regeneração do osso alveolar, adesão do tecido conectivo e neoformação de cemento. Os autores concluíram que as membranas de PLA podem ser utilizadas como uma alternativa interessante para RTG em lesões periodontais avançadas em humanos (ROBERT & FRANK, 1994).

Cirelli *et al.* (1997) desenvolveram uma membrana de colágeno aniônico a partir do colágeno encontrado em tendões bovinos e testaram a eficácia da membrana na técnica de RTG no tratamento em cães sem adição de medicamento à mesma. As membranas desenvolvidas possuem propriedades dielétricas melhoradas em relação aos materiais semelhantes de colágeno nativo. As membranas foram reticuladas com glutaraldeído, que permite um maior tempo de reabsorção. Esta característica, além da propriedade aniônica, dá boas condições para a regeneração periodontal. Foi administrado aos cães benzetacil (antibiótico) por 3 dias e solução de clorexidina. Com base nos dados obtidos, os autores observaram que a membrana de colágeno utilizada no estudo proporcionou um bloqueio eficaz do tecido epitelial e promoveu a regeneração dos tecidos periodontais, em associação com uma baixa resposta inflamatória e biodegradabilidade controlada.

Foi confeccionado uma membrana com três camadas constituída por poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)/colágeno mineralizado/nanohidroxiapatita (nHAP). A ideia deste estudo foi o desenvolvimento de uma membrana com um lado poroso e outro denso, apresentando boa flexibilidade, alta resistência mecânica, fácil manipulação, excelente biocompatibilidade e biorreabsorção controlável. A membrana biocompósita foi testada *in vitro* em células osteoblásticas. Os autores concluem que o material é promissor para RTG, além

de oferecer um *design* melhorado para aplicações de dispositivos médicos (LIAO *et al.*, 2005).

Horbylon (2008) preparou duas membranas de colágeno (produzido a partir do osso bovino) impregnadas com antibiótico, sendo uma com doxiciclina e outra com tetraciclina e analisou *in vitro* a cinética de desorção dos antibióticos. Foram construídas curvas de calibração para a doxiciclina e para a tetraciclina (fármacos liberados versus tempo). Os resultados demonstraram que os fármacos foram liberados por 48 h, sendo observada maior velocidade de desorção nas primeiras 4 horas, mostrando-se suficientes para inibir a ação dos patógenos periodontais.

Martins (2011) produziu uma membrana oclusiva biodegradável por meio da eletrofiação de soluções contendo policaprolactona e hidroxiapatita (HAP) para uso em RTG. Foram produzidos quatro tipos de membranas biocompósitas incorporando diferentes concentrações do biocerâmico (hidroxiapatita) em relação ao biopolímero (0, 10, 20 e 30%). As membranas foram caracterizadas por ensaios de tração, medição de ângulos de contato, MEV, testes de degradação, de bioatividade, de citotoxicidade e de adesão celular. Os resultados obtidos pelos ensaios demonstraram que as membranas possuem grande potencial para aplicação na técnica de RTG.

A HAP e o polihidroxibutirato (PHB), foram utilizados por Reis *et al.* (2012) para fabricar membranas rígidas para RTG, contendo 25, 35 ou 50% de HAP em matriz de PHB pelo método de moldagem por injeção. As membranas apresentaram alta cristalinidade e característica rígida capaz de manter sua forma, prevenindo seu colapso para dentro do defeito e mantendo o espaço para o coágulo, além de uma superfície interna de topografia complexa para promover maior adesão de fibrina, plaquetas e células progenitoras, favorecendo a manutenção do volume do coágulo sanguíneo, e a formação de novos tecidos.

Neste contexto, pela leitura dos artigos supracitados, percebe-se que houve uma evolução clara na estratégia para o desenvolvimento de membranas para RTG. As primeiras membranas eram de polímeros não reabsorvíveis (PTFE) sem adição de nenhum medicamento às mesmas. Num segundo momento as membranas foram substituídas por polímeros bioreabsorvíveis (colágeno, PLA e seus copolímeros), sendo administrado por via oral antibióticos e antibacterianos. Já num terceiro momento, percebe-se a estratégia de

incorporação de biocerâmicos (HAP) à membrana além do polímero bioreabsorvível formando materiais biocompósitos, bem como a adição de medicamentos. Nesse sentido, não foi encontrado na literatura nenhum estudo de membranas para RTG com adição de NpAg e NpZnO como agentes antibacterianos, evidenciando a inovação deste trabalho.

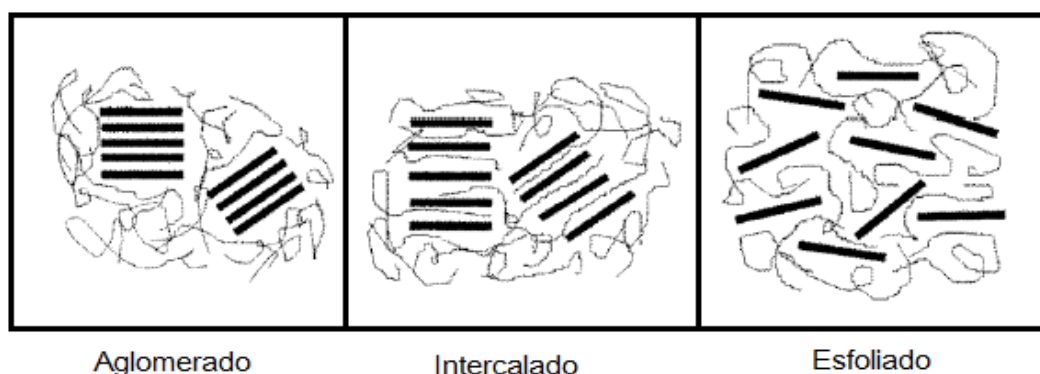
2.3 NANOCOMPÓSITOS

Um compósito pode ser considerado qualquer material formulado pela combinação de dois ou mais constituintes (multifásico), que exhibe uma proporção significativa das propriedades das fases que o constituem, de modo que é obtida uma melhor combinação de propriedades (CALLISTER, 2007).

Do mesmo modo como acontece nos compósitos tradicionais, nos nanocompósitos um dos componentes serve de matriz, na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas. Os nanocompósitos diferem dos compósitos tradicionais por possuírem a fase dispersa com dimensões nanométricas (ESTEVES *et al.*, 2004).

As propriedades dos nanocompósitos são influenciadas pela forma que o nanoreforço está disperso na matriz polimérica. Podem haver três formas básicas que definem a estrutura de um nanocompósito: o nanoreforço pode estar no estado aglomerado, sendo este semelhante a um compósito convencional; o nanoreforço pode estar intercalado por cadeias poliméricas com ordem estrutural, atribuindo ao nanocompósito propriedades superiores às encontradas em um compósito convencional; e o nanoreforço pode estar ainda na forma esfoliada, no qual as camadas estruturais estão totalmente desorientadas na matriz, aumentando as interações matriz-nanoreforço, levando a significativas melhorias em algumas propriedades do nanocompósito (GUIMARÃES *et al.*, 2006). Essas estruturas estão demonstradas na Figura 4.

Figura 4. Representação da estrutura de nanoreforço disperso em matriz polimérica.



Fonte: Adaptado GUIMARÃES *et al.*, 2006.

O elevado aumento das propriedades físicas nos nanocompósitos está relacionado à elevada área superficial dos nanoreforços. Quando dispersos em matrizes poliméricas promovem alterações nas propriedades da matriz associadas à interação química entre os nanoreforços e o polímero. Estas interações podem interferir na dinâmica molecular do polímero, obtendo-se alterações significativas em suas propriedades físicas, no seu comportamento térmico e mecânico (ESTEVES *et al.*, 2004). As interações interfaciais variam de acordo com o tipo de polímero, tipo de nanopartícula e com o método de síntese utilizado (BRAGANÇA, 2008).

2.4 AGENTES ANTIBACTERIANOS NANOESTRUTURADOS

A funcionalização de membranas biopoliméricas com agentes antibacterianos nanoestruturados têm atraído muita atenção, pois apresentam elevada atividade/eficiência devido à grande área de superfície em relação ao volume. Dentre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata (NpAg) e de óxido de zinco (NpZnO) se destacam devido ao seu potencial como agente antibacteriano. São amplamente utilizadas em muitos campos biológicos e áreas médicas, como biossensores, cicatrização de feridas e tratamento de queimaduras (KRISHNAN *et al.*, 2015; MOTSHEKGA *et al.*, 2013).

Nanopartículas de prata em baixas concentrações não são tóxicas para o corpo humano e possuem um largo espectro contra uma variedade de bactérias resistentes a antibióticos, o que as tornam atrativas em aplicações farmacêuticas e dispositivos médicos que podem ajudar a prevenir a transmissão de agentes

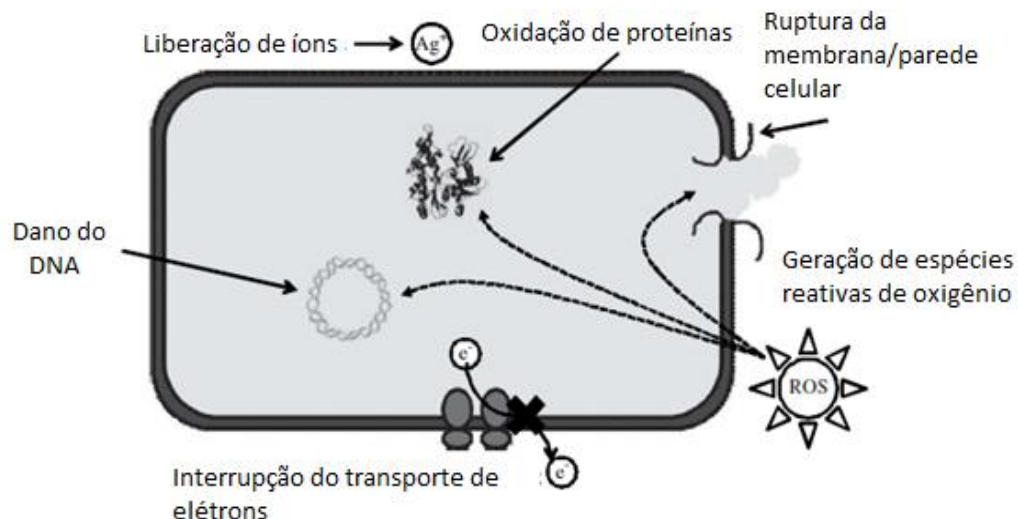
patogênicos resistentes aos medicamentos em ambientes clínicos diferentes. O mecanismo de ação bactericida destas nanopartículas metálicas é diferente dos mecanismos de ação dos antibióticos, não permitindo o desenvolvimento de resistência bacteriana (LARA *et al.*, 2011; SIMCHI, 2011; CHAKRABORTI, 2014).

A capacidade antibacteriana do zinco é expressiva quando seu tamanho de partícula é diminuído. Em escala nano o ZnO pode interagir com a superfície da célula bacteriana e/ou com o núcleo no interior da célula, apresentando mecanismos bactericidas distintos. As interações entre as partículas e as bactérias são principalmente tóxicas, propriedade esta que tem sido explorada para uma série de aplicações bactericidas, inclusive no desenvolvimento de embalagens funcionais na indústria de alimentos para aumento do tempo de prateleira de seus produtos (SIRELKHATIM *et al.*, 2015).

Os compostos de ZnO têm sido estudados há décadas. Além de propriedades físicas específicas, algumas das vantagens do ZnO são a grande disponibilidade, baixo custo de produção e baixa toxicidade. Com o seu intervalo de banda correspondente à luz UV de 365 nm, ZnO é transparente ao longo do espectro visível. Sob condições normais, cristaliza-se na estrutura de wurtzite hexagonal. Em aplicações industriais convencionais, ZnO é utilizado na fabricação em grande escala de produtos cosméticos, plásticos, aditivos alimentares, além de outras. Nos últimos anos, o interesse científico em ZnO foi renovada porque além do processamento ter melhorado a compreensão teórica de novas aplicações, por exemplo, em optoeletrônica, spintrônica, e nanotecnologia, aumentou significativamente o desenvolvimento de pesquisas (ERBETTA, 2001).

Li *et al.* (2008), descreveram em seus estudos a ação antimicrobiana das nanopartículas de quitosana, Ag, TiO₂, ZnO, fulereno e nanotubos de carbono. As nanopartículas interagem com células microbianas por meio de vários mecanismos. Elas podem interagir diretamente com as células microbianas e interromper a transferência de elétrons, romper/penetrar o envelope celular ou componentes de células oxidantes, ou ainda, produzir produtos secundários que causam danos, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS). Os principais mecanismos antimicrobianos relatados estão resumidos na Figura 5.

Figura 5. Mecanismos de atividades antimicrobianas exercidas por nanomateriais.



Fonte: LI *et al.*, 2008.

O mecanismo de ação inibitória de íons de prata em micro-organismos é parcialmente conhecido. Estudos apontam que os íons de prata interagem com grupos tiol em proteínas, estes íons de prata monovalentes (Ag^+) substituem os íons H^+ dos grupos sulfidrilo ou tiol, inativando a proteína, diminuindo a permeabilidade da membrana, levando à produção de ROS e eventualmente causando a morte celular (MATSUMURA *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008; BARUD *et al.*, 2008). Foi também demonstrado que os íons Ag^+ impedem a replicação do DNA e afetam a estrutura e a permeabilidade da membrana celular (Feng *et al.*, 2000).

O mecanismo das nanopartículas de ZnO é devido à sua atividade única de ruptura bacteriana fotocatalítica, e em parte devido à dissolução de íons Zn^{2+} . O mecanismo de desinfecção fotocatalítica das NpZnO depende da separação foto-gerada de elétrons e buracos sob irradiação, o que pode, portanto, produzir ROS para atacar as células bacterianas, resultando em danos celulares, apoptose e até mesmo a morte celular (BAI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014).

2.5 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

As propriedades de superfície são de suma importância para o desenvolvimento de tecnologias com nanopartículas. Com isso, os materiais nanocompósitos orgânicos/inorgânicos que passam pelo processo de

modificação de superfície vêm ganhando destaque cada vez maior. A modificação de superfície pode alterar as propriedades de nanopartículas hidrofílicas para hidrofóbicas, melhorar a adesão, a compatibilidade e a interface entre nanopartículas inorgânicas e materiais orgânicos, melhorar a capacidade de dispersão e evitar agregação das nanopartículas causada pela elevada energia superficial e forças de atração das partículas (TANG *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2011 a).

As nanopartículas inorgânicas convencionais têm polaridade superficial elevada. Em meio orgânico, por consequência, exibem estabilidade extremamente baixa, levando a separação de fases. Para realizar a dispersão de compostos inorgânicos hidrofóbicos em matrizes poliméricas lipofílicas, deve haver uma compatibilidade interfacial entre esses compostos, essa afinidade pode ser obtida por tratamento de superfície dos materiais inorgânicos. Por esta razão, é muito importante a realização de modificação da superfície de nanopartículas de zinco para ampliar a aplicação de tais materiais (TANG *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2011 b), utilizou a técnica de modificação de superfície de nanofios de ZnO para a dispersão em meio orgânico e aquoso. Como solvente orgânico foi utilizado clorofórmio, sendo que a modificação de superfície foi realizada com a adição de 1-dodecanotiol (DDT). Já para dispersão em meio aquoso foi utilizado ácido 11-mercaptoundecanóico. Os nanofios foram caracterizados por UV visível, FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM). Para avaliar a superfície modificada foi utilizado a técnica de FTIR.

Chen *et al.* (2015) realizou em seu trabalho uma transferência de fase utilizando 1-dodecanotiol (DDT), objetivando encontrar uma alternativa atraente para a extração de metais nobres a partir de água, solo, ou placas de circuito impresso de resíduos. Foram extraídos íons de metais nobres de uma fase aquosa para um meio orgânico não polar, com resultados altamente eficientes. Este método envolve a mistura de uma solução aquosa de íons de metais nobres com uma solução etanólica de DDT, extraindo os compostos de coordenação formados entre os íons de metal e o DDT em diclorometano. A interação entre o DDT e os íons de metais nobres foi confirmada por espectros de FTIR utilizando a técnica de grânulo de KBr.

2.6 BIOMATERIAIS

Os biomateriais poliméricos são caracterizados por serem capazes de serem metabolizados e eliminados do organismo, por seus produtos de degradação serem atóxicos, por não causarem reações tóxicas ou resposta inflamatória no local de aplicação, pelo tempo de degradação compatível com o processo de regeneração ou cicatrização e por apresentarem propriedades mecânicas e permeabilidade adequadas à aplicação desejada (SANTOS, 2007).

Os polímeros de origem sintética e os de origem natural têm sido amplamente estudados como biomateriais (NAIR e LAURENCIN, 2007). O termo "degradável" foi aplicado aos polímeros que se desintegram por inúmeros processos, incluindo a desintegração física, a biodegradação por mecanismos biológicos, e de reação química às unidades de monômero. A biodegradação envolve dois processos complementares, degradação e erosão. A degradação refere-se à clivagem hidrolítica da ligação de modo a formar produtos solúveis em água que podem dissolver num meio aquoso, sendo considerado um fenômeno químico, o que resulta na erosão do polímero que refere-se ao esgotamento de material abrangendo fenômenos físicos, tais como a dissolução e difusão (TAMADA e LANGER, 1993).

Os polímeros naturais foram os primeiros biomateriais utilizados clinicamente, alguns exemplos desses materiais são o colágeno, a gelatina e as albuminas bovina e humana. Os polímeros sintéticos são normalmente biologicamente inertes, apresentando propriedades mais previsíveis e possuem maior uniformidade. As poliamidas, os poliaminoácidos, os polialquilcianacrilatos, os poliésteres, os poliuretanos e as poliacrilamidas são alguns dos representantes dos polímeros sintéticos (SANTOS, 2007).

Os polímeros a base de ácido láctico e ácido glicólico receberam grande atenção no campo de aplicações médicas no passado, pois estes poliésteres degradam no corpo por uma simples hidrólise e além da sua biocompatibilidade, liberam compostos não-tóxicos e não prejudiciais. Os produtos de degradação ou são excretados pelos rins ou finalmente eliminado como água e dióxido de carbono por meio das vias bioquímicas conhecidas (BENDIX, 1998; SANTOS, 2007).

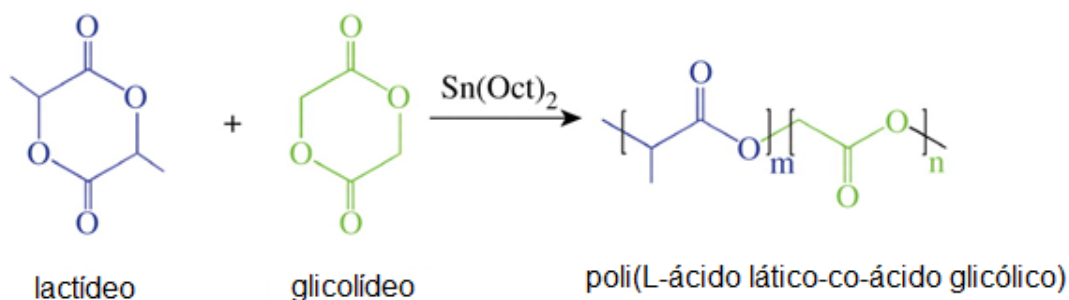
Além das suturas, os polímeros são utilizados como materiais de partida na produção de dispositivos medicinais implantáveis, como em aplicações ortopédicas (parafusos, pinos) e aplicações dentárias (membranas) que apresentam um grande campo de crescimento (BENDIX, 1998).

2.7 PLGA

O poli(L- ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, é um copolímero derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA). Os derivados desses ácidos foram empregados como material de fios de sutura na década de 1960, desde então, outros poliésteres alifáticos foram desenvolvidos como polímeros biodegradáveis e também despertam atenção devido à biocompatibilidade, aos perfis de degradação controláveis que apresentam e às suas propriedades mecânicas, especialmente dureza e fácil processabilidade (SANTOS, 2007; PAN e DING, 2012).

O PLGA é um poliéster relativamente hidrofóbico, instável em condições úmidas, biodegradável e seus subprodutos são atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água), além de ser produzido a partir de recursos renováveis e facilmente encontrados (SOARES *et al.*, 2005). Pode ser produzido a partir de vias de polimerização dependendo da unidade monomérica e a partir da copolimerização pela abertura do anel de lactídeo e glicolídeo (SANTOS, 2007; PAN e DING, 2012). A Figura 6 demonstra a reação de formação do PLGA pela abertura dos anéis.

Figura 6. Síntese de PLGA a partir da abertura dos anéis dos monômeros de lactídeo e glicolídeo.



Fonte: PAN e DING, 2012.

O lactídeo pode ser formado pela condensação de ácidos L-láctico ou ácidos D-láctico ou uma mistura dos dois (configurações D- e L-). O D, L-lactideo é utilizado com maior frequência do que o L, L-lactídeo, devido ao fato de que os materiais correspondentes são mais resistentes e as taxas de degradação são facilmente controladas por um polímero amorfo (PAN e DING, 2012).

Houve muito progresso em pesquisas na última década referentes ao PLGA, assim como suas aplicações médicas devido às suas amplas aplicações e as exigências específicas de matrizes porosas em medicina regenerativa, o que estimula a pesquisa, investigação e design de outros materiais biodegradáveis para diversas aplicações (PAN e DING, 2012).

O grande interesse nos copolímeros de PLGA vem do fato de que suas propriedades mecânicas e tempo de degradação podem ser controlados através da relação que se emprega dos monômeros. Por exemplo, o PLLA apresenta uma elevada cristalinidade e a presença do monômero glicolídeo na cadeia do polímero faz com que ocorra um abaixamento significativo neste grau de cristalinidade, tornando até o material completamente amorfo, como por exemplo, na relação lactídeo/glicolídeo 50/50 (MOTTA, 2002).

2.8 UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Ag E ZnO EM MATERIAIS POLIMÉRICOS

O quadro 2 apresenta estudos referente a incorporação de NpAg ou NpZnO em materiais poliméricos.

Quadro 2. Estudos realizados por alguns autores na incorporação de NpAg ou NpZnO em materiais poliméricos

Autor	Título	Partícula utilizada
ZHANG <i>et al.</i> , 2011	Surface modification of zinc oxide nanorods for potential applications in organic materials	ZnO
GIBELLI, 2012	Ação Antibacteriana de Nanopartículas de Prata em Poli (ácido láctico) – PLA e a avaliação da Biodegradação	Ag
MELLO, 2013	Nanocompósitos de prata - preparação e liberação catiônica	Ag
STANKOVIC <i>et al.</i> , 2016	PLGA/Nano-ZnO Composite Particles for Use in Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity	ZnO
BOJARSKA <i>et al.</i> , 2017	Growth of ZnO nanowires on polypropylene membranesurface - Characterization and reactivity	ZnO

Nanofios de ZnO sofreram modificação de superfície, deixando de ser um material hidrofílico passando a ser hidrofóbico, utilizando para isso, o agente de acoplamento de titanato NDZ-311w, que foi selecionado não só por causa do bom efeito de modificação lipofílica, mas também por seus grupos multifuncionais, podendo desempenhar um papel crucial em compósitos adicionais com materiais orgânicos. Os autores concluíram que o agente de acoplamento NDZ-311w titanato não só tem bom efeito hidrofóbico, mas também tornam os nanofios de ZnO mais facilmente vinculados com materiais orgânicos, além de apresentarem boa dispersão. Os autores evidenciaram também, que o agente de acoplamento estava ligada de forma covalente à superfície dos nanofio de ZnO (ZHANG *et al.*, 2011 a).

Foram avaliados a ação antibacteriana, biodegradante e a inibitória na formação de biofilmes sobre PLA modificado com nanopartículas de prata em diversas concentrações. Os materiais foram processados em extrusora dupla-rosca e posteriormente injetados. Para a avaliação antibacteriana foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O autor concluiu que a análise do composto apresentou boa distribuição e má dispersão, que pode ter influenciado na atividade antibacteriana que apresentou diminuição da atividade apenas para *Escherichia coli* (GIBELLI, 2012).

Foi preparado por Melo (2013), um material polimérico de poli(metil metacrilato) (PMMA) incorporado com nanopartículas de prata. O estudo objetivou preparar e caracterizar o material desenvolvido, posteriormente avaliou-se a liberação da prata iônica para o meio. O autor obteve nanopartículas de prata com um revestimento orgânico, que foram caracterizadas por vários métodos. Posteriormente, as nanopartículas foram misturadas com o polímero, dissolvendo ambos em tolueno com agitação vigorosa, para a preparação dos nanocompósitos. Nesta mistura foram utilizadas diferentes porcentagens de nanopartículas de prata no polímero de forma a estudar a influência da quantidade de nanopartículas na liberação iônica. Melo concluiu que os fatores limitantes da liberação de íons de prata para o meio podem ser a existência de revestimento orgânico e a temperatura exercida (MELO, 2013).

Stankovic *et al.* (2016) desenvolveram esferas de nanocompósitos de PLGA e nano-ZnO (PLGA/nano-ZnO). No estudo, foram avaliados a influência de diferentes solventes, bem como o método de secagem sobre a morfologia de

PLGA/nano-ZnO. Além disso, foi avaliado o potencial citotóxico *in vitro* do material utilizando células HepG2 e a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram negativas e leveduras *Candida albicans*. Os ensaios indicaram que há boa biocompatibilidade do PLGA/nano-ZnO e demonstraram que existe inibição da atividade microbiana. Os autores concluíram que as nanopartículas de PLGA/nano-ZnO são candidatas promissoras para aplicações em campo biomédico.

Bojarska *et al.* (2017), desenvolveram uma membrana de PP e nanofios de ZnO. A membrana foi primeiramente modificada com plasma para posteriormente incorporação dos nanofios de ZnO por meio de método químico de deposição de banho. Os autores avaliaram as propriedades fotocatalíticas e antibacterianas das membranas (utilizando bactérias gram-positivas e negativas). Os autores concluíram que as membranas modificadas exibem propriedades fotocatalíticas e antibacterianas contra bactérias gram-positivas e negativas. O uso de plasma, como passo inicial de modificação, melhorou a deposição de nanofios de óxido de zinco na superfície da membrana, aumentando suas propriedades antibacterianas.

Por meio dos estudos pesquisados, pode-se observar que em um primeiro momento, houve a preocupação em modificar a superfície do ZnO para torná-lo um material mais hidrofóbico e assim, incorporá-lo em materiais orgânicos. Ao mesmo tempo que a NpAg foi incorporada em um material polimérico e sua atividade antibacteriana foi avaliada.

Em um segundo momento, percebe-se que a incorporação de NpAg em materiais poliméricos, despertam outros interesses além da atividade bacteriana e incorporação em matriz polimérica, como a liberação de íons para o meio. Já as NpZnO são incorporadas em materiais poliméricos e sua atividade antibacteriana é avaliada, por fim, são avaliados a modificação da NpZnO além da incorporação em materiais orgânicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Para a realização deste trabalho as NpAg utilizadas foram sintetizadas conforme o procedimento descrito por Nogueira *et al.* (2014) e as NpZnO foram fornecidas pela empresa Cristal Master.

Como solvente utilizou-se clorofórmio P.A.

Para a realização da síntese das NpAg foram utilizados: nitrato de prata (AgNO_3) (marca Cennabras, grau de pureza > 99 %), citrato de sódio (marca Dinâmica, grau de pureza > 99 %), borohidreto de sódio (NaBH_4) (marca Cinética, grau de pureza > 98 %) e oleilamina (marca Sigma- Aldrich).

O polímero utilizado foi o PLGA 80/20 (80 % ácido láctico e 20 % ácido glicólico), fornecido pelo Laboratório de Biomateriais da PUC-SP em dois lotes, sintetizado pelo procedimento descrito por Motta (2002). O primeiro lote foi usado para preparação das membranas contendo NpAg, enquanto o segundo lote foi usado para as membranas contendo NpZnO.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE PLGA

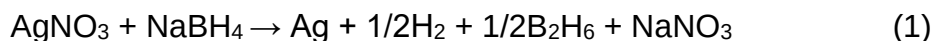
3.2.1. Ressonância Magnética Nuclear ($\text{RMN-}^1\text{H}$)

Os espectros de $\text{RMN } ^1\text{H}$ foram obtidos num espectrômetro Bruker AVANCE 400 MHz. Todos os espectros de ^1H foram realizados em CDCl_3 e os desvios químicos foram dados em ppm relacionados com o tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para realizar a síntese das NpAg, seguiu-se a metodologia proposta por Nogueira *et al.* (2014). As reações foram conduzidas em um reator de vidro borossilicato com capacidade de 125 mL mantido sob agitação magnética (1000 rpm) e com temperatura controlada a 20 °C por meio de banho termocriostático.

Foram adicionados ao reator 90 mL de água deionizada, nitrato de prata (AgNO_3) e citrato de sódio. A concentração do citrato de sódio usada nas sínteses foi 15 mmol/L. O nitrato de prata foi usado como sal precursor das nanopartículas e o citrato de sódio como estabilizante da dispersão de prata coloidal. Após cerca de 5 minutos para homogeneização e mistura destes dois componentes, 10 mL de uma solução aquosa de borohidreto de sódio (NaBH_4), mantida em banho de gelo, foi dosada ao meio reacional por meio de uma bureta graduada com uma vazão volumétrica de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Ao término da dosagem de NaBH_4 o meio reacional foi mantido sob agitação por mais 10 min, totalizando em 20 min o tempo de ciclo da batelada. De acordo com estes experimentos a reação (1) descrita a seguir representa a reação química do processo.

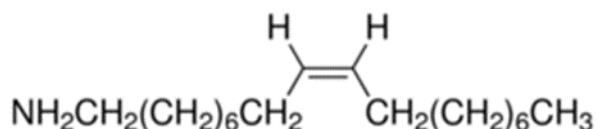


Fonte: SOLOMON *et al.*, (2007)

A proporção estequiométrica entre o AgNO_3 e o NaBH_4 foi de 1,0:0,5 em base molar.

As nanopartículas de prata, produzidas em meio aquoso, foram transferidas para o clorofórmio, por ser um meio orgânico capaz de solubilizar o PLGA. Uma amina graxa (oleilamina) foi usada como agente de transferência de fases devido sua habilidade em capturar as nanopartículas de prata de um meio aquoso através do grupo funcional polar amina e, via ligações de coordenação, transportá-las para uma fase orgânica em função da sua longa cadeia hidrocarbônica linear. Na Figura 7 é mostrada a estrutura molecular da oleilamina.

Figura 7. Estrutura química da oleilamina.



Para a transferência das NpAg da fase aquosa para a orgânica, 0,75 mL de oleilamina foram solubilizados em 75 mL de clorofórmio. O clorofórmio, contendo a oleilamina devidamente misturada, foi adicionado a 75 mL da

dispersão aquosa de NpAg, produzidas e estabilizadas com citrato de sódio. O sistema foi mantido em agitação magnética (500 rpm) durante 30 min e, em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação para coletar a fase orgânica contendo as nanopartículas de prata.

3.4. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DAS NpZnO

Foram realizados 6 experimentos para avaliar a modificação de superfície das NpZnO, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos experimentos realizados para modificação das NpZnO.

EXPERIMENTO	NpZnO não secas	NpZnO secas (g)	* DDT (mL)	Álcool etílico 96% (mL)
E1	0,3057 g	----	1,0	50,0
E2	-----	0,3025	1,0	50,0
E3	-----	0,2000	0,2104	15,0
E4	0,2000 g	-----	0,2371	15,0
E5	20 mg	----	50,0	----
E6	20 mg	----	19,2	20

* DDT = 1-dodecanotiol

Os experimentos E1, E2, E3 e E4 foram realizados em meio alcoólico seguindo a metodologia descrita por Zhang *et al.* (2011 b) e utilizando NpZnO submetidas ou não a secagem com intuito de avaliar a influência desse fator na modificação. Todos os componentes (NpZnO, 1-dodecanotiol (DDT) e álcool etílico 96%) foram adicionados nas quantidades descritas na Tabela 2, em um frasco de Duran de 50 mL e mantidos sob agitação magnética por 24 h. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 min, lavadas 3 vezes com álcool etílico e então as nanopartículas modificadas foram filtradas a vácuo e secas em estufa por 1 h a 80 °C (ZHANG *et al.*, 2011 b).

O experimento E5 seguiu a metodologia descrita por Wagner *et al.* (2014). 20 mg de NpZnO e 50 mL DDT foram misturadas em um frasco de Duran de 50 mL e mantidas sob agitação magnética por 24 h. Os produtos resultantes foram

isolados por centrifugação a 3500 rpm por 10 min e lavados três vezes com clorofórmio para remover o excesso de ligantes livres.

Já o experimento E6 foi realizado em meio alcoólico com sonificação, seguindo a metodologia descrita por Singh e Whitten (2009). Em um frasco de Duran de 50 mL, as nanopartículas foram suspensas em 95% de etanol e 5% de H₂O e mantidas sob agitação magnética por 3 min. Posteriormente, a dispersão foi sonificada em banho de ultra-som (Thornton) por 30 min, em seguida, foi adicionado o DDT e a mistura foi sonificada durante 5 min. A solução foi então agitada (magneticamente) durante 1 h. Os produtos resultantes foram isolados por filtração a vácuo, lavados três vezes com 100% de etanol, secos a 110° C durante 10 min, e armazenados à temperatura ambiente num dessecador.

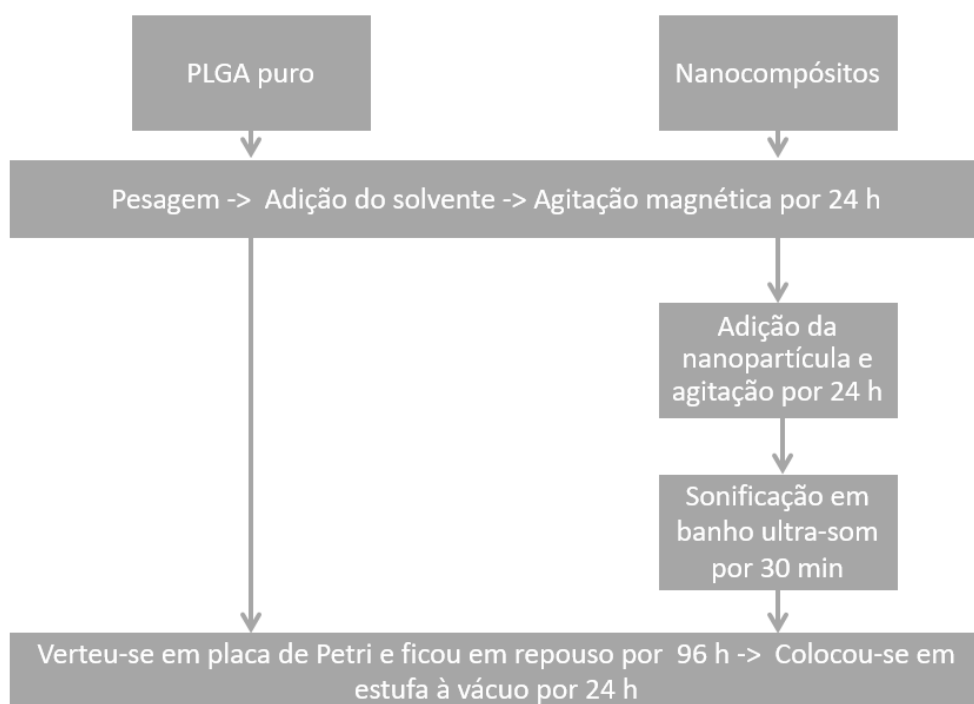
Para avaliar se houve modificação na superfície das NpZnO, as amostras foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em um equipamento da Perkin-Elmer Spectrum (Laboratório de Caracterização de Materiais/Univille) de 4000 a 450 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr.

3.5. PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

O PLGA, foi inicialmente dissolvido em clorofórmio, sob agitação magnética por 24 h. Posteriormente, foram adicionadas as NpAg nas concentrações aproximadas de 5; 7; 8 e 10 ppm formando soluções 3 % (m/v). A solução foi submetida à sonificação em banho de ultrassom por 30 min e vertida em placas de Petri. As amostras foram tampadas e mantidas em capela de exaustão de gases, a temperatura ambiente, por 96 h para secagem lenta do solvente e formação das membranas. Após a evaporação do solvente, as membranas foram secas em estufa a vácuo a 30 °C por 24 h e armazenadas em dessecador (MAZUR, 2012).

O processo de preparação das NpZnO seguiu o mesmo mencionado para os nanocompósitos de NpAg, divergindo apenas nas concentrações utilizadas (10; 50; 100 e 150 ppm) devido a atividade bactericida do ZnO ser menor quando comparado à prata. O esquema do processo de preparação dos nanocompósitos pode ser verificado na Figura 8.

Figura 8. Esquema do processo de preparação dos nanocompósitos.



3.6. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.6.1. Espectrofotometria de UV-Visível

Para que as NpAg pudessem ser analisadas por espectrofotometria de UV-Vis, as amostras de NpAg em meio aquoso e meio orgânico foram diluídas na proporção de 0,5 mL de amostra para 3,5 mL de diluente. Para analisar as nanopartículas em meio aquoso, o diluente utilizado foi a água deionizada e para as nanopartículas em fase orgânica foi o clorofórmio. As diluições foram vertidas em uma cubeta de vidro para que fossem analisadas em espectrofotômetro na região do ultravioleta visível (SCHIMADZU, UVPC-V.3.9). Espectros de absorbância de luz na região ultravioleta foram obtidos devido às propriedades ópticas referentes à ressonância do plasmon de superfície das nanopartículas de prata. A lei de Lambert-Beer explica a relação exponencial entre a transmissão de luz através de uma substância e a concentração da mesma, assim como, entre a transmissão e o comprimento do corpo que a luz atravessa. Como as propriedades ópticas são diretamente dependentes das características geométricas e de tamanho das nanopartículas, é possível estabelecer uma

relação entre as propriedades ópticas e morfológicas das nanopartículas mediante as análises de UV-Vis (NOGUEIRA *et al.*, 2014).

3.6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de MET foram realizadas para se avaliar o tamanho médio, bem como a distribuição de tamanhos e a forma geométrica das nanopartículas sintetizadas. Para a realização das análises, foram pingadas 10 gotas das dispersões de nanopartículas de prata em fase aquosa e orgânica em *grids* de cobre com malha de 300 mesh, recobertos por carbono. Após secagem em temperatura ambiente, os *grids* foram inseridos no microscópio (JEOL, JEM-2100) e as imagens foram capturadas utilizando-se uma voltagem de 200 kV.

3.6.3. Espectroscopia de absorção atômica

A concentração de NpAg no clorofórmio foi determinada por espectroscopia de absorção atômica – AAS (Perkin Elmer, PinAAcle 900 T), pela técnica da chama.

Para realização da análise, 10 mL de NpAg em clorofórmio foram pipetadas em um béquer, e o mesmo foi mantido em repouso em temperatura ambiente para evaporação total do solvente. Em seguida, 3 mL de HNO₃ 65 % foram dosados para oxidar as NpAg, transformando-as em íons Ag⁺ passíveis de serem quantificados pelo equipamento. Para a digestão das NpAg e degradação da oleilamina, o sistema foi aquecido sem deixar que a mistura entrasse em fervura até que restasse aproximadamente 1,0 mL do ácido utilizado. Por fim, água deionizada foi adicionada até completar 100 mL, e então esta solução foi injetada no espectrômetro para quantificar a concentração de íons Ag⁺.

3.7. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

3.7.1. Análise termogravimétrica (TGA)

Com o intuito de conhecer a estabilidade térmica dos nanocompósitos e os efeitos dos agentes nanoestruturados nas membranas produzidas, foram realizadas as análises de TGA. As curvas de TGA foram obtidas em uma termobalança TGA-Q50/TA Instruments, no Laboratório de Materiais da UNIVILLE. Foram colocadas aproximadamente 6,0 mg de amostra no porta-amostra de platina sob atmosfera inerte de N₂ e as amostras foram aquecidas de 25 até 900 °C a 10 °C/min.

3.7.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas com o objetivo de identificar o efeito das nanopartículas nas propriedades térmicas das membranas produzidas, (temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e no grau de cristalinidade (X_c). As curvas DSC foram obtidas em um DSC-Q20/TA Instruments (Laboratório de Materiais da UNIVILLE). As amostras foram aquecidas a 10 °C/min, de 25 a 200 °C, mantendo-as nessa temperatura por 2 min, resfriadas até -90 °C (*jumping*), sendo novamente aquecidas a 200 °C. As análises foram realizadas sob fluxo de N₂ (50 °C/min).

3.7.3. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Para avaliar as características superficiais e a dispersão das nanopartículas utilizadas nas membranas produzidas a análise de MEV-FEG foi realizada. As membranas foram fixados em um suporte metálico, recobertos com ouro e observados no microscópio MEV-FEG DSM 940A da marca Zeiss com 10 kV de tensão de aceleração no Laboratório de Materiais da UDESC.

3.7.4. Atividade antibacteriana

O intuito desta análise foi avaliar a atividade antibacteriana das membranas. O ensaio foi realizado conforme a norma ASTM E 2180 - 07 – Determinação de Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Incorporados em Materiais Poliméricos ou Hidrofóbicos, utilizando-se a bactéria

Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC Nº 6538). O experimento foi conduzido em duplicata.

A norma estabelece que o micro-organismo deve ser cultivado em um caldo nutriente estéril por 24 h antes do início do teste. A cultura foi diluída em solução tampão até atingir uma absorbância de $0,28 \pm 0,01$ em 475 nm que foi medida por espectrofotometria, correspondendo a $1,5 - 3,0 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, foi misturado 1,0 mL da solução de inóculo em 100 mL de ágar *slurry* (0,3 g de ágar e 0,85 g de NaCl, para 100 mL de H₂O), e a pasta resultante (ágar *slurry* contendo o inóculo) foi utilizada para cobrir as membranas.

As análises para determinação da atividade antibacteriana foram realizadas com as membranas de PLGA funcionalizadas com NpAg com 5, 7, 8 e 10 ppm e ZnO com 10, 50, 100 e 150 ppm, além da membrana pura de PLGA, sem nanopartículas, denominada de branco. As membranas, com dimensões de 3,0 x 3,0 cm, foram colocadas em placas de Petri, umedecidas com *swab* e, em seguida, o ágar *slurry* contendo o inóculo foi depositado sobre as membranas até que fossem totalmente cobertas. As membranas foram incubadas por 24 h a 37 °C, com umidade de aproximadamente 75 %. Após este tempo, as membranas foram transferidas para frascos contendo 10 mL de solução tampão. Estes recipientes foram colocados em um banho de ultrassom e mantidos por 1 min, e em seguida em vórtex por 1 min, a fim de descolar o ágar *slurry* das membranas. As suspensões resultantes foram adequadamente diluídas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), e então plaqueadas em meio PCA (*Plate Count Agar*). As placas de Petri foram incubadas por 18 – 24 h a 36 ± 2 °C. Posteriormente, as colônias foram contadas, e os valores obtidos foram usados para determinar o percentual de redução das bactérias presentes no meio utilizando a equação 2.

$$\% \text{ redução} = \frac{(a-b) \times 100}{a} \quad (2)$$

onde:

a – antilog da média geométrica dos micro-organismos recuperados da placa controle.

b – antilog da média geométrica dos micro-organismos contados da placa teste.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE PLGA

4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^1H)

Nesse trabalho a análise dos espectros RMN- ^1H das membranas de PLGA (lotes 1 e 2), permitiu a sua caracterização qualitativa. O intuito dessa análise foi analisar e comparar as diferenças entre os lotes de PLGA utilizados.

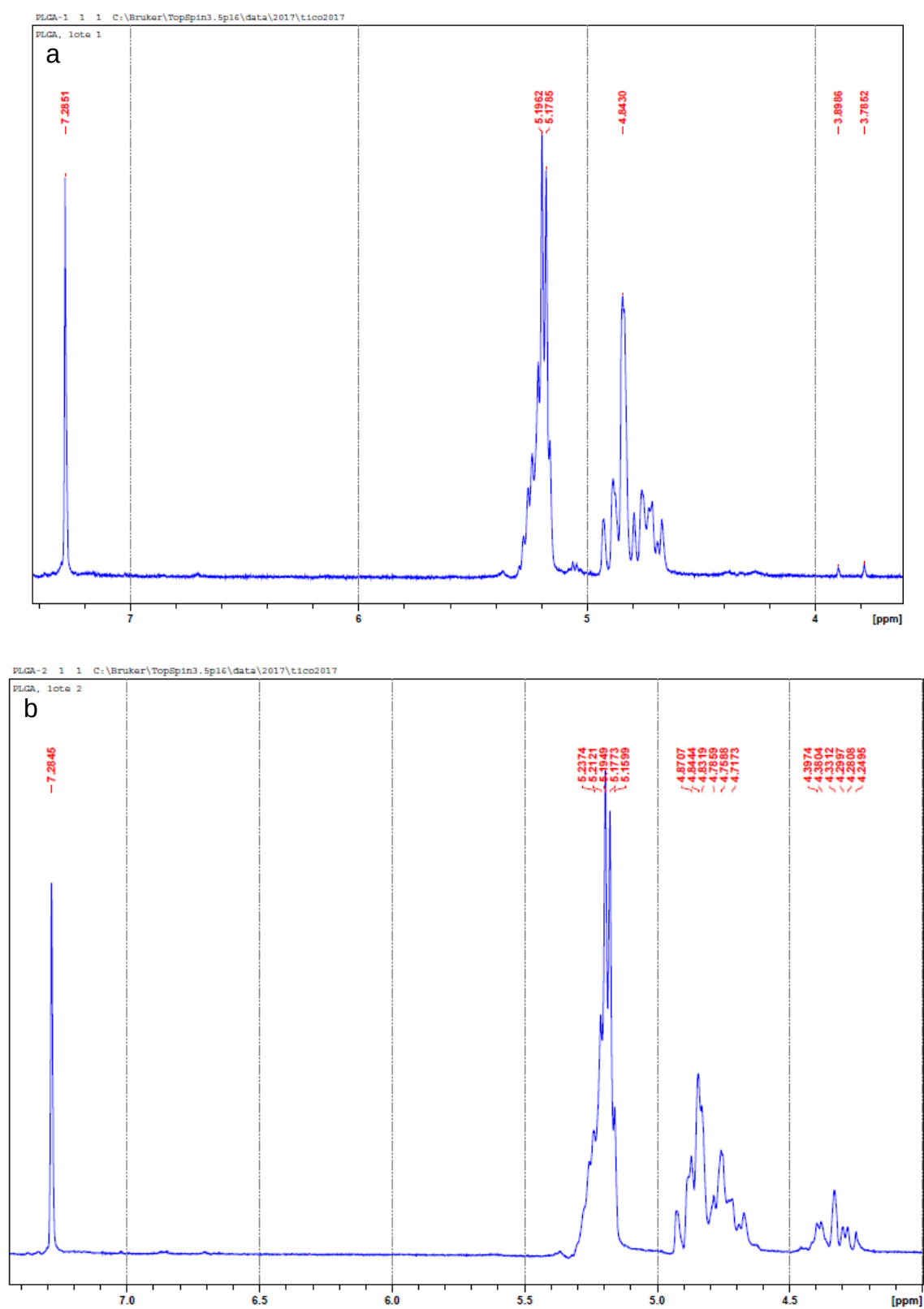
A Figura 9 apresenta os espectros na região de diferenciação (4,74 a 5,1 ppm) observada pelos autores para as membranas de PLGA lote 1 e lote 2.

A análise do espectro foi baseada no estudo de MOTTA (2002). Segundo Kaspertczyk (1996) a região que diferencia as proporções de unidades lactídeo/glicolídeo do PLGA é a região entre 4,74 a 5,1 ppm. Motta, também observou diferenciação nessa região em seu estudo.

O tipo de catalisador utilizado durante a síntese do polímero (PLGA) tem influência direta nas sequências das unidades dos meros lactídeo/glicolídeo, podendo haver uma redistribuição das sequências dos meros ao longo da cadeia polimérica (KASPERTCZYK, 1996).

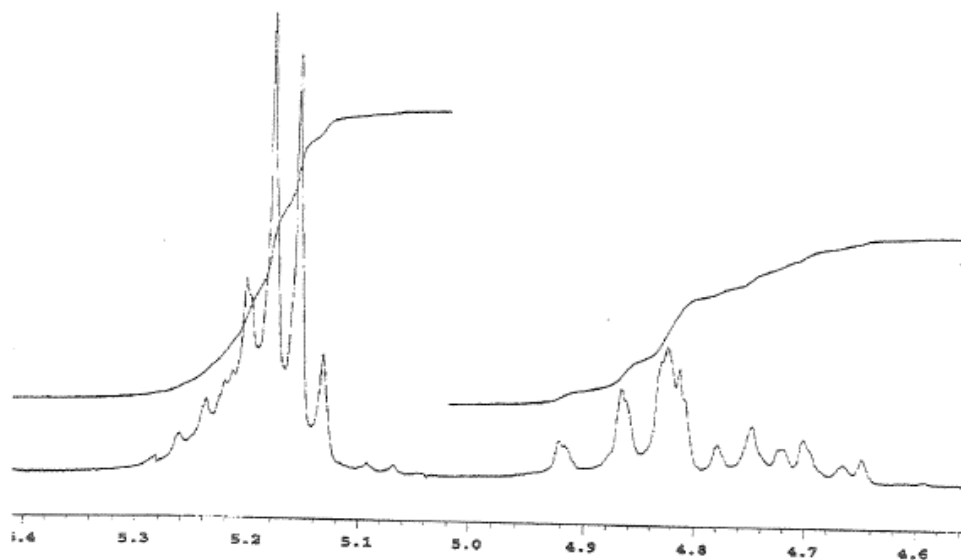
Kaspertczyk atribuiu cada pico obtido por RMN- ^1H , uma sequência de unidades lactídeo/glicolídeo, após diversas sínteses do copolímero PLGA em diversas proporções. Considerando que o trabalho desenvolvido nesse projeto, não realizou a síntese do polímero, torna-se difícil fazer essas atribuições de sequências. Contudo, ao comparar os espectros obtidos por Motta, pode-se afirmar que o pico 4,83 ppm trata-se da sequência GG (unidades glicolídeo / glicolídeo).

Figura 9. Espectros RMN- ^1H do PLGA na região de 4 a 7 ppm a) Lote 1; b) lote 2.



A Figura 10 ilustra o espectro obtido por Mota (2002) para o PLGA na razão 80/20 (a mesma utilizada nesse estudo).

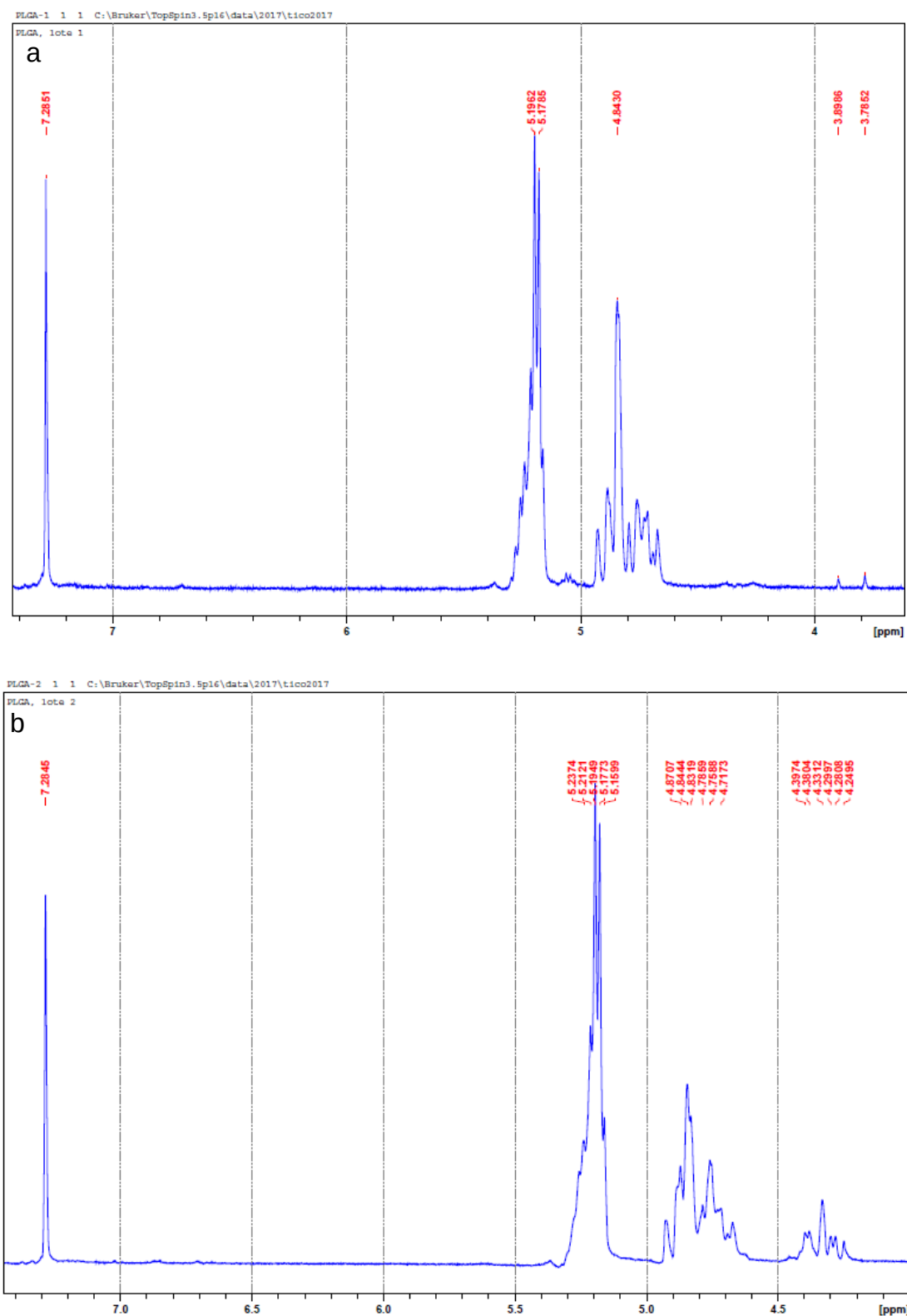
Figura 10. Espectro de RMN- ^1H para o PLGA na razão 80/20, possuindo picos pouco intensos na região de 4,8 ppm.



Fonte: MOTTA, 2002

A Figura 11 apresenta os espectros na região de diferenciação (4,74 a 5,1 ppm) observado para as membranas de PLGA lote 1 e lote 2.

Figura 11. Espectros RMN- ^1H do PLGA na região de 4 a 7 ppm a) Lote 1; b) lote 2.



Pode-se observar que ambos os polímeros apresentam os picos característicos do copolímero PLGA na região mencionada. Contudo, a razão dos picos não é a mesma para os dois lotes, indicando que as proporções de PLA e PGA no polímero são diferentes para cada lote. É importante enfatizar

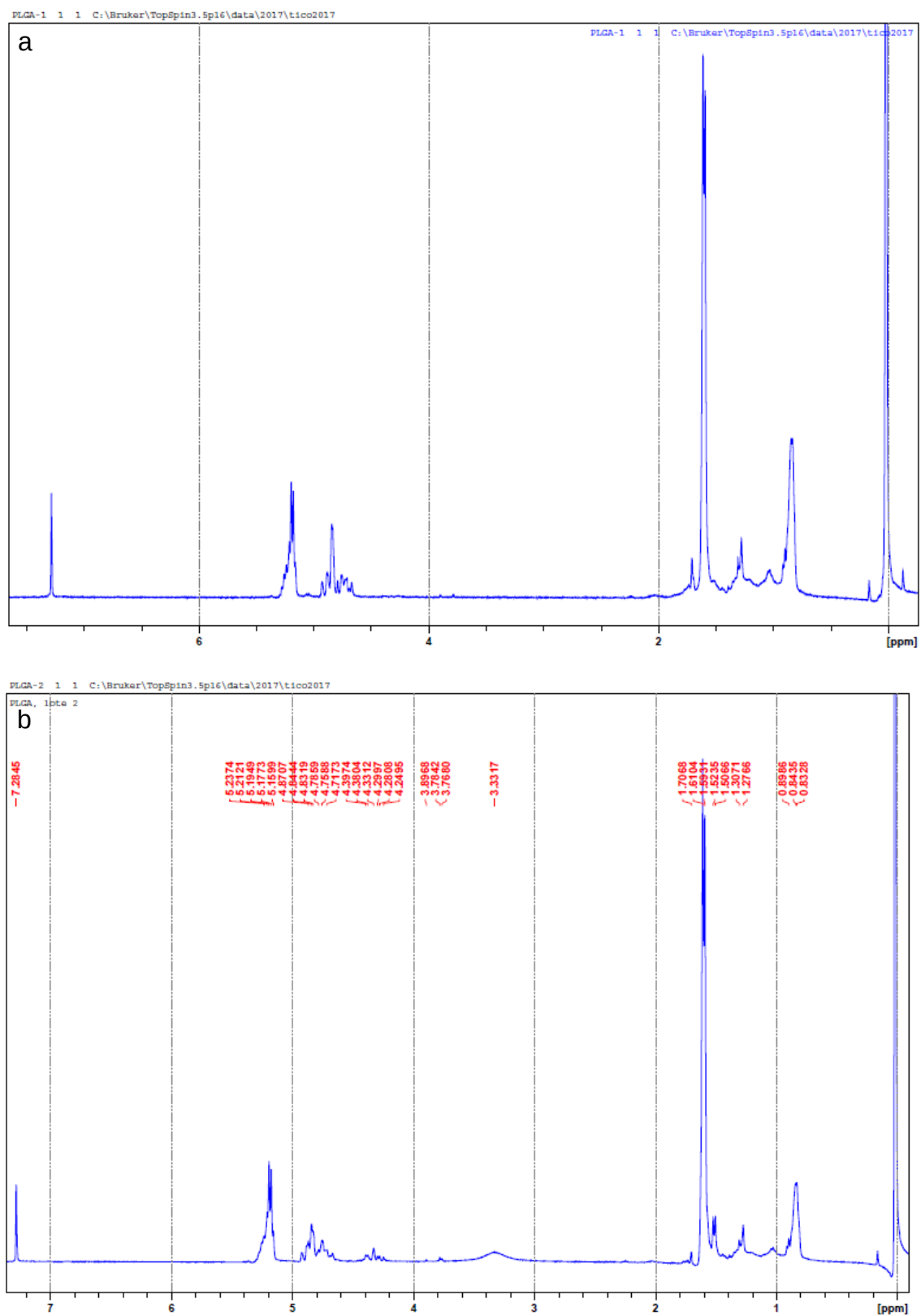
que a proporção de glicolídeo para lactídeo e as propriedades físico-químicas do copolímero correspondente não são lineares. Enquanto o PGA é altamente cristalino, a cristalinidade desaparece rapidamente em copolímeros de lactídeo e glicolídeo. Essa mudança morfológica leva a um aumento da taxa de hidratação e hidrólise. De acordo com GILDING e REED (1979), a maior reatividade do glicolídeo em comparação com o lactídeo significa que o glicolídeo é geralmente encontrado no polímero final em uma proporção maior em comparação com a sua porção na mistura inicial de monômeros (ERBETTA *et al.*, 2012).

Outro ponto a ser considerado é que o lote 2 apresenta picos que não são observados no espectro do lote 1, como pode ser verificado melhor na Figura 12.

Analisando-se os espectros dos dois lotes de PLGA, observa-se que o lote 2 apresenta picos na região de 0 a 2 ppm e até mesmo na região de 4 a 6 ppm que não aparecem no espectro do lote 1. Esses picos podem estar relacionados a presença de oligômeros presentes no material.

Outras diferenças observadas entre os dois lotes é a T_{onset} ser diferente, além disso, o lote 1 apresenta características semicristalinas, enquanto o lote 2 apresenta características amorfas. Para obter-se PLGA amorfo, a proporção de glicolídeo em relação a lactídeo deve ser superior a 30 %. Acredita-se que os lotes de PLGA possuam proporções diferentes.

Figura 12. Comparação entre os espectros RMN-¹H do PLGA a) Lote 1; b) lote 2.



4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.2.1. Espectrofotometria de UV-Visível

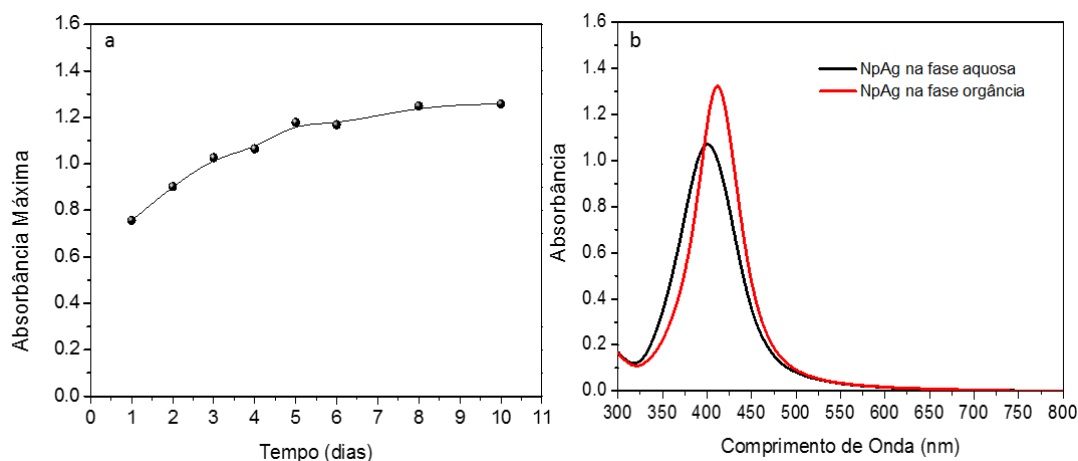
As sínteses de NpAg e as transferências de fases foram realizadas em triplicata para se avaliar a reprodutibilidade destas etapas do processo. Dessa forma, os resultados apontados nas Figuras 13 a e b demonstram a média das triplicatas.

As NpAg foram sintetizadas em meio aquoso e transferidas para meio orgânico (clorofórmio). A oleilamina (amina graxa), foi utilizada como agente de transferência de fases, viabilizando a transferência das nanoestruturas entre as fases. A oleilamina possui grupo funcional polar (NH_2), onde o átomo de nitrogênio tem capacidade de formar ligações de coordenação com a prata (FRATINI *et al.*, 2005, MANIVEL e ANANDAN, 2012, LV *et. al.*, 2009). Desta forma, as NpAg são transferidas da fase aquosa para a fase orgânica (contendo o clorofórmio e a oleilamina) naturalmente sob agitação, devido a captura da prata pelos grupos amina, por meio da formação das ligações de coordenação da interface água-óleo.

Observando os resultados expostos na Figura 13a, nota-se que a absorbância máxima das NpAg na fase aquosa aumenta no decorrer dos dias após a síntese, estabilizando por volta do 10º dia. As transferências de fases ocorreram no 4º dia após a síntese, apesar da estabilização do sistema coloidal ter ocorrido no 10º dia. O aumento da absorbância máxima ao longo do tempo está associado à ação redutora do citrato de sódio, utilizado na síntese como agente estabilizante. Os íons de prata que não foram reduzidos pelo NaBH_4 foram lentamente reduzidos pelo citrato de sódio, que além de ser um agente estabilizante do sistema, também atua como agente redutor fraco nas sínteses de NpAg. Segundo Vilain *et al.* (2007), o citrato apresenta duas funções distintas e complementares, agente redutor e estabilizante. Por esta razão, mesmo que a síntese, sob condições controladas tenha sido interrompida, os íons de prata não convertidos em prata metálica foram reduzidos lentamente pelo citrato de sódio ao longo da primeira semana, causando o aumento da absorbância em todos os produtos sintetizados. Após este período, percebe-se que as absorbâncias máximas se mantiveram praticamente constantes até o término do período de

acompanhamento. Este comportamento é um indicativo que o sistema se estabilizou e as quantidades de citrato de sódio empregadas foram suficientes para prevenir a agregação das NpAg.

Figura 13. a) variação da absorbância máxima das nanopartículas de prata em fase aquosa ao longo do tempo; b) Espectros de absorbância das nanopartículas dispersas na fase aquosa e na fase orgânica.



Na Figura 13b observa-se os resultados dos espectros de absorbância das NpAg dispersas na fase aquosa e na fase orgânica, avaliado no dia da realização da transferência de fases (4º dia após a síntese). Por meio do gráfico, nota-se um aumento da absorbância em função da transferência das nanopartículas da água para o clorofórmio, além de um deslocamento do espectro no sentido dos maiores comprimentos de onda. Conforme sugerem os resultados apresentados na Figura 10 a, no 4º dia após as sínteses ainda haviam íons de prata não reduzidos (Ag^+) e, por esta razão, acredita-se que o aumento da absorbância após a transferência de fases esteja associado à ação redutora do grupo funcional amina, conforme sugerido por Fratini *et al.* (2005).

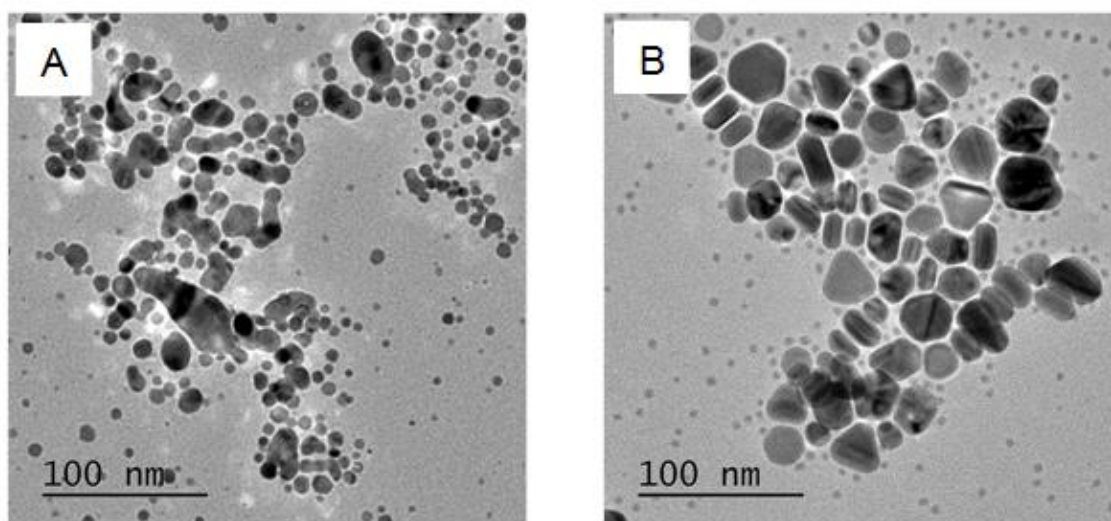
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na Figura 14 são apresentadas as imagens de MET obtidas das nanopartículas de prata no dia da transferência de fases (4º dia após a síntese). Pode-se observar que ao transferir as nanopartículas da fase aquosa para a fase orgânica, há um aumento de tamanho e modificação na geometria dessas nanopartículas. Pode-se observar que a maioria das nanopartículas formadas,

na fase aquosa, apresentou um formato tendendo ao esférico, apesar de haver alguns aglomerados disformes. Após a transferência de fases, a geometria das nanopartículas se mostra mais regular e com formas geométricas melhor definidas.

Estes resultados representam mais um indício que o grupo funcional amina pode realmente ter reduzido os íons de prata remanescentes da síntese, e estes novos átomos de prata metálica formados devem ter se incorporado nas nanopartículas já existentes. A alteração na geometria e o aumento de tamanho das nanopartículas justificam o deslocamento do espectro de absorbância das nanopartículas de prata em clorofórmio no sentido dos maiores comprimentos de onda.

Figura 14. Imagens de MET das nanopartículas de prata: a) em fase aquosa, após a síntese; b) em clorofórmio, após a transferência de fases.



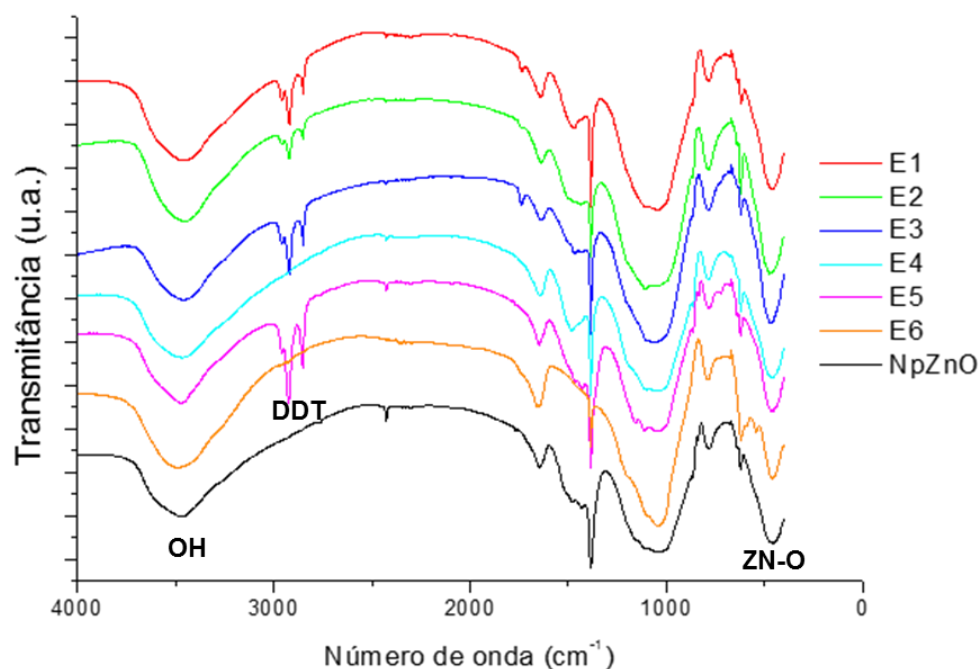
4.2.3. Espectroscopia de Absorção Atômica

As análises de espectroscopia de absorção atômica foram realizadas em quadruplicata, sendo que cada amostra analisada foi obtida de sínteses e transferências distintas, realizadas todas nas mesmas condições. Os resultados desta análise revelaram que a quantidade média de nanopartículas presentes no clorofórmio foi de $95,1 \pm 11,69$ mg/L. Com base nestas informações, foi possível estimar a concentração média de nanopartículas presentes em cada uma das membranas funcionalizadas com nanopartículas de prata.

4.3. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DAS NpZnO

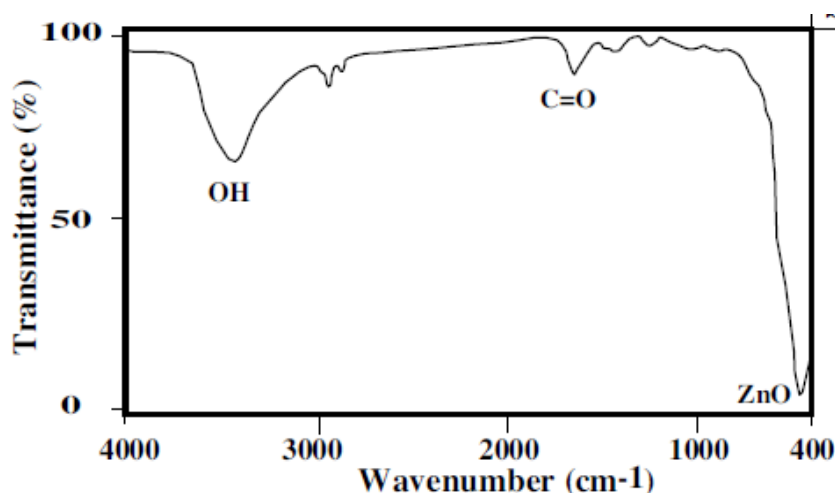
Apenas as NpZnO modificadas foram analisadas por FTIR. A Figura 15 apresenta os espectros de FTIR para as amostras de óxido de zinco modificadas.

Figura 15. Espectros de FTIR das NpZnO modificadas.



O espectro das NpZnO apresentou uma banda larga e intensa na região de $3400\text{--}3560\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento de grupos OH ou água (PASTRELLO, 2016), além de uma banda em 469 cm^{-1} , que foi atribuída a frequência de alongamento do grupo Zn-O (ZOU *et al.*, 2011). Outras bandas foram observadas em 1643 , 1390 , 1056 , 776 e 613 cm^{-1} . Essas bandas não foram observadas em NpZnO na literatura. ISAWI *et al.* (2016) observou apenas estiramentos de OH e C=O residual, além do pico de ZnO, (Figura 16). A NpZnO utilizada para esse estudo é um produto comercial, não sendo possível confirmar ao que se referem essas bandas, uma vez que a síntese do material não é conhecida, nem os reagentes utilizados. Todas as amostras tratadas também apresentaram essas bandas.

Figura 16. Espectro de FTIR de NpZnO encontrado na literatura.



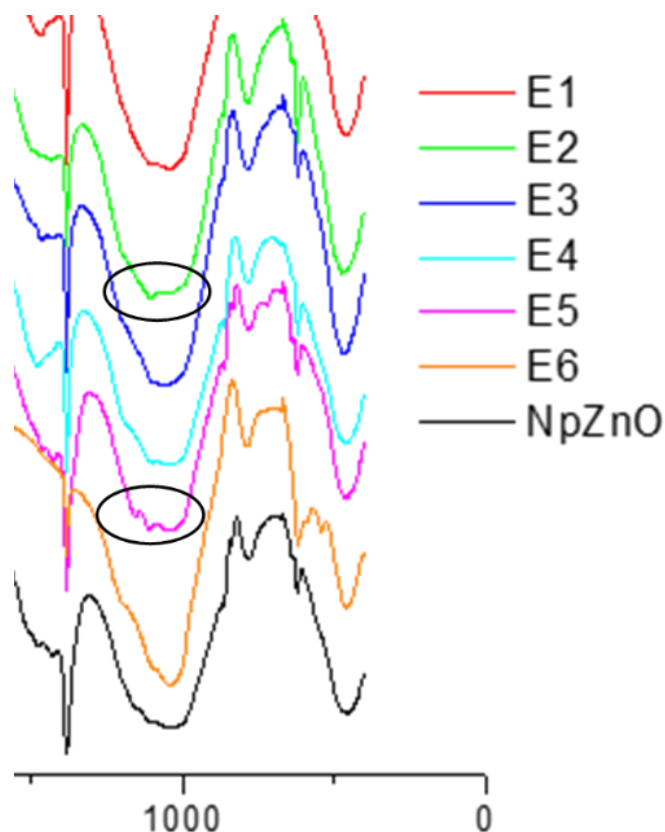
Fonte: ISAWI *et al.*, 2016.

As amostras E1, E2, E3 e E5 apresentaram além da banda de água e do pico de Zn-O, dois picos em cerca de 2926 e 2854 cm^{-1} , correspondentes aos modos de estiramento assimétrico e simétrico do grupo C-H, característicos do dodecanotiol (CLARO, 2005). As bandas mencionadas só não são observadas nos experimentos E4, E6 e nas nanopartículas sem tratamento de modificação de superfície.

As bandas entre 1112 e 1107 cm^{-1} (Figura 17) correspondem ao estiramento do grupo Zn-S (IRANMANESH *et al.*, 2015). Esse pico, só pôde ser observado nos experimentos E2 e E5. Wagner *et al.* (2014) diz que o grupo tiol se liga na superfície do ZnO.

Dentre os experimentos analisados, o E5 apresentou maior intensidade nas bandas 2958 e 2850 cm^{-1} que, segundo Claro (2005), são regiões comuns ao dodecanotiol, além de possuir o pico referente ao estiramento Zn-S mais pronunciado. Por essa razão, as nanopartículas que passaram por esse tratamento foram utilizadas na fabricação dos filmes com PLGA.

Figura 17. Detalhe dos picos referente ao estiramento Zn-S.



4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

4.4.1. Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 18 apresenta as curvas de TGA do PLGA puro (lote 1) e dos nanocompósitos com NpAg, e a Tabela 3 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Alguns nanocompósitos apresentaram dois estágios de degradação, sendo o primeiro estágio relacionado à presença de umidade ou traços de solvente da amostra. O último estágio, e mais importante, está relacionado a perda de massa do polímero.

Figura 18. Curvas TG e DTG (termogravimetria derivada) do PLGA puro (lote 1) e dos nanocompósitos com NpAg.

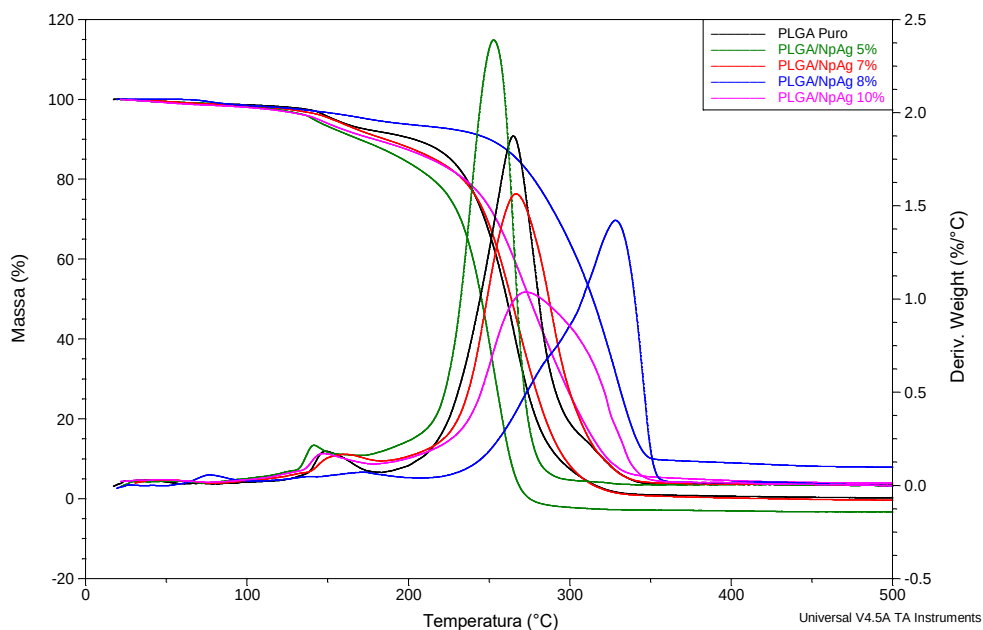


Tabela 3 - Dados da análise de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando NpAg.

AMOSTRAS	T _{onset} 1 (°C)	T _{máx} 1 (°C)	Perda de Massa 1 (%)	T _{onset} 2 (°C)	T _{máx} 2 (°C)	Perda de Massa 2 (%)
PLGA puro lote 1	138,9	148,0	8,2	241,2	264,9	91,1
PLGA/NpAg 5 ppm	130,9	140,9	10,6	233,2	252,7	92,4
PLGA/NpAg 7 ppm	142,5	157,3	9,9	243,2	266,6	89,9
PLGA/NpAg 8 ppm	157,9	170,8	6,5	287,0	328,2	84,9
PLGA/NpAg 10 ppm	139,8	146,5	9,9	244,0	273,3	85,0

O PLGA puro (lote 1) apresentou 1 estágio principal de degradação, atribuído ao polímero, com T_{onset} igual a 241,2 °C, temperatura onde a degradação é máxima (T_{máx}) 264,9 °C e 91,7 % de perda de massa. Estes valores estão inferiores aos encontrados na literatura (303,5 °C do PLGA) (DIAS, 2012). Este comportamento pode ser explicado pela diferença nas características do polímero, como por exemplo, a sua massa molar. Segundo Lucas (2001), a estabilidade térmica de materiais poliméricos pode variar em função da sua massa molar.

O perfil de degradação do nanocompósito PLGA/NpAg 5 ppm apresentou 1 estágio principal de degradação com T_{onset} igual a 233,2 °C e T_{máx} 252,7 °C,

demonstrando que a estabilidade térmica do material diminuiu cerca de 8 °C em relação ao PLGA puro.

A curva termogravimétrica (curva TG) do nanocompósito PLGA/NpAg 7 ppm demonstra que o material possui 1 estágio principal de degradação com T_{onset} igual a 243,2 °C e $T_{\text{máx}}$ igual a 266,6 °C, portanto sua estabilidade térmica aumentou em 2 °C em relação ao PLGA puro. O mesmo ocorreu ao verificar os materiais PLGA/NpAg 8 ppm e PLGA/NpAg 10 ppm. O nanocompósito PLGA/NpAg 8 ppm se destacou dos demais, apresentando T_{onset} igual a 45,8 °C em relação ao PLGA puro.

Analisando-se as curvas e os demais dados obtidos com as curvas termogravimétricas dos nanocompósitos, pode-se afirmar que a estabilidade térmica do PLGA aumentou a partir da adição de 7 ppm de NpAg.

A Figura 19 apresenta as curvas de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos com NpZnO e a Tabela 4 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

O perfil de degradação térmica do PLGA mostra a ocorrência de 1 evento térmico principal, atribuído ao polímero, com T_{onset} em 324,7 °C, temperatura onde a degradação é máxima ($T_{\text{máx}}$) em 348,7,5 °C e 87,5 % de perda de massa. Essa diferença de perfil da curva do PLGA analisado anteriormente, pode ser atribuída à síntese dos copolímeros (produzindo copolímeros com diferentes composições), pois estes foram sintetizados em datas diferentes com lotes de PLGA diferentes.

As curvas TG mostraram que praticamente todos os nanocompósitos apresentaram um estágio de perda de massa na faixa de 70 a 80 °C referente a existência de água e/ou solvente incorporado ao material.

O nanocompósito PLGA/ZnO 10 ppm apresentou T_{onset} igual a 326,5 °C e $T_{\text{máx}}$ igual a 357,5, portanto a estabilidade térmica aumentou 1,8 °C em relação ao PLGA puro. Todos os outros nanocompósitos apresentaram T_{onset} inferiores ao PLGA puro. Assim, a partir da adição de 50 ppm de NpZnO o nanocompósito diminui sua estabilidade térmica.

Figura 19. Curvas de TGA e DTG (termogravimetria derivada) do PLGA puro, e dos nanocompósitos usando NpZnO.

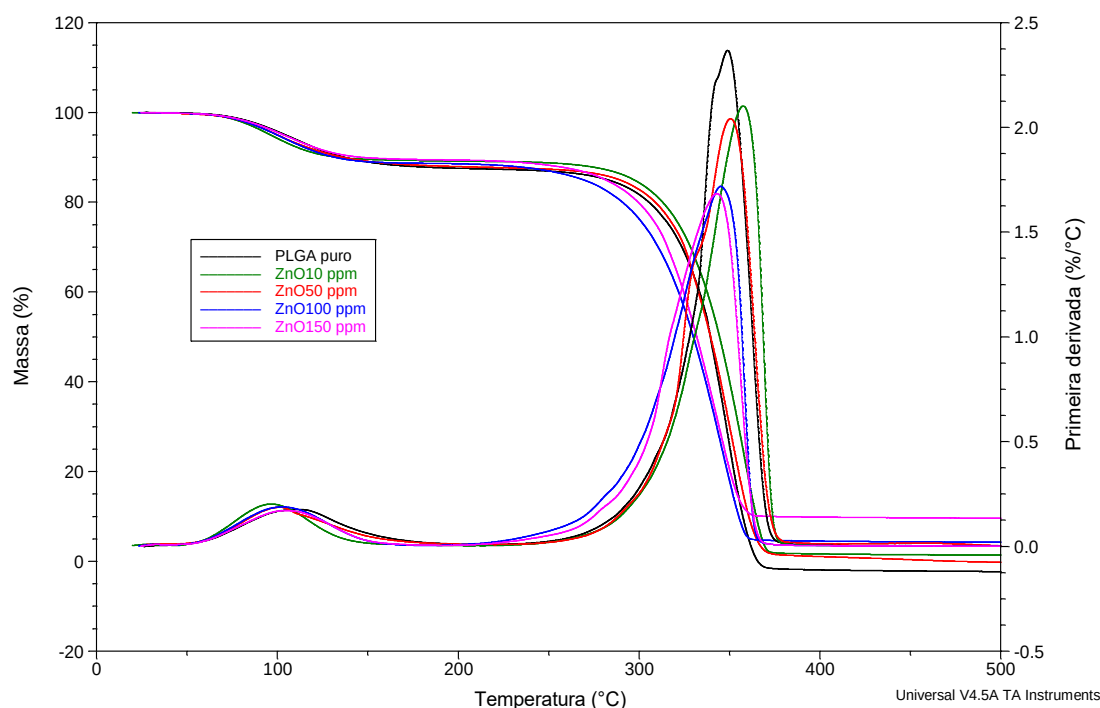


Tabela 4 - Dados da análise de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando NpZnO.

AMOSTRAS	T _{onset 1} (°C)	T _{máx 1} (°C)	Perda de Massa 1 (%)	T _{onset 2} (°C)	T _{máx2} (°C)	Perda de Massa 2 (%)
PLGA puro lote 2	78,5	111,9	12,5	324,7	348,7	87,5
PLGA/ZnO 10 ppm	73,9	95,7	10,8	326,5	357,5	89,2
PLGA/ZnO 50 ppm	78,0	100,9	12,0	319,9	350,5	88,0
PLGA/ZnO 100 ppm	76,6	102,4	11,3	308,4	344,8	88,7
PLGA/ZnO 150 ppm	77,4	104,5	10,5	309,4	343,0	89,5

4.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 20 apresenta as curvas de DSC do PLGA puro e dos nanocompósitos com NpAg e a Tabela 5 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Para o PLGA observou-se uma T_g de 47,9 °C, T_m de 144,3 °C e a ΔH_m encontrada foi de 21,5 J/g, o que corresponde a 22,9 % de cristalinidade, indicando que o polímero é semicristalino, o que está de acordo com a literatura que descreve que copolímeros de PLGA apresentarão certa cristalinidade

quando um de seus monômeros estiver em concentração maior que 70 % em mol (MIDDLETON & TIPTON, 2000). A T_m do PLGA foi muito próxima à T_m do PLGA 80/20 encontrado na literatura ($T_m = 148\text{ }^{\circ}\text{C}$) para um dos copolímeros sintetizados por Motta (2002).

Figura 20. Curvas de DSC para as membranas de PLGA com NpAg: a) 1º aquecimento; b) 2º aquecimento.

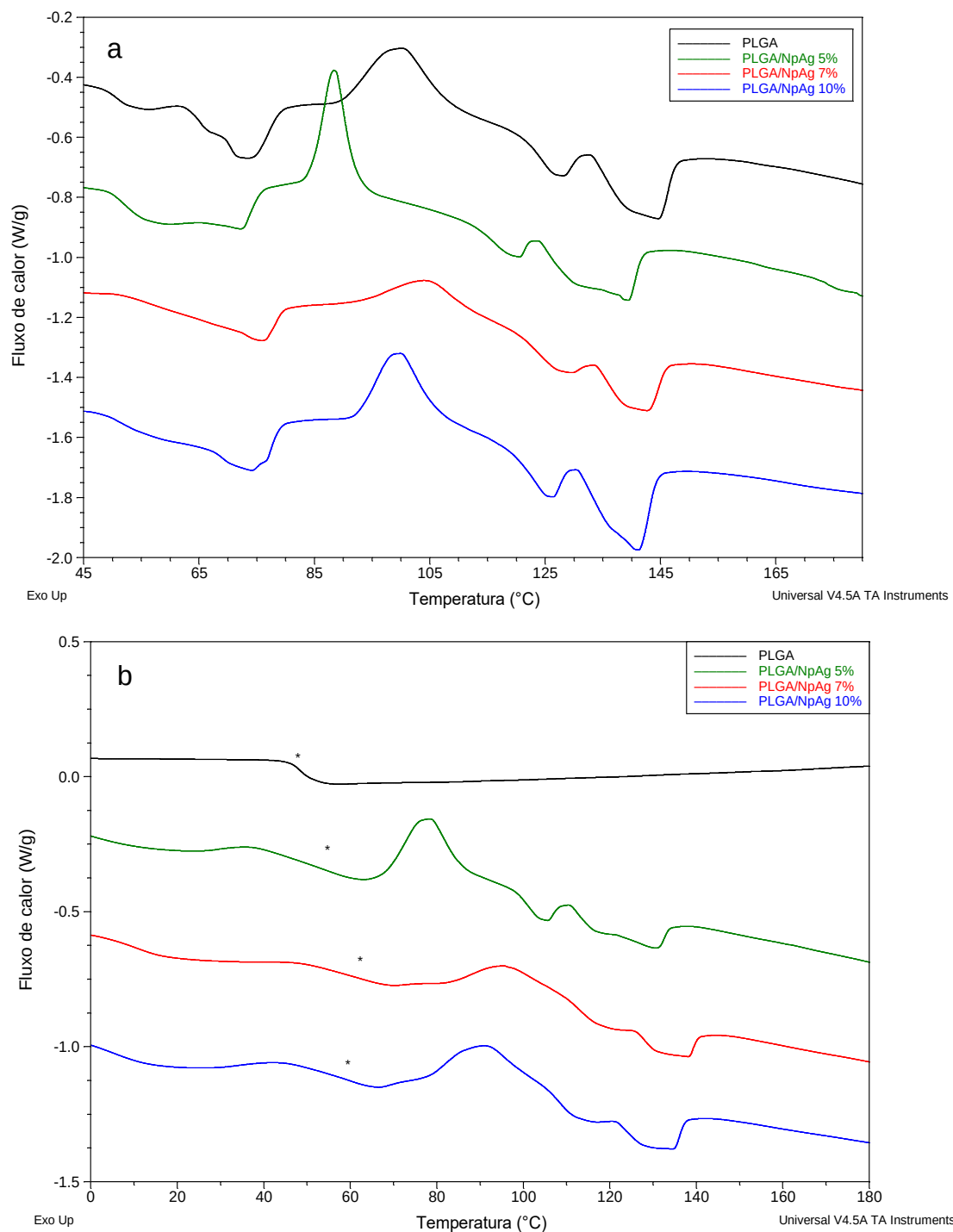


Tabela 5 - Dados de temperatura de transição (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m) obtidos das curvas DSC para as membranas de PLGA e membranas de PLGA funcionalizadas com NpAg.

Membranas	T_g (°C)	ΔH_m (J/g)	T_m (°C)
PLGA lote 1	47,9	21,5	144,3
PLGA/NpAg 5 ppm	54,8	18,2	139,2
PLGA/NpAg 7 ppm	62,3	15,2	141,3
PLGA/NpAg 8 ppm	27,8	5,9	145,9
PLGA/NpAg 10 ppm	59,4	21,4	140,7

Para o nanocompósito PLGA/NpAg 8 ppm, observou-se uma T_g de 27,8 °C, T_m de 145,9 °C e ΔH_m encontrado foi de 5,99 J/g o que corresponde a 6,4 % de cristalinidade. Em relação ao PLGA puro, houve uma diminuição da T_g e do grau de cristalinidade, por outro lado, houve um aumento da T_m .

Foi observado comportamento oposto para as demais membranas em relação a T_g e a T_m . O acréscimo de 5, 7 e 10 ppm aumentou a T_g do material em relação ao PLGA puro, enquanto que a T_m diminuiu. Já a entalpia de fusão e consequentemente o grau de cristalinidade, diminuiu em todos os nanocompósitos quando comparados ao PLGA puro. Esta diminuição no grau de cristalinidade poderá acarretar uma diminuição do tempo de degradação desses materiais em relação ao PLGA puro. Júnior (2013) também observou uma diminuição da T_m e da ΔH_m em relação ao polímero puro ao produzir matrizes de nanofibras por eletrofiação de soluções poliméricas de poli(vinil)pirrolidona (PVP) e óxido de zinco (ZnO).

A Figura 21 apresenta as curvas de DSC do PLGA puro (lote 2) e dos nanocompósitos com NpZnO e a Tabela 6 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

O PLGA puro (lote 2) apresentou uma T_g em 47,9 °C e não apresentou T_m , possuindo comportamento amorfo, diferentemente do comportamento encontrado para o copolímero PLGA puro (lote 1).

Pode-se observar pelas curvas de DSC que o PLGA puro e todos os nanocompósitos apresentaram comportamento amorfo, não apresentando T_m nem entalpia de fusão.

A T_g para o PLGA puro (lote 2) foi de 47,9 °C. Referente à incorporação das NpZnO, observou-se aumento entre 2 a 5 °C na T_g dos nanocompósitos em relação ao PLGA puro, porém não houve uma tendência relacionada às concentrações.

Figura 21. Curvas de DSC para as membranas de PLGA funcionalizadas com NpZnO: a) 1º aquecimento; b) 2º aquecimento.

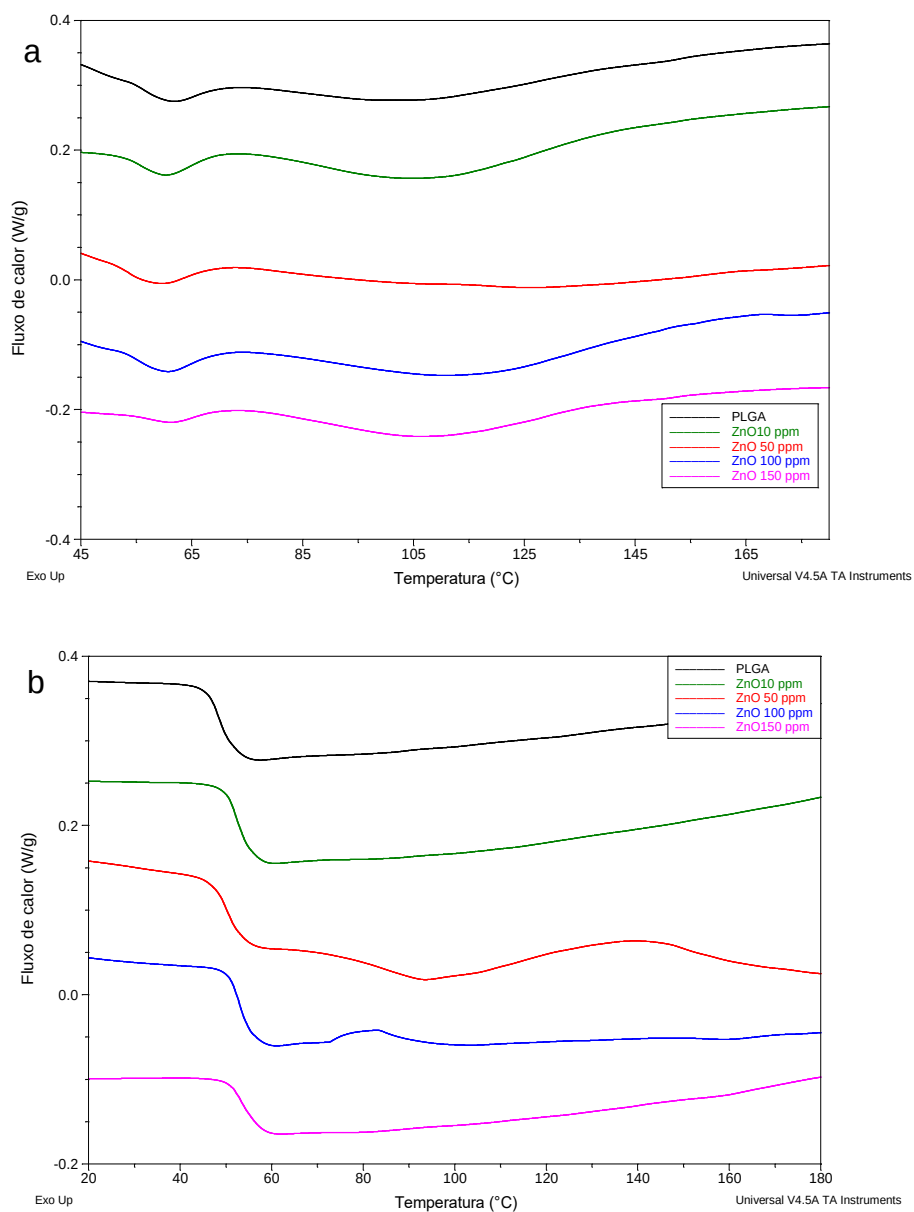


Tabela 6 - Dados de temperatura de transição (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m) obtidos das curvas DSC para as membranas de PLGA e membranas de PLGA com NpZnO.

Membranas	T_g ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_m (J/g)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
PLGA lote 2	47,9	---	---
PLGA/ZnO 10 ppm	52,1	---	---
PLGA/ZnO 50 ppm	49,8	----	---
PLGA/ZnO 100 ppm	52,9	----	---
PLGA/ZnO 150 ppm	53,2	---	----

4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

A Figura 22 apresenta a micrografia do PLGA puro, sem adição das nanopartículas com 5.000 vezes de aumento, onde se observa que, de maneira geral, o material apresenta superfície lisa e homogênea.

Figura 22. Micrografia da superfície do PLGA puro.



Para verificar a dispersão da prata e do óxido de zinco nanoestruturados nas membranas poliméricas foram realizadas análises da superfície por meio de MEV-FEG e os resultados são mostrados nas Figura 23 e 24.

Os aglomerados de nanopartículas foram contados e suas medidas foram estimadas utilizando o programa ImageJ. Em seguida, os dados foram compilados por meio do programa Origin (versão A 8).

É importante destacar que a análise de MEV-FEG é feita em uma pequena amostra da membrana. Dessa forma, as nanopartículas consideradas para essas análises não correspondem ao total contido no material.

Em geral, os aglomerados de nanopartículas apresentaram tamanho próximo a 1000 nm, sendo esse, considerado um diâmetro grande para a utilização em nanomateriais. Segundo Melo e Pimenta (2004), objetos e dispositivos, devem possuir uma de suas dimensões físicas menor que, ou da ordem de algumas dezenas de nanômetros, geralmente entre 0,1 e 100 nanômetros. Portanto, pode-se dizer que houve a aglomeração das nanopartículas ao incorporá-las na matriz polimérica.

Figura 23. Gráfico do tamanho das nanopartículas pela frequência relativa dos materiais contendo NpAg, quantidade de aglomerados de nanopartículas contados (n) e moda (valor que mais aparece - Xc): a) NpAg 5 ppm; b) NpAg 7 ppm; c) NpAg 8 ppm; d) NpAg 10 ppm.

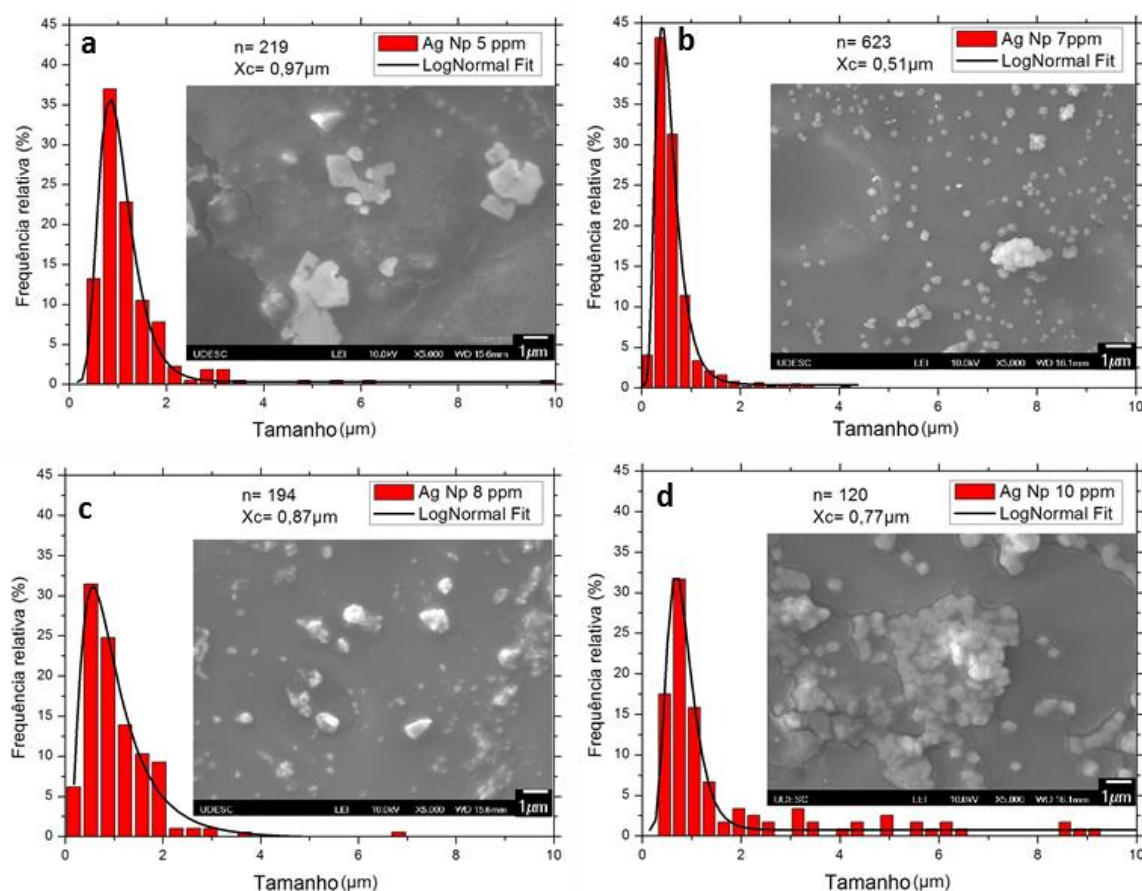
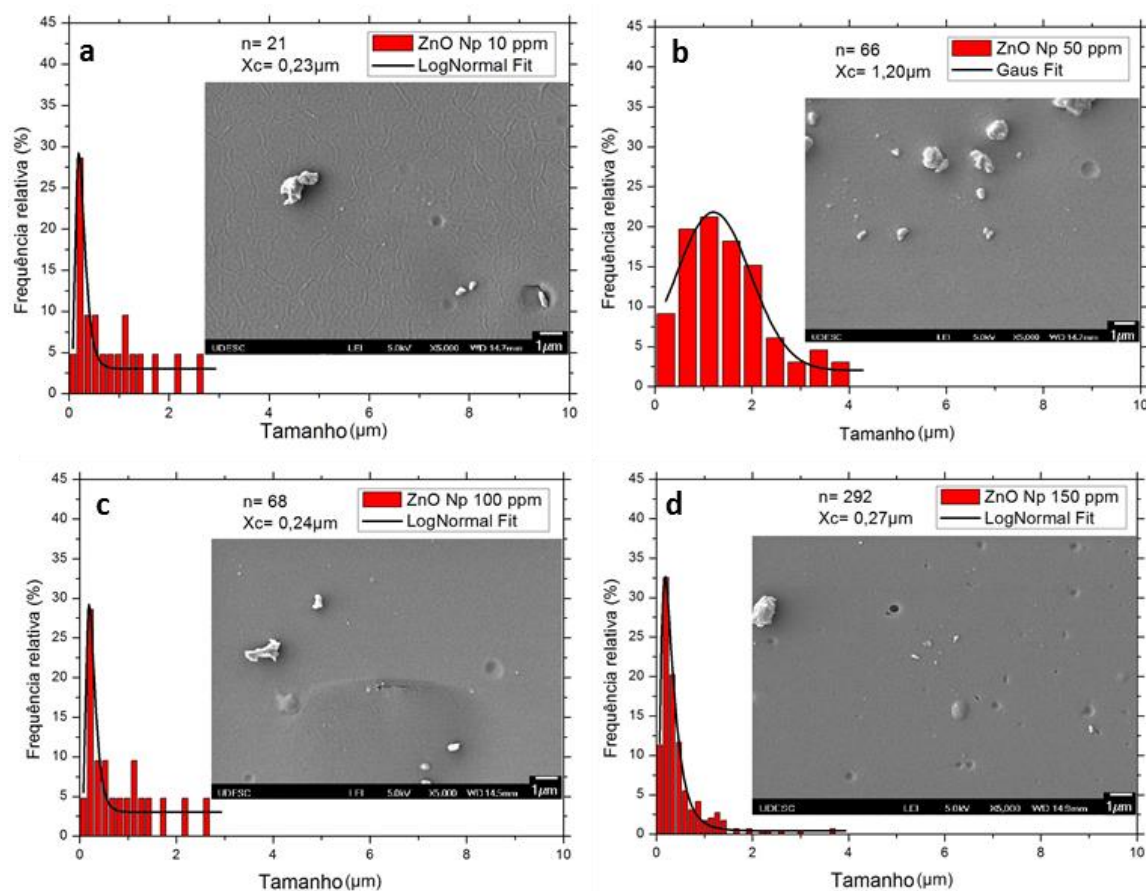


Figura 24. Gráfico do diâmetro das nanopartículas pela frequência relativa dos materiais contendo NpZnO, quantidade de aglomerados de nanopartículas contados (n) e moda (valor que mais aparece - X_c): a) NpZnO 10 ppm; b) NpZnO 50 ppm; c) NpZnO 100 ppm; d) NpZnO 150 ppm.



A incorporação de NpAg apresentou um resultado mais satisfatório em relação as membranas com NpZnO. Embora as NpAg e NpZnO apresentem tamanhos próximos, houve uma melhor dispersão das NpAg. Esse resultado já era esperado, pois as NpZnO não são compatíveis com a matriz polimérica, tendo que passar por processo de modificação de superfície.

Por meio das imagens de MEV-FEG, pode-se notar que a quantidade de nanopartículas é proporcional a concentração utilizada na preparação dos filmes. Apenas as imagens referentes a concentração de 100 e 150 ppm de NpZnO não condizem com as demais, pois a membrana não foi analisada por inteiro e como as nanopartículas tendem a se aglomerar é provável que elas não estejam uniformemente distribuídas na membrana.

De maneira geral, as membranas contendo NpAg apresentaram melhor dispersão que as membranas de NpZnO.

4.4.4. Atividade Antibacteriana

As análises antibacterianas foram realizadas utilizando-se a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, seguindo a norma ASTM E2180. Para as amostras contendo NpAg, observou-se um percentual de redução de 100 % do micro-organismo para todas as concentrações utilizadas em relação ao PLGA puro. Todeschini (2015), também observou em seus experimentos, redução de 100 % das bactérias ao incorporar nanopartículas de prata em PLLA (utilizando concentração de 150 µg NpAg / g PLLA). Outros autores também evidenciaram a atividade antibacteriana das NpAg em diferentes concentrações (PETICA *et al.*, 2008; KRISHNAN *et al.*, 2015; WRIGHT *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2014).

Na Tabela 7 são apresentadas as porcentagens de redução das unidades formadoras de colônia das membranas de PLGA funcionalizadas com distintas concentração de NpAg e NpZnO, comparando com a amostra controle isenta destas nanoestruturas.

Tabela 7 – Percentual de redução das bactérias Gram positiva *Staphylococcus aureus* pelas membranas de PLGA funcionalizadas com distintas concentrações de NpAg ou NpZnO.

Amostras	Unidades formadoras de colônias (UFC/mL)	Redução de células bacterianas (%)
PLGA	4,18x10 ⁴	---
PLGA/Ag 5 ppm	0	100
PLGA/Ag 7 ppm	0	100
PLGA/Ag 8 ppm	0	100
PLGA/Ag/ 10 ppm	0	100
PLGA/ZnO 10 ppm	7,20 x10 ⁴	Não houve redução
PLGA/ZnO 50 ppm	8,93 x10 ⁴	Não houve redução
PLGA/ZnO 100 ppm	3,66 x10 ⁴	12,4
PLGA/ZnO 150 ppm	1,30 x10 ⁴	68,9

A membrana contendo 100 ppm de NpZnO apresentou percentual de redução de bactérias de 12,4 %, enquanto que a incorporação de 150 ppm apresentou percentual de 68,9 % em relação ao controle, indicando que, a partir dessas concentrações, à medida que se aumenta a concentração de NpZnO

incorporada na membrana, maior é a atividade antibacteriana apresentada pela mesma. As amostras com concentração inferior a 100 ppm não apresentaram percentual de redução de células. Desta forma, pode-se afirmar que essas concentrações não são suficientes para conferir alguma atividade antibacteriana nas membranas de PLGA.

Zhang *et al.* (2014), também comparou a atividade antibacteriana de NpAg e NpZnO em seus estudos e verificou que a NpZnO não é tão eficiente quanto a NpAg em iguais concentrações, porém a atividade antibacteriana das nanopartículas melhora muito quando são misturadas. Para o estudo foram utilizadas as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Para extinguir a incerteza de que a modificação química de superfície ou o polímero interfiram na atividade antibacteriana da NpZnO, repetiu-se a análise apenas com a Np pura, sem o processo de modificação nem incorporação no PLGA, adjunto, testou-se outra Np fornecida e sintetizada pelo Professor André L. Nogueira na Universidade da Região de Joinville (resultados não apresentados), para efeito de comparação. Verificou-se que a modificação química de superfície nada interfere na ação antibacteriana da Np, contudo, a NpZnO utilizada neste trabalho, apresenta resultados inferiores quando comparado a outra Np, indicado que o material talvez não seja puro, o que interfere na atividade antibacteriana.

CONCLUSÃO

A análise de RMN demonstrou que os dois lotes de PLGA não possuem a mesma proporção, sendo que o lote 1 apresenta características semicristalinas e o lote 2 características amorfas, tendo sido comprovado pela análise de DSC.

Os resultados obtidos demonstraram que foi possível modificar a superfície das NpZnO utilizando o dodecanotiol, sendo possível assim, incorporá-las nas membranas de PLGA.

A incorporação de NpAg na membrana de PLGA aumenta a estabilidade térmica do material a partir de 7 ppm de concentração. Já a incorporação de NpZnO diminui a estabilidade térmica do material a partir de 50 ppm.

Não houve tendência em relação a concentração das NpAg observadas pela análise de DSC. O material contendo 8 ppm apresentou T_g e entalpia de fusão menores que o PLGA puro, enquanto que as demais concentrações apresentaram valores maiores em relação ao PLGA puro.

Por meio da incorporação de NpZnO, observou-se aumento entre 2 a 5 °C na T_g dos nanocompósitos em relação ao PLGA puro, porém não houve uma tendência relacionada às concentrações.

Por meio da análise MEV-FEG, observou-se que as nanopartículas (NpAg e NpZnO) aglomeraram em todas as concentrações utilizadas. As NpAg apresentaram uma boa dispersão, permeando todo o polímero, enquanto as NpZnO a interação não foi satisfatória, pois mesmo fazendo a modificação as NpZnO ainda tendem a se aglomerar.

A atividade antibacteriana da NpAg foi muito maior em relação a NpZnO, não houve crescimento da bactéria em nenhuma das concentrações enquanto que para as concentrações de NpZnO, houve redução do percentual de crescimento bacteriano apenas para concentrações acima de 100 ppm em relação ao PLGA puro.

Com base nos resultados de FTIR e atividade antibacteriana, foi possível verificar que a NpZnO não é pura, interferindo na atividade antibacteriana da mesma.

Dentre as membranas estudadas, pode-se dizer que os copolímeros contendo NpAg são mais indicadas para a utilização na RTG, pois apresentaram excelentes características antibacterianas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a modificação de superfície do óxido de zinco com outros reagentes e metodologias.

Avaliar a atividade antibacteriana em concentrações menores para nanopartículas de prata.

Avaliar a atividade antibacteriana em bactérias Gram-negativas.

Investigar a citotoxicidade dos materiais desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

ASTM E 2180 – 07, **Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials**, 2012.

BAI, H.W.; LIU, Z.Y.; SUN, D.D.L. Hierarchical ZnO/Cu “corn-like” materials with high photodegradation and antibacterial capability under visible light. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, pp. 6205–6210, 2011.

BALATA, M.L.; RIBEIRO, E.D.P.; BITTENCOURT, S.; TUNES, U.R. Regeneração tecidual guiada: 15 anos de acompanhamento de um caso clínico. **International Journal of Dentistry**, v.10, pp.45-49, 2011.

BARUD, H.S.; REGIANE, T.; BARRIOS, C.; MARQUES, R.F. C.; MOLINA, C.; VERELST, M.; DEXPERT-GHYS, J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, pp. 515-518, 2008.

BEHRING, J.; JUNKER, R.; WALBOOMERS, X. F.; CHESSNUT, B.; JANSEN, J. A. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. **Odontology**, v. 96, pp.1-11, 2008.

BENDIX, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. **Polymer Degradatio and Stability**, v.59, pp.129-135, 1998.

BOJARSKA, M.; NOWAK, B.; SKOWRONSKI, J.; PIATKIEWICZ, W.; GRADON, L. Growth of ZnO nanowires on polypropylene membranesurface — Characterization and reactivity. **Applied Surface Science**, v. 391, pp.457- 467, 2017.

BOTTINO, M.C.; THOMAS, V.; JANOWSKI, G. M. A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. **Acta Biomaterialia**, v.7, pp.216–224, 2011.

BRAGA, F.S.F.F.; MIRANDA, L.A.; MICELI, V.C.; ÁREAS, A.; FIGUEREDO, C. M.S. FISCHER, R.G.; MARQUES, A.F.G.S.; CAMPOS, L.L.; SZTAJNBOK, F.R. Artrite crônica e periodontite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.47, pp.276-280, 2007.

BRAGANÇA, F.C. **Nanocompósitos poliméricos com argila preparados a partir de dispersões aquosas: efeito dos contra-íons e auto-adesão**. Tese de doutorado (Instituto de Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CALLISTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução**. 7th ed. Rio de Janeiro, 2007.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, A.K.; SARWAR, S.; SINGH, P.; CHAKRABORTY, R.; CHAKRABARTI, P. Bactericidal effect of polyethyleneimine capped ZnO nanoparticles on multiple antibiotic resistant bacteria harboring genes of high-pathogenicity island. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.121, pp.44–53, 2014.

CHEN, D.; CUI, P.; CAO, H.; CHEN, J.Y.D.; CUI, P.; CAO, H.; YANG, J. A 1-Dodecanethiol-Based Phase Transfer Protocol for the Highly Efficient Extraction of Noble Metal Ions from Aqueous Phase. **Journal of Environmental Sciences**, v.29, pp.146-150, 2015.

CIRELLI, J.A.; JR, E.M.; CHIKRICI MARCANTONIO, R.A.C.; LIA, R.C.C.; GOISSI, G.; JR, C.R. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. **Biomaterials**, v.18, pp.1227-1234, 1997.

CLARO, S.F. **Estudo de Complexos de Ni (II) com os Ligantes Dodecanotiol e Ácido Hexanóico**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DELIBERADOR, T.M.; NAGATA, M.J.H.; FURLANETO, F.A.C.; MESSORA, M. R.; SANTOS, F.R. Regeneração Tecidual Guiada no Tratamento dos Defeitos de Furca classe II. **RSBO**, v.5, pp.57-65, 2008.

DIAS, D.J.S.; **Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (mcf-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília.

ERBETTA, C.D.C.; VIEGAS, C.C.B.; FREITAS, R.F.S.; SOUZA, R.G. Síntese e Caracterização térmica e química do copolímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo). **Polímeros**, v.21, pp.376-382, 2001.

ERBETTA, C. D. C.; ALVES, R. J.; RESENDE, J. M.; FREITAS, R. F. S. F.; SOUSA, R. G. Synthesis and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) copolymer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.3, pp.208-225, 2012.

ESTEVEES, A.C.C.; TIMMONS, A.B.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v.27, pp.798-806, 2004.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, pp. 662–668, 2000.

FENG, X.; FENG, L.; JIN, M.; ZHAI, J.; JIANG, L.; ZHU, D. Reversible super-hydrophobicity to super-hydrophilicity transition of Aligned ZnO nanorod films. **J. American Chemical Society**, v.126, pp.62-63, 2004.

FRATTINI, A.; PELLEGRINI, N.; NICASTRO, D.; SANCTIS, O; Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. **Materials Chemistry and Physics**, v.94, pp.148-153, 2005.

GIBELLI, I. C. **Ação antibacteriana de nanopartículas de prata em poli (ácido láctico) – PLA e a avaliação da biodegradação.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

GILDING, D. K.; REED, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolid/poly (lactic acid) homo and copolymers. **Polymer**, v.20, pp.1459-1464, 1979.

GUIMARÃES, T.R.; MORALES, A.R.; PAIVA, L.B.; nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita: caracterização estrutural, morfológica e de opacidade. *In: Congresso brasileiro de engenharia e ciência de materiais*, 2006.

HORBYLON, B.Z. **Estudo *in vitro* da cinética de desorção de doxíciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

IRANMANESH, P.; SAEEDNIA, S.; NOURZPOOR, M. Characterization of ZnS nanoparticles synthesized by co-precipitation method. **Chinese Physics B**, v.24, 046104, 2015.

JUNIOR, F.A.G.S. **Preparação e Caracterização de Compósitos Polímeros/Semicondutor Inorgânico a Partir da Técnica de Eletrofiação**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, São Paulo, 2013.

KASAJ, A.; REICHERT, C.; GÖTZ, H.; RÖHRIG, B.; SMEETS, R.; WILLERSHAUSEN, B. *In vitro* evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head & Face Medicine**, v. 4, pp.22-30, 2008.

KASPERCZYK, J. Microstructural analysis of poly[(L,L-lactide)-co-(glycolide)] by ^1H and ^{13}C n.m.r. spectroscopy. **Polymer**, v.37, pp.201-203, 1996.

KRISHNAN, S.K.; PROKHOROV, E.; ITURRIAGA, M.H.; MORALES, J.D.M.; LEPE, M.V.; KOVALENKO, Y.; SANCHEZ, I.C.; BARCENAS, G.L. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, v.67, pp.242–251, 2015.

LARA, H.H.; TREVIÑO, E.N.G.; TURRENT, L.I.; SINGH, D.K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of Nanobiotechnology**, v.9, pp.1-8, 2011.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D. Y.; BRUNET, L.; LIGA, M. V.; LI, D.; ALVAREZ, P. J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, pp. 4591–4602, 2008.

LI, M.; ZHU, L.Z.; LIN, D.H. Toxicity of ZnO Nanoparticles to Escherichia coli: Mechanism and the Influence of Medium Components. **Environmental Science and Technology**, v. 45, pp. 1977–1983, 2011.

LIAO, S.; WANG, W.; UO, M.; OHKAWA, S.; AKASAKA, T.; TAMURA, K.; CUI, F.; WATARI, F. A Three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue **Regeneration Biomaterials**, v.26, pp.7564–7571, 2005.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros. **E-papers**. Rio de Janeiro. 2001.

LV ,Y.; LIU, H.; WANG, Z.; LIU, S.; HAO, L.; SANG, Y.; LIU, D.; WANG, J.; BOUGHTON, R. I. J. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. **Journal Membrane Science**, v.331, pp. 50-56, 2009.

MANIVEL, A.; ANANDAN, S.; Spectral interaction between silica coated silver nanoparticles and serum albumins. **Colloids and Surface A: Physicochemical & Engineering Aspects**, v.395, pp.38-45, 2012.

MARRETA, S.M. **Recognition and treatment of periodontal disease**. In: The Atlantic Coast Veterinary Conference, 2001, New Jersey, USA. Disponível em: <<http://www.vin.com/ACVC/2001/>>. Online. Acesso em: 06 abr. 2015.

MARTINS, J.D.S. **Membranas compósitas de policaprolactona/hidroxiapatite para aplicação estomatológica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, pp. 4278-4281, 2003.

MAZUR, L.P. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de poli(L-ácido láctico) e diferentes argilas organofílicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2012

MELO, C.P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. PARCERIAS ESTRATÉGICAS - NÚMERO 18 – AGOSTO de 2004. Disponível em: <http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/130/124>. Acesso em: 24 de out. 2016.

MENDES, R.T. **Efeitos Cardiovasculares da Inibição da Ciclooxygenase-2 em um Modelo Experimental de Periodontite Induzida por Ligadura**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v.21, pp.2335-2346, 2000.

MOTTA, A.C. **Síntese e caracterização do poli(L-ácido láctico)-PLLA e Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA e degradação “in vitro”**. Dissertação (Mestrado Engenharia Mecânica) - UNICAMP, Campinas, 2002.

MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R, Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v.11, pp.340-350, 2006.

MOTSHEKGA, S.C.; RAY, S.S.; ONYANGO, M.S.; MOMBA, M.N.B. Microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial activity of Ag/Zn nanoparticles supported bentonite clay. **Journal of Hazardous Materials**, v.262, pp.439-446, 2013.

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

NOGUEIRA, A. L., MACHADO, R. A. F., SOUZA, A. Z., MARTINELLO, F., FRANCO, C. V., DUTRA, G. B., Synthesis and Characterization of Silver

Nanoparticles Produced with Bifunctional Stabilizing Agent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.53, pp.3426-3434, 2014.

OHLRICH, E. J.; CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, G. J. The immunopathogenesis of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, v.54, S2–S10, 2009.

PAN, Z.; DING, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative **Medicine Interface Focus**, v.2, pp.366–377, 2012.

PASTRELLO, B. **estudos biológicos de nanopartículas de óxido de zinco: interação com proteínas e avaliação de “burst” oxidativo de leucócitos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Bauru, 2016.

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

REIS, E.C.C.; BORGES, A.P.B.; CARLO, R.J. Regeneração periodontal em cães. **Ciência Rural**, v.41, pp.2128-2136, 2011.

REIS, E.C.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M.; SILVA, C.L. desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, v.22, pp.73-79, 2012.

SANTOS, R.M.M.; FIALHO, S.L. Nanopartículas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.10, pp.52-59, 2007.

ROBERT, P.M.; FRANK, R.M. periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane. **Journal of Periodontology**, v.65, pp.414-422, 1994.

SCHENK, R.K.; BUSER, D.; HARDWICK, W.R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **JOMI on CD-ROM**, pp.13-29, 1994.

SIMCHI, A.; TAMJID, E.; PISHBIN, F.; BOCCACCINI, A.R., recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications, nanomedicine: nanotechnology, **Biology and Medicine**, v.7, pp.22-39, 2011.

SINGH, J.; IM, J.; WHITTEN, J.E. encapsulation of zinc oxide nanorods and nanoparticles. **Langmuir**, v.25, pp.9947–9953, 2009.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N.H.M.; ANN, L.C.; BAKHORI, S.K.M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Lett**, v.7, pp.219–242, 2015.

SITE MACHADO & MIRANDA. **Periodontia - Saúde da Gengiva -Laser**. 2015. Disponível em: <<http://www.machadomiranda.com.br/tratamentos.php?id=19>> Acesso em: 14 de fev. 2016.

SOARES, A.Q.; OLIVEIRA, L.F.; RABELO, D.; SOUZA, A.R. Polímeros biodegradáveis: novas perspectivas para as ciências farmacêuticas. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v.2, pp.202-205, 2005.

STANKOVIC, A.; SEZEN, M.; MILENKOVIC, M.; KAIŠAREVIC, S.; ANDRIC, N.; STEVANOVIC, M. PLGA/Nano-ZnO Composite Particles for Use in Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity. **Journal of Nanomaterials**, v.2016, pp.1-10, 2016.

TAKEISHI, H.; IRIE, K.; OKUDA, K.; OZAWA, H.; YAJIMA, T.; EJIRI, S. Molded bone augmentation by a combination of barrier membrane and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Oral Diseases**, v.7, pp.281-286, 2001.

TAMADA, J.A.; LANGER, R. erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, pp.552-556, 1993.

TANG, L.; ZHOU, B.; TIAN, Y.; BALA, H.; PAN, Y.; REN, S.; WANG, Y.; LV, X.; LI, M.; WANG, Z. preparation and surface modification of uniform zno nanorods via a one-step process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v.296, pp.92–96, 2007.

TODESCHINI, L.C. **síntese de nanopartículas de prata para o desenvolvimento de membranas biocompósitas de poli(l-ácido láctico) com propriedades antibacterianas para aplicação em tratamentos por regeneração tecidual guiada**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2015.

VILAIN, C.; GOETTMANN, F.; MOORES, A.; LE FLOCH, P.; SANCHEZ, C. Study of metal nanoparticles stabilised by mixed ligand shell: a striking blue shift of the surface-plasmon band evidencing the formation of Janus nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, pp. 3509-3514, 2007.

WAGNER, T.W.; LUO, Y.; REDEKER, N.D.; IMMOOS, C.E.; ZHANG, S. Effect of surface-modified zinc oxide nanowires on solution crystallization kinetics of poly(3-hexylthiophene). **Polymer**, v.55, pp.2008-2013, 2014.

WIGGS, R.B.; LOBPRISE, H.; MITCHELL, P.Q. Oral and periodontal tissue. Maintenance, Augmentation, Rejuvenation, and Regeneration. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.28, pp.1165-188, 1998.

WRIGHT, J. B.; LAM, k.; BURRELL, E. R. Wound Management in an Era of Increasing Bacterial Antibiotic Resistance: A role for Topical Silver Treatment. **American Journal of Infection Control**, v 26, pp.572-577, 1998.

YAMAGATA, Y.; MISAKI, M.; KUROKAWA, T.; TAIRA, K.; TAKADA, S. Preparation of a copoly (dl-lactic/glycolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules containing recombinant human growth hormone. **International Journal of Pharmaceutics**, v.251, pp.133-141, 2003.

ZHANG, L.; ZHONG, M.; G.E.H. Surface Modification of Zinc Oxide Nanorods for Potential Applications in Organic Materials. **Applied Surface Science**, v.258, pp.1551– 1554, 2011a.

ZHANG, S.; MAJEWSKI, P.W.; KESKAR, G.; PFEFFERLE, L.D.; OSUJI, C.O. Lyotropic self-assembly of high-aspect-ratio semiconductor nanowires of single-crystal ZnO. **Langmuir**, v.27, pp.11616–11621, 2011b.

ZHANG, Y.; GAO, X.; ZHI, L.; LIU, X.; JIANG, W.; SUN, Y.; YANG, J. The Synergetic antibacterial activity of ag islands on ZnO (Ag/ZnO) heterostructure

nanoparticles and its mode of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 130, pp.74-83, 2014.

ZOU, W.; ZHU, J.; SUN, Y.; WANG, X. Depositing ZnO nanoparticles onto graphene in a polyol system. **Materials Chemistry and Physics**, v.125, pp.617-620, 2011.