



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI

ANA KARINA MARQUES FORTES LUSTOSA

Desenvolvimento de géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro fitalada ou natural para aplicação como agente antimicrobiano e cicatrizante

Ana Karina Marques Fortes Lustosa

Desenvolvimento de géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro fitalada ou natural para aplicação como agente antimicrobiano e cicatrizante

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia do Ponto Focal Piauí (RENORBIO/UFPI), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

L972d Lustosa, Ana Karina Marques Fortes.

Desenvolvimento de géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro fitalada ou natural para aplicação como agente antimicrobiano e cicatrizante / Ana Karina Marques Fortes Lustosa. – 2017.

70 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Teresina, 2017.

“Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.”

“Co-orientação: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Meneses Oliveira.”

1. Nanotecnologia - Medicamento. 2. Nanopartículas de prata.
3. Goma de cajueiro - Atividade antimicrobiana. 4. Goma de cajueiro – Propriedades cicatrizantes. I. Título.

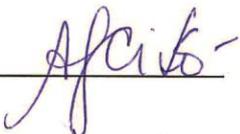
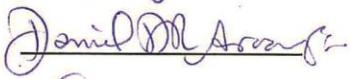
CDD 615.315 654

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: ANA KARINA MARQUES FORTES LUSTOSA

TÍTULO DO PROJETO: "Desenvolvimento de géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro fitalada ou natural para aplicação como agente antimicrobiano e cicatrizante".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, UFPI (Coorientadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva, UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo – UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 02 de maio de 2017.

HORÁRIO: 15h

LOCAL: Auditório do Curso de Farmácia/UFPI.

Dedico aos meus pais, Assis Lustosa (in memorian) e Graça Lustosa, que me ensinaram o valor de uma saudade. Ao meu marido, Luiz Fortes, meu porto seguro e ponto de equilíbrio, sempre me dando forças, a Dr^a Virgínia por ser para mim como uma segunda mãe, a Virgínia (in memorian) e Ana Valéria por serem exemplos de vida e as minhas filhas pelo simples fato de existirem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte infinita de amor, pela providência divina, pelo livre arbítrio, por ter me dado tudo e todos que estão na minha vida.

A Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses, por ter me recebido como sua filha, aberto as portas do seu laboratório e ter aceitado a coorientação deste projeto de ser doutora.

A Prof^a. Dra. Durcilene Silva por seu jeito calmo, seguro, firme, por ter me acolhido, confiado em mim e me orientado nos momentos de agonia mesmo eu estando a quilômetros de distância.

Ao Prof. Dr. José Roberto Leite pelo incentivo, pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos e por contribuir de forma direta para o meu crescimento profissional.

Ao prof. Dr. André Menezes pela parceria, pela amizade, pelo respeito, pelo tempo que generosamente dividiu comigo, pela sua ética inquestionável e procedimentos retos.

Ao meu pai (in memorian) por todas as lembranças que deixou e pela certeza que tenho que jamais poderia ter tido um pai melhor. Muitas saudades.

A minha mãe pelo amor incondicional e por toda a disponibilidade em cuidar da família que construí.

Ao meu marido, Luiz Fortes, por ser meu ponto de equilíbrio, me completar e nunca me deixar sozinha me incentivando e sempre olhando além do que eu posso ver.

A Amanda, Virgínia e Ana Vitória, filhas geradas ou de coração, que sempre me ajudaram a ser uma pessoa melhor para o mundo, para mim e para os outros. Obrigada por todas as alegrias e pelo amor compartilhado. Vocês são meu maior orgulho.

A Dra. Virgínia Castelo Branco por ser minha segunda mãe e me tratar como filha, sempre disponível a ouvir, ajudar, incentivar. Por ter sempre acreditado em mim.

A Virgínia Fortes (*in memoriam*) que mesmo ausente fisicamente está sempre presente em minhas lembranças, pelos seus ensinamentos que fazem parte da minha conduta e que ajudaram a me tornar quem sou.

À Carlinha Nere peça fundamental de todo este projeto.

À minha tão cara amiga, Profa. Dra. Francilene Vieira, por ser uma das melhores pessoas que este mundo teve a sorte de acolher.

Ao amigo Dr. Patrick Quelemes, por quem tenho um imenso respeito. Pela sua disponibilidade, dedicação, paciência, compreensão, doando seu tempo, seus conhecimentos e sua disponibilidade em ajudar. Sem ele boa parte deste trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Daniel Arcanjo por ser um grande amigo sempre disposto a ajudar.

Aos meus irmãos e demais familiares pelo amor e carinho, e por compreenderem a minha ausência em muitas reuniões da família.

Aos amigos do NPPM, Irisdalva Oliveira, Hélio Barros, Suylane Sobral que arregaçaram as mangas pra fazer com que este projeto se tornasse realidade.

Aos amigos do BIOTEC, que sempre me receberam para realização dos meus experimentos.

A Farmácia escola, em especial ao Professor André Meneses e ao Sean Telles pela contribuição.

A Farmácia Galeno, em especial Dra. Virgínia Fortes, por permitir a fabricação das minhas formulações.

Aos companheiros de jornada, Verônica Rodrigues, Ioneide Duarte e Ana Paula Santos Silva sempre disponíveis me ajudaram nos experimentos.

Aos amigos que conheci durante este período.

À Universidade Federal do Piauí – UFPI pelo apoio;

Ao Núcleo de Plantas Medicinal – NPPM pela realização dos testes em animais.

À Rede de Nanotecnologia do Nordeste- RENORBIO pelo apoio para realização deste doutorado.

À Universidade Federal do Ceará - UFC ao Grupo de Polímeros em especial a Dra. Natália Pires pelas análises de Análise Reológica

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto- FCUP pela realização das Análises de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).

Ao Instituto de Investigação e Inovação em Saúde do Porto - I3S- pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

LUSTOSA, A.K. M. F. **Desenvolvimento de géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro ftalada ou natural para aplicação como agente antimicrobiano e cicatrizante.** Tese (Doutorado em Biotecnologia). 69 f.; Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. RENORBIO/UFPI, 2017

RESUMO

Com o advento da nanotecnologia, as nanopartículas de prata (AgNPs) vêm se destacando por suas inúmeras propriedades no campo da óptica, catálise e especialmente, devido às suas propriedades antimicrobianas e cicatrizantes. Tais nanopartículas vêm sendo sintetizadas pelos mais diferentes tipos de rotas, podendo ser utilizados produtos naturais, como as gomas exsudadas, como agente estabilizante da solução coloidal. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver géis formulados com nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas *in situ* em hidrogel de carboximetilcelulose (CMC) contendo goma de cajueiro natural (NCG) ou goma de cajueiro ftalada (PhCG) e avaliar suas atividades antibacterianas e cicatrizantes. Primeiramente, a goma de cajueiro isolada sofreu uma reação com anidrido ftálico sendo que a modificação na estrutura da goma foi confirmada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As AgNPs foram preparadas *in situ* durante a fabricação do hidrogel contendo CMC e glicerina, utilizando como agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄), na razão molar de 1:6 em relação ao nitrato de prata. Deste modo, foram produzidos um hidrogel contendo AgNPs com goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e outro contendo AgNPs com goma de cajueiro modificada (PhCG-AgNPs). Um gel sem a presença de prata e goma de cajueiro, para servir de controle (base do hidrogel), também foi confeccionado. O estudo reológico caracterizou os géis como não newtonianos e pseudoplásticos. Para caracterização das AgNPs utilizou-se: espectroscopia de UV-vis em que a banda máxima para NCG-AgNPs e PhCG-AgNPs foi de 408 e 404 nm, respectivamente; Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) onde os compósitos apresentaram tamanho médio 119,7±5 e concentração de 6,36 x 10¹⁰ partículas/mL (NCG-AgNPs) e tamanho médio 123,8±8,9 nm com concentração de 4,03 x 10¹⁰ partículas/mL (PhCG-AgNPs); Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que determinou a morfologia das AgNPs nos hidrogéis formados, observando-se a formação de AgNPs triangulares, duplos triângulos e hexágonos para NCG-AgNPs além de nanos esféricas, quadradas e agregados de esferas irregulares para PhCG-AgNPs; e espectroscopia por energia dispersiva (EDS) que confirmou a presença da prata e a formação das nanopartículas. Para estudar o efeito antimicrobiano dos hidrogéis foi utilizado o teste de contato direto e a determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM) sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Constatou-se excelente atividade antimicrobiana pela observação de inibição de crescimento bacteriano sob ambos os géis, inclusive com formação de halos de inibição, além de reduzidos valores de CIM e CBM. Por exemplo, o gel de PhCG-AgNPs sobre *P. aeruginosa* promoveu uma CBM de 0,84 µgAg/mL. Para a avaliação da atividade cicatrizante, foi utilizado um modelo de ferida cirúrgica em dorso de ratos, sob as quais foram aplicados os hidrogéis com

NCG-AgNPs ou PhCG-AgNPs um gel de CMC e glicerina foi utilizado como controle. Foram realizadas medidas do ferimento (altura e largura) no 0°, 4°, 7° e 14° dias. A formulação com PhCG-AgNPs mostrou significativo efeito cicatrizante no 4°, 7° e 14° dias. Já a formulação com NCG-AgNPs promoveu uma tendência à cicatrização no 4° dia e um resultado significativo em relação ao grupo controle no 7° dia. As caracterizações dos hidrogéis produzidos com AgNPs sintetizadas *in situ* atestaram a eficiência desta rota de síntese. Os hidrogéis com AgNPs promoveram excelente atividade antibacteriana além de apresentarem potencial efeito cicatrizante.

Palavras-chave: Goma de cajueiro fialada. Síntese *in situ*. Nanopartículas de prata. Atividade antimicrobiana. Cicatrização.

LUSTOSA, A.K.M.L. **Development of gels formulated with silver nanoparticles synthesized in situ containing phthalated or natural cashew gum for application as an antimicrobial and healing agent.** Thesis (Doctoral in Biotechnology). 69 f.; Post-graduate Program in Biotechnology. RENORBIO/UFPI, 2017

ABSTRACT

With the advent nanotechnology, silver nanoparticles (AgNPs) have been highlighted due to their innumerable properties in the fields of optics, catalysis and specially, due to their antimicrobial and healing properties. Such nanoparticles have been synthesized in the most diverse ways, using natural products as raw materials, like exuded gums as colloidal solution's stabilizing agent. Therefore, the aim of this work was to develop gels formulated with silver nanoparticles (AgNPs) synthesized *in situ* in carboxymethylcellulose hydrogel containing natural cashew gum (NCG) or cashew phthalated gum (PhCG) and to evaluate its antimicrobial and healing activities. Firstly, isolated cashew gum reacted with phthalic anhydride with modifications on the structure being confirmed by Fourier Transform Infrared (FTIR). The AgNPs were prepared *in situ* during the hidrogel's production containing CMC and glycerin, having sodium borohydride (NaBH₄) as a reducing agent, on the molar ratio of 1:6 in relation to the silver nitrate. Thus, a hydrogel containing AgNPs with natural cashew gum (NCG-AgNPs) and another one containing AgNPs with modified cashew gum (PhCG-AgNPs) were produced. One without silver and cashew gum, serving as control (hydrogen base), was also made. The rheology study characterized the gels as non-newtonian and pseudoplastic. For the AgNPs characterization, a UV-vis spectroscopy was used in which the maximum band for NCG-AgNPs and PhCG-AgNPs was of 408 and 404 nm respectively; Nanoparticle Tracing Anslsysis (NTA) in which the compounds exhibited medium size of 119,7±5 nm and concentration of 6,36 x 10¹⁰ particles/mL (NCG-AgNPs) and medium size of 123,8±8,9 nm and concentrarion of 4,03 x 10¹⁰ particles/mL (PhCG-AgNPs); Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to determine the AgNPs morphology within the hydrogels, which exhibited triangular formations, double triangles and hexagons for NCG-AgNPs and nano spherical, square and aggregated irregular spheres for PhCG-AgNPs; and energy dispersive spectroscopy (EDS) which confirmed the presence of silver and the formation of nanoparticles. To study the antimicrobial effect of the hydrogels, the direct contact method was used and the measure of the minimal inhibitory and minimal bactericide concentrations (MIC and MBC) on the *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were determined. Excellent antimicrobial activity was found by observing growth inhibition on both gels, with the formation of inhibition halos, in addition to reduced values of MIC and MBC. For instance, the PhCG-AgNPs gel exhibited a MBC of 0,84 µgAg/mL. For the evaluation of the healing activity, the rat surgical wound model was used. The NCG-AgNPs and PhCG-AgNPs hydrogels were applied on the wounds. A CMC and glycerin gel was used as control. Wound measure procedures were performed (height and width) on the 0^o, 4th, 7th and 14th days. The formulation with PhCG-AgNPs showed significant healing effect on the

4th, 7th and 14th days. On the other hand, the oformulation with NCG-AgNPs exhibited a tendency for healing on the 4th day and a significant result in relation to the control group on the 7th day. The characterization of the hydrogels produced with AgNPs synthetized *in situ* attested the efficiency of this synthesis pathway. The hydrogels with AgNPs showed excellent antibacterial activity besides exhibiting potential healing effect.

Keywords: Cashew phthalated gum; *in situ* synthesis; silver nanoparticles; antimicrobial activity; healing.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Área de Contração
ADBI	Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
AF	Anidrido Ftálico
Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata (Do termo em inglês: <i>silver nanoparticles</i>)
ANOVA	Análise de Variância
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG	Goma do cajueiro
CLSI	Clinical and Laboratorial Standard Institute
CMC	Carboximetilcelulose
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMF	N,N-dimethylformamida
DRX	Difração de Raio-x
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva
EDX	Espectroscopia de Raio-x
FDA	Food and Drugs Administration
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
FP	Fatores Plaquetário
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
NCG	Goma de Cajueiro Natural
NCG-AgNPs	Hidrogel com Nanopartículas de Prata e Goma de Cajueiro Natural
NINTEC	Núcleo de Inovações Tecnológicas

NO	Óxido Nítrico
NPs	Nanopartículas
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas
P. aeruginosa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PhCG	Goma ftalada
PhCG-AgNPs	Hidrogel com Nanopartículas de Prata e Goma de Cajueiro Ftalada
RNA	Ácido ribonucleico
RTA	Reflectância Total Atenuada
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TG	Termogravimetria
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
UV	Ultravioleta
Uv-vis	Uv- visível

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 01 - Síntese de nanopartículas pelos métodos <i>bottom up</i> (a) e <i>top down</i> (b).	25
Figura 02 - Síntese de Nanopartículas de Prata.....	27
Figura 03 - Estrutura da goma de cajueiro. GAL (galactose); GLI (glicose); ÁC. GLIC (ácido glicurônico). R representa: D-manose, D-xilose, L-raminose ou L-arabinose. R'' representa: D-glicose ou ácido D-glicurônico (adaptada de Anderson e Bell, 1975).	28
Figura 04 - Esquema de produção de nanoprtículas de prata <i>in situ</i> e sua caracterização ..	30
Figura 05 - Métodos utilizados para caracterização das nanopartículas de prata.	31
Figura 06 - Espectro do FTIR da goma ftalada (PhCG).....	40
Figura 07 - Esquema simplificado da formação de AgNPs <i>in situ</i> em gel de CMC.	4
Figura 08 - Espectro UV-vis dos hidrogéis com AgNPs.....	42
Figura 9 - Análise do tamanho e concentração de AgNPs por rastreamento (NTA). A. NCG-AgNPs (Média: 119,7±5,1 nm e moda: 86,4±4,7 nm, 6,36 x 10 ¹⁰ partículas/mL). B. PhCG-AgNPs (Média: 123,8±8,9 nm e moda: 103,1±18.8 nm, 4,03 x 10 ¹⁰ partículas/mL).....	43
Figura 10 - Imagens representativas por MET de AgNPs. A. NCG-AgNPs. e B. PhCG-AgNPs. Aumento de 100000×. Espectroscopia de dispersão de energia de raios X (EDS) das AgNPs contidas na análise da MET. C. NCG-AgNPs e D. PhCG-AgNPs	44
Figura 11 - Análise reológica dos hidrogéis com AgNPs. A. Viscosidade e B. Estresse de cisalhamento	45
Figure 12 - Efeito antibacteriano do contato direto de hidrogéis de NGC-AgNPs (A e C) e PhGC-AgNPs (B e D), com presença de halos de inibição (setas).....	46
Figura 13 - Relação entre o tempo de ação dos hidrogéis (dias) NCC-AgNPs (A) and PhCG-AgNPs (B) sobre a área do ferimento em ratos * p<0.05 estatisticamente significativo.	48
Figure 14 - Imagens representativas do processo de cicatrização promovida pelos hidrogéis com AgNPs em ferimentos no dorso de ratos.	49
Tabela 01 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bacericida mínima (CBM) de hidrogéis de NGC-AgNPs e PhGC-AgNPs.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.1 Objetivos Específicos	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Nanotecnologia	22
3.2 Nanopartículas de prata	23
3.3 Síntese de nanopartículas de prata	24
3.4 Gomas naturais como agentes estabilizantes de Nanopartículas de prata	27
3.5 Síntese de Nanopartículas de prata <i>in situ</i>	29
3.6 Caracterização das nanopartículas de prata	30
3.7 Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata	31
3.8 Uso de nanopartículas de prata para cicatrização de feridas	33
4 METODOLOGIA	35
4.1 Isolamento da goma de cajueiro	35
4.2 Modificação da goma de cajueiro	35
4.2.1 Caracterização da goma ftalada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR	35
4.3 Síntese <i>in situ</i> de nanopartículas de prata em hidrogel de carboximetilcelulose (CMC)	35
4.4 Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNPs)	36
4.4.1 Análise dos Hidrogéis por espectrofotometria de Uv-vis	36
4.4.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	36
4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	37
4.4.4 Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)	37
4.5 Análise reológica dos hidrogéis	37
4.6 Avaliação do efeito antimicrobiano dos hidrogéis com AgNPs	37
4.6.1 Crescimento bacteriano e condições de cultura	37
4.6.2 Avaliação do Efeito Antibacteriano por Teste de Contato Direto	38
4.6.3 Determinação das Concentrações Inibitórias (CIM) e Bactericidas (CBM) mínimas	38
4.7 Avaliação da atividade cicatrizante dos hidrogéis com AgNPs	38
4.7.1 Análise estatística	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Caracterização da goma de cajueiro ftalada (PhCG) por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR	40
5.2 Fabricação dos hidrogéis de carboximetilcelulose (CMC) contendo goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e ftalada (PhCG-AgNPs)	41
5.3 Caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas <i>in situ</i>	41
5.3.1. Espectroscopia de UV-Vis	41
5.3.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	42
5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).....	43
5.4 Análise reológica dos hidrogéis	44
5.5 Efeito antimicrobiano dos hidrogéis com AgNPs	45
5.6 Efeito cicatrizante dos hidrogéis com AgNPs	48
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	67
Reinvidicação de Patente Depositada.....	68

1 INTRODUÇÃO

Historicamente a prata tem sido utilizada para os mais diferentes fins, sendo considerada superior a outros metais em muitos campos (AHMED et al., 2016). O desenvolvimento de dispositivos biotecnológicos contendo prata se dá, dentre outras coisas, pela sua eficiência no tratamento de feridas, queimaduras, infecções, e uso em materiais médico-hospitalares, agindo contra um grande espectro de patógenos (RAI; YADAV; GADE, 2009). Embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido, existe uma eficácia bem estabelecida quanto ao seu uso (KENDALL; KENDALL; REHFELDT, 2011; NAM et al., 2015). Levando em consideração que a cada dia o arsenal de medicamentos vem sendo limitado em virtude da capacidade das bactérias patogênicas de resistir a agentes antibacterianos, o desenvolvimento de novos produtos traz a necessidade de outras formas de apresentação da prata como agente antimicrobiano (HANH et al., 2016; HUH; KNOW, 2011).

Avanços na nanotecnologia nos permitem produzir prata pura, na forma de nanopartículas, definidas como dispersões com um tamanho entre 1-100 nm (KEAT et al., 2015) que são mais eficientes do que os íons de prata (LARA et al., 2010). Podem ser dissolvidos em um ambiente líquido que impede a sua aglomeração ou em uma matriz que usa sistemas de suporte de fármaco especiais, como no caso da fabricação de nanopartículas *in situ* que utiliza polímeros como agentes estabilizantes e que apresentam características interessantes para pesquisa como microbicidas sem falar na sua melhor eficácia em pequenas doses, menor toxicidade e menos efeitos colaterais (LARA et al., 2011; MISRA et al., 2011).

O potencial das nanopartículas de prata associadas aos géis que são tradicionalmente utilizados no tratamento de feridas tem sido bastante investigado (THOMAS et al., 2011; YANG et al., 2011; PRUSTY e PARIDA, 2015). A carboximetilcelulose, por exemplo, é um polímero que forma um hidrogel amorfo e tridimensional bastante apropriados para a produção *in situ* de nanopartículas do que a maioria dos sistemas aquosos (DAS et al., 2015). As nanopartículas podem ser incorporadas na matriz do hidrogel apenas sendo misturadas com o gel pré-formado ou adicionadas durante o processo de gelificação (HEBEISH et al., 2013). Esses hidrogéis podem servir como um reservatório para liberação sustentada de íons de prata além de manter um ambiente úmido para auxiliar na cicatrização de feridas (DAS et al., 2015).

Baseado na potencialidade de associar metais aos polímeros, a goma de cajueiro (GC), que é um heteropolissacarídeo, abundante na Região Nordeste do Brasil, com histórico como

agente anti-inflamatório e cicatrizante (SCHIRATO et al., 2006), agente antibacteriano (CAMPOS et al.; 2013) e imunomodulador (YAMASSAKI et al., 2015), foi associado á carboximetilcelulose com intuito de promover propriedades sinérgicas quanto aos resultados.

Algumas modificações na estrutura química foram realizadas com a goma do cajueiro com objetivo de se obter características diferenciadas e novas propriedades, podendo destacar as reações de carboximetilação (SILVA et al., 2006); oxidação (CUNHA et al., 2007), sulfatação (MOURA NETO et al., 2011), acetilação (PITOMBEIRA et al., 2015) e quaternização (QUELEMES et al., 2017).

O presente trabalho tem como objetivos desenvolver géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro natural (NCG) ou goma de cajueiro ftalada (PhCG) e avaliar suas atividades antibacterianas e cicatrizantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver géis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro natural (NCG) ou goma de cajueiro ftalada (PhCG) e avaliar suas atividades antibacterianas e cicatrizantes.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Promover a modificação química da goma de cajueiro utilizando anidrido ftálico;
- ✓ Desenvolver géis com nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro ftalada ou natural;
- ✓ Confirmar a formação das AgNPs nos géis pelas seguintes técnicas de caracterização: Espectroscopia de Uv-vis, Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia por Energia Despersiva (EDS).
- ✓ Realizar reologia dos géis com nanopartículas de prata estabilizadas com goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e com goma de cajueiro ftalada (PhCG-AgNPs);
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos géis com nanopartículas de prata estabilizadas com goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e com goma de cajueiro ftalada (PhCG-AgNPs);
- ✓ Avaliar a atividade cicatrizante *in vivo* dos géis com nanopartículas de prata estabilizadas com goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e com goma de cajueiro ftalada (PhCG-AgNPs);

4 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nanotecnologia

A palavra “nano” vem do latim “*nanus*” e é utilizada para denominar estruturas de dimensões nanométricas. O termo “nanotecnologia” surgiu em 1974, quando Nori Taniguchi, em uma apresentação intitulada “*On the Basic Concept of Nano-Technology*”, propôs um novo campo em escala submicrométrica, definindo a “nanotecnologia como um processo de separação, consolidação e deformação dos materiais átomo por átomo ou molécula por molécula” (SHEW, 2016). Atualmente não há uma definição padronizada para o termo, porém uma definição abrangente, simples e aplicável para as ciências naturais e da saúde, define a nanotecnologia como o entendimento e o controle da matéria em dimensões ente 1 a 100 nm (FDA, 2014).

A “nanomedicina”, naturalmente, tem seu conceito derivado da nanotecnologia, podendo ser definida como a ciência e tecnologia usada no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, no alívio da dor, na preservação e melhoramento da saúde humana, usando ferramentas e conhecimentos moleculares (HOFMANN-AMTENBRINK et al., 2014). No entanto, mais importante do que o conceito, a nanomedicina é um campo que tem atraído a atenção de pesquisadores, agências reguladoras de saúde e do público por traduzir à pesquisa básica nanotecnológica em aplicações clínicas, especialmente, ao gerar produtos mais seguros e eficazes quando comparados com os disponíveis no mercado (SATALKAR; ELGER; SHAW, 2015).

Tratando-se dos sistemas de liberação de fármaco, a redução para escala nanométrica, produz um grande impacto nas características físicas e físico-químicas desses sistemas (OTTO; DE VILLIERS, 2009), podendo: melhorar a solubilidade de fármacos, conseqüentemente, sua dissolução e biodisponibilidade (MERISKO-LIVERSIDGE, 2015); diminuir a dosagem do fármaco, reduzindo também seus efeitos tóxicos (XU et al., 2015); otimizar a reologia de formulações líquidas e semi-sólidas (CHAYKAR; GOHARPEY; YEGANEH, 2016); promover maior penetração transdérmica de fármacos veiculados em formulações tópicas (AL-KASSAS et al., 2016).

Os polímeros, tanto naturais como sintéticos, despontam como peças básicas para o desenvolvimento farmacotécnico de nanoformulações, como nanopartículas, nanoemulsões, nanogéis, nanocápsulas, nanofibras, nanotubos (TANG et al., 2015). Em particular, esses polímeros são fundamentais para o desenvolvimento de sistemas sítio-específicos,

possibilitando por exemplo a liberação do fármaco dependente do pH (DONG et al., 2016); da temperatura (ABREU et al., 2016); de um agente etiológico, como *Helicobacter pylori* (LIN et al., 2013), ou de uma parte específica de um órgão, como o cólon (LU; CHEN; QIU, 2016).

Tem-se desenhado um panorama mundial com o crescimento cada vez maior e com maiores investimentos em pesquisas que envolvem estudos com nanomateriais. Na última década a produção científica relacionada à nanociência mais que triplicou. O Brasil tem avançado consistentemente no desenvolvimento de ações estando entre os 25 primeiros no *ranking* geral de produção científica e na 20ª posição em termos do número de trabalhos científicos publicados e indexados (ABDI, 2010). A nanotecnologia representa, portanto, uma nova revolução para todas as áreas da ciência.

3.2 Nanopartículas de prata

Shankar (2016) afirma que as nanopartículas são o alicerce fundamental da nanotecnologia em virtude delas possuírem as mais variadas aplicações nos campos da física, química, eletrônica, óptica, ciências de materiais, robótica e ciências biomédicas. Existem diferentes tipos de nanopartículas como ouro, prata, cobre, ferro, platina, zircônio, titânio e paládio. Entre todas estas, as nanopartículas de prata e de ouro são as mais encontradas na literatura (AHMAD et al., 2015; CATAURO et al., 2004; KORRAPATI et al., 2016; SHANKAR et al., 2016).

As nanopartículas destes metais possuem propriedades magnéticas, ópticas, eletrônicas e catalíticas diferentes do material que as originou devido a sua maior área superficial em relação ao volume. As nanopartículas metálicas, como ouro e prata, mostram cores diferentes devido ao fenômeno de ressonância plasmática, que é uma oscilação de elétrons livres destas nanopartículas em ressonância com a frequência da luz mostrando bandas plasmáticas que podem está entre 390- 420nm, se observada na região do Ultra violeta-visível (UV-vis) e infravermelho (FIRDHOUSE; LALITHA, 2015).

As nanopartículas de prata despertam um particular interesse pela sua estabilidade química, boa condutividade, grande área superficial e propriedades biológicas ímpares. Atualmente são utilizadas em mais de 200 produtos de consumo incluindo roupas, medicamentos e cosméticos (AHMED et al., 2016). Tem sua aplicação consagrada na fabricação de biossensores (NAM et al., 2015), agentes cicatrizantes de feridas (KIRUBA et al., 2010), na implantação de cateteres para reduzir infecções (CRABTREE et al., 2003), fabricação de sondas de peptídeos (ANANTH et al., 2011), terapia contra o câncer (KAJANI

et al., 2014) e utilização de testes de diagnósticos extremamente sensíveis (HAINFELD et al., 2014). São amplamente utilizadas na engenharia de tecidos (MCGILLICUDDY et al., 2016), para sanitização de embalagens (BERNI NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTO, 2008), fabricação de sensores químicos (TAN et al., 2004), dispositivos ópticos (SCHMIDL et al., 2015; TAN et al., 2004), produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (KOKURA et al., 2010), na medicina, usado no segmento de imagens diagnósticas (CORMODE et al., 2010), como antifúngicos (TUTAJ et al., 2016), detecção da entacaona dos fármacos antiparkisonianos (BAGHAYERI et al., 2016), como modelo de entrega de fármacos (LIU et al., 2008; NAYAK et al., 2016) e agente antimicrobiano (DURÁN et al., 2016).

Devido às nanopartículas serem muito pequenas e termodinamicamente instáveis, torna-se necessário estabilizá-las mediante adição de estabilizantes. A estabilização eletrostática ocorre através de espécies carregadas, como cátions e ânions, que se adsorvem à superfície das nanopartículas. Já a estabilização estérica, ocorre através do uso de grupos volumosos (AIKEN; FINKE, 1999). Além disso, a escolha adequada do material de proteção também pode fornecer uma barreira para neutralizar a atração entre as nanopartículas, devido à interação das forças de van der Waals (FONSECA; SOUZA, 2002), evitando que as mesmas se aglomerem.

Diante disso, diversos métodos têm sido sugeridos para a síntese das nanopartículas de prata como método químico (SUN et al., 2014), baseado na redução química de sais de prata; métodos físicos (JIANG et al., 2012; KIM et al., 2007), eletroquímicos (BOLDYREV, 2002), fotoquímicos (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015) e recentemente métodos biológicos (AHMED et al., 2016). A síntese de nanopartículas de prata pelo método biológico pode utilizar microorganismos (SUNKAR; NACHIYAR, 2012), enzimas (SCHNEIDEWIND et al., 2012), extrato de plantas (MOHANPURIA; RANA, 2008), gomas (RASTOGI et al., 2014), dentre outros.

3.3 Síntese de nanopartículas de prata

Os processos de síntese, caracterização, produção e aplicações ganham cada vez mais espaço e esforços diferenciados a fim de produzir nanopartículas de prata com novas funções e propriedades reforçadas, sendo de primordial importância que sejam facilmente produzidas e de baixo custo. E que a síntese seja eficiente, e que tenha uma potencial aplicação com o mínimo de efeitos tóxicos (AHMED et al., 2016; CONTE et al., 2016).

De uma forma geral, as nanopartículas podem ser obtidas através de duas abordagens: *bottom up* e *top down* (**Figura 01**). Na abordagem *bottom up*, as nanopartículas podem ser sintetizadas usando rotas químicas e biológicas em que, através do controle do comportamento intramolecular de moléculas ou estruturas desenhadas e/ou sintetizadas, essa manipulação dos átomos ou das moléculas permita formar nanoestruturas. Neste processo há formação de novos núcleos que crescem em uma partícula em escala nano, enquanto que a abordagem *top down*, padrões a partir de partes maiores, são criados, ou seja, o metal é decomposto em finas partículas por redução de tamanho por técnicas litográficas como, por exemplo, nas rotas físicas que incluem trituração, moagem por esferas, pulverização catódica, decomposição térmica e ablação térmica e a laser (CHO; CHOO; JOO, 2005; KEAT et al, 2015; KELSALL; HAMLEY; GEOGHEGAN, 2005; MOHANPURIA; RANA, 2008)

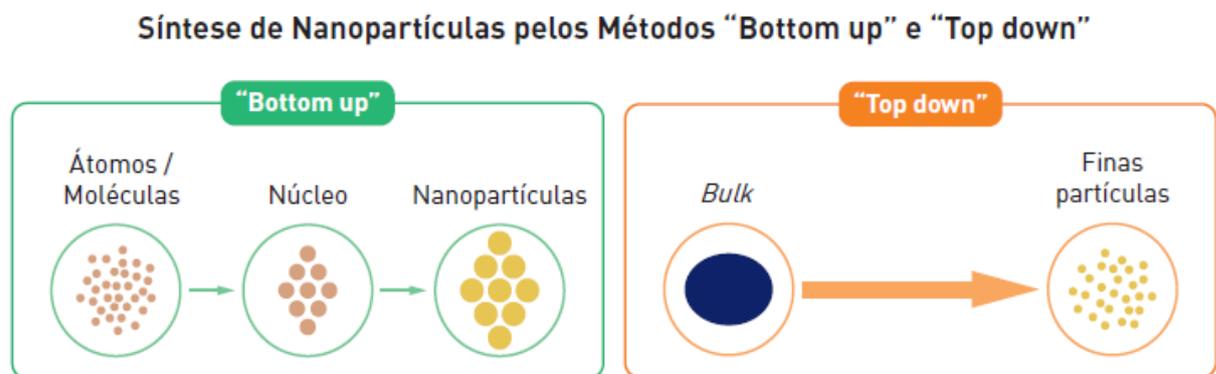


Figura 01- Síntese de nanopartículas pelos métodos *bottom up* (a) e *top down* (b).

Pela síntese física as nanopartículas de prata são formadas por evaporação ou condensação, em busca de um melhor desempenho, menor gasto de energia e maior estabilidade. Novos métodos tem sido desenvolvidos como o de decomposição térmica para sintetizar nanopartículas em pó (VARADARAJAN, 2007), síntese de nanopartículas (NPs) usando aquecedor de cerâmica ou pelo método não convencional onde as Nanopartículas de Prata (AgNPs) são sintetizadas diretamente do metal por pulverização catódica (SHARANOVA et al., 2015).

A síntese biológica tem como objetivo prevenir os danos à natureza, minimizando ou eliminando o uso de substâncias perigosas para o meio ambiente, como solventes orgânicos; e possibilitando o uso dos princípios ativos em quantidades menores (ALEXANDER et al., 2016). Essa rota de obtenção tem crescido em maior escala se comparada às rotas química e física. Para síntese biológica, basicamente, só é necessário o uso do solvente, normalmente

água, do agente redutor e do agente estabilizador (AJITHA et al., 2016) e seu grande diferencial é o fato de não provocar contaminação no meio ambiente além de ser um processo rentável, que pode ser reproduzido em larga escala e não precisa utilizar altas temperaturas, pressão elevada ou grande gasto de energia (AHMED et al., 2016).

A síntese biológica pode ser realizada por várias rotas como exemplo, utilização de algas (SHANKAR et al., 2016), açúcares (MALLMANN et al., 2015), caules (SATHISHKUMAR et al., 2009), sementes (BONATTO; SILVA, 2014), gomas (VELUSAMY et al., 2015), rizomas (KAYALVIZHI; RAVIKUMAR; VENKATACHALAM, 2016) e extratos de plantas como *Rosmarinus officinalis* (GHAEDI et al., 2015), *Aloe vera* (TIPPAYAWAT et al., 2016), *Anacardium occidentale* (SHENY; MATHEW; PHILIP, 2011). A rota mediada por micróbios não tem viabilidade industrial devido à necessidade de condições altamente assépticas para sua manutenção. No entanto, o uso de plantas diminui os custos com isolamento dos microorganismos e meios de cultura (AHMED et al., 2016).

A síntese química normalmente utiliza apenas o metal precursor, o agente redutor e o agente estabilizante (MELO et al., 2012). O tipo de redutor utilizado depende fortemente da temperatura (LAI et al., 2014). Na indústria química vários reagentes são utilizados como citrato de sódio, N,N-dimethylformamide (DMF), ascorbato, dextrose, hidralazina e borohidreto de sódio – NaBH_4 (AHMED et al., 2016; KIM et al., 2007; TRAN; NGUYEN; LE, 2013). A redução de sais de prata com uso de borohidreto de sódio ou tetrahidro boreto de sódio tornou-se um dos métodos químicos mais utilizados devido a sua reatividade mais elevada e toxicidade mais baixa que o citrato de sódio e a hidralazina (HU; PFIRMAN; CHUMANOV, 2015).

A junção de polímeros naturais com metais, seja pelo método químico ou pela síntese verde, é considerada uma excelente alternativa porque origina partículas revestidas e biocompatíveis (ANANTH et al., 2011). Outras vantagens são biodegradabilidade, fácil aquisição e fonte renováveis (SCHIRATO et al., 2006). Vários polissacarídeos têm sido utilizados como carboximetil dextrano (CMD)(GLIŠIĆ et al., 2015), goma kondagogu (*Cochlospermum gossipium*) (KORA, A. J.; SASHIDHAR; ARUNACHALAM, 2010), quitosana (JIANG et al., 2012), amido (RAGHAVENDRA; JUNG; SEO, 2016) e goma de cajueiro (QUELEMES et al., 2013).

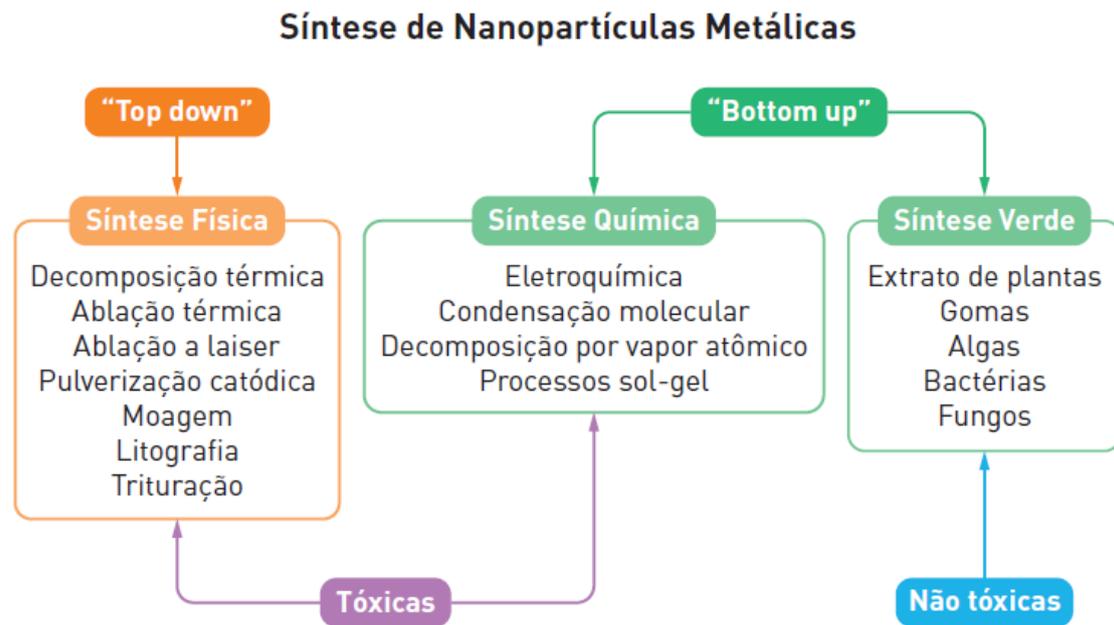


Figura 02- Síntese de Nanopartículas de Prata.

3.4 Gomas naturais como agentes estabilizantes de Nanopartículas de prata

As gomas naturais são classificadas como polissacarídeos que têm sido cada dia mais utilizado para a síntese de nanopartículas de prata devido à sua simplicidade de procedimentos, estabilidade e suas potenciais aplicações em sensores químicos, imagens diagnósticas, antimicrobianos, agentes cicatrizantes, silenciamento de genes (VELUSAMY et al., 2015). Vários estudos demonstram o uso destas gomas como agentes redutores e estabilizantes como, por exemplo, quitosana (COLLADO-GONZÁLEZ et al., 2017), goma olibanum (KORA, A. J.; SASHIDHAR; ARUNACHALAM, 2012), dextrana (REMYA et al., 2016), goma kondagogu (KORA, A. J.; SASHIDHAR; ARUNACHALAM, 2010), alga *Hypnea musciformes* (RONI et al., 2015), usadas para a biossíntese de nanopartículas de prata. As gomas à base de plantas são heteropolissacarídeo em que suas propriedades morfológicas, fisicoquímicas, térmicas, reológicas e emulsificantes têm sido bem estudados (PRAJAPATI et al., 2013).

Algumas propriedades como solubilidade em água e fácil disponibilidade; não toxicidade e propriedades de bioadsorção de metal incentiva o uso destas gomas como estabilizantes como é o caso da goma exsudada do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), complexo heteropolissacarídeo ramificado, exsudado naturalmente ou por incisões no tronco ou nos ramos das árvores, apresentando-se como uma resina de coloração amarelada

sulfatação (NETO et al., 2011), acetilação (DIAS et al., 2016) e mais recentemente quaternização (QUELEMES et al., 2017). Neste sentido este trabalho desenvolveu a modificação da goma do cajueiro natural (NCG) utilizando anidrido ftálico obtendo-se a goma de cajueiro ftalada (PhCG). As gomas NCG e PhCG foram utilizadas como agente estabilizante na fabricação *in situ* de nanopartículas de prata.

3.5 Síntese de Nanopartículas de prata *in situ*

A fabricação de nanopartículas de prata *in situ* (**Figura 04**) tem crescido bastante nos últimos anos, na tecnologia de ponta como por exemplo, na indústria de fibras têxteis (PIVEC et al., 2017) com intuito de obter produtos com acabamento antimicrobianos, sem toxicidade, mais eficientes e duráveis, onde a síntese *in situ* consome menos tempo, produtos químicos e energia (REHAN et al., 2017), na obtenção de materiais inteligentes como vidros bioativos (FERRARIS et al., 2017), na medicina, como metodologia inovadora, para detecção fluorimétrica de ácido ascórbico, contribuindo para desenvolvimento de biossensores (REZAEI; SHAHSHAHANIPOUR; ENSA, 2017) ou na criação de biomateriais curativos para feridas (SINGLA et al., 2017).

Para confecção de nanopartículas de prata *in situ* utilizando hidrogéis, que são polímeros tridimensionais que podem absorver uma grande quantidade de água, salina e soluções fisiológicas, é necessário a escolha do excipiente ou da matriz polimérica, o agente estabilizante e o agente redutor. As nanopartículas podem ser incorporadas na matriz do gel simplesmente misturando as NPs com o hidrogel pré-formado ou adicionado durante o processo de gelificação (HEBEISH, A.; SHAHEEN; EL-NAGGAR, 2016; YADOLLAHI; NAMAZI; AGHAZADEH, 2015).

A carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo derivado da celulose, aprovado pelo FDA, solúvel em água que forma um gel amorfo e tridimensional que é bastante apropriado para a produção *in situ* de nanopartículas do que a maioria dos sistemas aquosos sendo utilizada como matriz polimérica. Apresenta biocompatibilidade e baixo custo, sem falar que devido a sua origem vegetal é menos provável que provoque uma resposta imunológica comparado com os outros biomateriais de origem animal (BAO et al., 2014; VARMA et al., 2014).

Como agentes estabilizantes utilizou-se as gomas de cajueiro natural (NCG) e goma de cajueiro ftalada (PhCG). A utilização do polímero natural produz AgNPs biodegradáveis e biocompatíveis (QUELEMES et al., 2013). O agente redutor utilizado foi o borohidreto de

sódio (NaBH_4) que é um redutor forte e resulta em uma reação mais rápida de redução da prata Ag^+ em Ag^0 . Normalmente se utiliza a estequiometria da reação de 1:1 da Ag^+ em relação ao BH_4^- mas este deve-se ser adicionado em excesso porque o borohidreto extra permanece na solução ajudando a estabilizar as nanopartículas formadas, ao passo que começa a ser hidrolisado reduzindo assim o borohidreto disponível (GRIFFITH et al., 2015). Na fabricação das nanopartículas em questão o NaBH_4 foi utilizado na razão molar de 1:6 em relação a prata.

Para a caracterização dos géis, primeiramente, utiliza-se UV-vis que confirma o que visualmente pode ser observado, que é a mudança de um gel transparente para um tom que vai do amarelo citrino ao castanho claro (**Figura 04**). Outras técnicas que podem ser utilizadas são FTIR (Espectroscopia na Região do Infravermelho), TEM (Espectroscopia Magnética de Transmissão), EDS (Espectroscopia por Energia Dispersiva), Raio-X, DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial).

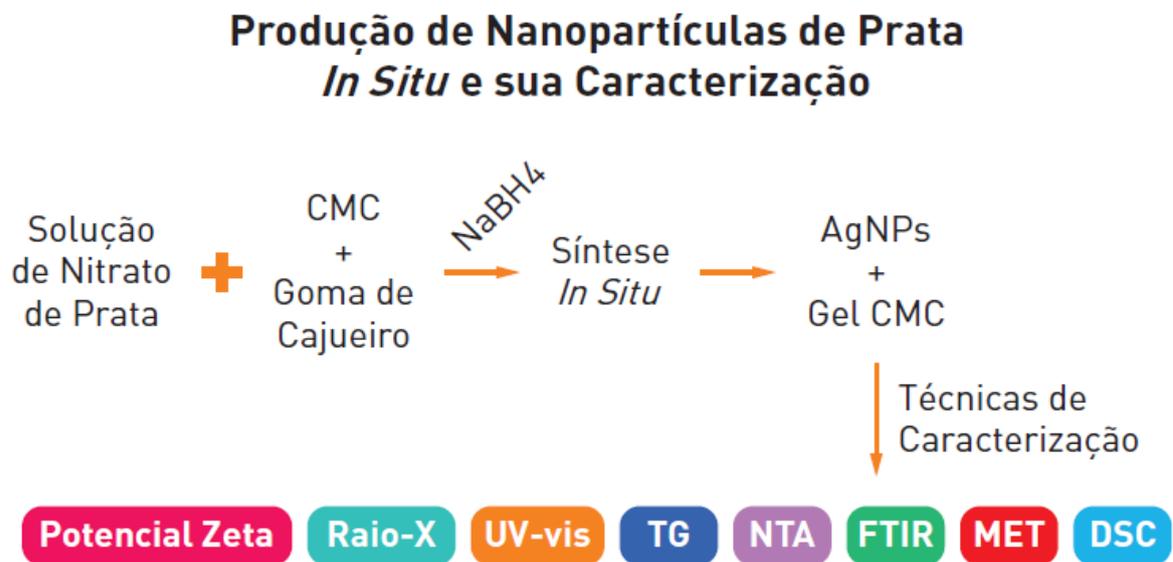


Figura 04- Esquema de produção de nanoprtículas de prata *in situ* e sua caracterização

3.6 Caracterização das nanopartículas de prata

A caracterização das nanopartículas de prata é importante para entender e controlar a síntese e as aplicações. Para isso várias técnicas são utilizadas com diferentes parâmetros (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015). A Espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis identifica a formação das AgNPs, o que se dá em virtude da banda plasmônica que normalmente encontra-se entre 390 e 420 nm. De acordo com a literatura, o

aumento no tamanho das NPs resulta em um deslocamento desta banda para regiões de maior comprimento de onda, o que pode identificar uma agregação das nanopartículas com perda das suas propriedades (SONG; KIM, 2009). O Potencial zeta determina o tamanho das partículas e a carga, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) analisam o tamanho e a forma das nanopartículas formada. A Espectroscopia de raio-x (EDX) e Difração de Raio-x (DRX) são utilizados para a identificação e confirmação da estrutura cristalina de nanopartículas de prata (GLIŠIĆ *et al.*, 2015). A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é utilizada pra obter espectros de absorção, emissão, fotocondutividade ou de difração de Raman de infravermelho das nanopartículas. O NTA (análise de rastreamento de nanopartículas), Calorimetria diferencial de exploração (DSC) e termogravimetria (TG) também são utilizadas (CAKIĆ *et al.*, 2016; KIRUBA *et al.*, 2010; MALLMANN *et al.*, 2015).



Figura 05. Métodos utilizados para caracterização das nanopartículas de prata.

3.7 Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata

O efeito antimicrobiano da prata é conhecido desde a antiguidade. Na década de 60 o nitrato de prata era utilizado na concentração de 0,5 % para tratamento de queimaduras por não interferir na proliferação epidérmica e possuírem propriedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em 1968, foi produzido um creme a base de sulfadizina de prata considerado como antimicrobiano de largo espectro usado para tratamento de queimaduras e com atividade contra *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* (CHOPRA, 2007).

Com a descoberta da penicilina o uso da prata diminuiu consideravelmente. Porém, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em virtude da necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA; HESSE; NEILL, 2002; HANH et al., 2016). Existe atualmente pesquisas de ponta que utilizam nanopartículas de prata em pesquisas *in vitro* contra células cancerígenas (JANG et al., 2016) e contra a transmissão do vírus do HIV (LARA et al., 2010). A Medicina tem demonstrado que a prata aniquila mais de 650 agentes patogênicos e não cria resistência (PETICA et al., 2008).

As propriedades antimicrobianas da prata estão relacionadas com a quantidade de prata no estado metálico e a taxa de prata liberada. A prata em seu estado metálico é inerte, contudo ao reagir com a umidade da pele e com os fluidos da ferida, fica ionizada. A prata ionizada é altamente reativa, uma vez que se liga a proteínas teciduais e traz mudanças estruturais na parede celular bacteriana e membrana nuclear levando a distorção celular e morte. A prata também se liga ao DNA e RNA bacteriana e inibe a replicação bacteriana (LANSDOWN, 2002; CASTELLANO et al, 2007).

Levando em conta todas as características e propriedades que a prata tem a sua utilização na forma de nanopartículas só vem agregar mais características e possibilidades. Segundo ANSARI (2011) as nanopartículas de prata possuem maior atividade antimicrobiana do que íons e sais de prata. Outros pontos importantes para a efetiva atividade antimicrobiana das AgNPs está relacionada ao método que as deu origem, a sua forma e ao seu tamanho (ETHIRAJ et al., 2016; PAL; TAK; SONG, 2015).

Uma relação inversa entre o tamanho da nanopartícula e a atividade antibacteriana tem sido demonstrada, onde AgNPs com tamanho variando de 1-10 nm tem mostrado maior atividade antibacteriana. Também é observada uma maior dificuldade das bactérias adquirirem resistência contra nanopartículas de prata, devido estas agirem sobre uma ampla variedade de alvos nesses microorganismos (PAL; TAK; SONG, 2015).

O mecanismo de ação das AgNps não está totalmente esclarecido. DURAN et al. (2010), sugeriram dois mecanismos. Um seria pela grande área de superfície que as nanopartículas possuem facilitando o maior contato e aderência com a parede celular das bactérias aumentando sua permeabilidade celular. Outra possibilidade é que as nanopartículas de prata ou íons de prata interferem com a cadeia respiratória e interferem na permeabilidade da parede das bactérias, resultando na morte celular (DURÁN et al., 2016). Além disso, as AgNPs ligam-se ao enxofre e ao fósforo presentes no DNA, impedindo a divisão celular.

3.8 Uso de nanopartículas de prata para cicatrização de feridas

A pele é o maior órgão do corpo humano. De estrutura biológica complexa, compreende 10 a 15% do peso corporal e realiza múltiplas atividades de forma precisa para regular e defender o organismo (HORITA et al., 2017; ZHU et al., 2017). Esse envoltório de proteção e comunicação com o meio externo desempenha diferentes funções, como barreira física para proteção contra perda de água, termorregulação, resposta aos estímulos imunológicos, síntese bioquímica, proteção frente a atritos e a radiação ultravioleta, detecção sensorial e comunicação social e sexual (OLIVEIRA et al., 2004).

É composta por duas camadas: epiderme (camada superficial, não vascularizada e constituída por tecido epitelial) e derme (camada profunda, ricamente vascularizada e constituída por tecido conjuntivo). Abaixo da derme encontra-se a hipoderme ou tecido subcutâneo, a qual não pertence à pele e serve-lhe apenas de união com órgãos adjacentes.

Quando a pele é lesionada, uma série de eventos celulares e moleculares é desencadeada visando à regeneração do tecido danificado e o restabelecimento da homeostasia. O processo de cicatrização depende de fatores como tipo de pele, localização anatômica, raça, sexo, idade, estado nutricional, oxigenação, infecção, doenças como diabetes, colonização por microorganismos no leito da ferida (NAM et al., 2015).

Normalmente, o processo de reparação de feridas envolve três fases: inflamatória, proliferação e maturação. A hemostasia e a inflamação começam imediatamente após a lesão. O corpo começa pelo controle do sangramento e ativa a cascata de coagulação. O coágulo formado pelas plaquetas estimula a liberação de fatores de crescimento das plaquetas iniciando a fase inflamatória. Nesta fase são produzidos fatores de crescimento não hematopoiéticos que agem para modular a cicatrização. Nesta complexa cascata temos envolvidos neutrófilos, fatores de necrose tumoral (TNF), fatores plaquetários (PF), proteases metaloproteinases, monócitos que são transformados em macrófagos cerca de 48 a 96 horas após a lesão. Os macrófagos fagocitam os neutrófilos e geram óxido nítrico (NO) e recrutam fibroblastos necessários para fase proliferativa da cicatrização (ATHER et al., 2007; GURTNER et al., 2008).

A fase proliferativa, que acontece dois a dez dias após a lesão, os queratinócitos (células produtoras de queratina) são estimulados para as margens da ferida, dando início à epitelização. Concomitantemente, fibroblastos atuam produzindo colágeno, elastina, fibronectina, proteases e glicosaminoglicana – substituindo a matriz provisória, composta por fibrina, pelo tecido de granulação (PAWAR et al., 2016; RAND; GELLHORN, 2016).

A fase de maturação- acontece duas a três semanas após a lesão e pode durar até um ano, tem como principal característica a produção de colágeno em uma rede organizada. Nela os eventos celulares e moleculares ativados após a lesão são diminuídos, até cessarem por completo. Após abundante síntese e deposição de matriz extracelular (MEC), fibroblatos sofrem maturação e transformam em miofibroblatos – células que expressam largos filamentos de actina abaixo da membrana plasmática, sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da MEC, a qual se reorganiza e passa de provisória à definitiva. Nesta fase acontece a formação da cicatriz. Caso a cicatrização não progrida de forma adequada é formada uma cicatriz hipertrófica ou quelóide (GAINZA et al., 2015; RITSU et al., 2016).

O uso de profilaxia antimicrobiana é importante uma vez que uma ferida infectada tem sua cura retardada. O estímulo de um ambiente inflamatório induzindo a migração de monócitos, macrófagos e leucócitos, todos os quais inicialmente agem de forma apropriada, mas depois produzem uma resposta exagerada e deletéria. Isso é evidenciado pelo fato de que as feridas associadas a uma pesada carga bacteriana frequentemente apresentam falhas de cicatrização, aumentando os custos de cuidados de saúde para o paciente e o tempo de cicatrização (HAHNEL et al., 2017).

As nanopartículas de prata possuem ação antimicrobiana consagrada e para uma maior eficácia é necessário que haja a ionização da prata. Os íons de prata são altamente reativos agindo prontamente nas ligações de proteínas, DNA, RNA, e íons cloreto, fazendo com que ela se ligue antes ao complexo de proteínas presente no fluido da ferida dificultando a entrega da prata no local esperado (ATIYEH et al., 2007).

Avanços nos sistemas de entrega de drogas de medicamentos têm sido propostos com a finalidade de melhorar a eficácia dos tratamentos médicos disponíveis, possibilitando a entrega do princípio ativo com o máximo de aproveitamento. Seguindo está lógica a fabricação de nanopartículas de prata *in situ* utilizando hidrogéis, como carboximetilcelulose (CMC) são altamente recomendados, visto que está o mais próximo dos curativos ideais podendo ser usados para limpeza de feridas e em quais quer estágio da cicatrização de feridas, isto é, na resposta vascular (hemostasia), resposta inflamatória (inflamação), fase proliferativa (granulação) e fase de maturação (fase de reconstrução) (GAINZA et al., 2015; MORGAN, 2002).

4 METODOLOGIA

4.1 Isolamento da goma de cajueiro

A Goma de cajueiro coletada em árvores do gênero *Anacardium occidentale L.* foi obtida de plantas nativas de Parnaíba, Piauí, Brasil e foi purificada e adaptada pelo método de PAULA; HEATLEY; BUDD (1998).

4.2 Modificação da goma de cajueiro

A goma do cajueiro (CG) foi isolada a partir do exsudato proveniente de árvores do gênero *Anacardium occidentale L.*, nativas de Parnaíba, Piauí, Brasil. A CG foi purificada por meio de precipitação em álcool etílico por método descrito por DIAS et al., (2016). A modificação da goma foi realizada seguindo a metodologia proposta por VIEIRA et al. (2010) com algumas modificações. Foram utilizadas 1g de CG e 5g de anidrido ftálico (AF). O AF foi colocado em banho a 130°C, sob constante agitação até a fusão do mesmo, em seguida a CG foi adicionada e a reação conduzida por 40 minutos. Após este tempo, a N, N-dimetilacetamida (5 mL) foi adicionada para parar a reação. O produto da reação foi precipitado e lavado com água ultra pura para a remoção de subprodutos.

4.2.1 Caracterização da goma ftalada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR

Os grupos funcionais presentes nas gomas de cajueiro natural e ftalada (NCG e PhCG) foram detectados por meio de espectrofotômetro FTIR IRAffinity-1S (SHIMADZU), usando a técnica de Reflectância Total Atenuada (RTA) e faixa de leitura espectral de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.3 Síntese *in situ* de nanopartículas de prata em hidrogel de carboximetilcelulose (CMC)

As nanopartículas foram preparadas *in situ* durante a fabricação do hidrogel. Primeiramente, para a produção de 100 g de hidrogel utilizou-se: 2 g de carboximetilcelulose

(CMC), 5 g de glicerina, solução de nitrato de prata Ag^+NO_3^- a $1 \mu\text{M}$, além de 0,2 g de goma de cajueiro natural (NCG) ou 0,2 g de goma de cajueiro ftalada (PhCG). O veículo utilizado foi água ultrapura utilizando-se o homogeneizador ultra-turax durante 5 minutos, para promover a completa interação entre os componentes da formulação. Logo após, para a formação de *in situ* de AgNPs no hidrogel, foi adicionado o agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4), na proporção de razão molar de 1:6 em relação à prata, sendo o hidrogel homogeneizado por mais 5 min. Deste modo, foram produzidos um hidrogel contendo AgNPs com goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e outro contendo AgNPs com goma de cajueiro modificada (PhCG-AgNPs). Foi produzido também um gel sem a presença de prata e goma de cajueiro, para servir de controle (gel base).

4.4 Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNPs)

4.4.1 Análise dos Hidrogéis por espectrofotometria de Uv-vis

Os espectros de Uv-vis da base do hidrogel e dos hidrogéis com nanopartículas de prata contendo as gomas natural (NCG-AgNPs) ou modificada (PhCG-AgNPS) foram analisados em um espectrofotômetro (UV-3101 PC, Shimadzu, Japan). Para o procedimento, foi diluído 1 g de cada gel em 10 mL de água sendo as soluções formadas analisadas entre os comprimentos de ondas 300-600 nm.

4.4.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada usando o aparelho NanoSight NS 300 com o auxílio do programa NTA 3.2, para a obtenção do diâmetro e concentração de partículas suspensas em solução. Cinco vídeos de 1 minuto foram capturados para cada amostra. As definições de análise, nomeadamente, limiar de detecção, foram definidas em função da intensidade da luz difusa observada nos vídeos capturados. Os valores de viscosidade do meio foram ajustados independentemente, de acordo com dados experimentais da formulação. Para todas as formulações, foram feitas diluições 1:100 em água ultrapura. Cada um dos vídeos foi analisado independentemente e os resultados são automaticamente mesclados em um gráfico de distribuição de tamanho de partícula.

4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise dos hidrogéis por microscopia eletrônica de transmissão, 10 μL das amostras foram montadas em telas revestidas por malhas de níquel (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) deixando-se secar por 2 minutos. O líquido em excesso foi removido com papel de filtro. A visualização foi observada num aparelho JEOL JEM 1400 TEM e 120kV (Tokyo, Japan). Imagens foram capturadas digitalmente utilizando uma câmera CCD digital Orious 1100W.

4.4.4 Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

A análise de EDS foi realizada na Estação de Análise JEOL JEM-2300 com uma tensão de aceleração de 20KeV.

4.5 Análise reológica dos hidrogéis

A análise reológica foi realizada em um reômetro modelo AR50 (TA instruments). Análises de fluidez foram executadas com uma velocidade de cisalhamento de 0 a 1000 s^{-1} , mantendo-se uma temperatura de 25° C.

4.6 Avaliação do efeito antimicrobiano dos hidrogéis com AgNPs

4.6.1 Crescimento bacteriano e condições de cultura

Para avaliar o efeito antimicrobiano dos hidrogéis com AgNPs, *Staphylococcus aureus* ATCC (bactéria Gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negativa) foram reativadas em caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA) e incubadas à 37° C por 24h. Desse caldo, as bactérias foram semeadas em ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA) nas mesmas condições descritas. Do qual, colônias isoladas foram coletadas para se preparar uma suspensão de salina (NaCl 0,9 % w/v) equivalente ao valor de 0,5 da escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Essa suspensão foi diluída a fim de se obterem as concentrações desejadas para os experimentos descritos a seguir.

4.6.2 Avaliação do Efeito Antibacteriano por Teste de Contato Direto

A partir da solução bacteriana descrita anteriormente, as bactérias foram inoculadas em ágar Muller-Hinton (concentração de 1×10^6 UFC/mL) por meio do auxílio de “swabs” estéreis como recomendado pelo CLSI 2013. Logo após, 1 g de cada hidrogel com AgNPs (concentração de 1000 μ M ou 108 μ gAg/mL) foi aplicada na área central das placas com ágar inoculado, sendo essas incubadas à 37°C por 24 h para verificação de inibição bacteriana resultante deste contato. A base do hidrogel foi utilizada como controle negativo.

4.6.3 Determinação das Concentrações Inibitórias (CIM) e Bactericidas (CBM) mínimas.

A CIM foi determinada utilizando-se placas de microtitulação de 96 poços com caldo Mueller-Hinton (QUELEMES et al., 2013) nas quais as bactérias (concentração de 5×10^5 UFC/mL) foram expostas a uma diluição seriada de razão 2 de cada hidrogel com AgNPs. As concentrações de prata variaram de 3,9 a 250 μ M (ou 0,42 a 27 μ gAg/mL). Como controle, foi determinada também a CIM do AgNO_3 com as mesmas concentrações anteriormente descritas, bem como a CIM de antibióticos padrões efetivos para cada micro-organismo. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em condições aeróbicas. A CIM foi definida como a menor concentração do agente que restringiu visualmente o crescimento bacteriano no meio de cultura.

Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 μ L removidas de todos os poços com concentrações maiores ou iguais à CIM foram semeadas em ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em condições aeróbicas e, após esse intervalo de tempo, a CBM foi definida como a menor concentração do agente que inviabilizou o surgimento de colônias sobre o ágar. Ambos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Avaliação da atividade cicatrizante dos hidrogéis com AgNPs

Os testes *in vivo* foram realizados com ratos Wistar (180-220 g) machos que foram mantidos em gaiolas-padrão, em temperatura controlada (24 ± 1 ° C) com ciclo de 12h claro/escuro, tendo livre acesso à água e ração. Eles foram mantidos em jejum de sólidos por 18 h, em seguida, aclimatizadas ao ambiente de teste 2 h antes de cada experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos diferentes. Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (50 e 5 mg/kg, I.M.,

respectivamente. Dois grupos de ratos Wistar ($n=5/\text{grupo}$) foram divididos em controle e experimentais tratados com uma dose por ferida. No mesmo animal foram realizadas duas incisões de 8 mm (feridas cirúrgicas), sendo que uma ferida (lado esquerdo) recebeu o gel que serve de base para a formulação e a outra (lado direito) aplicou-se formulações testes (NCG-AgNPs ou PhCG-AgNPs). Os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico, com todos os materiais cirúrgicos autoclavados. Primeiramente, foi realizada a tricotomia manual na região mediana do dorso. Para a indução da ferida foi utilizado um punch metálico circular de 8 mm de diâmetro na região dorso-cervical de cada animal sob anestesia de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 5,0 mg/kg i.m., respectivamente) (PACHALY, 2006). Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados por tiopental de sódio (100 mg/kg, I.P.). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil (CEEAA/UFPI, número 135/16).

Os tratamentos ocorreram logo após a cirurgia e diariamente no mesmo horário, tanto o gel base, quanto as formulações foram instiladas nas feridas dos animais, nos dias 0, 4, 7 e 14 dias após a cirurgia e foi avaliado o processo de cicatrização. Todos os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, ocasião em que se procede a avaliação macroscópica da ferida, observando-se a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta, sendo os dados registrados em fichas individuais (MARTINS et al., 2003). As feridas foram fotografadas nos dias 0, 4, 7 e 14 do protocolo experimental, o grau de contração da área (AC) da ferida foi calculado por meio da fórmula demonstrada por OLIVEIRA et al. 2000. Ao final dos tratamentos crônicos os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (tiopental sódico, 100 mg/kg) e as amostras retiradas para análise histológica.

4.7.1 Análise estatística

Conforme a metodologia empregada em cada teste, foram utilizados métodos de análise estatística apropriados, especialmente ANOVA one way seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas, estabelecendo-se um nível de significância de 5 % ($p<0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da goma de cajueiro ftalada (PhCG) por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR

A goma de cajueiro natural (NCG) foi modificada por uma reação com uso do anidrido ftálico. A modificação ocorreu por meio de uma reação de esterificação ao grupo hidroxila do carbono 6 da unidade de galactose, levando a formação de um grupo éster/ácido e conseqüentemente a presença de um grupo carboxila remanescente. A reação pode ser confirmada por meio da análise de espectro de FTIR como pode ser observado na **Figura 06**. Processo semelhante é relatado por (CHADLIA; FAROUK, 2010).

Os espectros de infravermelho (IV) apresentaram bandas características em 1153, 1077 e 1038 cm^{-1} para a goma natural e 1123, 1064 e 1022 cm^{-1} para a goma ftalada atribuídas as vibrações de estiramento das ligações glicosídicas C-O-C e dobramentos de O-H de álcoois (DA SILVA et al., 2009; PITOMBEIRA et al., 2015). A diferença que demonstra a inserção do grupamento corresponde as bandas em 1702 e 1257 cm^{-1} que são atribuídas aos estiramentos dos grupos C=O e C-O característicos de ácidos carboxílico provenientes da modificação inserida na estrutura da NCG.

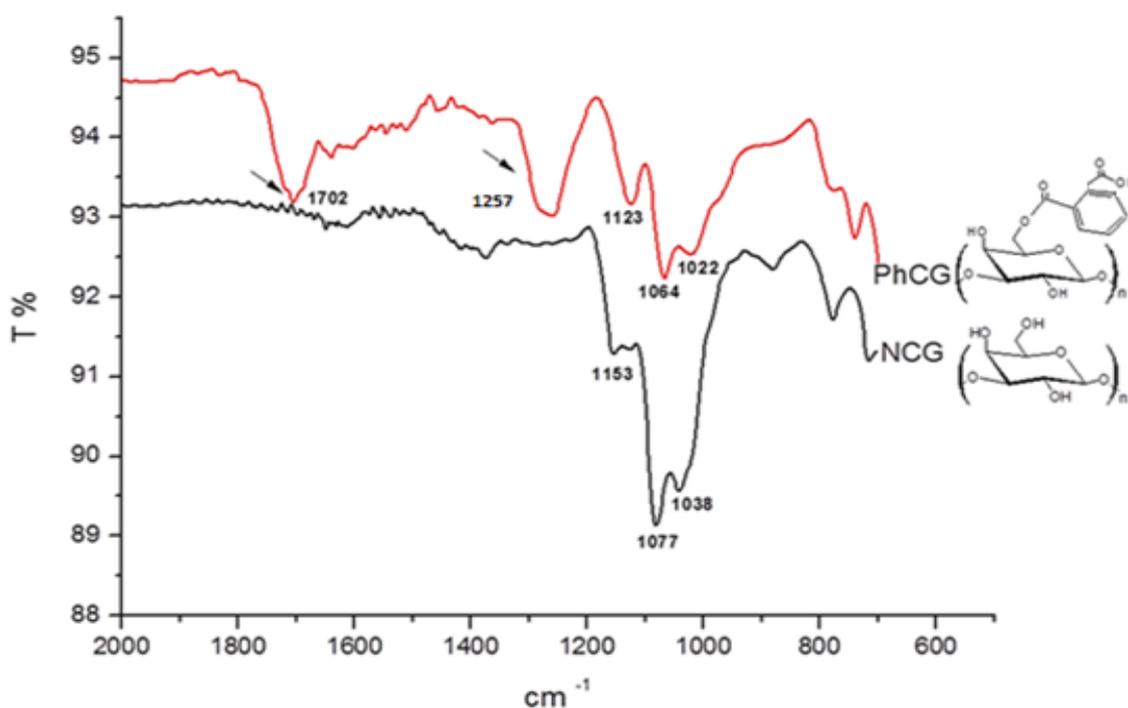


Figura 06- Espectro do FTIR da goma ftalada (PhCG).

5.2 Fabricação dos hidrogéis de carboximetilcelulose (CMC) contendo goma de cajueiro natural (NCG-AgNPs) e ftalada (PhCG-AgNPs)

A formação das nanopartículas de prata *in situ* foi observada (pela mudança da cor transparente para amarelo) logo após a adição do agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4) aos géis com Nitrato de prata (AgNO_3) previamente preparados. No entanto no gel contendo goma natural (NCG) observou-se uma intensificação maior da cor, como demonstrado na **figura 07**.

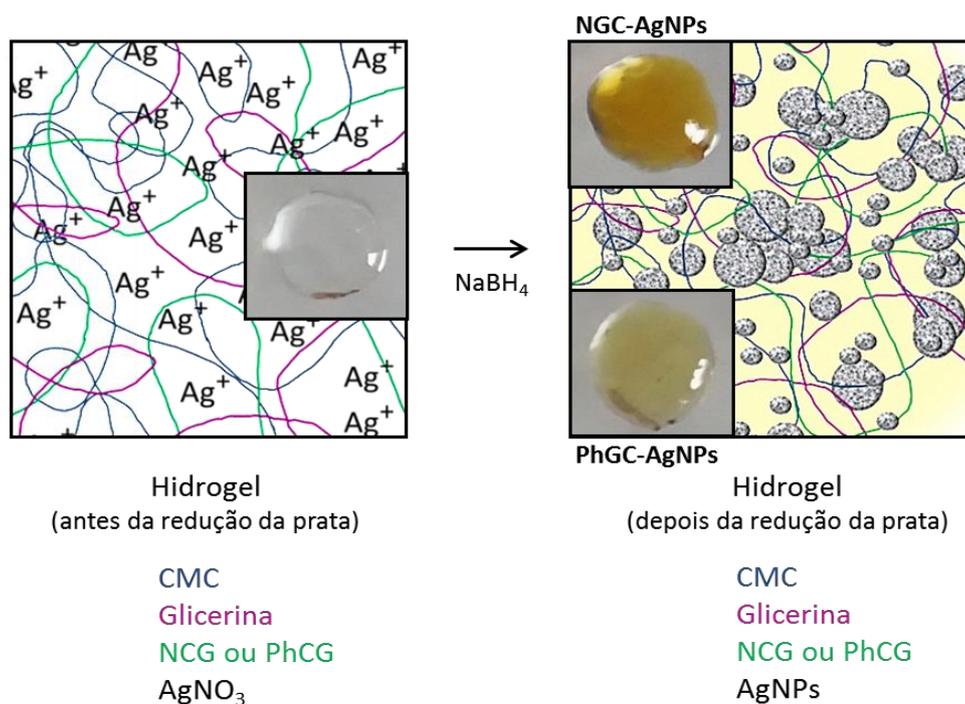


Figura 07. Esquema simplificado da formação de AgNPs *in situ* em gel de CMC.

5.3 Caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas *in situ*

5.3.1. Espectroscopia de UV-Vis

A formação das nanopartículas fabricadas *in situ* em géis de CMC foi comprovada pela análise de espectroscopia UV-Vis tendo sido observada a formação das bandas plasmônicas na região entre 380-420 nm (**Figura 08**) característica das nanopartículas de prata (SONG; KIM, 2009). Para o hidrogel NCG-AgNPs a banda plasmônica observada ficou em torno de 408 já para o gel com PhCG_AgNPs, a absorvância máxima ficou em torno de 404 nm.

Uma maior intensidade na banda plasmônica foi observada pela NCG-AgNPs, sabendo-se que a banda plasmônica tem correlação com a forma e tamanho da partícula e está relacionado principalmente com as propriedades ópticas e eletrônicas das AgNPs consequentemente afetando as suas aplicações biomédicas (PAL; TAK; SONG, 2015).

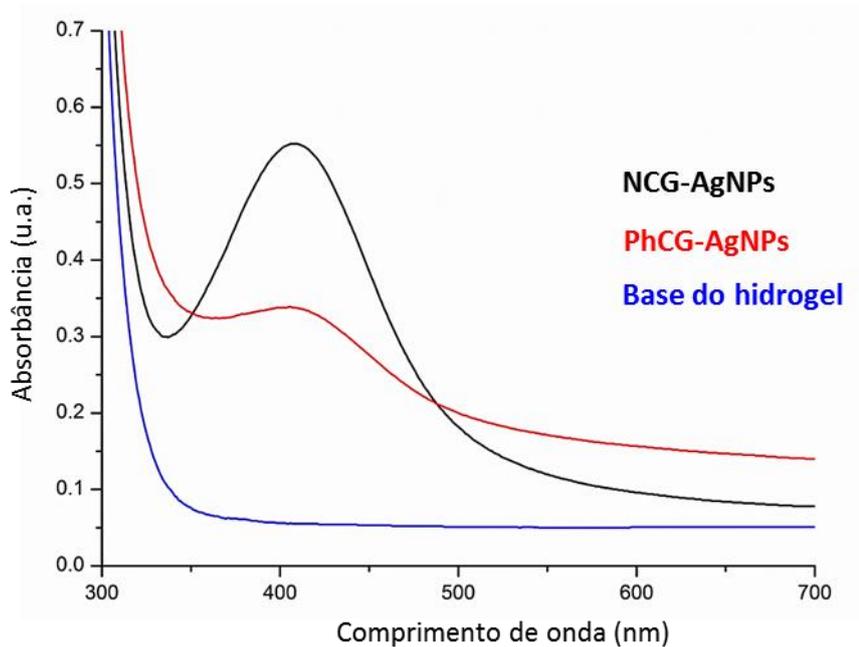


Figura 08. Espectro UV-vis dos hidrogéis com AgNPs.

A reação de formação das nanopartículas *in situ* foi atribuída à redução da prata Ag^+ em Ag^0 pela utilização do agente redutor borohidreto de sódio (HUH; KNOW, 2011) e em menor escala, devido à quantidade utilizada, a presença das gomas visto que elas também podem se apresentar como potencial redutor, segundo QUELEMES et al. (2013) e KORA et al. (2010).

5.3.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

O tamanho das nanopartículas foi determinado pela técnica de análise de rastreamento de nanopartícula (NTA). Esta técnica utiliza as propriedades de espalhamento da luz dinâmica e movimentos Brownianos a fim de obter a distribuição de tamanho das partículas em suspensão (HOLE et al., 2013) tratando-se de uma análise de alta resolução considerando que as partículas são avaliadas na suspensão de forma individual fornecendo ainda a concentração aproximada na formulação (FILIPPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

Foram encontrados para as nanopartículas NCG-AgNPs, um tamanho médio de $119,7 \pm 5$ nm e concentração de $6,36 \times 10^{10}$ partículas/mL e para PhCG-AgNPs, tamanho médio $123,8 \pm 8,9$ nm com concentração de $4,03 \times 10^{10}$ partículas/mL. A pequena diferença de tamanho associada ao número de partículas corrobora com os resultados encontrados na análise de UV-VIS onde a banda plasmônica é mais intensa e mais bem definida para amostra com NCG.

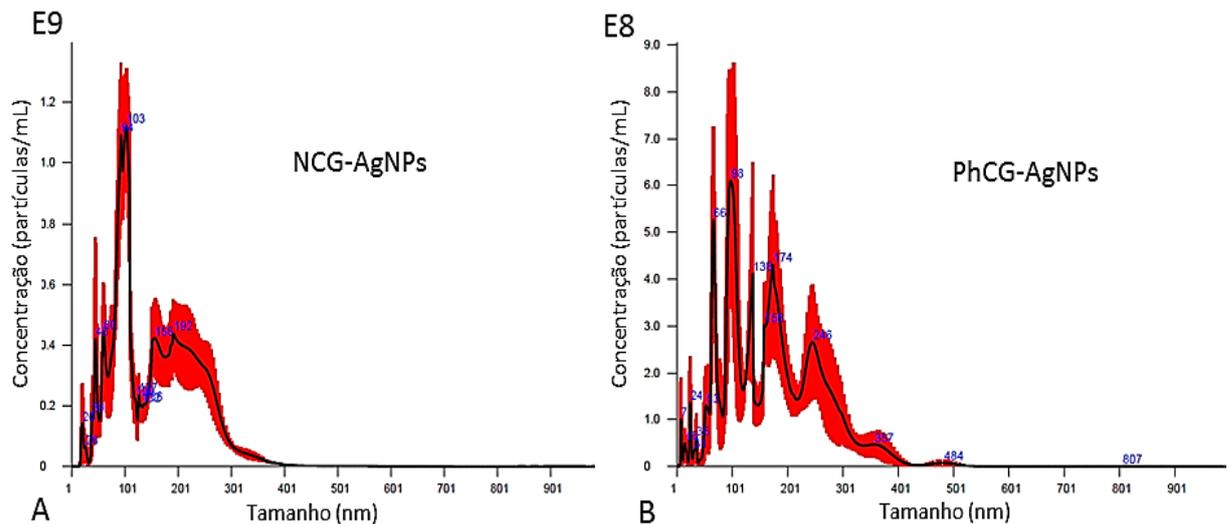


Figura 9. Análise do tamanho e concentração de AgNPs por rastreamento (NTA). **A.** NCG-AgNPs (Média: $119,7 \pm 5,1$ nm e moda: $86,4 \pm 4,7$ nm, $6,36 \times 10^{10}$ partículas/mL). **B.** PhCG-AgNPs (Média: $123,8 \pm 8,9$ nm e moda: $103,1 \pm 18,8$ nm, $4,03 \times 10^{10}$ partículas/mL)

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Dependendo da técnica utilizada para síntese das AgNPs pode-se formar partículas e observar as mais diversas variedades quanto ao tamanho e a forma (BEGUM; NASEEM; FAROOQI, 2016; FIRDHOUSE; LALITHA, 2015). Nanoestruturas de prata esféricas, hexagonais, triangulares e em forma de barra foram sintetizadas utilizando CMC, todas reduzindo Ag^+ e utilizando temperaturas diferentes (MISRA et al., 2011). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi usada para determinar a morfologia das AgNPs nos hidrogéis. Na **Figura 10A** observamos a formação de AgNPs triangulares, duplos triângulos e hexágonos utilizando o centro metálico da prata (Ag) com matéria orgânica ao redor para as nanopartículas formadas com NCG e na **Figura 10B** uma imagem um pouco mais heterogênea com a presença de nanopartículas esféricas, quadradas e agregados de esferas

irregulares formadas com a PhCG. Observa-se que a forma das nanopartículas é diretamente determinada também pelo agente estabilizante como é o caso das NCG e PhCG.

O espectro de EDS (**Figuras 10C e 10D**) mostra fortes sinais de prata. O eixo vertical mostra a contagem de raios X e o eixo horizontal mostra a energia em KeV. Onde se verifica a presença de picos atribuídos a prata (Ag) que confirmam a presença de nanopartículas nos hidrogéis NCG- AgNPs e PhCG- AgNPs (AHER, 2015; KULKARNI et al., 2011).

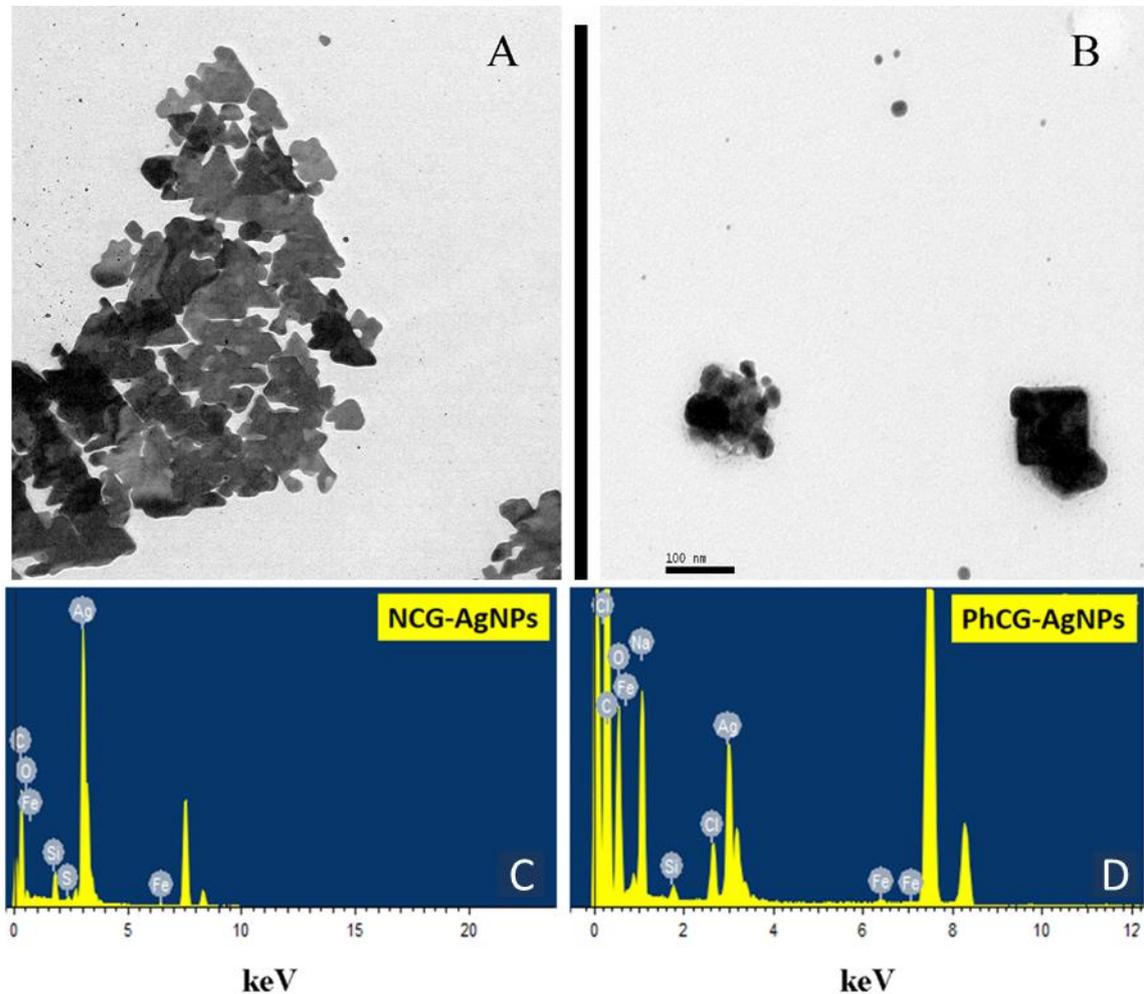


Figura 10. Imagens representativas por MET de AgNPs. **A.** NCG-AgNPs. e **B.** PhCG-AgNPs. Aumento de 100000 \times . Espectroscopia de dispersão de energia de raios X (EDS) das AgNPs contidas na análise da MET. **C.** NCG-AgNPs e **D.** PhCG-AgNPs

5.4 Análise reológica dos hidrogéis

A análise reológica foi realizada para observar o parâmetro viscoelástico das amostras. Segundo a literatura, os géis de carboximetilcelulose (CMC) se apresentam como não newtonianos e pseudoplásticos uma vez que há uma diminuição da viscosidade conforme o

aumento da taxa de cisalhamento aplicada (MATHIAS et al., 2013), comportamento observado para os hidrogéis de NCG-AgNPs e PhCG-AgNPs (**Figura 11A**).

Observou-se que após o carregamento dos géis preparados com CMC e NCG ou PhCG com as nanopartículas, as propriedades mecânicas sofreram alterações. Os hidrogéis com o PhCG-AgNPs e NCG-AgNPs apresentaram-se mais consistentes em relação ao hidrogel base (**Figura 11A**). O que pode ser explicado pelo fato das gomas, mesmo que em pequenas concentrações, promovam um aumento da viscosidade dos sistemas.

O hidrogel de PhCG-AgNPs apresentou uma maior tensão de cisalhamento, mostrando uma maior resistência á força aplicada sobre o gel, (**Figura 11B**) que sugere uma interação entre a estrutura química do CMC e a PhCG visto que os dois são carregados negativamente e podem apresentar maiores repulsão como observado.

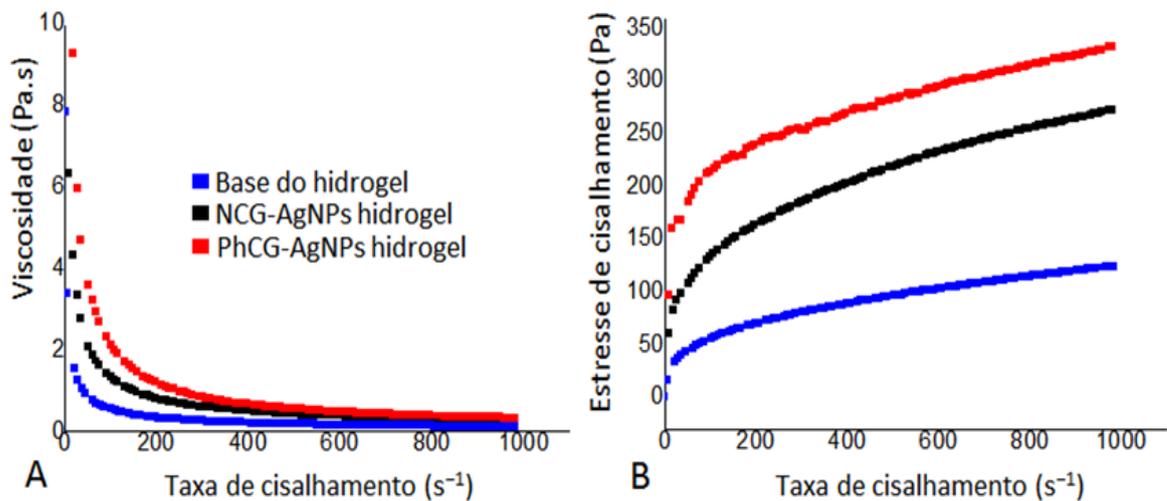


Figura 11. Análise reológica dos hidrogéis com AgNPs. **A** .Viscosidade e **B**. Estresse de cisalhamento

5.5 Efeito antimicrobiano dos hidrogéis com AgNPs

Para verificar a atividade antibacteriana de hidrogéis formulados com AgNPs, foram utilizadas duas espécies de bactérias, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, diretamente envolvidas em processos infecciosos de feridas (DELEON et al., 2014). Inicialmente foi realizada a avaliação de contato direto na qual foi observada ausência de qualquer crescimento bacteriano sob os hidrogéis após 24 h de incubação (**Figura 12**). Foi observada ainda, a formação de halos de inibição em torno dos hidrogéis depositados para ambos os micro-organismos. A base do hidrogel aplicada sobre os micro-organismos não ocasionou efeito inibitório.

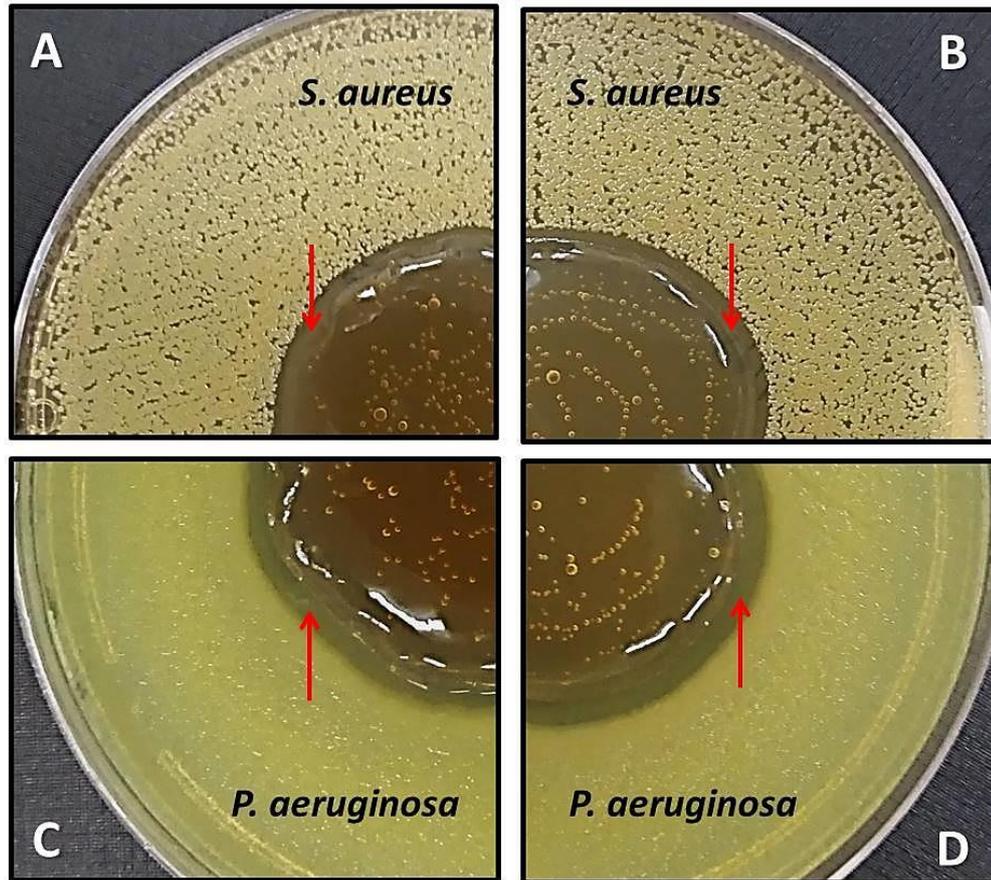


Figure 12. Efeito antibacteriano do contato direto de hidrogéis de NGC-AgNPs (A e C) e PhGC-AgNPs (B e D), com presença de halos de inibição (setas).

Estudos posteriores de determinação das CIM e CBM mostraram um potente efeito de hidrogéis com AgNPs sobre as bactérias testadas (**Tabela 1**). A base hidrogel não apresentou efeito antimicrobiano e os antibióticos padrões utilizados como controle evidenciaram efeito previsto pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*).

Em geral, o efeito dos hidrogéis foi mais expressivo contra *P. aeruginosa* sendo que, o hidrogel PhCG-AgNPs apresentou-se mais potente que o NCG-AgNPs. Para essa bactéria Gram-negativa, os valores de CIM apresentaram o mesmo valor de CBM para ambos os hidrogéis, o que caracteriza um efeito bactericida (GONZALEZ et al., 2013). Por exemplo, CIM e CBM de PhCG-AgNPs sobre *P. aeruginosa* obtiveram um valor excelente de 0,84 $\mu\text{gAg/mL}$.

De acordo com Venkatpurwar e Porkharkar (2011), o melhor efeito das AgNPs sobre uma bactéria Gram-negativa pode ser explicado devido à rápida internalização das nanopartículas através da delgada parede celular dessa bactérias, pobre em peptidoglicano, inativando e/ou alterando estruturas proteicas levando à morte celular.

Tabela 01. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de hidrogéis de NGC-AgNPs e PhGC-AgNPs.

Bactéria	NGC-AgNPs		PhGC-AgNPs		AgNO ₃	Antibiótico
	μM (μgAg/mL)		μM (μgAg/mL)		μM (μgAg/mL)	(μg/mL)
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	62,5 (6,75)	250 (27)	31,25 (3,37)	250 (27)	125 (13,5)	Oxacilina 1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	15,6 (1,68)	15,6 (1,68)	7,81 (0,84)	7,81 (0,84)	31,25 (3,37)	Meropenem <0,5

Os hidrogéis promoveram CIM mais baixa em comparação com o efeito das soluções de AgNO₃ nas mesmas concentrações testadas para as duas bactérias. Por exemplo, o efeito de PhCG-AgNPs sobre *S. aureus* causou uma CIM de 3,37 μgAg/mL, enquanto que AgNO₃ necessitou de uma concentração quatro vezes maior para inibir o crescimento bacteriano (**Tabela 1**).

O efeito antimicrobiano de AgNPs veiculadas em géis de CMC tem sido relatado (CHEN et al., 2008; HEBEISH et al., 2010). A utilização da goma de cajueiro para auxiliar no processo de estabilização de AgNPs foi planejado devido esse polímero já ter sido aplicado em síntese de AgNPs por uma rota de aquecimento em banho-maria (ARARUNA et al., 2013; QUELEMES et al., 2013), apresentando atividade antimicrobiana. Utilizando-se da mesma técnica de determinação da CIM e comparando-se os resultados achados neste estudo com os apresentados por QUELEMES et al. (2013), observa-se que o efeito antimicrobiano das AgNPs sintetizadas no hidrogel foi mais potente que o efeito da solução aquosa de AgNPs desenvolvida no referido estudo. Por exemplo, a CIM e CBM do hidrogel NCG-AgNPs sobre *P. aeruginosa* apresentaram valores iguais a 1,68 μgAg/mL; já os valores do efeito da solução de AgNPs estabilizadas com goma de cajueiro foram 3,37 μgAg/mL e 6,65 μgAg/mL (respectivamente). A mesma tendência ocorreu sobre o *S. aureus*. Esse aumento na capacidade antimicrobiana pode ser explicado devido a um processo mais efetivo de redução da prata iônica proposto neste trabalho, na qual se utilizou de um forte agente redutor, boridreto de sódio, além de um melhor efeito estabilizante causado pelos constituintes do gel (goma+CMC+gliresina).

5.6 Efeito cicatrizante dos hidrogéis com AgNPs

A análise estatística dos dados referentes aos percentuais de contração das lesões demonstraram que, no período de quatro dias pós-cirúrgico, não foi verificada diferença estatística significativa entre as médias dos índices de contração das feridas dos grupos contendo a NCG-AgNPs (47 ± 3.2) quando comparada ao grupo formulação base para esta formulação (52 ± 2.8), sendo que a média do índice de contração da ferida foi significativamente superior no grupo tratados com as formulações contendo PhCG-AgNPs (43 ± 3.0 ; $*p < 0,05$) quando comparado ao grupo com a formulação base (62 ± 3.9).

Aos sete dias após a cirurgia, foi verificada diferença significativa entre as médias dos índices de contração das feridas do grupo tratados com as formulações contendo NCG-AgNPs (16 ± 3.1 ; $*p < 0,05$), bem como a formulação contendo PhCG-AgNPs (20 ± 1.9 ; $*p < 0,05$) quando comparados os grupos que receberam apenas a formulação base para cada formulação (31 ± 4.7 , 33 ± 3.0).

Aos 14 dias após a cirurgia não foi verificada diferença significativa entre as médias dos índices de contração das feridas dos animais do grupo contendo a formulação com NCG-AgNPs (7 ± 0.5) quando comparada ao grupo formulação base para esta formulação (11 ± 1.6), a média do índice de contração da ferida foi significativamente superior no grupo tratados com as PhCG-AgNPs (5 ± 0.8 $p < 0,005^{**}$) quando comparado ao grupo com a formulação base (12 ± 1.4). Com base nestes dados podemos sugerir que a modificação da goma de cajueiro (CG) com anidrido ftálico favoreceu uma melhora no efeito cicatrizante desta quando comparadas ao grupo gel base.

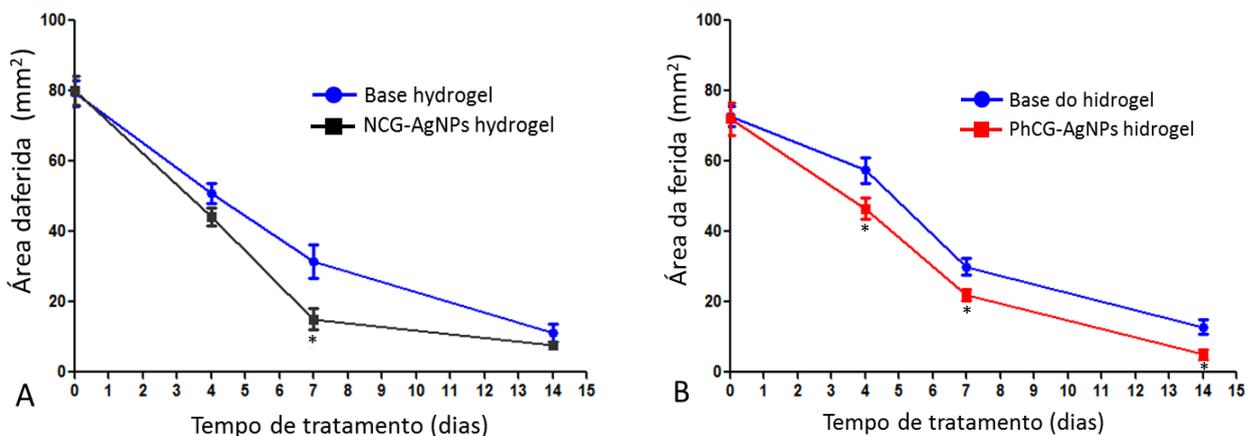


Figura 13. Relação entre o tempo de ação dos hidrogéis (dias) NCC-AgNPs (A) and PhCG-AgNPs (B) sobre a área do ferimento em ratos * $p < 0.05$ estatisticamente significativo.

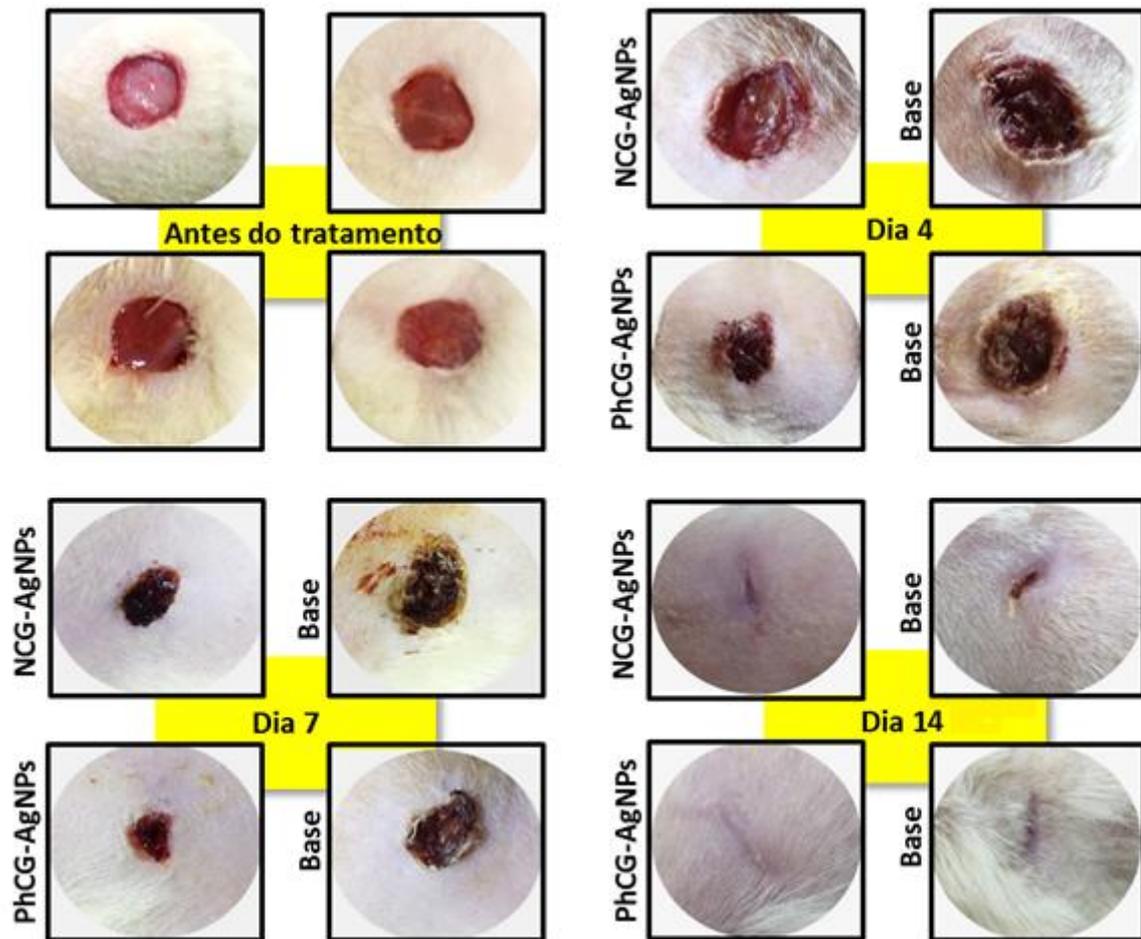


Figure 14. Imagens representativas do processo de cicatrização promovida pelos hidrogéis com AgNPs em ferimentos no dorso de ratos.

As feridas, particularmente as feridas não cicatrizantes, tornaram-se um problema de saúde importante em todo o mundo, estas podem levar a uma morbidade notável, tempo de tratamento prolongado e altos custos de cuidados de saúde (SU et al., 2016). A lesão cutânea advém de diversos processos inflamatórios que ocorrem na pele, decorrentes de queimaduras ou doenças de cunho inflamatório, feridas entre outras (HAERTEL, WERNER, SCHAFER, 2014; WAGENER, CARELS, LUNDTVIG, 2013).

A cicatrização da ferida consiste em uma progressão ordenada de restabelecer a integridade do tecido danificado: inflamação, proliferação e remodelação (YOUNG; MCNAUGHT, 2011; KOKANE et al., 2009). A fase de inflamação começa imediatamente após a lesão, ocorre inicialmente a vasoconstrição que favorece a homeostase e liberações em mediadores inflamatórios. A fase proliferativa é caracterizada por proliferação de tecido de granulação formada principalmente por fibroblastos e pelo processo de angiogênese

(VAROGLU et al., 2010). A remodelação envolve uma série de reações regenerativas complexas, desencadeadas por sinalização bioquímica e mediadores inflamatórios, originadas a partir da ruptura da continuidade tecidual (AYA; STERN, 2014).

Conhecer a fisiopatologia da cicatrização e os fatores que podem acelerá-la ou retardá-la tem sido alvo de estudos na busca de alternativas terapêuticas para cicatrização de feridas cutâneas (DWIVEDI et al., 2017; SU et al., 2016). Grande parte das pesquisas que estudam patologias cutâneas em prol do tratamento e da cura de feridas, utilizam modelos animais, especialmente em murinos, que apresentam características histológicas que se assemelham com a pele humana. Processos inflamatórios cutâneos e de cicatrização são reproduzidos na maioria das vezes em camundongos e ratos (GAUTAM et al., 2014; KIM et al., 2014).

O estudo em questão baseou-se na avaliação macroscópica, que embora muito subjetiva, mostra-se de grande importância para o acompanhamento da reparação de feridas cirúrgicas que gera excelentes informações em relação ao comportamento dos eventos biológicos durante a reparação tecidual (LI et al., 2016).

Na análise da contração da ferida, verificou-se progressiva diminuição da área da lesão em todos os grupos, nenhuma ferida apresentou área maior que a inicial, a diminuição da área ocorreu por conta do mecanismo de contração tecidual. Pode-se observar também que os percentuais da contração das feridas foram maiores a partir do 7^o dia, isso se justifica porque entre o 7^o e 14^o dia ocorre a fase de fibroplasia da cicatrização, com presença de fibroblastos e miofibroblastos (OLIVEIRA et al., 2010)

Nos 14 dias de tratamento pode-se observar que no grupo tratado com a formulação de PhCG-AgNPs a cicatrização foi superior quando comparada a formulação com NCG-AgNPs quando comparadas respectivamente aos grupos que continham apenas as suas formulações base, sendo a PhCG-AgNPs efetiva em todos os estágios da avaliação da cicatrização e NCG-AgNPs mostrou diferença significativa apenas no 7^o dia de tratamento, isto sugere que PhCG-AgNPs foi capaz de acelerar o processo de cicatrização, possivelmente por essa modificação facilitar a ação da goma do cajueiro sobre os diversos fatores que atuam no processo inflamatório, na migração de células, bem como na reparação tecidual.

Nos grupos tratados com as formulações NCG-AgNPs e PhCG-AgNPs durante os 14 dias de tratamento o exsudato foi monitorado. O exsudato quando presente apresentava aspecto seroso, característico de feridas não contaminadas (DA SILVEIRA VASCONCELOS et al., 2015). No grupo das formulações base, a presença de exsudato persistiu até o 9^o dia e em feridas agudas a presença de exsudato é normal durante as primeiras 48 e 72 horas. Depois

de tal período a exsudação é prejudicial a cicatrização (GAUTAM et al., 2014), assim pode-se dizer que o tratamento diário com as NCG-AgNPs e PhCG-AgNPs favoreceram uma progressiva evolução da cicatrização e redução gradativa do exsudato.

A hiperemia caracteriza-se por ser um fenômeno vascular envolvido no processo de inflamação durante o reparo tecidual, tendo início alguns minutos após a ação traumática, nesse momento é liberado vários mediadores químicos como a histamina (YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Neste trabalho foi verificada a hiperemia em todos os grupos, variando apenas em sua intensidade. Nos grupos tratados com NCG-AgNPs e PhCG-AgNPs mostraram uma intensa hiperemia, especialmente nos três primeiros dias. No grupo NCG-AgNPs, essa hiperemia durou mais tempo persistindo até o nono dia, no grupo tratado com a PhCG-AgNPs após o terceiro dia a hiperemia foi se tornando branda e posteriormente discreta ou ausente nos demais dias de tratamento, demonstrando que houve ação significativa no controle da reação inflamatória superior da PhCG-AgNPs quando comparada NCG-AgNPs, nos grupos tratados com as formulações base esse parâmetro persistiu até o 10 dia.

6 CONCLUSÕES

- 1- A modificação química da goma de cajueiro com anidrido ftálico foi comprovada por FTIR.
- 2- Neste estudo, foram desenvolvidos hidrogéis formulados com nanopartículas de prata sintetizadas *in situ* contendo goma de cajueiro ftalada ou natural para aplicação como agente antimicrobiano e cicatrizante.
- 3- A formação das AgNPs nos hidrogéis foi confirmado pelas seguintes técnicas de caracterização: Espectroscopia de Uv-vis, Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).
- 4- Pela análise reológica os hidrogéis com AgNPs foram classificados como não newtonianos e pseudoplásticos;
- 5- A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos hidrogéis constatou excelente atividade antimicrobiana pela observação de inibição de crescimento bacteriano sob ambos os géis, inclusive com formação de halos de inibição, além de reduzidos valores de CIM e CBM;
- 6- A atividade cicatrizante *in vivo* dos hidrogéis foi verificada pelo modelo de cicatrização em feridas cirúrgicas em ratos. Pode-se observar que a goma do cajueiro modificada por anidrido ftálico apresentou um melhor perfil de cicatrização

REFERÊNCIAS

- ABDI. **Panorama da Nanotecnologia**. [S.l.: s.n.], 2010. v. XIX. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>>. Acesso em: 05 mar. 2017.
- ABREU, C. M. W. S. et al. Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77–85, 2016.
- AHER, A. J. **Characterization and application of silver nanoparticles biosynthesized under control and clinorotation Condition**. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado em Filosofia) Universidade de Pune, India, 2013.
- AHER, M. N. et al. Unimolecular antiparallel G-quadruplex folding topology of 2'-5'-isoTBA sequences remains unaltered by loop composition. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, p. 11696-11703, 2015.
- AHMAD, R. et al. Alpha amylase assisted synthesis of TiO₂ nanoparticles: Structural characterization and application as antibacterial agents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 171-177, 2015.
- AHMED, S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 1, p. 17–28, 2016.
- AIKEN, J. D.; FINKE, R. G. A review of modern transition-metal nanoclusters : their synthesis , characterization , and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 145, p. 1–44, 1999.
- AJITHA, B. et al. Instant biosynthesis of silver nanoparticles using Lawsonia inermis leaf extract: Innate catalytic, antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Molecular Liquids**, v. 219, p. 474–481, 2016.
- AL-KASSAS, R. et al. Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 176–186, 2016.
- ALEXANDER, A. et al. Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. **Journal of Controlled Release**, v. 241, p. 110–124, 2016.

- ANANTH, A. N. et al. PVA and BSA stabilized silver nanoparticles based surface-enhanced plasmon resonance probes for protein detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n.2, p. 138–144, 2011.
- ANSARI, M. A. et al. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. **Biology and Medicine**, v. 3, n.2, p. 141–146, 2011.
- ARARUNA, F.B.; EIRAS, C.; LEITE, J.R.S.A.; PINTADO, M. M. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2013.
- ATIYEH, B. S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, v. 33, n. 2, p. 139–148, 2007.
- AYA, K. I.; STERN, R. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. **Word Repair and Regeneration**, v.22, p. 579- 593, 2014.
- BAGHAYERI, M. et al. A novel way for detection of antiparkinsonism drug entacapone via electrodeposition of silver nanoparticles/functionalized multi-walled carbon nanotubes as an amperometric sensor. **Materials Science and Engineering:C**, v. 66, 2016.
- BAO, D. et al. Preparation and characterization of double crosslinked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 113–120, 2014.
- BEGUM, R.; NASEEM, K.; FAROOQI, Z. H. A review of responsive hybrid microgels fabricated with silver nanoparticles: synthesis, classification, characterization and applications. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 77, n. 2, p. 497–515, 2016.
- BERNI NETO, E. A.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. 2008. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2008131734>>. Acesso em: 05 mar 2017.
- BOLDYREV, V. V. Thermal decomposition of silver oxalate. **Acta Thermochemica**, v. 388, p. 63–90, 2002.
- BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops & Products**, v. 58, p. 46–54, 2014.

CAKIĆ, M. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1110, p. 156–161, 2016.

CAMPOS, D.A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2013.

CATAURO, M. et al. Antibacterial and bioactive silver-containing $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{CaO} \cdot 2\text{SiO}_2$ glass prepared by sol-gel method. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 15, p. 831–837, 2004.

CASTELLANO, J. J. et al. 2007. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressing and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n. 2, p. 144–22, 2009.

CHADLIA, A.; FAROUK, M. M. Chemical modification of Posidonia with cyclic anhydrides: effect on thermal stability. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 2, p. 264–269, 2010.

CHAYKAR, A. S.; GOHARPEY, F.; YEGANEH, J. K. Volume phase transition of electron beam cross-linked thermo-responsive PVME nanogels in the presence and absence of nanoparticles: with a view toward rheology and interactions. **RSC Advances**, v. 6, n. 12, p. 9693–9708, 2016.

CHEN, J. et al. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate. **Materials Chemistry and Physics**, v. 108, p. 421–424, 2008.

CHO, K.; CHOO, J.; JOO, S. Surface-enhanced Raman scattering and density functional theory calculation of uracil on gold and silver nanoparticle surfaces. **Acta Spectrochimica**, v. 61, p. 1141–1145, 2005.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents : a useful development or a cause for concern. **Jouranal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. February, p. 587–590, 2007.

CHOPRA, I.; HESSE, L.; NEILL, A. O. Discovery and Development of New Anti-Bacterial Drugs Ian Chopra, Lars Hesse and Alexander O'Neill. **Elsevier Science**, p. 213–225, 2002.
COLLADO-GONZÁLEZ, M. et al. Chitosan as stabilizing agent for negatively charged nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 63–70, 2017.

CONTE, R. et al. New Therapeutic Potentials of Nanosized Phytomedicine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 8176–8187, 2016.

CORMODE, D. P. et al. Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 329–338, 2010.

CRABTREE, J. H. et al. The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. **Peritoneal Dialysis International**, v. 23, n. 4, p. 368–374, 2003.

DA SILVA, D. A. et al. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 437–441, 2009.

DAS, A. et al. Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 254–261, 2015.

DIAS, S. F. L. et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 254–261, 2016.

DONG, Z. et al. Biomaterials CaCO₃ nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nanoplatform enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy. **Biomaterials**, v. 110, p. 60–70, 2016.

DURAN, N. et al. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. **J Nanobiotechnol**, 2015.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2016.

DWIVEDI, S. et al. Perinatal Outcome In Hiv Infected Pregnant Women At Tertiary Care Hospital In North India: Eleven Years Retrospective Study. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 8, p. 16801-16805, 2017.

ETHIRAJ, A. S. et al. Control of size and antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles. **Materials Letters**, v. 185, p. 526–529, 2016.

FDA. *National nanotechnology initiative strategic plan*. Disponível em: <http://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/2014_nni_strategic_plan.pdf>. Acesso em :02 fev. 2016.

FERRARIS, S. et al. Applied Surface Science In situ reduction of antibacterial silver ions to metallic silver nanoparticles on bioactive glasses functionalized with polyphenols. **Applied Surface Science**, v. 396, p. 461–470, 2017.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FIRDHOUSE, M. J.; LALITHA, P. Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Applications. **Journal of Nanotechnology**, v. 2015, n. September 2014, p. 1–18, 2015.

FONSECA, G. S.; SOUZA, R. F. **Nanopartículas de Iridio em Líquidos Iônicos : Síntese, Caracterização e Aplicação em reações de Hidrogenação Catalítica**. 2002. 377 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

GAINZA, G. et al. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1551–1573, 2015.

GAUTAM, M. K. et al. *In vivo* healing potential of *Aegle marmelos* in excision, incision, and dead space wound models. **Hindawi Publishing Corporation, the scientific world journal**, p.9, 2014

GHAEDI, M. et al. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Rosmarinus officinalis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 167–172, 2015.

GLIŠIĆ, S. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1110, n. October, p. 156–161, 2015.

GRIFFITH, M. et al. Silver Nanoparticle Applications. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-11262-6>>. Acesso em: 01 fev 2017.

GURTNER, G.C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p.314–321. 2008.

HAERTEL, E.; WERNER, S.; SCHAFER, M. Transcriptional regulation of wound inflammation. **Seminars in immunology**, 2014.

HAHNEL, E. et al. The epidemiology of skin conditions in the aged : A systematic review. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, n. 1, p. 20–28, 2017.

HAINFELD, J. F. et al. Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1609–1617, 2014.

HANH, T. T. et al. Preparation of silver nanoparticles fabrics against multidrug-resistant bacteria. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 121, p. 87–92, 2016.

HEBEISH, A. et al. Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 407–413, 2013.

HEBEISH, A.; SHAHEEN, T. I.; EL-NAGGAR, M. E. Solid state synthesis of starch-capped silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 70–76, 2016.

HOFMANN-AMTENBRINK, M. et al. Nanotechnology in medicine: european research and its implications. **The European Journal of Medical Sciences**, v. 144, p. 1–7, 2014.

HOLE, P. et al. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 12, 2013.

HORITA, K. et al. Effects of different base agents on prediction of skin irritation by sodium lauryl sulfate using patch testing and repeated application test. **Toxicology**, v. 382, p. 10–15, 2017.

HU, L.; PFIRMAN, A.; CHUMANOV, G. Applied Surface Science Stabilization of 2D assemblies of silver nanoparticles by spin-coating polymers. **Applied Surface Science**, v. 357, p. 1587–1592, 2015.

HUH, A. J. ; KNOW, Y. J. “ Nanoantibiotics ” : A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 128–145, 2011.

JANG, S. J. et al. In-vitro anticancer activity of green synthesized silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells. **Materials Science and Engineering**, v. 68, p. 430–435, 2016.

JIANG, H. et al. Peroxidase-like activity of chitosan stabilized silver nanoparticles for visual and colorimetric detection of glucose. **The Analyst**, v. 137, n. 23, p. 5560, 2012.

KAJANI, A. A. et al. Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles with potent anticancer activity using *Taxus baccata* extract. **RSC Advance**, v. 4, n. 106, p. 61394–61403, 2014.

KAYALVIZHI, T.; RAVIKUMAR, S.; VENKATACHALAM, P. Green Synthesis of Metallic Silver Nanoparticles Using *Curculigo orchioides* Rhizome Extracts and Evaluation of Its Antibacterial, Larvicidal, and Anticancer Activity. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 9, 2016.

KEAT, C.L.; AZIZ, A.; EID, A. M; ELMARZUGI, N. A. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. **Journal of Nanotechnology**, v. 2015, 2015.

KELSALL, R. W.; HAMLEY, I. W.; GEOGHEGAN, M. **Nanoscale Science and Technology**. Edited by, 2005. Disponível em : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470020873.fmatter/pdf>. Acesso em: 02 mar. 2017.

KENDALL, K.; KENDALL, M.; REHFELDT, F. Adhesion of cells, viruses and nanoparticles. **Adhesion of Cells, Viruses and Nanoparticles**, p. 1–282, 2011.

KIM, B. et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Astragalus sinicus* L. in cytokine-induced keratinocytes and skin. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 46, 2014.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KIRUBA, D. S. C. G. K. et al. Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 4, p. 547–551, 2010.

KOKANE, D. D. et al. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 124, p. 311-5, 2009.

KOKURA, S. et al. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 570–574, 2010.

KORA, A. J.; SASHIDHAR, R. B.; ARUNACHALAM, J. Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 670–679, 2010.

KORA, A. J. ; SASHIDHAR, R. B.; ARUNACHALAM, J. Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): A reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1516–1520, 2012.

KORRAPATI, P. et al. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 747-765, 2016.

KULKARNI, A. P. et al. Plant mediated synthesis of silver nanoparticles - tapping the unexploited sources. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, n. 4, p. 100–107, 2011.

LAI, C. Y. et al. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles and Silver Inks: Review on the Past and Recent Technology Roadmaps. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 23, n. 10, p. 3541–3550, 2014.

LANSDOWN, A.B. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal Wound Care**, v.11, p.125-30, 2002.

LARA, H. H. et al. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 1–10, 2010.

LARA, H. H. et al. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. **Journal of nanobiotechnology**, v. 8, n. 1, p. 15, 2010.

LARA, H. H. et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 2–9, 2011.

LI, S. et al. Preparation and characterization of a novel conformed bipolymerpaclitaxel-nanoparticle using tea polysaccharides and zein. **Carbohydrate Polymers**, v.146, p. 52-57, 2016.

LIN, Y. H. et al. Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of Helicobacter pylori. **Biomaterials**, v. 34, n. 18, p. 4466–4479, 2013.

LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.

LU, L.; CHEN, G.; QIU, Y. Nanoparticle-based oral delivery systems for colon targeting: principles and design strategies. **Science Bulletin**, v. 61, n. 9, p. 670–681, 2016.

MALLMANN, E. D. et al. Brief Communication Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Obtained By Green Synthesis. **Revista do instituto de Medicina Tropical**, v. 165, n. 2, p. 148–151, 2015.

MARTINS, D. et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical, carnosol. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003.

MATHIAS, T. R. DOS S. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 12–20, 2013.

MCGILLICUDDY, E. et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 231–246, 2016.

MELO, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1–12, 2012.

MERISKO-LIVERSIDGE, E. Nanosizing: "end-to-end" formulation strategy for poorly water-soluble molecules. **Discovering and Developing Molecules with Optimal Drug-Like Properties**, p. 437–467, 2015.

MISRA, A. et al. Temperature controlled synthesis of silver nanostructures of variable morphologies in aqueous methyl cellulose matrix. **Journal of Molecular Liquids**, v. 158, n. 3, p. 170–174, 2011.

MOHANPURIA, P.; RANA, Æ. N. K. Biosynthesis of nanoparticles : technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 507–517, 2008.

MORGAN, D. Wounds - What should a dressings formulary include. **Hospital Pharmacist**, v. 9, n. 9, 2002.

NAM, G. et al. The Application of Bactericidal Silver Nanoparticles in Wound Treatment. **Nanomaterials and Nanotechnology**, v. 5, n. 23, p. 1–14, 2015.

NATSUKI, J.; NATSUKI, T.; HASHIMOTO, Y. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. **International Journal of Materials Science and Applications**, v. 4, n. 5, p. 325, 2015.

NAYAK, D. et al. Synergistic combination of antioxidants, silver nanoparticles and chitosan in a nanoparticle based formulation: Characterization and cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cell lines. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 470, p. 142–152, 2016.

OLIVEIRA, P. et al. Influência de Fatores Antinutricionais da Leucena (*Leucaena leucocephala* e *Leucaena cunningan*) e do Feijão Guandu (*Cajanus cajan*) Sobre o Epitélio Intestinal e o Desempenho de Frangos de Corte 1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n. 6, p. 1759-1769, 2000.

OTTO, D. P.; DE VILLIERS, M. M. Physicochemical Principles of Nanosized Drug Delivery Systems. **Nanotechnology in Drug Delivery**, p. 3–33, 2009.

PACHALY, J.R. Terapêutica por extrapolação alométrica. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 1215-1223, 2006.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle: A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 42, p. 1712–1720, 2015.

PAWAR, R. S. et al. *Sida cordifolia* Linn. accelerates wound healing process in type 2 diabetic rats. **Journal of Acute Medicine**, p. 1–8, 2016.

PETICA, A. et al. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. **Materials Science & Engineering B**, v. 152, p. 22–27, 2008.

PITOMBEIRA, N. A. O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.

PIVEC, T. et al. Environmentally friendly procedure for in-situ coating of regenerated cellulose fibres with silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 163, p. 92–100, 2017.

PRAJAPATI, V. D. et al. Pharmaceutical applications of various natural gums , mucilages and their modified forms. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1685–1699, 2013.

PRUSTY, A. K.; PARIDA, P. Development and Evaluation of Gel Incorporated with Biogenically Synthesised Silver Nanoparticles. **Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**, v. 3, p. 1-6, 2015

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

QUELEMES, P. V. et al. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 567–575, 2017.

RAGHAVENDRA, G. M.; JUNG, J.; SEO, J. Step-reduced synthesis of starch-silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 126–128, 2016.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAND, E.; GELLHORN, A. C. The Healing Cascade Facilitating and Optimizing the System. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of NA**, v. 27, n. 4, p. 765–781, 2016.

RASTOGI, L. et al. Gum kondagogu reduced/stabilized silver nanoparticles as direct colorimetric sensor for the sensitive detection of Hg^{2+} in aqueous system. **Talanta**, v. 118, p. 111–117, 2014.

REHAN, M. et al. Towards multifunctional cellulosic fabric : UV photo-reduction and in-situ synthesis of silver nanoparticles into cellulose fabrics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 877–886, 2017.

REMYA, N. S. et al. Toxicity , toxicokinetics and biodistribution of dextran stabilized Iron oxide Nanoparticles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 586–598, 2016.

REZAEI, B.; SHAHSHAHANIPOUR, M.; ENSA, A. A. In situ production of silver nanoparticles for high sensitive detection of ascorbic acid via inner filter effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 663–668, 2017.

RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, 2016.

RITSU, M. et al. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, p. 1–6, 2016.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais : Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, p. 31–36, 1993.

RONI, M. . et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Characterization and biotoxicity of *Hypnea musciformis* -synthesized silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121, p. 31–38, 2015.

SATALKAR, P.; ELGER, B. S.; SHAW, D. M. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter. **Science and Engineering Ethics**, p. 1255–1276, 2015.

SATHISHKUMAR, M. et al. Biointerfaces Cinnamon *zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 73, p. 332–338, 2009.

SCHIRATO, G.V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L . na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 149–154, 2006.

SCHMIDL, G. et al. Formation and characterization of silver nanoparticles embedded in optical transparent materials for plasmonic sensor surfaces. **Materials Science & Engineering B**, v. 193, p. 207–216, 2015.

SCHNEIDEWIND, H. et al. The morphology of silver nanoparticles prepared by enzyme-induced reduction. **Journal Beilstein of Nanotechnology**, p. 404–414, 2012.

SHANKAR, P. D. et al. A review on the Biosynthesis of metallic Nanoparticles (Gold and Silver) using Bio-components of microalgae: Formation Mechanism and Applications. **Enzyme and Microbial Technology**, 2016.

SHARANNOVA, A. et al. Synthesis of positively and negatively charged silver nanoparticles and their deposition on the surface of titanium. **IOP Publishing**, 2015.

SHENY, D. S.; MATHEW, J.; PHILIP, D. Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 1, p. 254–262, 2011.

SHEW, A. Nanotech's history - an interesting , interdisciplinary , ideological Split. **Bulletin of Science, Technology & Society**, v. 28, n. 5, p. 390–399, 2016.

SINGLA, R. et al. In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 152–162, 2017.

SILVA, D. et al. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 16-26, 2006.

SONG, J. Y.; KIM, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 79–84, 2009.

SU, P. et al. The Role of Autophagy In Modulation Of Neuroinflammation In Microglia. **Neuroscience**, v. 319, p. 155-167, 2016.

SUN, Y. et al. Superlattices and Microstructures The preparation and characterization of nanoparticle Ag – SiO₂ composite films with super low refractive index. **Superlattices And Microstructures**, v. 73, p. 136–144, 2014.

SUNKAR, S.; NACHIYAR, C. V. Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 12, p. 953–959, 2012.

TAN, J. et al. Oil dispersion of AgI / Ag₂S salts as a new electroactive material for potentiometric sensing of iodide and cyanide. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 101, p. 57–62, 2004.

TANG, Z. et al. Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 86–128, 2015.

THOMAS, T.K et al. Triple-antiretroviral prophylaxis to prevent mother-to-child-transmission through breast feeding the Kisumu Breastfeeding Study, Kenya: a clinical trial. **PloS Medicine**, 2011.

TIPPAYAWAT, P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. **Peer J**, p. 1–24, 2016.

TRAN, Q. H.; NGUYEN, V. Q.; LE, A.-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, n. 3, 2013.

TUTAJ, K. et al. Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles: Synthesis, properties and antifungal activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1095–1103, 2016.

VARADARAJAN, T. K. Thermal decomposition as route for silver nanoparticles. **Nanoscale research letters**, p. 44–48, 2007.

VARMA, D. M. et al. Acta Biomaterialia Injectable carboxymethylcellulose hydrogels for soft tissue filler applications. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 4996–5004, 2014.

VAROGLU, A. et al. Effects of valproate, carbamazepine, and levetiracetam on the antioxidant and oxidant systems in epileptic patients and their clinical importance. **Clinical Neuropharmacology**, v.33, p. 155–157, 2010.

VENKATPURWAR, V.; PORKHARKAR, P. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: Study of in-vitro antibacterial activity. **Materials Letters**, v.65, p. 999-1002, 2011.

VELUSAMY, P. et al. Greener approach for synthesis of antibacterial silver nanoparticles using aqueous solution of neem gum (*Azadirachta indica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 66, n. 1, p. 103–109, 2015.

VIERA, A. et al. Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp. **Chemical Engineering Journal**. v. 161, p. 99-105, 2010.

WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D. M. S. Targeting the Redox Balance in inflammatory Skin Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9126-9167, 2013.

XU, X. et al. Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223–232, 2015.

YADOLLAHI, M.; NAMAZI, H.; AGHAZADEH, M. Antibacterial carboxymethyl cellulose / Ag nanocomposite hydrogels cross-linked with layered double hydroxides. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 79, p. 269–277, 2015.

YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241–248, 2015.

YANG, J. et al. Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. **Cell cycle**. v.10, p. 144-55, 2011.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 475-9, 2011.

ZHU, H. et al. Experimental study on the variations in human skin temperature under simulated weightlessness. **Building and Environment**, v. 117, p. 135–145, 2017.

ANEXOS

REIVINDICAÇÕES

- 1) **“Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) modificada com anidrido ftálico”** e com as mais diversas classes de anidridos com ou sem o uso de solventes **caracterizado por** ser o produto da reação da goma de cajueiro com anidrido ftálico sob agitação a uma temperatura entre 120-130°C em dois tempos 20 e 40 min em que no final de cada tempo foi adicionado 5mL de N-N- dimeticetamida a fim de parar a reação.
- 2) **“Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) modificada com anidrido ftálico”** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por compreender um produto para formulações farmacêuticas, produzidos na forma de géis, cremes, pomadas, soluções, para cicatrização de feridas e plataforma entrega de princípios ativos preferencialmente na preparação de nanopartículas metálicas e poliméricas.
- 3) **“Nanopartícula de prata estabilizadas com Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) modificada”** caracterizado por utilizar sais de prata e goma de cajueiro modificado por reação com anidridos para realização da síntese de nanopartícula.
- 4) **“Nanopartícula de prata estabilizada com Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) modificada”** de acordo com a reivindicação 3 utilizando nitrato de prata preferencialmente a concentração entre 0,1 a 10 mM.
- 5) **“Nanopartícula de prata estabilizada com Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) modificada”** de acordo com a reivindicação 3 para ser utilizada como componente em formulações com atividade antibacteriana, antifúngica, produto cicatrizante e de reparação tecidual, componentes de cimentos ortopédicos, curativos, ataduras, veículo para medicamentos, cremes, loções, gel e soluções estética.
- 6) **“Nanopartículas poliméricas com Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) modificada como veículo para incorporação de fármacos”** de acordo com a reivindicação 2, para uso como matriz obtida, preferencialmente, rotas de síntese por diálise para carreamento e incorporação de fármacos.