

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Andréia Grossi Santos de Laia

Estudo de filmes e hidrogéis a base de alginato e goma gelana visando aplicações na regeneração de discos intervertebrais

Belo Horizonte

Maio de 2015

Andréia Grossi Santos de Laia

Estudo de filmes e hidrogéis a base de alginato e goma gelana visando aplicações na regeneração de discos intervertebrais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Seleção, Processamento e Caracterização, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Hermes de Souza Costa

Ezequiel de Souza Costa Júnior

Belo Horizonte

Maio de 2015

Laia, Andréia Grossi Santos de.
L185e Estudo de filmes e hidrogéis a base de alginato e goma gelana
visando aplicações na regeneração de discos intervertebrais /
Andréia Grossi Santos de Laia. - 2015.
113 f. : il.; fotos ; tabs. ; grafs. –
Orientador: Hermes de Souza Costa.
Co-orientador: Ezequiel de Souza Costa Junior.
Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2015.
Bibliografia.

1. Disco intervertebral. 2. Hidrogéis. 3. Alginatos. 4. Polissacarídeos
Bacterianos. I. Costa, Hermes de Souza. II. Costa Junior, Ezequiel
de Souza. III. Título.

CDD: 610.28

*Aos meus queridos pais, Antônio Luiz dos Santos
e Belarminda Mariza Grossi dos Santos,
por serem exemplo para mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, sempre fiel, sempre me abençoando, me fortalecendo e guiando minha vida.

Aos meus pais Antônio e Mariza, pelo constante carinho, por colocarem em meu coração a necessidade de estudar.

Ao meu esposo Marconi, pelo incentivo constante sem o qual não teria chegado até aqui. Agradeço pela compreensão, pelo amparo e por não me deixar desistir.

Aos meus irmãos Bruno e Breno, por torcerem pela conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Hermes de Souza Costa, exemplo de pesquisador, que com sua orientação incentivadora e sua presteza me ensinou pacientemente e enxergou o melhor em meu trabalho.

Ao meu coorientador Ezequiel de Souza Costa Júnior, à quem tenho real admiração, agradeço pela amizade, por me ensinar, aconselhar e ajudar sempre.

À Professora Maria Celeste Monteiro de Souza Costa, por me trazer para o CEFET, por me incentivar, me dando palavras de fortalecimento sempre que eu a encontrava. Você faz parte da minha formação! À Professora Maria Cristina Monteiro de Souza Costa, por tamanha dedicação e cuidado no desenvolvimento da parte microbiológica deste trabalho. Vocês são muito queridas!

Ao Professor Claudinei Rezende Calado, que com sua disponibilidade dedicou tempo à minha dissertação, mesmo com uma agenda repleta de trabalhos.

À Professora Eliane Ayres, que com suas observações e sugestões contribuiu para melhor desempenho deste trabalho.

À Professora Elaine Carballo Siqueira Corrêa, pela alegria sempre presente e pela ajuda indispensável nesta trajetória.

Aos professores, Sidney Nicodemos da Silva, Danielle Marra Azevedo, Paulo Renato Perdigão de Paiva, Wellington Lopes, Roberta Viana Ferreira, Rogério Antônio Xavier Nunes, Augusto César da Silva Bezerra e Leonardo Roberto da Silva, pelos ensinamentos transmitidos e pelo incentivo sempre.

Aos funcionários Joel Romano, Bruno Cordeiro, Ivete Maria Aires, Airton Gomes, Sonja Bárbara Barczewski e aos alunos de iniciação científica, Marina Rabelo Moreira e Vinícius Meireles Mendonça, pela colaboração na conclusão dessa etapa.

À Debora Closel, por me ajudar com a língua inglesa, por se interessar pelo meu mestrado, por torcer pela minha vitória não somente aqui, mas pela vida toda.

À Maria da Conceição César pelo suporte nas horas de dificuldade.

À Greiziane da Silva Soares e à Cássia Vianna, pela verdadeira amizade, pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos “mais chegados que irmãos”, Leônidas Francisco, Ana Carolina Malta, Dimmy Carter, Andréia Carter, Miguel Carter, Silvio Junio Santos, Cláudia Lopez, Arthur, Aurélio Júnior, Cíntia Figueiredo e Isabela, pelas constantes orações e sábios conselhos.

Às amigas Adriana Zatti, Eliane Grigorowsky, Aline de Magalhães, Grazielle Braga, Suzanny Martins, Ana Pacheli, Sandra Regina, Talita Martins, Layla Mosqueira, Helane Lúcia, Liliane Cruz, pelo companheirismo nos momentos difíceis, nas alegrias e na troca de experiências.

Em especial à Fernanda de Magalhães e à Jacqueline Cavalieri, pelas horas de estudo, por não medirem esforços para me ensinar sobre a Engenharia de Materiais, sanando minhas dúvidas.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, ao Departamento de Engenharia de Materiais, ao Departamento de Química e ao órgão de fomento CAPES pelo auxílio financeiro e apoio neste trabalho.

“Feliz o homem que acha a sabedoria, e o homem que adquire o conhecimento; pois a sabedoria é muito mais proveitosa que a prata, e o lucro que ela proporciona é maior que o do ouro fino”.

(Bíblia Sheed – Pv. 3: 13, 14).

RESUMO

O disco intervertebral (IVD) é uma fibrocartilagem que fica entre corpos vertebrais ósseos, conferindo flexibilidade, transferência de peso e dissipação de energia para a coluna. Ele é formado pelo Núcleo Pulposo (NP), circunferencialmente rodeado pelo Anel Fibroso (AF). A degeneração do IVD é um problema clínico desafiador que demanda medidas para regenerações do disco lesionado. Os biomateriais têm demonstrado capacidade de desempenhar funções importantes no tratamento de lesões relacionadas ao IVD, e os dispositivos implantáveis destes materiais têm sido estudado por vários pesquisadores nos últimos anos. Os hidrogéis apresentam propriedades elásticas potencialmente viáveis para tratar lesões do IVD. Atualmente, hidrogéis a base de goma gelana e alginato têm sido cada vez mais utilizados na engenharia de tecidos. A goma gelana (GG) é um polissacarídeo extracelular secretado pela bactéria *Pseudomonas elodea*, que dependendo do processamento é capaz de formar um gel firme e transparente com características que permitem sua aplicação como matriz para crescimento de células, bem como para suporte e sustentação celular. O alginato, um polissacarídeo natural extraído de algas marinhas, possui propriedades mucoadesivas, além de ser biocompatível e biodegradável. A combinação destes biopolímeros permite a modulação de suas propriedades de modo a serem utilizadas como alternativa no tratamento de lesões do IVD, prevenindo complicações como consequência da lesão, proporcionando recuperação mais rápida e eficiente. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sobre os biopolímeros alginato de sódio (AS) e GG, obter e caracterizar hidrogéis de AS, GG e misturas de AS-GG-Cloreto de cálcio (CaCl_2) para possíveis aplicações no tratamento de lesões do IVD. Espera-se com este estudo desenvolver hidrogéis do sistema AS-GG capazes de auxiliar no processo de regeneração tecidual, proporcionando mais uma opção de tratamento para aqueles que apresentam estes tipos de lesões.

Palavras-chaves: Disco intervertebral. Hidrogéis. Alginato de sódio. Goma gelana.

ABSTRACT

The intervertebral disc (IVD) is a bone fibrocartilage, which is located between the vertebral bodies, providing flexibility, weight transfer and dissipation of energy into the column. It consists of the nucleus pulposus (NP), circumferentially surrounded by the fibrous ring (AF). Degeneration of the IVD is a challenging clinical problem that requires measures for regenerating the injured disc. Biomaterials have demonstrated the ability to perform important functions in the treatment of IVD-related injuries, and the implantable devices from such materials have been studied by many researchers in recent years. Hydrogels have potentially viable elastic properties to treat IVD injuries. Currently hydrogels based on alginate and gellan gum are being increasingly used in tissue engineering. Gellan gum (GG) is an extracellular polysaccharide secreted by the bacterium *Pseudomonas elodea*, which depending on the processing is capable of forming a firm, transparent gel with characteristics that allow its use as matrix for cell growth as well as support and cellular sustainability. Alginate which is a natural polysaccharide extracted from seaweed, has mucoadhesive properties, and is biocompatible and biodegradable. The combination of these biopolymers allows the properties of these materials properties adjustable to serve as an alternative treatment for IVD-wound healing, preventing injury complications and providing a more rapid and efficient recovery. The aim of this work was to conduct a study on the biopolymers sodium alginate (SA) and GG, to obtain and to characterize SA hydrogels, GG and mixtures of SA-GG-calcium chloride (CaCl_2) for potential applications to treat IVD injuries. Then, it will be possible to develop an SA-GG hydrogels system capable to assist in tissue regeneration, providing another treatment option for these types of injuries.

Keywords: Intervertebral disc. Hydrogels. Sodium alginate. Gellan gum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação de biomateriais poliméricos.	24
Figura 2 – Vértebras lombares: vista lateral esquerda.	25
Figura 3 – Disco intervertebral: vista superior.	25
Figura 4 – Hérnia de disco.	26
Figura 5 – Representação da estrutura dos meros e do polímero natural alginato. ...	29
Figura 6 – Formação da rede de alginato de cálcio.	31
Figura 7 – Estrutura química da goma gelana.	32
Figura 8 – Esquema de DRX.	36
Figura 9 – Estrutura do complexo químico do EDTA.	39
Figura 10 – Estrutura do complexo cálcio-EDTA.	40
Figura 11 – Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão. ...	43
Figura 12 – Fluxograma das etapas de trabalho.	45
Figura 13 – Difratoograma com regiões amorfas e cristalinas.	54
Figura 14 – Etapas de realização do ensaio de Volumetria de Complexação.	56
Figura 15 – Curva <i>DSC</i> da amostra de AS em pó sob atmosfera de N ₂ (30 a 500 ⁰ C).	60
Figura 16 – Curva <i>DSC</i> da amostra de AS em pó sob atmosfera de N ₂ (-50 a 0 ⁰ C).	61
Figura 17 – Curvas da <i>TGA</i> de AS em pó sob atmosfera de N ₂ (30 a 900 ⁰ C).	62
Figura 18– Curva <i>DSC</i> da amostra de GG em pó sob atmosfera de N ₂ (30 a 280 ⁰ C).	64
Figura 19 – Curvas da <i>TGA</i> da GG em pó sob atmosfera de N ₂ (30 a 900 ⁰ C).	64
Figura 20 – Espectro <i>FTIR</i> e estrutura química do AS em pó.	66
Figura 21 – Espectro <i>FTIR</i> e estrutura química da GG.	67
Figura 22 – Gráfico DRX do AS em pó.	68
Figura 23 – Gráfico DRX da GG em pó.	69
Figura 24 – Aspecto dos filmes de AS com CaCl ₂	70
Figura 25 – Aspecto dos filmes de goma gelana com alginato de sódio e CaCl ₂	71
Figura 26 – Aspecto dos filmes de AS com CaCl ₂	75
Figura 27 – Aspecto dos filmes de goma gelana com alginato de sódio e CaCl ₂	76
Figura 28 – Perfil de intumescimento dos filmes em solução tampão de pH (7±0,5).	77
Figura 29 – Curvas de <i>DSC</i> para os filmes de AS + CaCl ₂	79

Figura 30 – Curvas da <i>TGA</i> para os filmes de AS + CaCl ₂ sob atmosfera de N ₂ (30 a 900 ⁰ C).....	80
Figura 31 – Curvas de <i>DSC</i> para os filmes de AS + GG + CaCl ₂	83
Figura 32 – Curvas da <i>TGA</i> de AS + GG + CaCl ₂ sob atmosfera de N ₂ (30 a 900 ⁰ C).	84
Figura 33 – Espectro FTIR dos filmes de AS e CaCl ₂	86
Figura 34 – Espectro FTIR dos filmes de GG, AS e CaCl ₂	87
Figura 35 – Difração de raios X dos filmes de AS e CaCl ₂	89
Figura 36 – DRX dos filmes de AS, GG e CaCl ₂	90
Figura 37 – Comportamento mecânico dos filmes obtidos.....	93
Figura 38 – Atividade antimicrobiana dos diferentes filmes obtidos para a bactéria <i>Escherichia coli</i>	95
Figura 39 – Atividade antimicrobiana dos diferentes filmes obtidos para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	96
Figura 40 – Atividade antimicrobiana dos diferentes filmes obtidos para a bactéria <i>Candida albicans</i>	98
Figura 41 – Gráfico do diâmetro do halo de inibição dos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Anfotericina B.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações da goma gelana.	33
Tabela 2 – Regiões espectrais do infravermelho.....	37
Tabela 3 – Principais aplicações da espectroscopia no infravermelho.	38
Tabela 4 – Principais bandas de absorção de infravermelho para o AS.	38
Tabela 5 – Principais bandas de absorção de infravermelho para a GG.	39
Tabela 6 – Matriz Experimental.	46
Tabela 7 – Tabela da mistura dos reagentes para formulação dos filmes.	48
Tabela 8 – Tabela da descrição dos filmes obtidos.....	49
Tabela 9 – Micro-organismos, meios de cultura e antibióticos usados no teste de Antibiograma.....	59
Tabela 10 – Valores padrão de halos inibitórios para os respectivos antibióticos.....	59
Tabela 11 – Resultado da <i>TGA</i> e <i>DSC</i> do AS em pó.	63
Tabela 12 – Resultado da <i>TGA</i> e <i>DSC</i> da GG em pó.	65
Tabela 13 – Bandas encontradas no espectro de infravermelho do AS em pó e seus respectivos grupos químicos.	66
Tabela 14 – Bandas encontradas no espectro de infravermelho da GG em pó e seus respectivos grupos químicos.	68
Tabela 15 – Valores de espessura dos diferentes filmes obtidos.....	73
Tabela 16 – Resultado da <i>TGA</i> e <i>DSC</i> para análise do comportamento térmico das amostras dos filmes de AS + CaCl ₂	81
Tabela 17 – Resultado da <i>TGA</i> e <i>DSC</i> para análise do comportamento térmico das amostras dos filmes de AS + GG + CaCl ₂	85
Tabela 18 – Porcentagem de absorção de CaCl ₂ pelos filmes que receberam imersão.	88
Tabela 19 – Tenacidade, Limite de Resistência à Tração, Módulo de Elasticidade, % de alongamento dos filmes e Limite de escoamento dos filmes obtidos.	91
Tabela 20 – Tenacidade, Limite de Resistência à Tração, Módulo de Elasticidade, % de alongamento dos filmes e Limite de escoamento dos filmes controle e AS+GG com maiores proporções de CaCl ₂	92
Tabela 21 – Descrição das amostras para o ensaio de Antibiograma.	94
Tabela 22 – Diâmetro de inibição obtidos através dos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Anfotericina B.	99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Procedimento para obtenção dos filmes contendo diferentes proporções de cloreto de cálcio (CaCl_2).	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF = Anel Fibroso

AP = Área dos picos

AS = Alginato de sódio

AT = Área Total

Ba²⁺ = Bário

Ca²⁺ = Cálcio

Ca = Cálcio

CaCl₂ = Cloreto de Cálcio

CO₂ = Dióxido de Carbono

CLSI = *Clinical Laboratory Standards Institute* – Instituto Padrão de Laboratório de Análises Clínicas

DI = Água Deionizada

DRX = Difração de raios X

DSC = *Differential Scanning Calorimetry* – Calorimetria Diferencial Exploratória

EDTA = Ácido etilenodiaminotetra acético

EPS = Exopolissacarídeo

FDA = *United States Food and Drug Administration* – Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos

FTIR = *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

G = Monômero (1,4)- α -L-guluronato

GC = Grau de Cristalinidade

GG = Goma Gelana

GI = Grau de Intumescimento

GRAS = Generally Recognized as Safe (Geralmente Reconhecido como Seguro)

IVD = Disco Intervertebral

IVDs = Discos Intervertebrais

JECFA = Comitê de Especialistas Associados em Aditivos Alimentares

M = (1,4)- β -D-manuronato

ME = Matriz Extracelular

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg²⁺ = Cátion de Magnésio Bivalente

NaCO_3 = Carbonato de Sódio

NaO_2 = Superóxido de Sódio

NP = Núcleo Pulposo

N_2 = Nitrogênio

OMS = Organização Mundial de Saúde

PBS = Phosphate Buffered Saline – Tampão-fosfato-salino

Sr^{2+} = Cátion de Estrôncio II

TGA = Thermogravimetric Analysis – Termogravimetria

Tg = Temperatura de transição vítrea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Biomateriais	22
3.2 Engenharia de Tecidos	23
3.3 Disco Intervertebral	24
3.3.1 Patologia	26
3.4 Hidrogéis	27
3.5 Alginato	28
3.5.1 Propriedades.....	30
3.5.2 Aplicações.....	30
3.5.3 Interação com cloreto de cálcio (CaCl ₂)	31
3.6 Goma Gelana	32
3.6.1 Propriedades.....	33
3.6.2 Aplicações.....	34
3.7 Caracterização	35
3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
3.7.2 Difração de raio X (DRX)	36
3.7.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - <i>FTIR</i>	37
3.7.4 Volumetria de complexação.....	39
3.7.5 Termogravimetria (Thermogravimetric Analysis – <i>TGA</i>).....	40
3.7.6 Calorimetria Diferencial Exploratória (Differential Scanning Calorimetry – <i>DSC</i>)	41
3.7.7 Intumescimento de Hidrogéis	41
3.7.8 Propriedades mecânicas dos filmes	42
3.7.9 Análise da atividade antimicrobiana dos filmes	42
4.1 Etapas do desenvolvimento do trabalho	45
4.3 Preparo das soluções	47
4.3.1 Preparo da solução de AS.....	47
4.3.2 Preparo das soluções de GG.....	47

4.3.3 Preparo da solução de CaCl ₂	48
4.4 Preparo dos filmes.....	48
4.5 Modificação dos filmes	49
4.6 Caracterização da matéria prima e dos filmes.....	52
4.6.1 Análise térmica dos polímeros AS e GG - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA)	52
4.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	53
4.6.3 Difração de raios-x (DRX).....	53
4.6.4 Aspecto dos filmes.....	54
4.6.5 Espessura dos filmes.....	55
4.6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	55
4.6.7 Perfil de hidratação dos filmes.....	55
4.6.8 Volumetria de complexação.....	56
4.6.9 Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes.....	57
4.6.10 Caracterização Biológica <i>in vitro</i> - Antibiograma	58
5 RESULTADOS	60
5.1 Caracterização da matéria prima.....	60
5.1.1 Análise térmica do Alginato de Sódio (AS).....	60
5.1.2 Análise térmica da Goma Gelana (GG).....	63
5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	65
5.1.4 Difração de Raios-X.....	68
5.2 Caracterização dos filmes AS e GG	70
5.2.1 Morfologia macroscópica obtida por aspecto visual	70
5.2.2 Análise da espessura dos filmes	73
5.2.3 Análise Morfológica dos filmes	74
5.2.4 Perfil de hidratação dos filmes.....	77
5.2.5 Análise térmica dos filmes	78
5.2.6 Análise dos grupos químicos dos filmes.....	85
5.2.7 Volumetria de complexação.....	87
5.2.8 Determinação dos parâmetros de cristalinidade dos filmes	88
5.2.9 Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes.....	90
5.2.10 Caracterização biológica dos filmes <i>in vitro</i>	93
6 CONCLUSÕES.....	100
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
---	------------

1 INTRODUÇÃO

A degeneração do disco intervertebral (IVD) é patologia desafiadora que, devido à ineficiência dos tratamentos atuais, demanda urgentemente o desenvolvimento de novas abordagens e técnicas terapêuticas (SILVA-CORREIA et al., 2011). Dentre os materiais utilizados para a regeneração dos discos intervertebrais, os polímeros são os mais usados.

Os polímeros são importantes materiais empregados em aplicações biomédicas. São materiais escolhidos para serem aplicados em dispositivos cardiovasculares, bem como para substituição e acréscimo de diversos tecidos moles (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002).

Os melhores materiais de implante viáveis para regeneração do IVD ainda necessitam ser identificados, porém, acredita-se que materiais baseados em hidrogéis biodegradáveis são candidatos promissores (SILVA-CORREIA et al., 2011), como o AS e a GG.

O alginato é um polímero natural, solúvel em água e composto pela repetição de duas diferentes unidades, a (1,4)- α -L-guluronato ou unidade G e a (1,4)- β -D-manuronato ou unidade M (STEVENS, 2009). O alginato é extraído das algas, onde sua principal função é estrutural, conferindo resistência e flexibilidade ao tecido (FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014). Devido à sua habilidade de reter água e suas propriedades estabilizantes, gelificantes e espessantes, o alginato é comumente utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014; CHAN; LEE; HENG, 2002). Considerado biocompatível e biodegradável, possui a capacidade de formar matrizes porosas de gel com propriedades mucoadesivas (PAUL; SHARMA, 2004; FAN et al., 2006).

A goma gelana (GG) é um polissacarídeo aniônico produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea* através da fermentação aeróbica (SWORN, 2000 apud LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013, p. 672). Possui um esqueleto linear de unidades repetidas dos monossacarídeos 1,3 β -D-glucose, 1,4 β -D-ácido glucurônico, 1,4 β -D-glucose, 1,4 α -L-ramnose (CANILHA et al., 2006).

A GG pode ser usada para a obtenção de géis emulsificantes, os quais são amplamente utilizados em cosméticos, indústria alimentícia e indústria farmacêutica (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013).

O hidrogel de AS, bem como o hidrogel de GG promovem hidratação para a recuperação de lesões, não permitindo reações citotóxicas ao organismo, promovendo restauração funcional do tecido lesionado, uma vez que promovem o ambiente ideal para a recuperação de lesões (CURATEC, 2013).

Assim, a utilização de hidrogéis de AS e de GG pode ser alternativa para recuperação de lesões ocasionadas no IVD, proporcionando a restauração das estruturas que compõe esse disco e prevenindo futuras complicações.

Uma vez que os materiais relatados acima demonstram importância no auxílio à recuperação de lesões no IVD, o tema deste trabalho foi analisar e caracterizar a interação entre AS e a GG, bem como as propriedades e a biocompatibilidade desses materiais em conjunto e separadamente para auxiliar a recuperação de lesões ocasionadas no IVD.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter e caracterizar a interação de hidrogéis e filmes dos polímeros AS e GG, juntos e separadamente, para avaliar a possibilidade de sua utilização como biomaterial destinado à restauração de lesões do disco intervertebral.

2.2 Objetivos Específicos

Os seguintes objetivos específicos foram alvo à obtenção do objetivo geral do presente projeto:

- Estabelecer metodologia experimental para a obtenção de blendas de hidrogéis e filmes à base de alginato de sódio (AS) e goma gelana (GG);
- Sintetizar filmes de AS e GG com diferentes proporções de CaCl_2 ;
- Comparar as propriedades das blendas dos hidrogéis de AS, GG e CaCl_2 com as dos hidrogéis puros de AS e de GG;
- Caracterizar fisicamente, quimicamente e morfologicamente os hidrogéis empregando as técnicas de difração de raios-x (DRX), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TGA), volumetria de complexação e análise de espessura;
- Avaliar o comportamento mecânico dos materiais obtidos empregando ensaio de tração;
- Avaliar a capacidade de intumescimento dos materiais obtidos por meio de Tampão fosfato-salino (PBS);
- Verificar a capacidade antimicrobiana dos filmes obtidos através da caracterização biológica *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Há duas perspectivas diferentes e importantes ao se considerar o significado de Biomateriais. A primeira diz respeito à evolução da ciência de materiais e da ampla gama de materiais que surgiram na última década. A segunda está relacionada à evolução de tecnologias de cuidados de saúde (WILLIAMS, 2009).

Biomaterial pode ser definido como qualquer tipo de material utilizado para fabricação de dispositivos para substituição de uma parte ou de uma função do corpo, de maneira aceitável fisiologicamente. Essa substituição deve ser realizada de forma segura, confiável e econômica. Os materiais utilizados são denominados materiais biológicos, tais como osso e pele. Todo material usado *in vivo* deve ser aprovado pela *FDA (United States Food and Drug Administration)* (PARK; LAKES, 2010).

Uma das formas de intervenção de tratamento consiste na utilização desses biomateriais. Os biomateriais são amplamente usados principalmente para aplicações médicas. Seu uso envolve crescimento celular em cultivo, ensaios em laboratórios clínicos, matrizes de diagnósticos genéticos e diversos tipos de implantes (RATNER et al., 2004).

Os polímeros são importantes materiais usados para aplicações biomédicas. São usados em sistemas carreadores de fármacos, no diagnóstico da aids, e como material *scaffold* para aplicações na engenharia de tecidos. Os exemplos de aplicações incluem implantes vasculares, válvulas cardíacas, implantes mamários, lentes de contato, lentes intraoculares, componentes de oxigenadores extracorpóreos, unidades de plasmáfereze e dialisadores, revestimentos para cápsulas e comprimidos farmacêuticos, suturas, adesivos e substitutos sanguíneos (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002).

O estudo de biomateriais tem recebido atenção na última década. Em especial, sistemas de hidrogéis baseados em polímeros de origem natural e seus derivados

(por exemplo, quitosana, ácido hialurônico, alginato, carboximetilcelulose e GG) têm sido desenvolvidos para promover a regeneração do disco intervertebral (SILVA-CORREIA et al., 2011). Materiais poliméricos apresentam grande semelhança aos componentes de tecido poliméricos naturais. (PARK; LAKES, 2010). Estudos prévios afirmam que a combinação de células e biomateriais podem resultar em reparo tecidual rápido, previsível e controlado (PETITE, 2000).

3.2 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos compreende estudos de células para fisiologia e biologia do órgão, bem como a interação destas células com os biomateriais. É destinada a promover a regeneração da lesão pela restauração viável de um tecido ou órgão (PARK; LAKES, 2010).

A definição da engenharia de tecidos é ampla e pode incluir dispositivos que sejam acelulares ou celulares. No caso de dispositivos de engenharia de tecido acelular haverá crescimento do tecido existente através do implante. Já nos dispositivos de engenharia de tecido celular existirá o fornecimento de novas células ao sítio de implante, o que aumentará a população de células existente ou irá reintroduzir a população de células em falta (SHALABY; BURG, 2004).

Engenharia de tecidos refere-se à obtenção de tecidos doadores que são desenvolvidos dentro de matrizes com células específicas. Estas células podem ser implantadas diretamente no local destinado, ou estimuladas a se proliferarem de maneira organizada em cultura tecidual externa, onde podem ter seu crescimento orientado por meio de um substrato, denominado *scaffold*. Após a cultura celular o tecido é implantado no local previamente definido (PARK; LAKES, 2010).

A matriz ou o *scaffold* (geralmente são assim denominados) constitui o componente principal e é responsável por providenciar formação do arcabouço necessário e apropriado para o suporte do componente celular (SHALABY; BURG, 2004).

Os *scaffolds* são materiais temporários estruturados que desempenham um importante papel de guiar o crescimento celular *in vitro* ou *in vivo*. O local e a

resposta sistêmica dos tecidos para os implantes compreendem um aspecto de biocompatibilidade (PARK; LAKES, 2010).

O sucesso de um biomaterial ou de um implante depende de três fatores principais: as propriedades de biocompatibilidade do implante, o estado de saúde do paciente beneficiário e a competência do cirurgião que implanta e monitora seu progresso (PARK; LAKES, 2010).

Para classificar polímeros direcionados para engenharia de tecidos, duas propriedades são usadas tipicamente. Primeiro, o material é classificado por sua capacidade de fragmentação *in vivo*, isto, é, se o material é reabsorvível ou não reabsorvível. Segundo, o material é classificado como natural ou não natural. Para essa classificação, utiliza-se a fonte do material. As quatro combinações desta classificação estão demonstradas na figura 1, e são úteis para serem empregadas dentro da engenharia de tecidos (SHALABY; BURG, 2004).

Figura 1 – Classificação de biomateriais poliméricos.

Sintético Absorvível	Natural Absorvível
Sintético Não Reabsorvível	Natural Não Reabsorvível

Fonte: SHALABY; BURG, 2004.

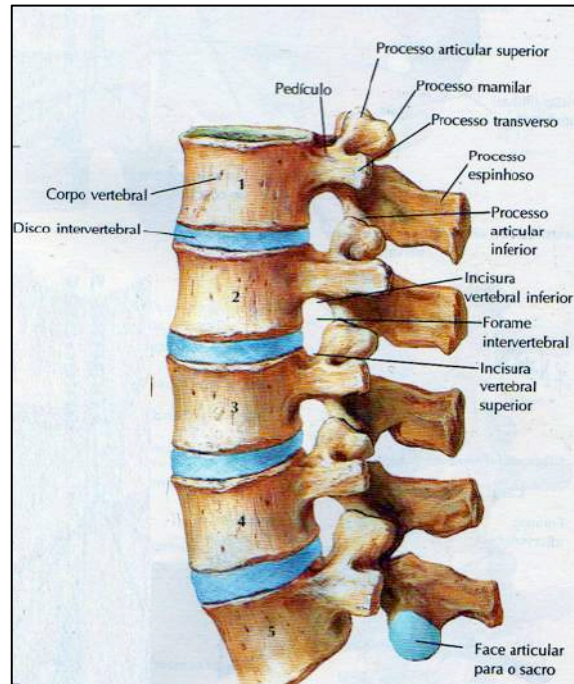
Langer e Vacanti (1993) discutiram e descreveram como o campo da engenharia de tecidos poderia contribuir para fornecer soluções clínicas. Eles destacaram diversas vezes a importância da utilização de polímeros na engenharia de tecidos, relatando o tratamento da doença de Parkinson e a regeneração de nervos periféricos para projetar o modelo de transplantes vasculares e a recuperação da cartilagem.

3.3 Disco Intervertebral

Os discos intervertebrais (IVDs) são constituídos por um anel fibroso (AF) presente na região periférica e por um núcleo pulposo (NP) presente na região central. Estão localizados entre as vértebras adjacentes (BRON et al., 2011; SILVESTRE et al., 2005) (figuras 2 e 3). Este NP é apresentado em forma de textura gelatinosa e macia, proporcionando funções de amortecimento à coluna vertebral, permitindo

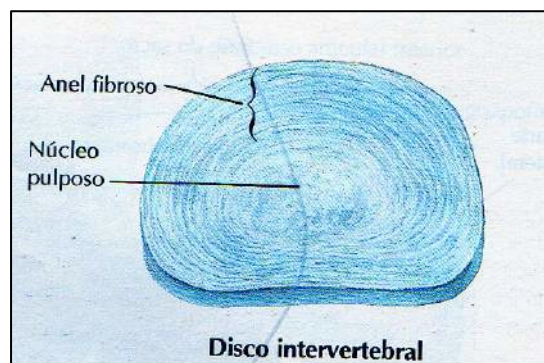
flexibilidade, prevenindo traumatismos e lesões ósseas. Além disso, suportam e distribuem carga de compressão, força de torção e curvatura da coluna vertebral. Desempenham função de coxim pneumático (NERURKAR; ELLIOTT; MAUCK, 2010; SILVESTRE et al., 2005).

Figura 2 – Vértex lombares: vista lateral esquerda.



Fonte: NETTER, 1998.

Figura 3 – Disco intervertebral: vista superior.

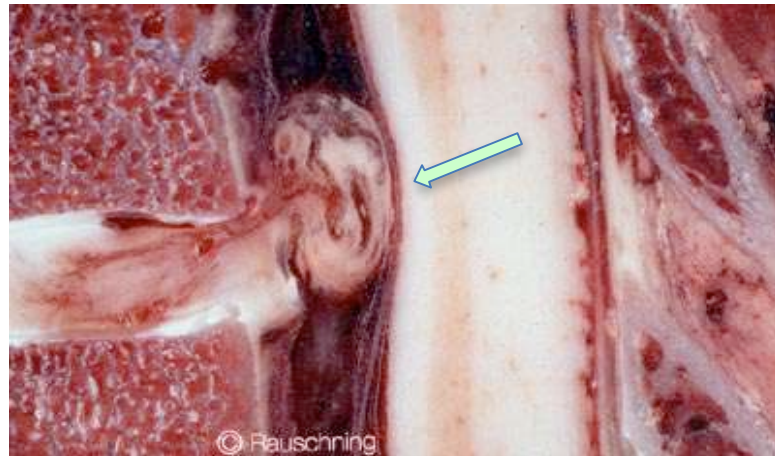


Fonte: NETTER, 1998.

Em um disco intervertebral (IVD) danificado, ocorrem alterações significativas, tais como: I) mudanças na composição bioquímica, isto é, remodelação da Matriz Extracelular (ME); II) perda da hidratação do NP; III) diminuição da altura do IVD; IV) deterioração da cartilagem da faceta e V) protusão do IVD ou surgimento de hérnia (SILVA-CORREIA et al, 2012) (figura 4). Eventualmente isso pode provocar impacto

nos nervos que se manifesta como dor nas pernas ou lombar (REITMAIER et al, 2012).

Figura 4 – Hérnia de disco.



Fonte: FAGUNDES, 2012.

3.3.1 Patologia

A dor na coluna vertebral é um transtorno frequentemente associado ao trabalho e à idade (DIAMOND; BORESTEIN, 2006). Não raro, está vinculada à limitação da atividade profissional e, por isso mesmo provoca impacto socioeconômico nas sociedades industrializadas. Além disso, muitas vezes, representa problema para a qualidade de vida de adultos e idosos. (SILVA-CORREIA et al., 2011).

Há diversos fatores que podem causar dor na coluna vertebral, mas a alteração do IVD parece ter alta relevância (URBAN; ROBERTS, 2003; CHEUNG; AL GHAZI, 2008). Ele está localizado entre as vértebras que compõe a coluna vertebral. São altamente deformáveis e permitem as mudanças de postura da coluna vertebral (SILVESTRE et al., 2005). O IVD é constituído por duas estruturas, sendo uma fibrosa de multicamadas externa (AF) e um gel como núcleo interno (NP), os quais são comprimidos entre duas placas terminais cartilagosas (SILVA-CORREIA et al., 2012).

Biomecanicamente, a degeneração do IVD é caracterizada pela diminuição da pressão osmótica e da pressão intradiscal (NACHEMSON, 1960 apud BARBIR, 2010, p.1067), o aumento do módulo compressivo no AF (IATRIDIS et al., 1998

apud BARBIR, 2010, p.1067), a diminuição da força de expansão do AF (ACAROGLU et al., 1995 apud BARBIR, 2010, p.1067) e a diminuição da pressão de dilatação do NP (JOHANNESSEN e ELLIOT apud BARBIR, 2010, p.1067).

Com o envelhecimento o NP do IVD sofre perda de água e proteoglicanos, ocasionando mudanças na estrutura destes discos, tornando-os mais fibrosos e rígidos. Embora essas mudanças até certo ponto sejam fisiológicas, elas podem resultar em doenças degenerativas sintomáticas do disco (BRON et al., 2011). Quanto mais rápido for o processo de intervenção para tratamento dos sintomas provocados por essas doenças, melhor será a prevenção de complicações.

Abordagens conservativas para tratamento da degeneração do IVD são baseadas principalmente na administração de droga, mas vários problemas requerem intervenções cirúrgicas, tais como dissecotomia, fusão da coluna e substituição do IVD (SILVA-CORREIA et al, 2012).

3.4 Hidrogéis

Os hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais que contêm grande quantidade de água. Geralmente são materiais obtidos através da copolimerização entre monômeros ou polímeros hidrofílicos com comonômeros polifuncionais, promovendo ligações cruzadas (BEJARANO et al., 2008). A presença destas ligações cruzadas proporciona aos hidrogéis a capacidade de absorver elevada quantidade de água ou fluidos biológicos sem perder sua estrutura (BEKIN et al., 2014; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Isso permite que os hidrogéis sejam usados na preparação de formas farmacêuticas, permitindo a liberação do fármaco após sua difusão em contato com o meio de dissolução ou em resposta a estímulos fisiológicos, tais como: temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (como exemplo, a glicose, a uréia e a insulina), força iônica e oxidação (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os hidrogéis podem absorver até milhares de vezes o seu peso seco em água ou fluidos biológicos (MOHAMED; SABAA, 2014). São usados como adsorvente eficazes para várias aplicações, incluindo a agricultura, horticultura, produtos de

cuidados pessoais, como veículos carreadores de fármacos, na adsorção de íons de metais pesados e em moléculas corantes de água (MANDAL e RAY, 2013). Têm atraído a atenção como material com grande potencial para substituição do NP, pois eles permitem o preenchimento de defeitos cirúrgicos irregulares com o uso de técnicas minimamente invasivas¹. Além disso, apresentam a vantagem de mimetizar funcionalmente a ME nativa apoiando as funções das células do núcleo pulposo e sustentando a liberação de moléculas bioativas (THANKAM; MUTHU, 2014; SILVA-CORREIA et al, 2012).

Os estudos atuais mostram o potencial de hidrogéis de alginato como estrutura para a engenharia do IVD, porém demonstram algumas limitações em suas características (por exemplo, suas propriedades bioadesivas) que ainda necessitam ser analisadas (BRON et al., 2011). Quando combinado com fonte de cátions divalentes, tais como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , o alginato forma gel (SHALABY; BURG, 2004). Por sua vez, Silva-Correia et al. relataram que estudos futuros deverão ser realizados com hidrogéis baseados em GG para verificar sua utilidade na regeneração do IVD (SILVA-CORREIA et al, 2011).

A GG possui grupos carboxilas livres e é, portanto, de natureza aniônica. Dessa forma, na presença de cátions monovalentes e bivalentes a goma gelana submete-se a gelificação iônica. O mecanismo de gelificação envolve a formação de zonas de junção helicoidais duplas, seguidas pela agregação de segmentos de dupla hélice para formar a rede tridimensional pela complementação com cátions e ligações de hidrogênio com a água (MUNDARGI et al., 2010).

3.5 Alginato

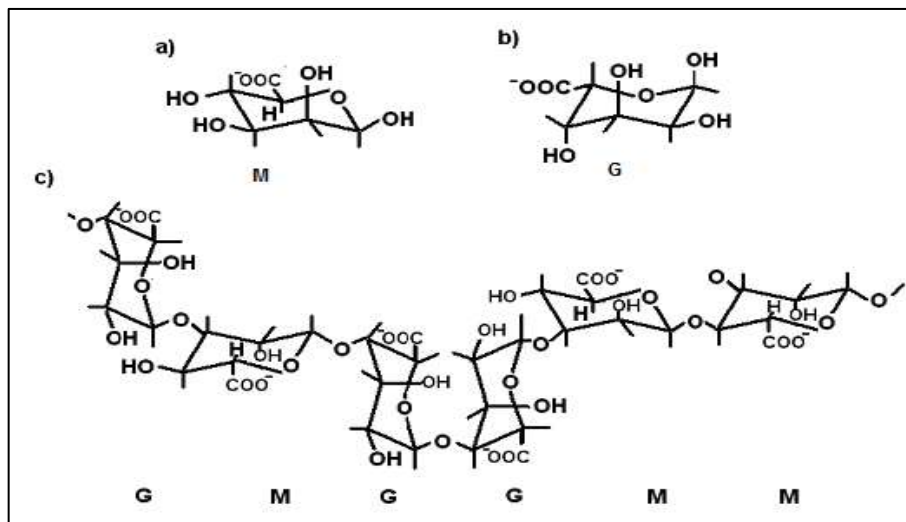
Os primeiros polímeros usados como *scaffold* para engenharia de tecidos foram os polímeros naturais. O alginato é um polissacarídeo natural e é usado amplamente em pesquisas relacionadas à engenharia de tecidos (BEKIN et al., 2014; SHALABY; BURG, 2004).

¹Técnicas onde os tecidos do corpo sofrem uma agressão mínima, durante um procedimento cirúrgico restrito à área doente, preservando assim as outras estruturas ao redor (SANCHES, 2013).

Dentre os biomateriais utilizados para regeneração do IVD o alginato é mais frequentemente estudado, uma vez que apresenta baixo custo e apresenta menor potencial para causar reações adversas nos tecidos humanos (LEONE et al., 2008; LI et al., 2008; NUNAMAKER et al., 2007).

O ácido algínico (como também é chamado) é encontrado em alguns tipos de algas marrons e é similar à celulose (STEVENS, 2009). Considerado um copolímero linear, o alginato é formado pela repetição de dois monômeros distintos, o (1,4)- α -L-guluronato ou unidade G e o (1,4)- β -D-manuronato ou unidade M (figura 5). Ele abrange cadeias de ácido glucurônico e ácido manurônico, com o comprimento e a quantidade de blocos glucurônicos tendo impacto direto em suas propriedades mecânicas e físicas (BEKIN et al., 2014; SHALABY; BURG, 2004). As propriedades físicas e químicas do alginato são influenciadas pela composição, pelo peso molecular, pela extensão e sequência dos monômeros (GEORGE; ABRAHAM, 2006; CHAN et al., 2002).

Figura 5 – Representação da estrutura dos meros e do polímero natural alginato.



(a) meros dos ácidos β -D-manurônico (bloco M);

(b) α -L-gulurônico (bloco G);

(c) polímero natural alginato.

Fonte: SANKALIA et al., 2007; ERTESVÁG; VALLA, 1998.

3.5.1 Propriedades

O alginato é biocompatível, biodegradável e possui a capacidade de formar matrizes de gel de elevada porosidade com boas propriedades mucoadesivas (FAN et al., 2006; PAUL; SHARMA, 2004). É hidrofílico, tem alta bioadesividade, baixa toxicidade, baixo custo (GEORGE; ABRAHAM, 2006). Possui característica espessante e gelificante como aditivo alimentar, uma vez que aumenta a viscosidade do alimento e confere textura por meio da formação de gel (BRASIL, 1999 apud LIMA, 2011, p. 103). É geralmente considerado como um material não tóxico e não irritante, é listado no GRAS (Generally Recognized as Safe), e aceito na Europa para uso como um aditivo alimentar (ZAM et al., 2014).

A propriedade mais usada e única em alginatos é sua habilidade de reagir com cátions polivalentes, especialmente íons Ca, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis (TURBIANI; KIECKBUSCH, 2011).

As propriedades do alginato relatadas acima são de extrema importância. Por isso sua utilização na recuperação de lesões do IVD é relevante.

3.5.2 Aplicações

As primeiras pesquisas realizadas relacionadas ao uso do alginato foram na década de 1980, onde os pesquisadores utilizaram os géis de alginato como veículos de microencapsulação para células. (SHALABY; BURG, 2004).

Dentre as diversas aplicações do alginato está sua utilização como hidrogel bioativo para o tratamento de lesões, consistindo de material fibroso absorvente, ele ajuda no desbridamento de feridas (ZAHEDI et al., 2010).

O alginato possui aplicações nas indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica, cosmética, na agricultura, na medicina e na engenharia de tecidos (MENEGUSSI et al., 2014; THU e NG, 2013; GEORGE; ABRAHAM, 2006). Embora o consumo oral excessivo pode ser prejudicial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não forneceu uma dose diária aceitável para o AS e outros sais de alginato, já que os

níveis utilizados nos alimentos não representam um perigo para a saúde humana (RAYMOND; PAUL; MARIAN; 2009).

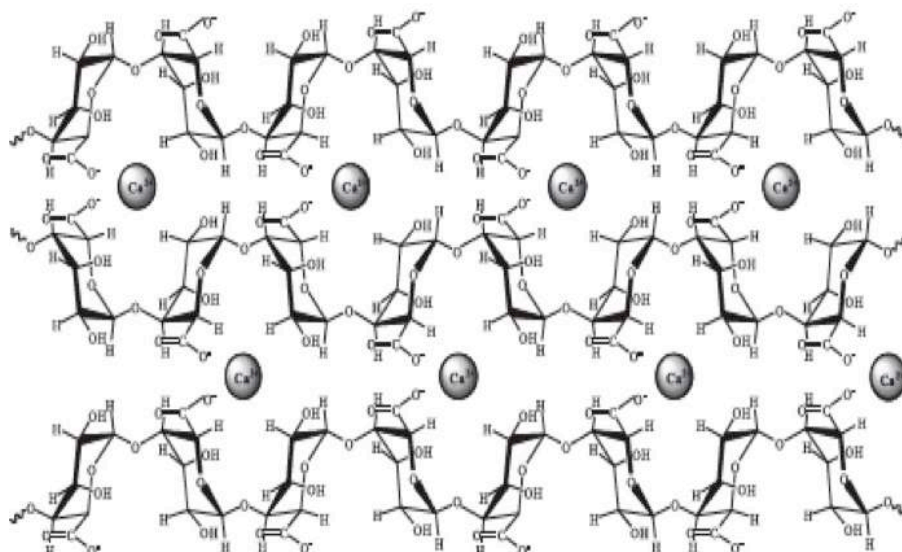
Como o sal de sódio, o alginato é usado em aplicações adesivas. É também usado nas aplicações de algumas fibras (STEVENS, 2009).

Finotelli et al. (2008) estudaram o sistema alginato de cálcio e nanopartículas de óxido de ferro como *scaffold* e concluíram que a combinação de propriedades magnéticas das nanopartículas de ferro com a biocompatibilidade do alginato de cálcio indicam que esses materiais têm potencial para serem usados como sistema de liberação de drogas.

3.5.3 Interação com cloreto de cálcio (CaCl₂)

Uma propriedade importante do alginato é sua habilidade de interagir e formar gel quando em contato com cátions divalentes, tais como o Ba²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ (BEKIN et al., 2014; GEORGE e ABRAHAM, 2006). A formação do gel é resultado das ligações cruzadas que ocorrem com os cátions divalentes, onde estes se alojam entre as cadeias do polímero, formando a estrutura de rede. Esta estrutura é demonstrada na figura 6.

Figura 6 – Formação da rede de alginato de cálcio.



Fonte: SACCHETEIN, 2009.

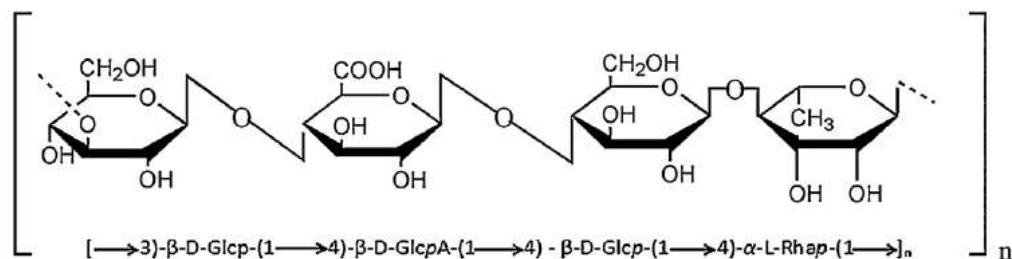
A quantidade de íons Ca^{2+} presente no sistema interfere na estabilidade destas redes poliméricas, formando associações intercadeias temporárias ou permanentes. Se os níveis de cálcio na rede de gel são pequenos, observam-se formações na rede de cadeias tipo temporária, que se transformam posteriormente em soluções altamente viscosas e tixotrópicas². Contudo, se a quantidade de íons cálcio são elevadas na rede de gel, observa-se formações na rede de cadeias tipo permanente com a formação de precipitado no gel. Existem estudos demonstrando que a estrutura química e o tamanho da molécula de alginato, assim como a cinética de formação do gel coligado ao tipo de íon empregado, são fatores determinantes das propriedades do mesmo, como capacidade de intumescimento, porosidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, resistência do gel e suas características imunológicas (GEORGE e ABRAHAM, 2006).

3.6 Goma Gelana

A goma gelana (GG) é obtida pela fermentação em cultura por *Pseudomonas elodea* e é utilizada em várias aplicações da engenharia de tecidos (SILVA-CORREIA et al., 2012). A GG é um polissacarídeo microbiano que pode apresentar-se como exopolissacarídeo (EPS), ou seja, pode ser secretada para o meio extracelular (CANILHA et al., 2006; GELLAN GUM, 2006).

A GG possui um esqueleto linear de unidades repetidas dos monossacarídeos 1,3 β -D-glucose, 1,4 β -D-ácido glucurônico, 1,4 β -D-glucose, 1,4 α -L-ramnose, ilustrados na figura 7.

Figura 7 – Estrutura química da goma gelana.



Fonte: PRAJAPATI et al, 2013.

² Substâncias que, por agitação, passam do estado gelatinoso para o estado líquido (BAHR JÚNIOR, 2012).

A Glucose, o ácido glucurônico e a ramnose estão presentes em relação molar 2:1:1. É um polieletrólito devido à presença do ácido galacturônico (AS GRANDES GOMAS, 2011; CANILHA et al., 2006).

Em 1996, especificações da goma gelana foram determinadas através do 46º Comitê de Especialistas Associados em Aditivos Alimentares (JECFA). Estas especificações estão mostradas na tabela 1 (PRAJAPATI et al., 2013).

Tabela 1 – Especificações da goma gelana.

Propriedade	Valor
Definição	GG é um polissacarídeo de alto peso molecular produzido por fermentação de cultura pura de carboidratos de <i>Pseudomonas Elodea</i> , purificado através do recobrimento com álcool isopropílico, seco e moído.
Massa molecular	Aproximadamente 500.000g/mol.
Descrição	Pó esbranquiçado.
Uso funcional	Agente espessantes, gelificantes, estabilizador, etc.
Solubilidade	Solúvel em água, formando uma solução viscosa, insolúvel em etanol.
Perda por secagem	Não superior a 15% (105°C, 2,5h).
Teor de chumbo	Não superior a 2mg/kg.
Nitrogênio	Não superior a 3%.
Teste de gel com íon de cálcio	Adicionar 1g da amostra, 0,5g de cloreto de sódio, calor a 80°C por 1min. Deixar a solução esfriar à temperatura ambiente. Um gel firme é produzido.
Teste de gel com íon de sódio	Para uma solução de 1% da amostra, adicionar 0,5g de cloreto de sódio, aquecer a 80°C por 1min. Deixar a solução esfriar à temperatura ambiente. Um gel firme é produzido.
Álcool Isopropílico	Não superior a 750mg/kg

Fonte: Adaptado de PRAJAPATI et al, 2013.

3.6.1 Propriedades

A obtenção de polissacarídeos de origem microbiana apresenta algumas vantagens em relação a outros tipos de gomas e, por isso, esses polissacarídeos têm sido os mais estudados nos últimos anos. A preferência se deve às suas características e propriedades funcionais, que estão relacionadas à capacidade de espessar, capacidade de retenção de água e capacidade de manter partículas em suspensão, dentre outras (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004 apud LIMA, 2011, p. 105). Pode ser destacado entre os biopolímeros mais utilizados, a goma xantana, com propriedades

espaesantes e estabilizantes e a GG, com propriedades gelificantes (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005 apud LIMA, 2011, p. 105).

Uma propriedade importante exibida pela GG é que ela demonstra excelente estabilidade em vasta faixa de pH, que pode ser de 3,5 a 8,0 (CANILHA et al., 2006), mas o valor ótimo para a produção de goma gelana varia de 6,5 a 7,0. Ambientes mais ácidos ou mais alcalinos podem reduzir o crescimento celular e consequentemente reduzir a produção da goma gelana (PRAJAPATI et al., 2013).

A GG possui propriedade de formar gel termoestável e esta característica proporciona a possibilidade de ser utilizada na substituição do ágar (CANILHA et al., 2006). Possui características funcionais, tais como alta dureza e transparência, baixa permeabilidade ao vapor de água e superfícies lisas (ALVARADO-GONZÁLES et al., 2012).

3.6.2 Aplicações

Materiais poliméricos são amplamente utilizados, principalmente em aplicações de implantes desde que possam ser fabricados em diversos formatos: fibras têxteis, filmes, hastes ou bastões e líquidos viscosos (PARK; LAKES, 2010).

Por ser EPS, a GG possui amplo espectro de aplicações na indústria alimentícia, sendo utilizada como espaesantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, dispersantes, agentes de suspensão, formadores de filmes e gelificantes (SUTHERLAND apud CANILHA et al., 2006; STREDANSKY et al. apud CANILHA et al., 2006). É também conhecida comercialmente como heteropolissacarídeo-60 (PS-60). Como relatado anteriormente, a GG possui boa estabilidade em pH ácido, o que é vantagem para produtos à base de frutas. Possui estrutura e propriedades de grande importância para aplicações nas indústrias alimentícias, farmacêutica e outras (CANILHA et al., 2006).

A produção da GG tem sido relacionada ao crescimento celular (CANILHA et al., 2006). O hidrogel de GG tem mostrado sustentar eficientemente a distribuição e o crescimento de condrócitos humanos articulares e suportam a deposição da Hialina

como ME, conduzindo à formação de cartilagem funcional (SILVA-CORREIA et al., 2012; SILVA-CORREIA et al., 2011).

O hidrogel de alginato, bem como o hidrogel de GG promovem o ambiente ideal para a recuperação de lesões, uma vez que favorecem hidratação para a recuperação dessas lesões, não permitindo reações agravantes ao organismo, propiciando suporte e formação funcional de cartilagens (CURATEC, 2013).

3.7 Caracterização

3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente maiores que outros instrumentos. As imagens possuem alta profundidade de foco, permitindo a análise de diferentes relevos da superfície da amostra simultaneamente em foco. São imagens tridimensionais, sem perda de nitidez. A coluna do microscópio consiste de fonte de elétrons, lentes eletromagnéticas e bobinas de varredura operando sob o vácuo. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados etc.) e de fótons (fotoluminescentes e raios X) os quais são captados por detectores apropriados. As lentes eletromagnéticas juntamente com os diafragmas são usados para reduzir o diâmetro do feixe de elétrons e focalizá-los sobre a superfície da amostra, uma vez que o diâmetro do feixe produzido diretamente pela fonte de elétrons convencional é muito grande para gerar a imagem definida em alta definição. Ao atingir a amostra o feixe de elétrons deve então ter tamanho menor que 10nm e corrente suficiente para formar uma imagem definida. As bobinas de varredura têm função de refletir o feixe e controlar sua varredura sobre a superfície da amostra (GONÇALVES, 2007).

3.7.2 Difração de raio X (DRX)

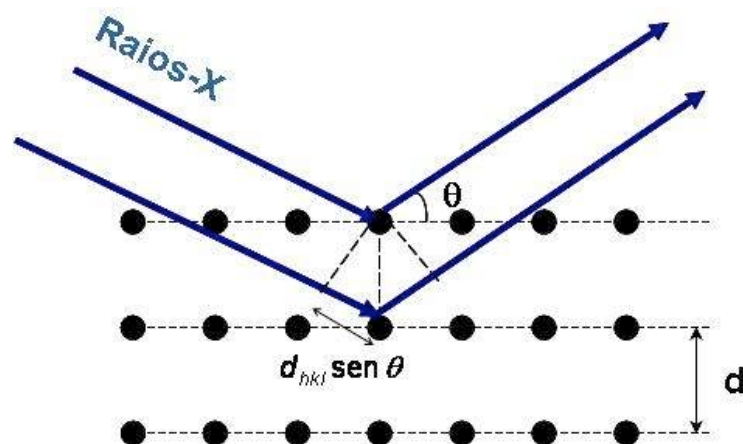
A interação entre a radiação X e a matéria que a radiação atravessa resulta no espalhamento dos raios. No instante em que os raios X são espalhados pelo ambiente ordenado do material, chamado cristal, ocorre a interferência, tanto construtiva quanto destrutiva da radiação espalhada, pois a distância entre os centros espalhadores são da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda da radiação, resultando assim na difração da mesma (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

Quando um feixe de raios X atinge a superfície de um cristal em um ângulo θ , parte é espalhada pela camada dos átomos da superfície. O espalhamento ocorre como consequência da interação da radiação com os átomos cuja distância interplanar é d , onde os feixes refletidos através do cristal apresentarão o fenômeno da difração (figura 8). Assim, podemos escrever que se a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimentos de onda, haverá superposição construtiva; caso contrário haverá superposição destrutiva. Esta condição é descrita pela Lei de Bragg (equação 1).

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (1)$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação, n é o número inteiro, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de incidência do feixe de raios X.

Figura 8 – Esquema de DRX.



Fonte: PRANDEL, 2006.

Os padrões de difração de raios X obtidos de uma amostra de alginato de sódio dependerão de sua composição química, relacionada aos comprimentos dos blocos do ácido polimanurônico (bloco M) e do ácido poligulurônico (bloco G). Nos estudos de Fabia et al. (2005), os sinais da difração para o ácido polimanurônico são indexados em célula unitária ortorrômbica com duas cadeias paralelas horizontalmente com as seguintes dimensões, $a=0,76\text{nm}$, $b=0,86\text{nm}$ e $c=1,04\text{nm}$. O ácido poligulurônico é composto por duas cadeias paralelas verticalmente e possui os seguintes parâmetros, $a=0,86\text{nm}$, $b=1,07\text{nm}$ e $c=0,87\text{nm}$, e também é ortorrômbico.

3.7.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

A espectroscopia de infravermelho compreende a região de radiação com número de onda com intervalo de aproximadamente 12800 a 10cm^{-1} ou comprimento de onda de $0,78$ a $1000\mu\text{m}$. Segundo Skoog, Holler e Nieman (2002), o espectro infravermelho é dividido em faixas de radiação que compreendem o infravermelho próximo, médio e distante, que são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Regiões espectrais do infravermelho.

Região	Intervalo de comprimento de onda (λ), μm	Região de número de onda (ν), cm^{-1}	Região de frequência (f), Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante	50 a 1.100	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
Mais usada	2,5 a 1,5	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Fonte: SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002.

A espectroscopia de reflexão no infravermelho tem apresentado inúmeras aplicações, especialmente para amostras sólidas que são de difícil manipulação, como filmes de polímeros por exemplo (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

A tabela 3 apresenta as principais categorias de aplicações da espectroscopia de infravermelho, baseadas nas três regiões espectrais. A região mais amplamente utilizada é o infravermelho médio, que vai de 670 a 4000cm^{-1} (λ de $2,5$ a $14,9 \mu\text{m}$).

Tabela 3 – Principais aplicações da espectroscopia no infravermelho.

Regiões Espectrais	Tipo de Medida	Tipo de Análise	Tipo de Amostra
Infravermelho próximo	Reflectância difusa	Quantitativa	Materiais comerciais sólidos ou líquidos Misturas gasosas
Infravermelho médio	Absorção	Quantitativa	Compostos puros sólidos, líquidos ou gasosos Misturas complexas gasosas, líquidas ou sólidas
		Qualitativa	
	Reflectância	Quantitativa	Misturas complexas gasosas, líquidas ou sólidas
		Qualitativa	Compostos puros sólidos ou líquidos
Infravermelho distante	Absorção	Quantitativa	Amostras atmosféricas
		Qualitativa	Espécies puras inorgânicas ou organometálicas

Fonte: SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002.

A tabela 4 mostra as principais bandas de absorção associadas aos respectivos grupos químicos do alginato de sódio em pó.

Tabela 4 – Principais bandas de absorção de infravermelho para o AS.

Bandas (cm^{-1})	Grupos químicos
3360-3380	Estiramento de O-H
2930-2532	Estiramento de C-H
1608-1611	Estiramento assimétrico de COO^-
1413-1414	Estiramento de COO^- e estiramento de C-O
1176	Estiramento de C-C
1087-1088	Estiramento de C-O-C
947	Estiramento de C-O
892	Estiramento de C-C-H e estiramento de C-C
781	Estiramento de C-C-O

Fonte: ABREU et al., 2008.

A tabela 5 mostra as principais bandas de absorção associadas aos respectivos grupos químicos da goma gelana em pó.

Tabela 5 – Principais bandas de absorção de infravermelho para a GG.

Bandas (cm ⁻¹)	Grupos químicos
3420	Estiramento de O-H
2920	Estiramento de C-H
1618	Estiramento assimétrico de COO ⁻
1412	Estiramento de COO ⁻
1037	Estiramento de C-O

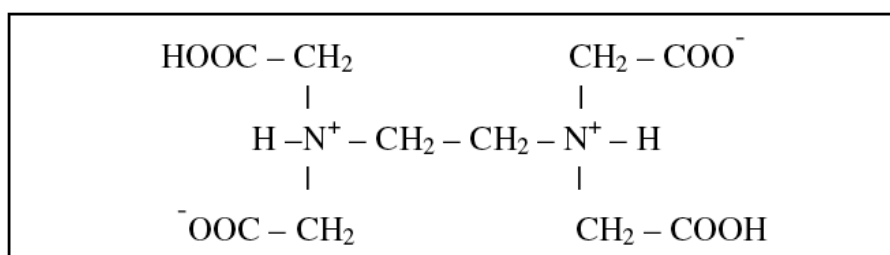
Fonte: SILVA-CORREA et al., 2011.

3.7.4 Volumetria de complexação

A titulação por complexação ou complexometria é uma técnica de análise volumétrica que utiliza métodos baseados na formação de compostos complexos (SILVA; MOTA; MORAES, 2010). Este método de análise química consiste na titulação de solução com concentração desconhecida (FERNANDES, 2014). Ela se fundamenta nas reações de formação de complexos entre íons metálicos e outros íons ou moléculas. Estes outros íons ou moléculas atuam como bases de Lewis (doadores de pares de elétrons) que realizam ligações coordenadas com os íons metálicos que, por sua vez, atuam como ácidos de Lewis (receptores de pares de elétrons). Os agentes complexantes são chamados de ligantes (representados por L), podendo ser mono, di, tri, etc. dentados, conforme a quantidade de ligações químicas que são capazes de formar com íons metálicos (GRANER; TAMBURINI JR, 2013). Os agentes complexantes mais úteis são os compostos orgânicos, pois estes possuem vários grupos doadores de elétrons que formam múltiplas ligações covalentes com íons metálicos (SILVA; MOTA; MORAES, 2010).

O ácido etilenodiaminotetra acético (EDTA) (figura 9), é extensamente utilizado como agente complexante, para dosar íons metálicos em solução.

Figura 9 – Estrutura do complexo químico do EDTA.

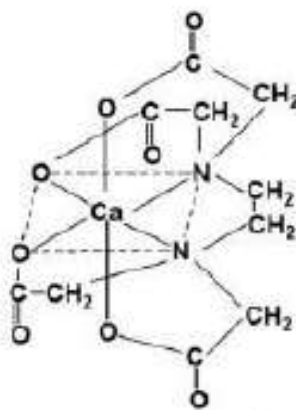


Fonte: GRANER; TAMBURINI JR, 2013.

Esta forma, com a maioria dos metais, complexos do tipo 1:1 (1 ânion ligante para 1 íon metálico) através da forma H_2Y^{2-} , que são solúveis em água e bastante estáveis. O EDTA é um ligante hexadentado (sendo quatro grupos carboxílicos e dois grupos amina) com 6 átomos capazes de atuar como doadores de pares de elétrons (figura 10), que para reagir com o íon metálico (M) os hidrogênios ligados aos grupos carboxilatos devem ser removidos. Daí a necessidade de meio alcalino para realização das titulações, como em soluções tamponadas, pois os íons hidroxila consomem os íons hidrogênio liberados na complexação, deslocando favoravelmente as reações no sentido da formação do complexo envolvido. (COTTA, 2013; GRANER; TAMBURINI JR, 2013; SILVA; TÓFANI; CARDEAL, 2013).

A determinação de cálcio em mistura pelo EDTA é de uso corrente, muito difundida, dada a importância desse metal para os sistemas biológicos. O resultado é satisfatório, além de ser simples e rápido (GRANER; TAMBURINI JUNIOR, 2013).

Figura 10 – Estrutura do complexo cálcio-EDTA.



Fonte: COTTA, 2013.

3.7.5 Termogravimetria (Thermogravimetric Analysis – TGA)

É uma das técnicas de análise térmica na qual a variação da massa da amostra, que pode ser tanto o ganho quanto a perda dessa massa, é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a variação controlada de temperatura (IONASHIRO; GIOLITO, 1980; SILVA; PAOLA; MATOS, 2007). Os experimentos são executados por meio de termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa (SILVA; PAOLA; MATOS,

2007). Esta técnica permite conhecer as reações ocorridas pela massa da substância provocadas pelo aquecimento, permitindo correlacionar a faixa de temperatura em que elas ocorrem, a temperatura em que a massa da substância começa a se decompor e, assim, realizar o acompanhamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição etc. (MATOS; MACHADO, 2007).

3.7.6 Calorimetria Diferencial Exploratória (Differential Scanning Calorimetry – DSC)

A DSC é a técnica de análise térmica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007). A amostra é colocada em uma cápsula, posicionada sobre disco, e submetida ao aquecimento por uma única fonte de calor. O calor é transferido para a cápsula da amostra por meio do disco, com o fluxo de calor sendo controlado por meio de termopares conectados ao disco, uma vez que a variação da temperatura em um dado momento é proporcional à variação da entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico (MACHADO; MATOS, 2007).

3.7.7 Intumescimento de Hidrogéis

O grau de intumescimento é importante para analisar o comportamento do material estudado mediante a sua absorção de fluido, pois desde o início o material deve ser mantido em contato para que sua estrutura de rede solvatada possa se deformar (COSTA JÚNIOR, 2008). A proporção de ligações cruzadas existente é um fator importante que afeta diretamente o grau de intumescimento, sendo definida como a razão entre a quantidade de matéria do agente reticulante e a quantidade de matéria das unidades de repetição do polímero. Quanto maior a razão de ligações cruzadas maior quantidade de agente reticulante é incorporada à estrutura do hidrogel, no qual a estrutura ficará mais rígida. Porém, o grau de intumescimento será maior quando este apresentar menor razão de ligação cruzada (PEPPAS apud COSTA JÚNIOR, 2008).

O grau de intumescimento também pode ser afetado pela composição química de um polímero. Os polímeros que contêm grupos hidrofílicos absorvem maior

quantidade de fluidos quando comparados àqueles que contém grupos hidrofóbicos, pois estes minimizam a exposição dos mesmos à água (PEPPAS apud COSTA JÚNIOR, 2008).

3.7.8 Propriedades mecânicas dos filmes

O ensaio de tração é considerado um dos ensaios mecânicos de tensão-deformação mais comuns. Nesse ensaio uma carga de tração é aumentada de maneira gradativa e uniaxialmente ao longo do eixo do corpo de provas. A amostra é deformada, geralmente até a sua fratura. Normalmente a configuração do corpo de provas é em forma de uma “gravata borboleta”. Essa configuração do corpo de provas é escolhida porque, durante os ensaios, a deformação fica confinada à região central mais estreita (que possui uma seção transversal uniforme ao longo de seu comprimento) e, ainda, para produzir a probabilidade de fratura nas extremidades do corpo de provas. Um ensaio de tração é conduzido de maneira semelhante à do ensaio de compressão, exceto pelo fato de que a força é de distensão (força de alongamento) e o corpo de prova tende a aumentar seu comprimento ao longo da direção da tensão aplicada. A máquina de ensaios de tração é projetada para alongar o corpo de provas em uma taxa constante, ao mesmo tempo em que mede contínua e simultaneamente a carga que está sendo aplicada. O resultado de um ensaio de tração é registrado como carga ou força em função de um alongamento (CALISTER; RETHWISCH, 2012).

3.7.9 Análise da atividade antimicrobiana dos filmes

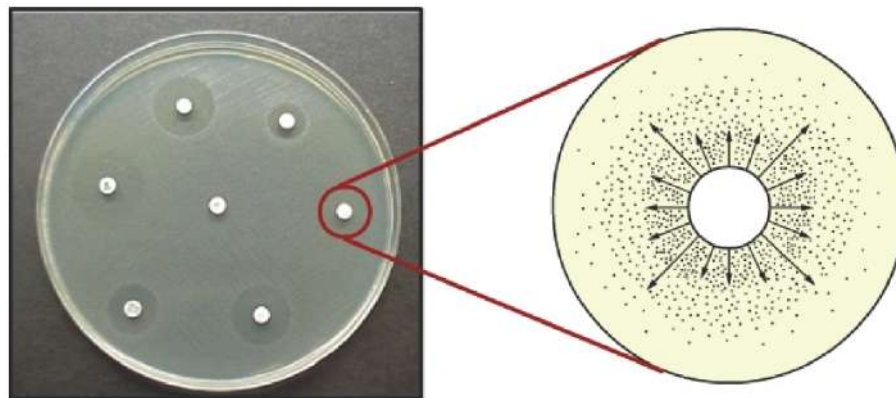
Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana. Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em muitos laboratórios de microbiologia clínica, utiliza-se rotineiramente o método de disco-difusão em ágar para testar os patógenos mais comuns e de crescimento rápido (ANVISA M2-A8).

A atividade antimicrobiana é usualmente determinada por ensaios *in vitro* utilizando técnicas de difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição). A técnica de difusão

em ágar é bastante utilizada, e considerada de fácil execução, reprodutível e permite a experimentação de diversas concentrações da amostra a ser analisada em uma mesma placa de cultivo (ROZATTO, 2012).

Os ensaios de difusão são métodos nos quais o efeito pode ser graduado (figura 11). A amostra a ser testada é colocada em contato com um meio de cultura sólido inoculado com um microrganismo, onde ocorre o aparecimento de um halo no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição (SILVEIRA et al., 2009). O uso de antibióticos específicos é necessário, pois desempenham um papel fundamental para parar de crescer microrganismos (KAMOUN et al., 2013) e para serem usados como halos de inibição comparativos com os das amostras.

Figura 11 – Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão.



Fonte: MACHADO; GALES, 2008

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1996 por Bauer e Kirby. A metodologia Bauer e Kirby para antibiograma é a mais difundida e utilizada até hoje na rotina de análises clínicas (LABORCLIN, 2011). O teste fornece resultados qualitativos. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo. Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento ao redor de cada disco são mensurados em milímetros e relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e à velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Após a medição dos halos, é feita sua interpretação, utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) específicos para a bactéria testada (MACHADO; GALES, 2008).

Vantagens do método disco-difusão:

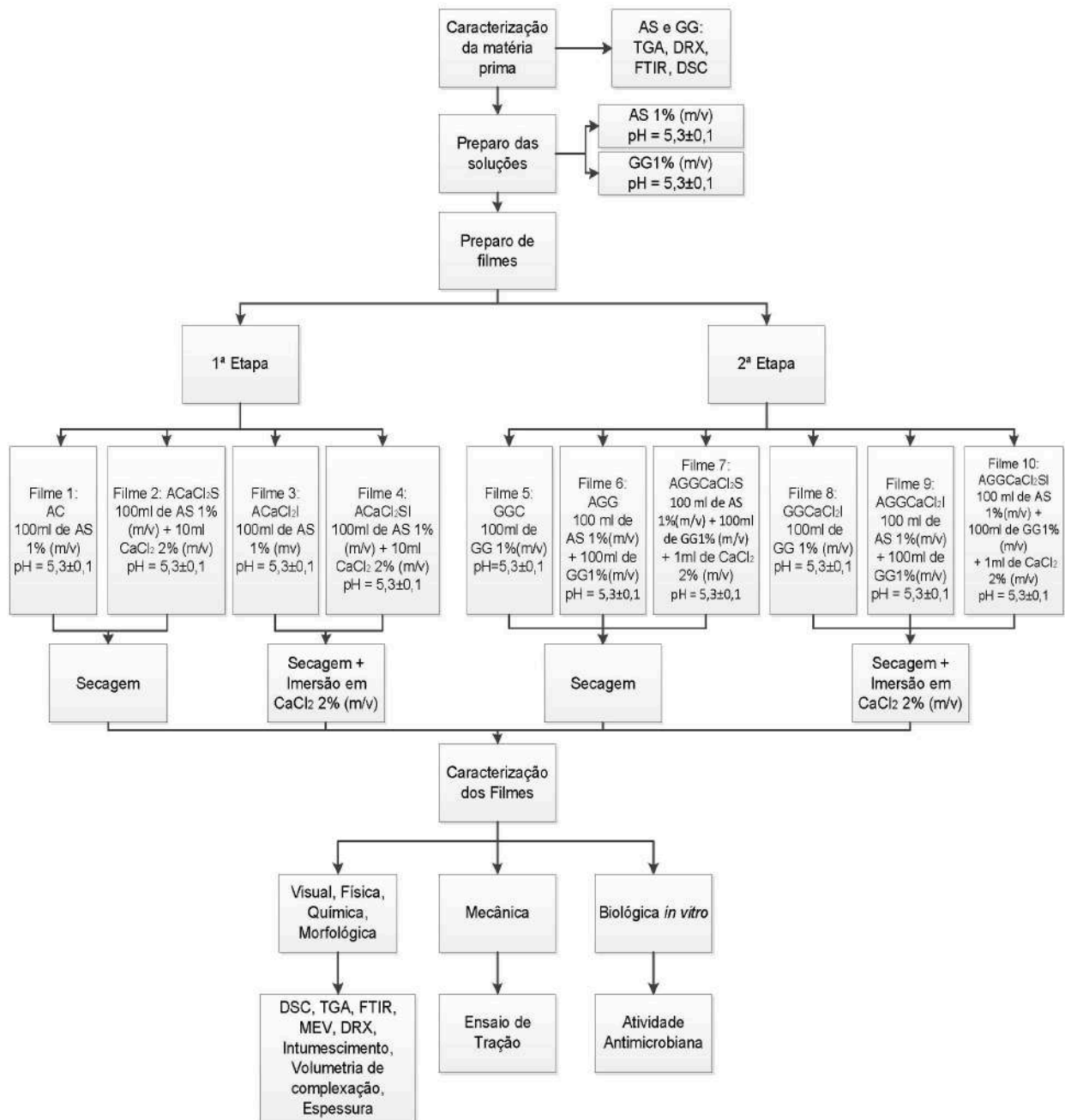
- fácil execução;
- reprodutibilidade;
- utilização de reagentes de baixo custo;
- resultados de fácil interpretação clínica;
- flexibilidade quanto à escolha dos antimicrobianos;
- não requer utilização de equipamentos especiais (LABORCLIN, 2011; MACHADO; GALES, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapas do desenvolvimento do trabalho

A figura 12 representa as etapas realizadas no trabalho.

Figura 12 – Fluxograma das etapas de trabalho.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A Tabela 6 representa a matriz experimental realizada neste estudo.

Tabela 6 – Matriz Experimental.

Filmes	AS 1% (m/v)	GG 1% (m/v)	CaCl ₂ 2% (m/v)	Imersão em CaCl ₂ 2% (m/v)	DSC	TGA	FTIR	DRX	MEV	Intumescimento	Volumetria de complexação	Espessura	Ensaio de tração	Atividade antimicrobiana
AC	X	-	-	-	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X
ACaCl ₂ S	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X
A CaCl ₂ I	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ACaCl ₂ SI	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GGC	-	X	-	-	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X
AGG	X	X	-	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X
AGGCaCl ₂ S	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X
GGCaCl ₂ I	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AGGCaCl ₂ I	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AGGCaCl ₂ SI	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2 Materiais

Os reagentes utilizados foram

- Alginato de Sódio em pó da Sigma-Aldrich® (massa molar (MW) = 100.000 g/mol, com aproximadamente 61% de ácido manurônico e 39% de ácido gulurônico, correspondendo a uma relação M/G de 1,56);
- Goma Gelana em pó da marca Sigma-Aldrich® (Gelzan™ CM, F_w = 1.000.000);
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (CaCl₂ da marca Vetec, PM igual a 147,01);
- Ácido Acético na concentração de 1% (CH₃COOH - Cat.#49199, da marca Sigma-Aldrich®);
- Hidróxido de Sódio (NaOH da marca Cinética®);
- Mueller Hinton Agar da marca HiMedia Laboratories Pvt. LTDA (Lote 0000128764);
- Sabouraud Dextrose Agar da marca HiMedia Laboratories Pvt. LTDA (Lote 00001262204);
- Disco de Ampicilina 10mcg do laboratório DME® (Diagnósticos Microbiológicos Especializados);

- Disco de Tetraciclina 30mcg do laboratório DME[®] (Diagnósticos Microbiológicos Especializados);
- Disco Anfotericina B 100mcg da CECON[®] (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos).

Sais e reagentes em grau analítico (P.A) foram utilizados neste trabalho e em todas as soluções foi utilizada água Milli-Q com resistividade mínima 18,0 $\mu\Omega$.cm a 25°C.

4.3 Preparo das soluções

4.3.1 Preparo da solução de AS

A solução de AS foi preparada a partir de 1% (m/v) de AS em água deionizada (DI). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Posteriormente, sob essa agitação foi adicionada gota-a-gota solução de ácido acético para correção do pH à $5,3\pm 0,1$. Após a completa adição o sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação. A solução foi desaerada em baixo vácuo com uma pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Após, a solução foi vertida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 24 horas.

4.3.2 Preparo das soluções de GG

A GG, conforme fornecida pelo fabricante, foi dissolvida em água destilada sob constante agitação para obter uma solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Sob essa agitação foi adicionada, em seguida, gota-a-gota solução de ácido acético para correção do pH à $5,3\pm 0,1$. O sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação e posteriormente desaerado em vácuo com uma pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos.

4.3.3 Preparo da solução de CaCl_2

A solução de CaCl_2 foi preparada a fim de obter uma solução de 2% (m/v). Esta foi mantida por 1 hora sob agitação de 100rpm.

4.4 Preparo dos filmes

Os filmes foram preparados a partir das misturas das soluções descritas nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3. Para tanto foi adicionada gota-a-gota 50ml de solução de CaCl_2 a 2% (m/v) na solução obtida em 4.3.1 sob agitação constante, seguida pela adição de solução de GG obtida no item 4.3.3. Os filmes foram obtidos através da transferência da solução para placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro, permitindo que a gelificação ocorresse em temperatura ambiente por aproximadamente 5min. Em seguida os filmes foram levados à estufa para secagem dos mesmos à 50°C por 24 horas. A produção de filmes de AS, CaCl_2 é uma operação complexa e depende do tipo de alginato utilizado, do grau de conversão entre o alginato e o cálcio, da fonte de íons de cálcio (cloreto, fosfato, lactato, etc.) e do método de preparação (MANCINI; MORESI; RANCINI, 1999).

Abaixo está representada a tabela da Matriz do Experimento, com as respectivas misturas dos reagentes para a formulação dos filmes (tabela 7).

Tabela 7 – Tabela da mistura dos reagentes para formulação dos filmes.

Materiais utilizados na mistura dos reagentes	Filmes sem imersão em CaCl_2	Filmes com imersão em CaCl_2
AS	Filme 1	Filme 3
AS+ CaCl_2	Filme 2	Filme 4
GG	Filme 5	Filme 8
AS+GG	Filme 6	Filme 9
AS+GG+ CaCl_2	Filme 7	Filme 10

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na tabela 8 estão descritas de forma detalhada as combinações dos filmes obtidos.

Tabela 8 – Tabela da descrição dos filmes obtidos.

Filme	Descrição
Filme 1 - AC	100ml de solução de AS 1% (m/v) - filme controle.
Filme 2 - A CaCl_2 S	100ml de solução de AS 1% (m/v) + 10ml de solução de CaCl_2 2% (m/v) - filme alginato contendo CaCl_2 2% (m/v) apenas na solução.
Filme 3 - A CaCl_2 I	100ml de solução de AS 1% (m/v) - filme alginato contendo CaCl_2 2%(m/v) apenas na imersão.
Filme 4 - A CaCl_2 SI	100ml de solução de AS 1% (m/v) + 10ml de solução de CaCl_2 2% (m/v) - filme alginato contendo CaCl_2 2% tanto na solução quanto na imersão.
Filme 5 - GGC	100ml de solução de GG 1% (m/v) - filme controle.
Filme 6 - AGG	100ml de solução de AS 1% + 100ml de solução de GG 1% (m/v).
Filme 7 - AGG CaCl_2 S	100ml de solução de AS 1% (m/v) + 100ml de solução de GG 1% (m/v) + 2ml de solução de CaCl_2 2% (m/v) - filme contendo CaCl_2 2% (m/v) apenas na solução.
Filme 8 - GG CaCl_2 I	100ml de solução de GG1%(m/v) - filme goma gelana contendo CaCl_2 2% (m/v) apenas na imersão.
Filme 9 - AGG CaCl_2 I	100ml de solução de AS 1% (m/v) + 100ml de solução de GG 1% (m/v) - filme goma gelana contendo CaCl_2 2% (m/v) apenas na imersão.
Filme 10 - AGG CaCl_2 SI	100ml de solução de AS 1% (m/v) + 100ml de solução de GG 1% (m/v) + 2ml de solução de CaCl_2 2% (m/v) - filme contendo CaCl_2 2% (m/v) na solução e na imersão.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.5 Modificação dos filmes

Os filmes 3, 4, 8, 9 e 10 obtidos no item 4.4, conforme a tabela 7, foram tratados com diferentes proporções de CaCl_2 , recebendo imersão em solução de CaCl_2 2% (m/v) durante 1 hora. Posteriormente foram secados à temperatura ambiente por 48 horas.

Os procedimentos estão descritos no quadro 1 abaixo:

Quadro 1 – Procedimento para obtenção dos filmes contendo diferentes proporções de cloreto de cálcio (CaCl_2).

Filmes	Procedimentos realizados
Filme 1: AC	<p>Os filmes contendo AS foram preparados a partir da dissolução do pó de AS em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 24 horas.</p>
Filme 2: ACaCl ₂ S	<p>Os filmes contendo AS e CaCl_2 foram preparados a partir da dissolução do pó de AS em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>Posteriormente, sob agitação constante foi adicionada gota-a-gota solução de CaCl_2 a 2% (m/v). Após a completa adição o sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 24 horas.</p>
Filme 3: ACaCl ₂ I	<p>Os filmes contendo AS foram preparados a partir da dissolução do pó de AS em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 24 horas.</p> <p>Os filmes obtidos foram imersos em solução de CaCl_2 2% (m/v) por 1 hora e secos em temperatura ambiente por 48 horas.</p>
Filme 4: ACaCl ₂ SI	<p>Os filmes contendo AS e CaCl_2 foram preparados a partir da dissolução do pó de AS em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>Posteriormente, sob agitação constante foi adicionada gota-a-gota solução de CaCl_2 2% (m/v). Após a completa adição o sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de</p>

	<p>poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 24 horas.</p> <p>Os filmes obtidos foram imersos em solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 1 hora e secos em temperatura ambiente por 48 horas.</p>
Filme 5: GGC	<p>Os filmes contendo GG foram preparados a partir da dissolução do pó de GG em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 48 horas.</p>
Filme 6: AGG	<p>Os filmes contendo AS e GG foram preparados a partir da dissolução separada dos pós de AS e GG em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Após a solução de AS 1% (m/v) foi vertida na solução de GG1% (m/v). Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 48 horas.</p>
Filme 7: AGGCaCl ₂ S	<p>Os filmes contendo AS, GG e CaCl₂ foram preparados a partir da dissolução separada dos pós de AS e GG em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Após a solução de AS 1% (m/v) foi vertida na solução de GG1% (m/v). Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>Posteriormente, sob agitação constante foi adicionada gota-a-gota a solução de CaCl₂ 2% (m/v). Após a completa adição o sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 48 horas.</p>
Filme 8: GGCaCl ₂ I	<p>Os filmes contendo GG foram preparados a partir da dissolução do pó de GG em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH.</p> <p>A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 48 horas.</p> <p>Os filmes obtidos foram imersos em solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 1 hora e secos em temperatura ambiente por 48 horas.</p>

<p>Filme 9: AGGCaCl₂I</p>	<p>Os filmes contendo AS e GG foram preparados a partir da dissolução separada dos pós de AS e GG em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Após a solução de AS 1% (m/v) foi vertida na solução de GG1% (m/v). Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH. A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 48 horas. Os filmes obtidos foram imersos em solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 1 hora e secos em temperatura ambiente por 48 horas.</p>
<p>Filme 10: AGGCaCl₂SI</p>	<p>Os filmes contendo AS, GG e CaCl₂ foram preparados a partir da dissolução separada dos pós de AS e GG em água destilada para obter solução de 1% (m/v). A solução foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Após a solução de AS 1% (m/v) foi vertida na solução de GG1% (m/v). Foi adicionada solução de ácido acético 1% para regular o pH. Posteriormente, sob agitação constante foi adicionada gota-a-gota a solução de CaCl₂ 2% (m/v). Após a completa adição o sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação. A solução foi desaerada em sistema sob vácuo com pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos. Posteriormente, a solução foi dividida em placas de Petri de poliestireno de 8,5cm de diâmetro e seca a 50°C em estufa por 48 horas. Os filmes obtidos foram imersos em solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 1 hora e secos em temperatura ambiente por 48 horas.</p>

Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.6 Caracterização da matéria prima e dos filmes

As matérias primas, AS e GG, foram caracterizadas empregando as técnicas de análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) e difração de raios-x (DRX). Os filmes obtidos no presente estudo também foram caracterizados empregando as técnicas acima, acrescentando-se análise do aspecto visual, da espessura, microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfil de hidratação, volumetria de complexação, propriedades mecânicas e caracterização biológica *in vitro*.

4.6.1 Análise térmica dos polímeros AS e GG - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA)

As análises térmicas do AS e GG (tanto as matérias primas quanto os filmes) foram determinadas através da calorimetria exploratória diferencial (*DSC*) no equipamento da marca SII EXSTAR, modelo *DSC 7020* em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $90 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de aquecimento $10^\circ\text{C min}^{-1}$ com massa de aproximadamente 2mg em suporte de alumínio, partindo de 30 até 500°C .

A termogravimetria (*TGA*) para o AS e GG foi obtida através do equipamento SII EXSTAR, modelo *TG/DTA 7200*, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $90 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento à razão de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, em suporte de alumina na temperatura compreendida entre 10°C a 900°C . Para a obtenção da curva de *TGA* pequena porção das amostras também foram colocadas em suporte de alumina (SANTOS et al., 2003).

4.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*FTIR*)

Os principais grupos químicos presentes nos polímeros em pó e nos filmes foram associados às bandas de vibração evidenciadas a partir dos espectros normalizados obtidos na região de infravermelho por transformada de Fourier.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho - *FTIR* para o AS e GG foi realizada em um espectrofotômetro da Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21 equipado com transformada de Fourier, *FTIR-8400S* e acessório ATR. A técnica utilizada foi com 68 varreduras entre 4000cm^{-1} e 500cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} e intervalo de 2cm^{-1} . As principais bandas de vibração encontradas nos filmes foram atribuídas aos principais grupos químicos do alginato de sódio e da goma gelana em pó obtidos anteriormente.

4.6.3 Difração de raios-x (*DRX*)

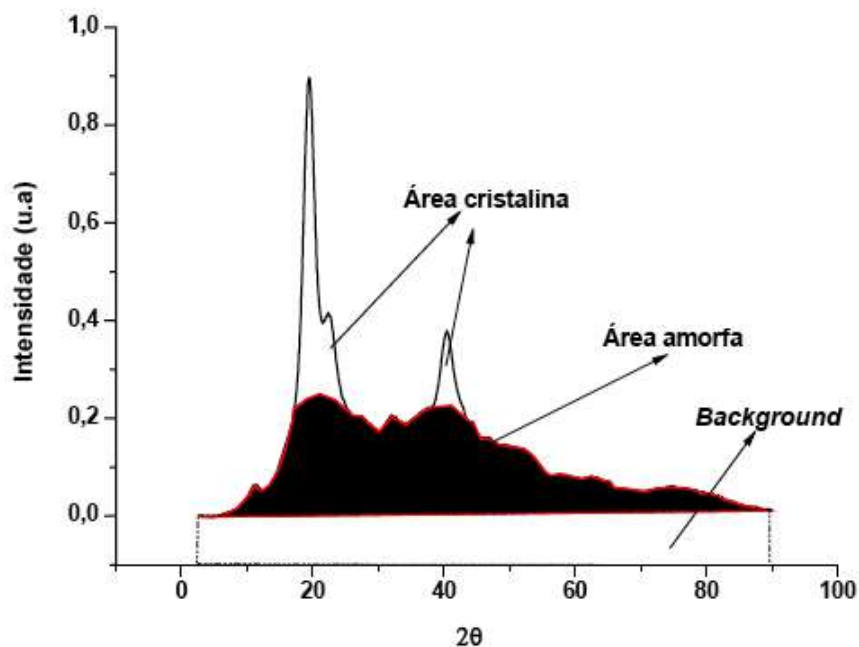
Para a determinação dos parâmetros de cristalinidade dos polímeros AS e GG foi realizada a técnica de difração de raios-X (*DRX*) dos polímeros no equipamento SHIMADZU XRD 7000 com 2θ variando de $4,00$ a $90,00^\circ$ e passo de $0,06^\circ$ (COSTA JÚNIOR; MANSUR, 2008). O grau de cristalinidade (*GC*) foi calculado baseando-se na equação 2 descrita a seguir.

A partir das áreas do difratograma, o GC foi calculado pelo programa Microcal Origin[®] versão 8.0 tendo como base a área dos picos (AP) e a área total (AT), de acordo com a equação 2.

$$GC = \frac{AP}{AT} \times 100 \quad (2)$$

A figura 13 apresenta o difratograma com as regiões amorfas e cristalinas identificadas.

Figura 13 – Difratograma com regiões amorfas e cristalinas.



Fonte: COSTA JÚNIOR, 2008.

4.6.4 Aspecto dos filmes

Os diferentes filmes obtidos foram avaliados qualitativamente quanto aos aspectos macro morfológico e macro homogêneo a olho nu e registrados em fotografias realizadas com câmera fotográfica digital modelo Sony *Cyber-Shot DSC-HX5V 10.2 mega pixels*.

4.6.5 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes secos obtidos foi mensurada através de um micrômetro eletrônico externo da Schut[®], realizando-se dez medições em diferentes pontos ao longo da superfície de cada filme.

4.6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A análise morfológica da superfície dos filmes obtidos foi realizada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) por meio do equipamento SHIMADZU SSX-550. As amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro por *sputtering* e posicionadas a máxima distância do alvo para evitar danos aos filmes (COSTA JÚNIOR; MANSUR, 2008).

4.6.7 Perfil de hidratação dos filmes

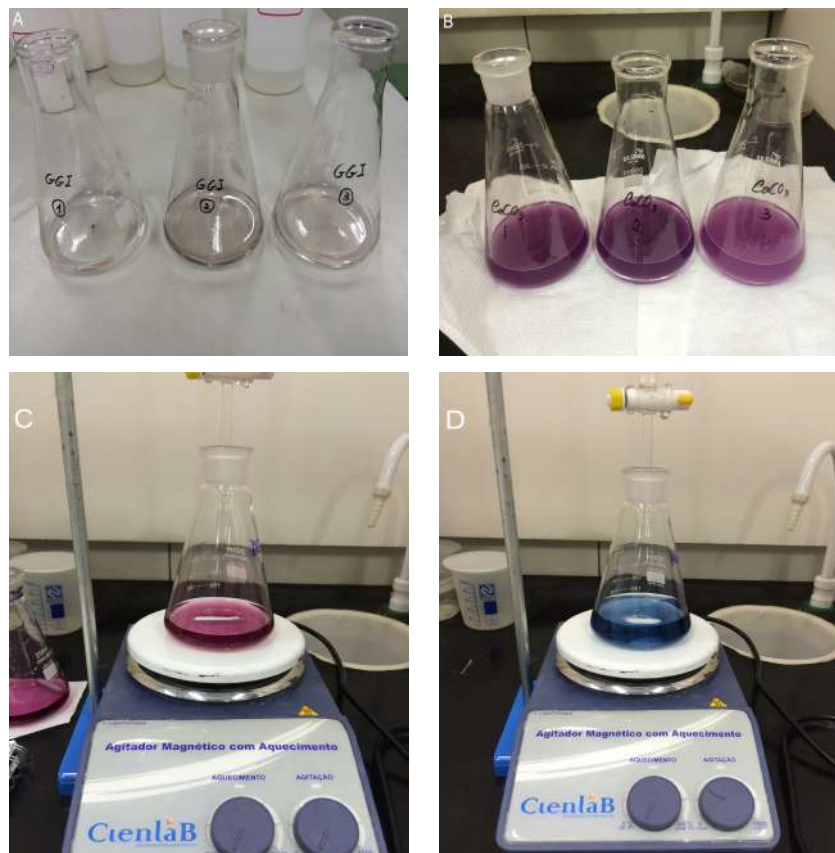
Através do grau de intumescimento (GI) foi avaliado o perfil de hidratação dos filmes obtidos. O GI foi determinado com amostras em triplicata para cada tempo determinado, secas em estufa a 50⁰C e pesadas após a estabilização de peso. Em seguida as amostras foram colocadas em recipientes contendo solução tampão pH 7,0±0,1 obedecendo a relação entre a área superficial e o volume de solução = 0,1cm⁻¹ (OREFICE, 2000). A massa de uma amostra cortada do filme, com dimensões de 1,0 x 1,5 cm para filmes de AS + CaCl₂ e dimensões de 1,5 x 2.0 cm para filmes de GG + CaCl₂ foi quantificada (M₀) e o material imerso em solução tampão sob temperatura ambiente. Períodos de tempo de leitura foram pré-estabelecidos, variando de 30, 60, 120 e 1.440 min. Após a hidratação as amostras foram pesadas novamente, retirando-se o excesso de umidade superficial, colocando-se o filme sobre uma folha de papel filtro, e sua massa intumescida determinada após média de seis pesagens. O grau de intumescimento foi calculado com a variação da massa inicial (M₀) e da massa das amostras úmidas no tempo (M_i), de acordo com a equação 3 (GIRATA, 2011; BIGI; PANZAVOLTA; RUBINI, 2004).

$$GI = \frac{M_i - M_0}{M_0} \times 100 \quad (3)$$

4.6.8 Volumetria de complexação

Para determinar a quantidade de cálcio contido nas amostras, foi realizada a titulação de complexação. As soluções da imersão dos filmes foram pipetadas em triplicata e transferidas para um erlenmeyer (figura 14a), seguindo-se a padronização da técnica de titulação. Foi adicionada uma parcela de Erio cromo T (0,001mg). Posteriormente foi adicionada solução tampão de amônia (figura 14b), até pH = 10, e esta solução foi titulada com solução padrão de EDTA até atingir coloração azul (figura 14c e 14d). Após esse procedimento foi realizado o cálculo para dureza total da água.

Figura 14 – Etapas de realização do ensaio de Volumetria de Complexação



A) Solução de imersão com Erio cromo T;
 B) Solução de imersão com amônia;
 C) e D) Solução titulada com solução padrão de EDTA até coloração azul.
 Fonte: Elaborado pela própria autora.

As fórmulas utilizadas para o cálculo de volumetria estão descritas abaixo. O cálculo da massa de Ca na solução antes da imersão foi realizado através da equação 4.

$$mCa_{total} = (vip) \times [EDTA] \times 40,078 \times 10^{-3} \quad (4)$$

onde mCa_{total} é a massa inicial de Ca; “ vip ” é o volume incorporado padrão de EDTA gasto para titular a solução de $CaCl_2$ 2%; $[EDTA]$ é a concentração de EDTA em $mol.L^{-1}$.

O cálculo da massa de Ca na solução após a imersão foi realizado através da equação 5.

$$mCa_{incorp} = (vip - via) \times [EDTA] \times 40,078 \times 10^{-3} \quad (5)$$

onde mCa_{incorp} é a massa de Cálcio incorporado; “ vip ” é o volume incorporado padrão de EDTA gasto para titular a solução de $CaCl_2$ 2%; “ via ” é o volume incorporado da amostra, que corresponde ao volume de EDTA gasto para titular a solução de $CaCl_2$ 2% após a imersão; $[EDTA]$ é a concentração de EDTA em $mol.L^{-1}$.

O Cálculo do percentual de incorporação (% de incorporação) de Ca na amostra foi realizado através da equação 6.

$$\% \text{ incorporação} = \frac{mCa_{incorp}}{mCa_{total}} \times 100 \quad (6)$$

4.6.9 Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes

Os diferentes filmes obtidos foram submetidos à avaliação de suas propriedades mecânicas através do ensaio de tração. Neste ensaio os filmes foram secados em estufa a $50^{\circ}C$ e após foram submetidos a uma tração de 50N, com velocidade de ensaio em 5 mm.min^{-1} , sob a forma de gravata borboleta com razão mínima de 8 entre largura e espessura, seguindo as especificações da ASTM D882/02 conforme o que foi realizado por Costa Júnior (2008). A tensão e a deformação foram

calculadas a partir das equações 7 e 8, respectivamente (CALISTER; RETHWISCH, 2012).

A tensão σ é definida pela relação:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (7)$$

na qual F é a carga instantânea aplicada na direção perpendicular à seção transversal do corpo de provas, em medida de Newton (N), e A_0 é a área da seção transversal original antes da aplicação de qualquer carga (em mm^2).

A deformação foi definida de acordo com a relação:

$$\varepsilon = \frac{l_i - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (8)$$

em que l_0 é o comprimento original antes de qualquer carga fosse aplicada e l_i é o comprimento instantâneo. Algumas vezes a grandeza $l_0 - l_i$ é simbolizada por Δl , que representa o alongamento ou a variação no comprimento em dado instante, em referencia ao comprimento original (CALISTER; RETHWISCH, 2012).

Para a caracterização mecânica dos filmes a análise estatística usada foi a análise de variância (ANOVA *One Way*) que apresentou resultados significativos com $p < 0,05$.

4.6.10 Caracterização Biológica *in vitro* - Antibiograma

Na tabela 9 estão representados os micro-organismos utilizados, bem como meios de cultura e os antibióticos de uso específico para cada um deles.

Tabela 9 – Micro-organismos, meios de cultura e antibióticos usados no teste de Antibiógrama.

Micro-organismo	Código ATCC	Meio de cultura	Antibiótico
<i>Escherichia coli</i>	n. 25922	Agar Mueller Hinton	Disco de Ampicilina 10mcg
<i>Staphylococcus aureus</i>	n.6538P	Agar Mueller Hinton	Disco de Tetraciclina 30mcg
<i>Candida albicans</i>	–	Agar Sabouraud	Disco de Anfotericina B 100mcg

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Foi analisada a atividade antimicrobiana dos filmes frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, onde placas de petri contendo agar foram inoculadas com os mesmos. Cada um destes micro-organismos expressam reações próprias de suas características, sendo portanto de vital importância o estudo dos mesmos neste estudo, uma vez que eles podem desencadear diferentes reações frente ao corpo humano.

O experimento foi realizado em triplicata, onde as placas anteriormente preparadas foram inoculadas. Para o inóculo das placas foi utilizado o volume de 200µl da cultura de cada micro-organismo com concentração celular em torno de 10^6 - 10^8 cel.ml⁻¹. Os filmes foram cortados em formato discoide, com diâmetro de aproximadamente 6mm e colocados sobre a superfície dessas placas. As placas foram incubadas por 24 horas em temperatura de 36°C e posteriormente a atividade antimicrobiana foi avaliada mediante os diâmetros da inibição (BODINI, 2011).

Os resultados foram obtidos utilizando um paquímetro digital da marca Starret®, medindo-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco. Uma tabela padronizada (tabela 10) foi consultada para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano testado.

Tabela 10 – Valores padrão de halos inibitórios para os respectivos antibióticos.

Antibiótico	R	I	S
Ampicilina	11mm	12-13mm	14mm
Tetraciclina	14mm	15-18mm	19mm

R = Resistente, I = Intermediário; S = Sensível.

Fonte: Adaptado de CARVALHO, L. C. F. 2015; LABROCLIN, 2011.

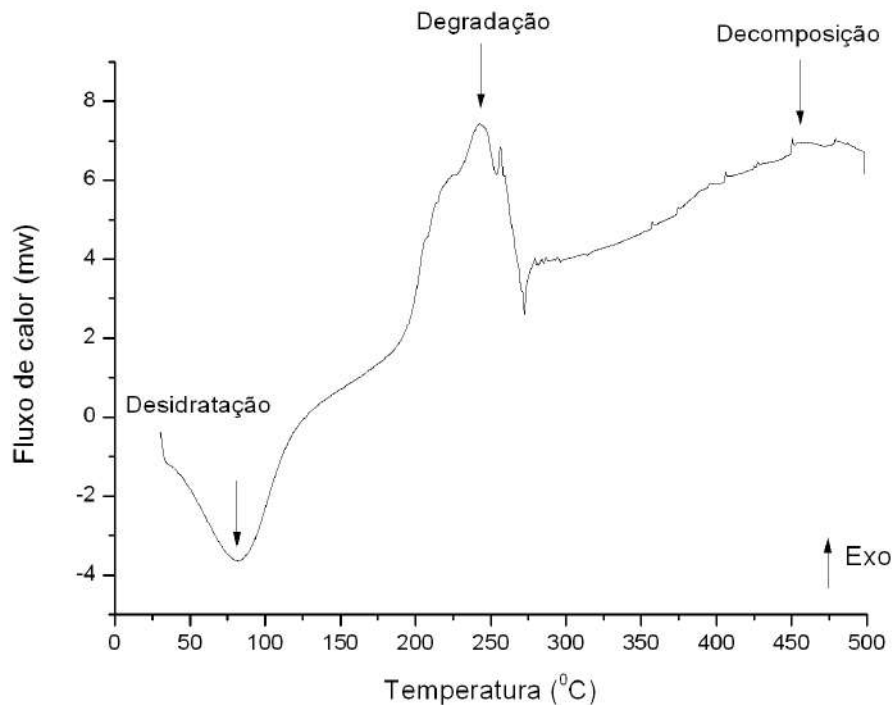
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da matéria prima

5.1.1 Análise térmica do Alginato de Sódio (AS)

O gráfico abaixo (figura 15) apresenta a curva de *DSC* do AS em pó sob atmosfera de nitrogênio (N_2) na faixa de temperatura de 30 a 500 $^{\circ}C$.

Figura 15 – Curva *DSC* da amostra de AS em pó sob atmosfera de N_2 (30 a 500 $^{\circ}C$).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

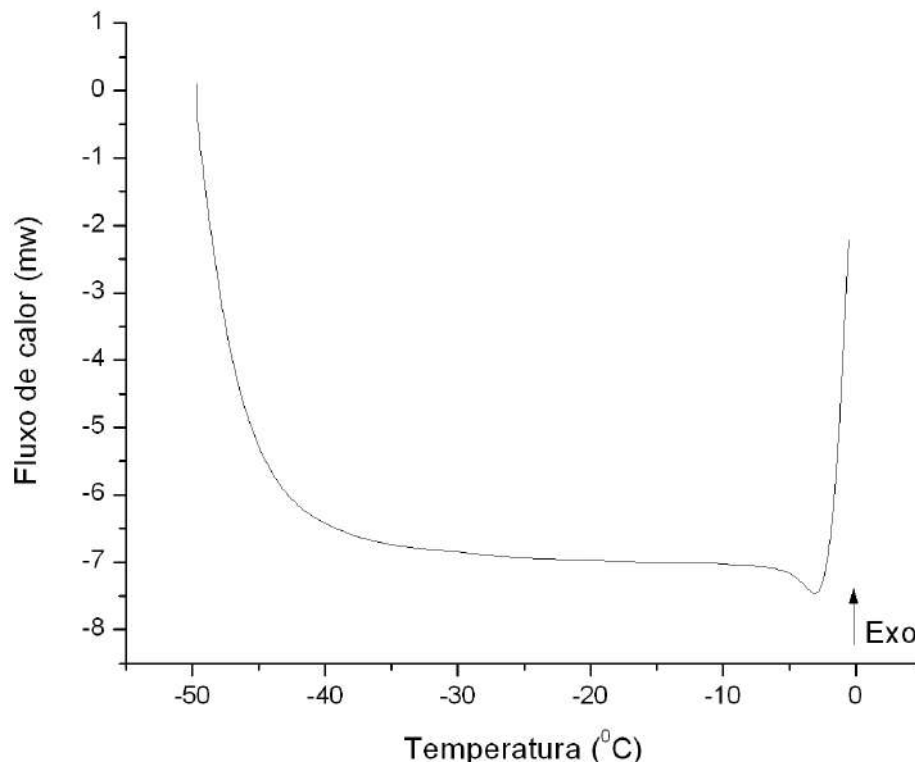
Foi observada a ocorrência de um pico na faixa de temperatura entre 30 $^{\circ}C$ a 200 $^{\circ}C$, correspondendo a um evento endotérmico com o ápice a 80 $^{\circ}C$, podendo estar associado ao processo de desidratação da amostra. Esse comportamento foi observado de forma semelhante para o alginato de sódio no estudo de Tagliari (2012). Como o evento tem início à temperatura ambiente, acredita-se tratar de umidade. Porém, como o término do processo ocorre em temperatura superior a 100 $^{\circ}C$ este evento pode estar associado a molécula de água coordenada ou ligada. Portanto, através da análise dos resultados, o alginato de sódio possui dois tipos de água em sua estrutura, uma parcela de água não ligada referente à umidade e outra

parcela da água ligada ao polímero. Outro pico observado no gráfico presente na faixa de temperatura de 200^oC a 260^oC, correspondendo a um evento exotérmico com o ápice a 240^oC, pode estar associado ao processo de degradação do polímero. Esses resultados foram observados semelhantemente no estudo de Soares et al. (2004) para o alginato de sódio. Na temperatura de 500^oC foi observado início o de um pico correspondendo à decomposição da amostra.

De acordo com Segato (2007), a temperatura de transição vítrea (Tg) do AS ocorre em torno de -25^oC, dessa forma, neste estudo em varredura realizada na faixa de temperatura entre -50^oC e 0^oC (figura 16) foi constatado a curva de Tg deste material.

O gráfico mostra fluxo de calor da amostra para aumentar a temperatura até -40^oC. Entre -40^oC e -5^oC a temperatura aumenta para um fluxo zero. Após -5^oC passa a ter fluxo para a amostra. Dessa forma a faixa de temperatura entre -40^oC e -5^oC sugere rearranjo da estrutura diminuindo a energia interna e levando ao aumento da temperatura.

Figura 16 – Curva DSC da amostra de AS em pó sob atmosfera de N₂ (-50 a 0^oC).



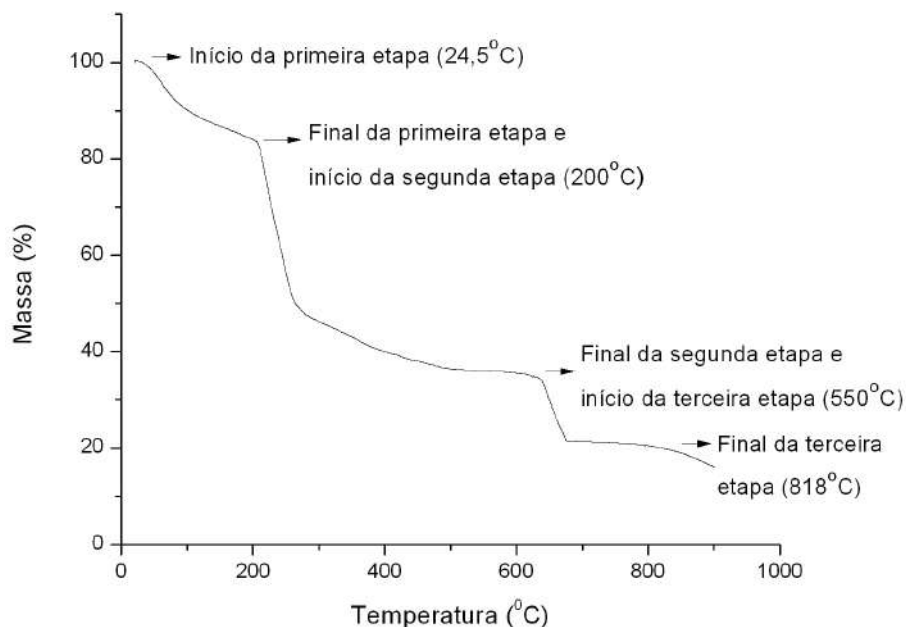
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Para análise de TGA, o percentual de perda de massa foi obtido através da equação 9, onde MI e MF são as massas inicial e final de cada etapa e M0 é a massa de partida das amostras no início do ensaio.

$$\% \text{ de perda de massa} = \frac{MI - MF}{M0} \times 100 \quad (9)$$

Na figura 17 é possível observar a curva de TGA do AS conforme fornecido pelo fabricante, onde são evidenciadas três etapas de perda de massa.

Figura 17 – Curvas da TGA de AS em pó sob atmosfera de N₂ (30 a 900°C).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A primeira etapa correspondente à faixa de temperatura entre 24,5°C e 200°C com perda de 16% em peso, onde se observa a desidratação da amostra iniciando em 60°C, resultando no composto anidro. A segunda etapa teve duas transições, correspondendo à faixa de temperatura compreendida entre 200°C e 550°C com perda de 49% em peso, onde o alginato de sódio registrou a maior perda de massa entre 205°C a 285°C correspondendo à decomposição completa de sua principal estrutura de suporte, que foi associada à degradação do alginato de sódio anidro em carbonato de sódio (NaCO₃) e à desidratação. Essa característica também foi observada nos trabalhos de Sundarrajan et al. (2012). A terceira etapa compreendeu

a faixa de temperatura entre 550⁰C e 818⁰C, com perda de 15% em peso, associada à decomposição do NaCO₃ em óxido de sódio (NaO₂) com liberação de dióxido de carbono (CO₂). O resíduo final foi obtido a partir da temperatura de 818⁰C com valores na ordem de 20% em peso da amostra inicial.

Estão apresentados na tabela 11 os valores da *TGA* e da *DSC* do alginato de sódio correspondentes aos eventos térmicos de desidratação e decomposição.

Tabela 11 – Resultado da *TGA* e *DSC* do AS em pó.

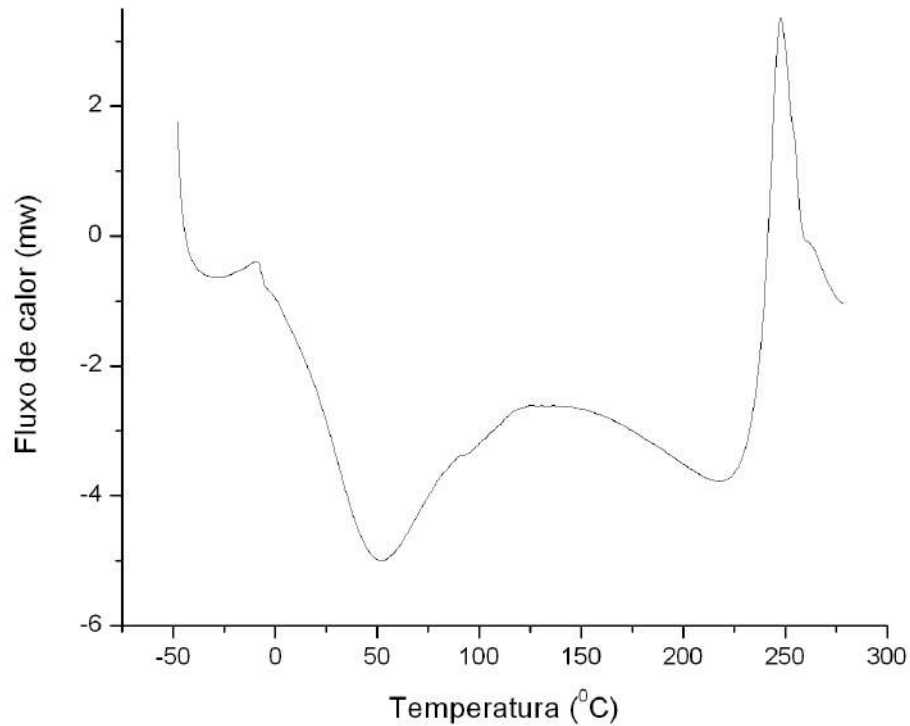
Alginato	TGA		DSC	
	Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Faixa de temperatura (°C)
	Transição vítrea (Tg)	–	–	-25
	Desidratação	24,4 a 200	16	30 a 200
	Degradação térmica do alginato de sódio (AS)	200 a 550	49	200 a 550
	Decomposição do carbonato de sódio (NaCO ₃)	550-818	15	A partir de 470
	Resíduo final	818	20	–

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.1.2 Análise térmica da Goma Gelana (GG)

A curva de *DSC* da GG conforme fornecida pelo fabricante (figura 18) e sob atmosfera de nitrogênio na faixa de temperatura entre -50⁰C e 280⁰C mostrou picos endotérmicos a -25⁰C, sugerindo temperatura de transição vítrea deste polímero, pico endotérmico em 51⁰C e em 218⁰C associados ao processo de desidratação da amostra. Foi observado também pico exotérmico em 247⁰C que pode estar associado ao processo de degradação do polímero.

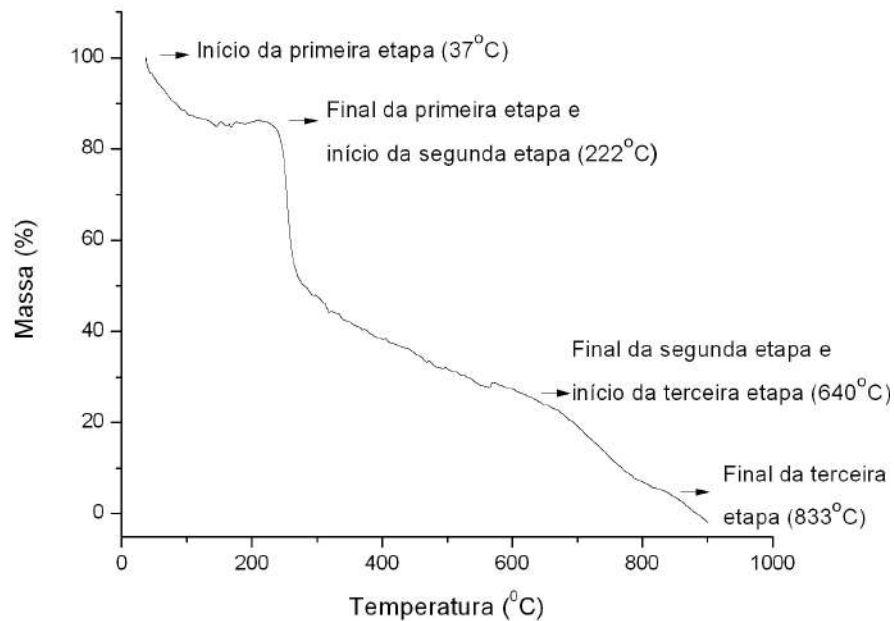
Figura 18– Curva DSC da amostra de GG em pó sob atmosfera de N₂ (30 a 280°C).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na figura 19 é observa-se a curva de TGA da GG conforme fornecida pelo fabricante.

Figura 19 – Curvas da TGA da GG em pó sob atmosfera de N₂ (30 a 900°C).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

O processo de desidratação pode ser observado na faixa de temperatura de 37^oC a 222^oC, havendo perda de 14% em massa desta amostra. Na segunda etapa à faixa de temperatura de 222^oC à 640^oC é observada a decomposição térmica da amostra. Nesta etapa há a maior perda em massa, sendo estimada em 62%. O processo de degradação pode ser observado à faixa de temperatura 640^oC à 833^oC, com perda térmica gerando material carbonizado. A perda da amostra em peso foi estimada em 19%. O resíduo final foi obtido à temperatura de 833^oC e correspondeu a 5% em peso da amostra inicial.

Estão apresentados na tabela 12 os valores da *TGA* e da *DSC* da goma gelana correspondentes aos eventos térmicos de desidratação e decomposição.

Tabela 12 – Resultado da *TGA* e *DSC* da GG em pó.

Goma Gelana	TGA		DSC
Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Faixa de temperatura (°C)
Transição vítrea (Tg)	–	–	-25
Desidratação	37 a 222	14	30 a 200
Decomposição térmica da Goma Gelana	222 a 640	62	200 a 260
Degradação da Goma Gelana	640-833	19	–
Resíduo final	833	5	–

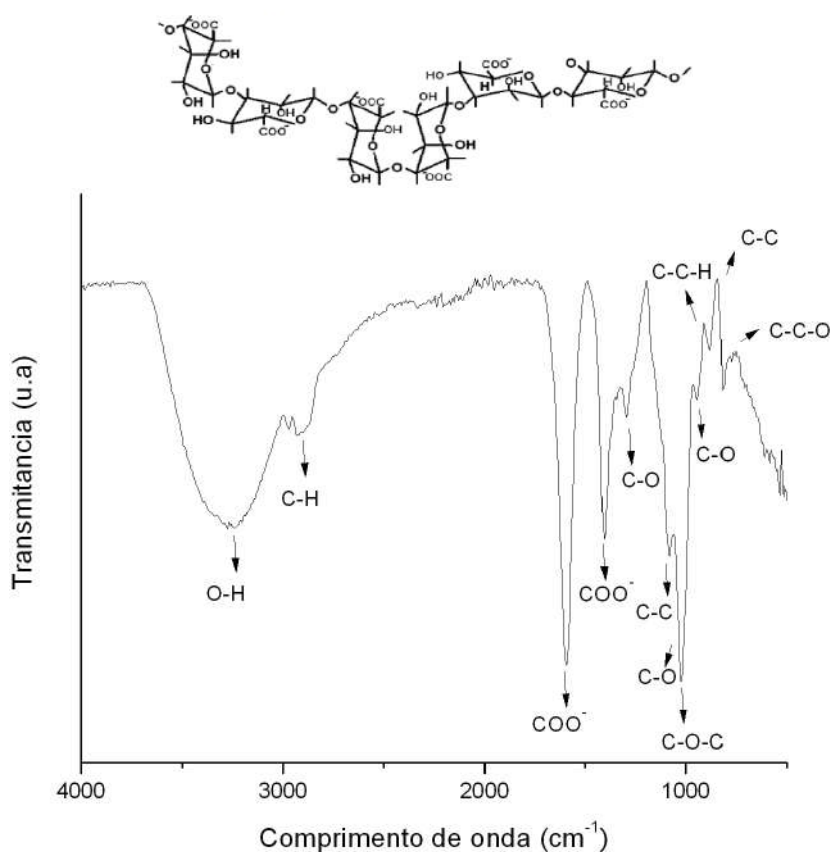
Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro de infravermelho do AS em pó (figura 20) mostrou absorção das principais bandas em 3243cm⁻¹ associada ao estiramento do grupo O-H, a banda de 2926cm⁻¹ a 3000cm⁻¹, associada ao estiramento do duplete simétrico e assimétrico do C-H, em 1592cm⁻¹ e 1413cm⁻¹, ao estiramento assimétrico de COO⁻, em 1297cm⁻¹ e 1021cm⁻¹, ao estiramento de C-O, em 1079cm⁻¹, ao estiramento de C-C, em 1021cm⁻¹, ao estiramento de C-O-C, em 945cm⁻¹, ao estiramento de C-O e em 912cm⁻¹ ao de C-C-H, em 841cm⁻¹, ao de C-C e em 778 cm⁻¹ associada ao C-C-O.

Esses valores são semelhantes aos valores encontrados nos estudos de Abreu et al. (2008) e Fan et al. (2006).

Figura 20 – Espectro FTIR e estrutura química do AS em pó.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A tabela 13 apresenta as principais bandas associadas aos respectivos grupos químicos do AS conforme fornecido pelo fabricante.

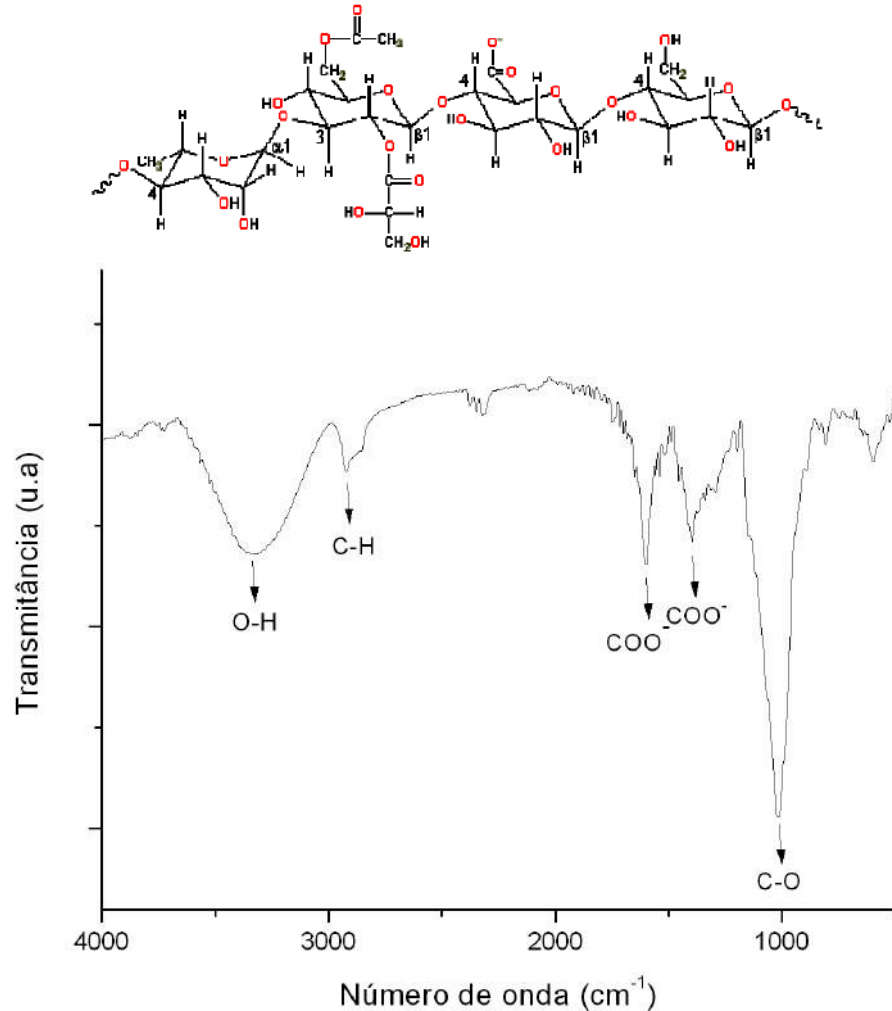
Tabela 13 – Bandas encontradas no espectro de infravermelho do AS em pó e seus respectivos grupos químicos.

Bandas	Grupos químicos
3243cm ⁻¹	Estiramento de O-H
2926cm ⁻¹ a 3000cm ⁻¹	Estiramento de C-H
1592cm ⁻¹ e 1413cm ⁻¹	Estiramento assimétrico de COO ⁻
1297cm ⁻¹ e 1021cm ⁻¹	Estiramento de C-O
1079cm ⁻¹	Estiramento de C-C
1021cm ⁻¹	Estiramento de C-O-C
945cm ⁻¹	Estiramento de C-O
912cm ⁻¹	Estiramento de C-C-H
841cm ⁻¹	Estiramento de C-C
778 cm ⁻¹	Estiramento de C-C-O

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A figura 21 apresenta o espectro de infravermelho da GG em pó.

Figura 21 – Espectro *FTIR* e estrutura química da GG.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

O espectro de infravermelho mostrou absorção das principais bandas em 3344cm^{-1} referente ao estiramento do grupo O-H, em 2920cm^{-1} referente ao estiramento do grupo C-H, em 1600cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico do grupo COO^- , em 1398cm^{-1} referente ao estiramento simétrico de COO^- , em 1018cm^{-1} referente ao estiramento do grupo C-O. Esses valores e grupos químicos também foram observados nos estudos de Pereira et al. (2014), Pereira et al. (2011), Silva-Correia et al. (2011), Coutinho et al (2010).

A tabela 14 apresenta as principais bandas associadas aos respectivos grupos químicos do alginato de sódio em pó.

Tabela 14 – Bandas encontradas no espectro de infravermelho da GG em pó e seus respectivos grupos químicos.

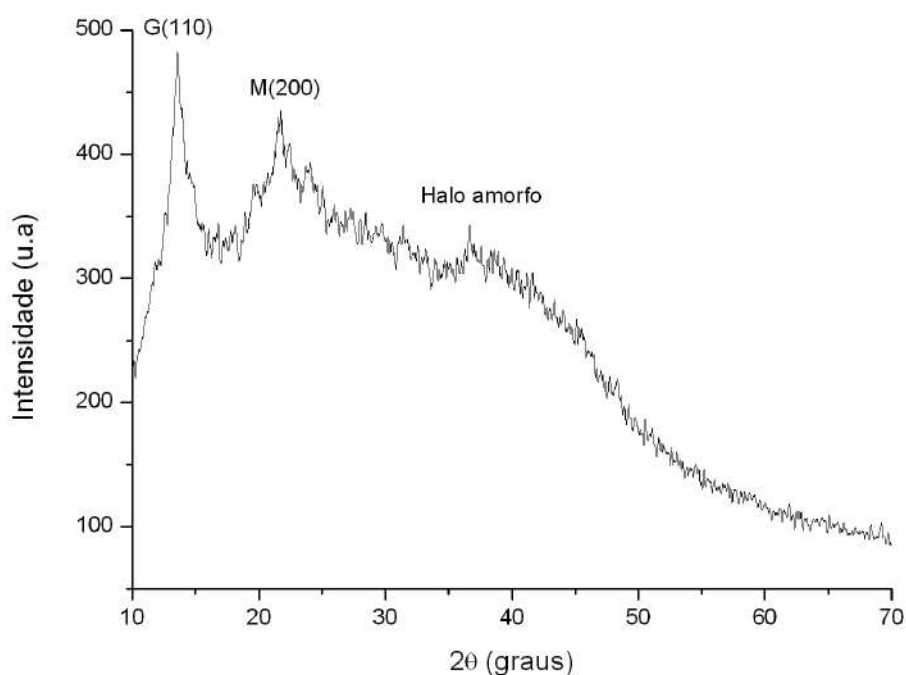
Bandas	Grupos químicos
3344cm ⁻¹	Estiramento de O-H
2920cm ⁻¹	Estiramento de C-H
1600cm ⁻¹	Estiramento assimétrico de COO ⁻
1398cm ⁻¹	Estiramento simétrico de COO ⁻
1018cm ⁻¹	Estiramento de C-O

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.1.4 Difração de Raios-X

A figura 22 apresenta o difratograma obtido a partir da amostra de AS em pó.

Figura 22 – Gráfico DRX do AS em pó.



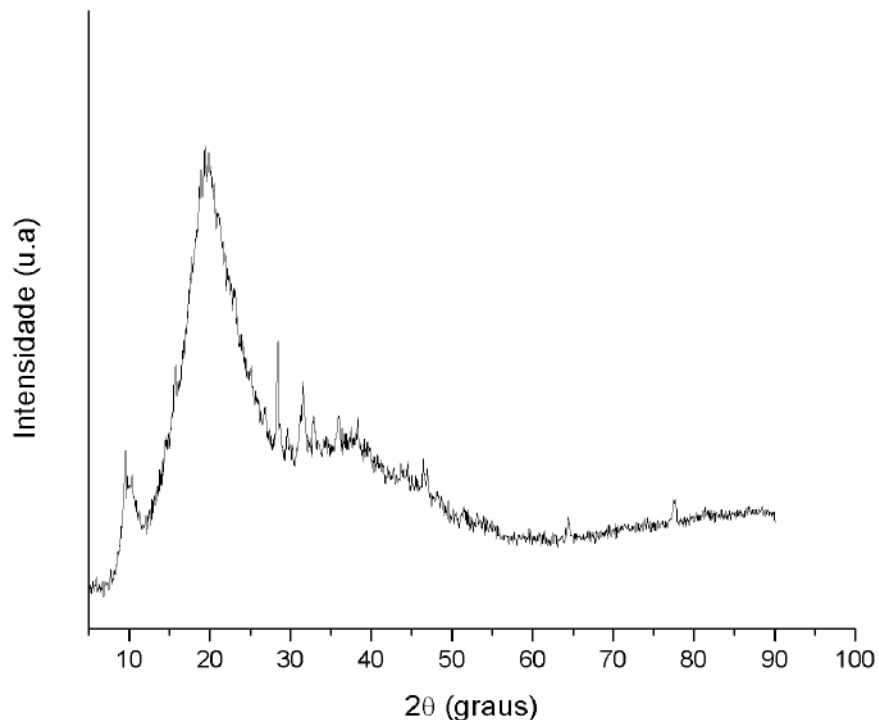
Fonte: Elaborado pela própria autora.

São observados dois picos de difração em valores 2θ , o primeiro pico de grande intensidade em $2\theta=13,5^\circ$ ($d=0,228\text{nm}$) associado ao plano cristalográfico (110), refletindo o plano da unidade do poliguluronato. O segundo pico de menor intensidade em $2\theta=21,8^\circ$ ($d=0,141\text{nm}$) associado ao plano cristalográfico (200), refletindo o plano da unidade do polimanuronato. O terceiro pico é considerado um halo amorfo. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Sundarajan et al. (2012).

Para calcular o GC das amostras de AS foi aplicada a equação 2 descrita no tópico 4.6.3, onde o valor estimado foi de 10% medindo a área sobre o gráfico com emprego do programa Microcal Origin[®] versão 8.0.

A intensidade dos picos está diretamente correlacionada com o número de cristalitos de difração dos raios X. Diante disso, a GG é um material tipicamente semicristalino, sendo observado através dos picos pontiagudos que aparecem no difratograma das análises de DRX. Esses resultados também foram encontrados nos estudos de Pereira et al. (2014). Na figura 23 foram observados dois picos.

Figura 23 – Gráfico DRX da GG em pó.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

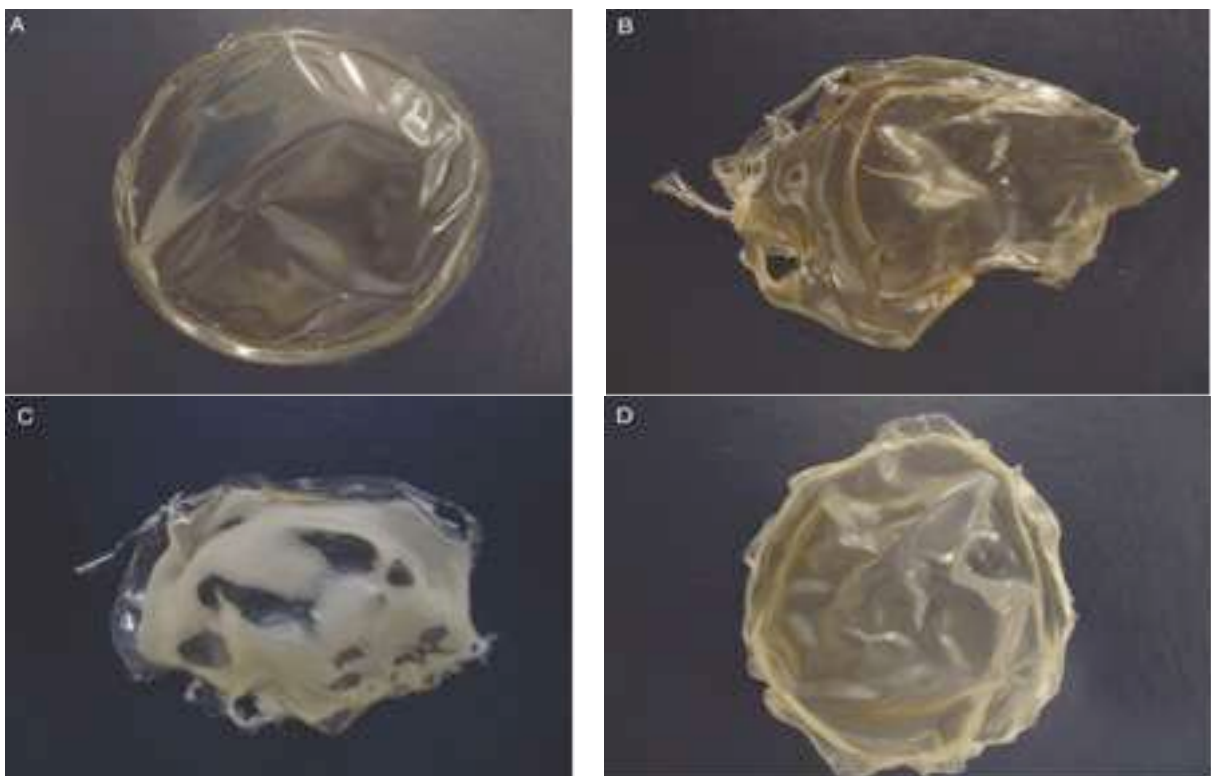
O primeiro pico de menor intensidade em $2\theta=9,52^{\circ}$ ($d=0,928\text{nm}$) e o segundo pico de maior intensidade em $2\theta=19,38^{\circ}$ ($d=0,457\text{nm}$). O GC das amostras de GG foi calculado através da equação 2 descrita no tópico 4.4.3, onde o valor estimado foi de 38%, bem superior àquele observado para as amostras de AS.

5.2 Caracterização dos filmes AS e GG

5.2.1 Morfologia macroscópica obtida por aspecto visual

As imagens da figura 24 evidenciam os aspectos macro morfológicos e de homogeneidade observados nos filmes preparados a partir de soluções de AS puro e de filmes preparados com solução AS misturado com solução de CaCl_2 .

Figura 24 – Aspecto dos filmes de AS com CaCl_2 .



A) Filme AC; B) Filme ACaCl_2S ; C) Filme ACaCl_2SI ; D) Filme ACaCl_2I .

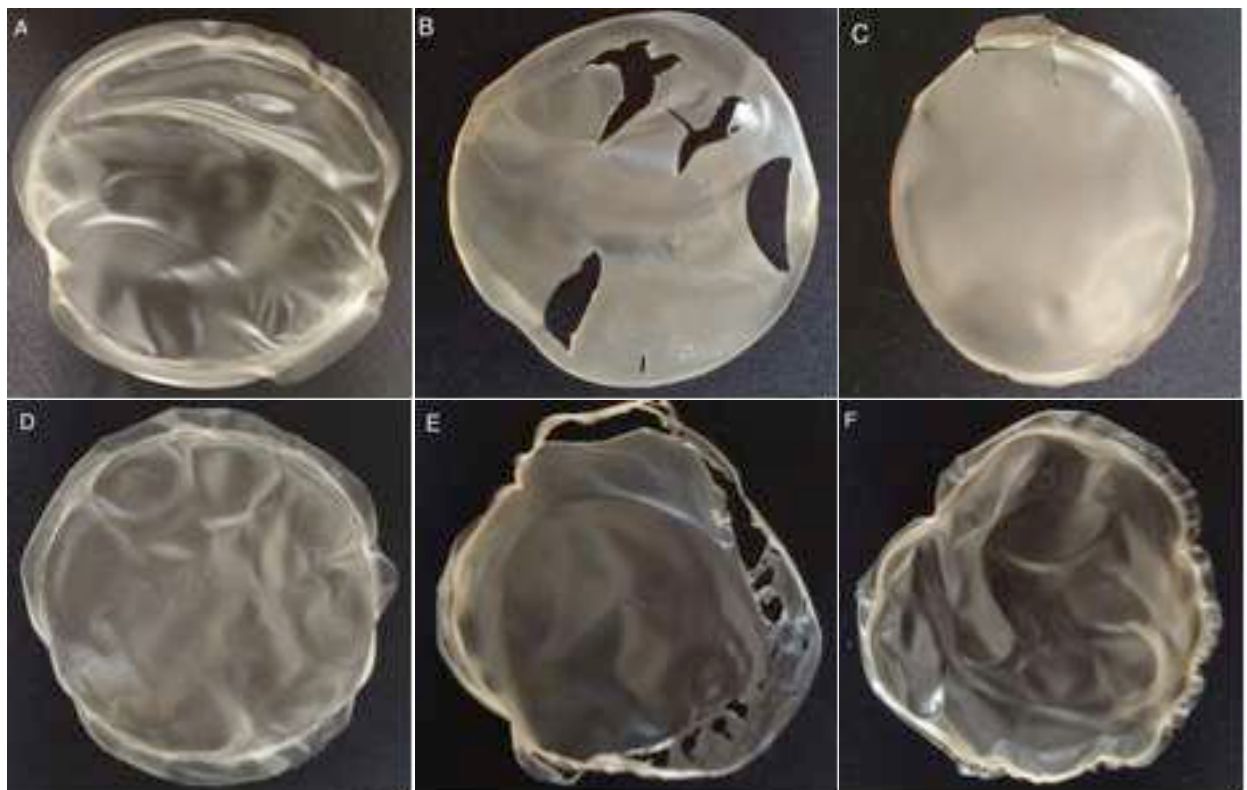
Fonte: Elaborado pela própria autora.

A imagem 24(a) mostra o filme contendo apenas o AS puro obtido a partir de solução aquosa 1% (m/v) - filme AC - controle. A imagem 24(b) mostra o filme preparado com a solução 1% (m/v) de AS misturada com a solução 2% (m/v) de CaCl_2 - filme ACaCl_2S . A imagem 24(c) contém o filme mostrado na figura 24(b) submetido à imersão em solução CaCl_2 2% (m/v) - filme ACaCl_2SI . A imagem 24(d) contém o filme mostrado na figura 24a imerso em solução de CaCl_2 2% (m/v) - filme ACaCl_2I . Pelas imagens podemos observar que o filme 24(a) parece ser mais homogêneo e menos rugoso quando comparado aos filmes mostrados nas figuras

24(b), 24(c) e 24(d), demonstrando que a presença de CaCl_2 promoveu aumento da rugosidade na superfície dos filmes. Essa rugosidade pode ser associada ao resultado das ligações cruzadas que ocorrem entre o AS e o CaCl_2 , como relatado nos estudos de Yang, Xie e He (2010). O filme 24(c) apresentou aspecto mais opaco que pode estar associado à presença de CaCl_2 em maior proporção, ou seja, devido à presença de CaCl_2 na solução e durante a imersão do filme, que deve ter reagido na estrutura do polímero.

A figura 25 apresenta o aspecto visual dos filmes contendo GG, AS e CaCl_2 .

Figura 25 – Aspecto dos filmes de goma gelana com alginato de sódio e CaCl_2 .



A) Filme GGC; B) Filme AGG; C) Filme AGGCaCl₂S; D) Filme GGCaCl₂I; E) AGGCaCl₂I; F) AGGCaCl₂SI.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A imagem 25(a) mostra o filme GG puro obtido a partir de solução aquosa 1% (m/v) - filme GGC - controle. A imagem 25(b) mostra o filme preparado com a solução 1% (m/v) de AS misturada com a solução 1% (m/v) de GG - filme AGG. A imagem 25(c) mostra o filme preparado com a solução de AS 1% (m/v) misturada com a solução de GG 1% (m/v) e com a solução 2% (m/v) de CaCl_2 - filme AGGCaCl₂S. A imagem

25(d) contém o filme mostrado na figura 25(a) submetido à imersão em solução 2% (m/v) de CaCl_2 - filme GGCaCl_2I . A imagem 25(e) contém o filme mostrado na figura 25(b) submetido à imersão em solução 2% (m/v) de CaCl_2 - filme $\text{AGGCaCl}_2\text{I}$. A imagem 25(f) contém o filme mostrado na figura 25(c) submetido à imersão em solução 2% (m/v) de CaCl_2 - filme $\text{AGGCaCl}_2\text{SI}$.

O filme mostrado em 25(a) aparenta ter leve rugosidade e transparência, mantendo o formato circular ao qual foi submetido a secagem. O filme 25(d) apresentou integro, sem defeitos, fissuras ou descontinuidades ao aspecto visual. Além disso, esse filme apresentou maior opacidade quando comparado ao filme controle, o que pode ser explicado pela presença de CaCl_2 na imersão ao qual este filme foi inserido dando impressão dos elementos da solução de CaCl_2 terem reagido com o material da superfície do filme.

O filme 25(b) não apresentou uniformidade superficial quando comparado aos demais filmes, o que pode estar relacionado a menor resistência da superfície dos filmes sem o travamento dos íons da solução de CaCl_2 , que durante o processo de secagem rompeu parte de sua estrutura devido aos esforços presentes durante a contração em diferentes direções, uma vez que o CaCl_2 promoveria interação entre os polímeros, pois ambos são aniônicos (COUTINHO et al., 2010; GASEROD et al., 1998). O mesmo pode ser observado para o aspecto do filme 27(e), porém com menor descontinuidade, pois o filme recebeu imersão em CaCl_2 2% (m/v) que desempenhou função de compatibilizante, promovendo interação entre os polímeros.

O filme 25(c) apresentou textura mais lisa com rugosidade menor se comparada com as demais amostras e superfície plana, reproduzindo o formato da placa ao qual foi inserido, demonstrando excelente homogeneidade dos polímeros ao CaCl_2 . Diferentemente, o filme 25(f) que recebeu imersão em CaCl_2 apresentou maior rugosidade na superfície, com alteração do seu formato inicial quando comparado ao filme 25(e).

Os filmes de AS e GG produzidos com CaCl_2 foram em sua maioria homogêneos, transparentes e visualmente atrativos. O uso do CaCl_2 como agente compatibilizante

foi necessário para se conseguir uma adequada manuseabilidade dos filmes. Estes filmes obtidos foram flexíveis e completamente solúveis em água. Zactiti e Kieckbusch (2006) obtiveram filmes de alginato totalmente solúveis em água, e Pavlath et al. (1999) também obtiveram filmes de alginato totalmente solúveis em água, porém em um único estágio de reticulação. Formulações semelhantes as do presente trabalho contendo alginato de sódio foram apresentadas por Rajsharad e Kamble (2008) e Nery (2014) para aplicação como filmes, coberturas, liberação controlada de fármacos, dentre outros.

5.2.2 Análise da espessura dos filmes

Na tabela 15 estão apresentados os valores de espessura obtidos para os diferentes filmes.

Tabela 15 – Valores de espessura dos diferentes filmes obtidos.

Amostra	Espessura
Filme 1 - AC	75 ± 41 µm
Filme 2 - A CaCl_2 S	128 ± 42 µm
Filme 3 - A CaCl_2 I	166 ± 108 µm
Filme 4- A CaCl_2 SI	128 ± 42 µm
Filme 5 - GGC	142 ± 27 µm
Filme 6 - AGG	104 ± 29 µm
Filme 7 - AGG CaCl_2 S	63 ± 20 µm
Filme 8 - GG CaCl_2 I	75 ± 20 µm
Filme 9 - AGG CaCl_2 I	118 ± 41 µm
Filme 10 - AGG CaCl_2 SI	64 ± 32 µm

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Segundo a literatura, filmes com espessura entre 66 e 80µm podem ser adequados para utilização no tratamento de lesões (RODRIGUES, 2008). Neste trabalho as espessuras médias dos filmes obtidos variaram de 63 a 166µm, porém somente os filmes AC, AGG CaCl_2 S, GG CaCl_2 I e AGG CaCl_2 SI estão dentro dos valores

sugeridos como adequados. A análise estatística revelou que diferentes proporções de CaCl_2 podem interferir na espessura dos filmes de AS, deixando os filmes mais espessos devido ao acúmulo de CaCl_2 presente em sua superfície como demonstrado no filme ACaCl_2I (espessura de $166\mu\text{m}$). Entretanto esse tratamento de imersão em CaCl_2 pode contribuir para aumento na rugosidade observada no exame visual como mostrado na figura 26 compatível com o acúmulo de cristais de CaCl_2 presentes na superfície, também observado na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

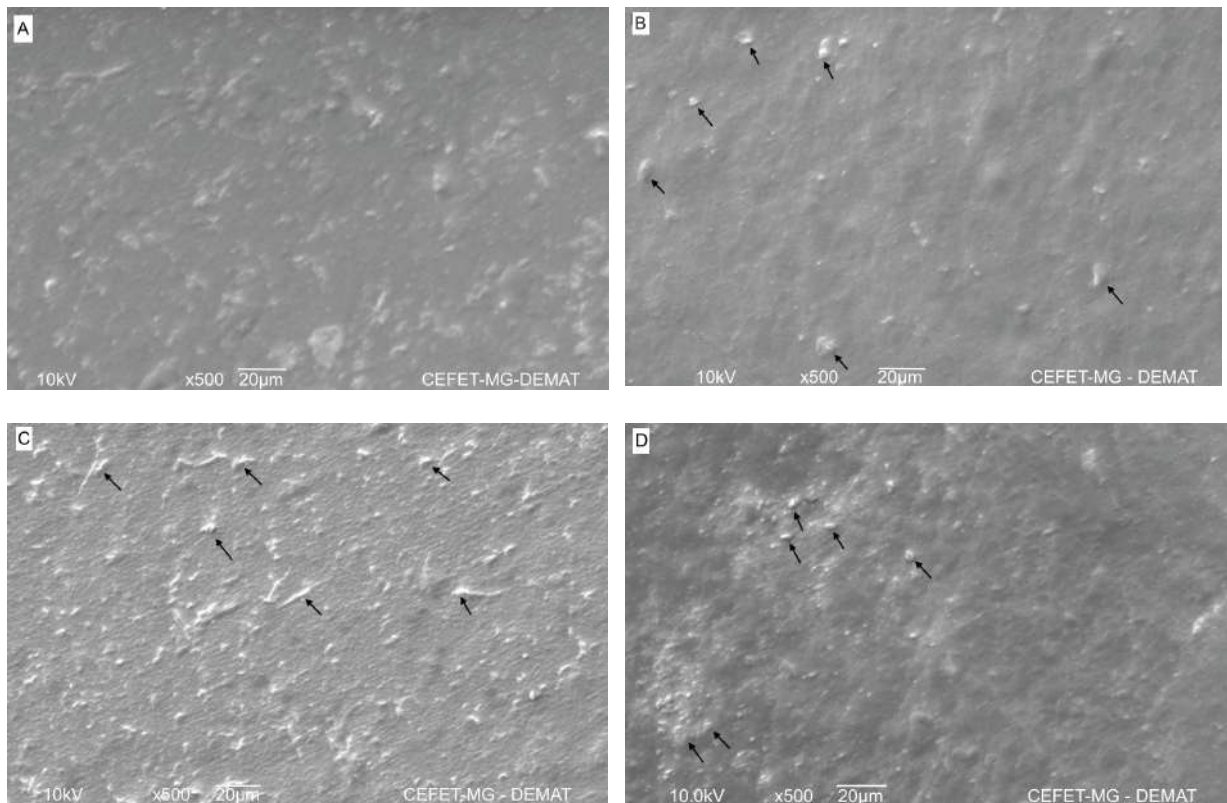
A proporção de CaCl_2 presente no filme da GG diminuiu a espessura dos filmes como observado no filme GGCaCl_2I quando comparado ao filme controle (GGC). O filme AGG diminuiu sua espessura e manteve seus valores quando recebeu proporções de CaCl_2 na solução ou na imersão ($\text{AGGCaCl}_2\text{S} = 63\mu\text{m}$ e $\text{AGGCaCl}_2\text{I} = 64\mu\text{m}$).

5.2.3 Análise Morfológica dos filmes

A análise por MEV da morfologia da superfície dos filmes de AS e CaCl_2 é demonstrada na figura 26.

Foi observado que o filme mostrado em 26B (filme ACaCl_2SI) apresenta alguns pontos brancos referentes ao CaCl_2 e alguns pequenos poros. O filme da figura 26C (filme ACaCl_2I) contém em sua superfície maior parcela de particulado fino representado por pontos brancos podendo ser referentes à presença de Ca depositados após a imersão do mesmo.

Ambos os filmes das figuras 26B, 26C e 26D apresentaram leve rugosidade em sua superfície quando comparados ao filme A (filme AC) porém o filme B apresentou superfície mais homogênea, demonstrando que a presença de CaCl_2 tanto na solução quanto na imersão promovem maior estabilidade à estrutura obtida.

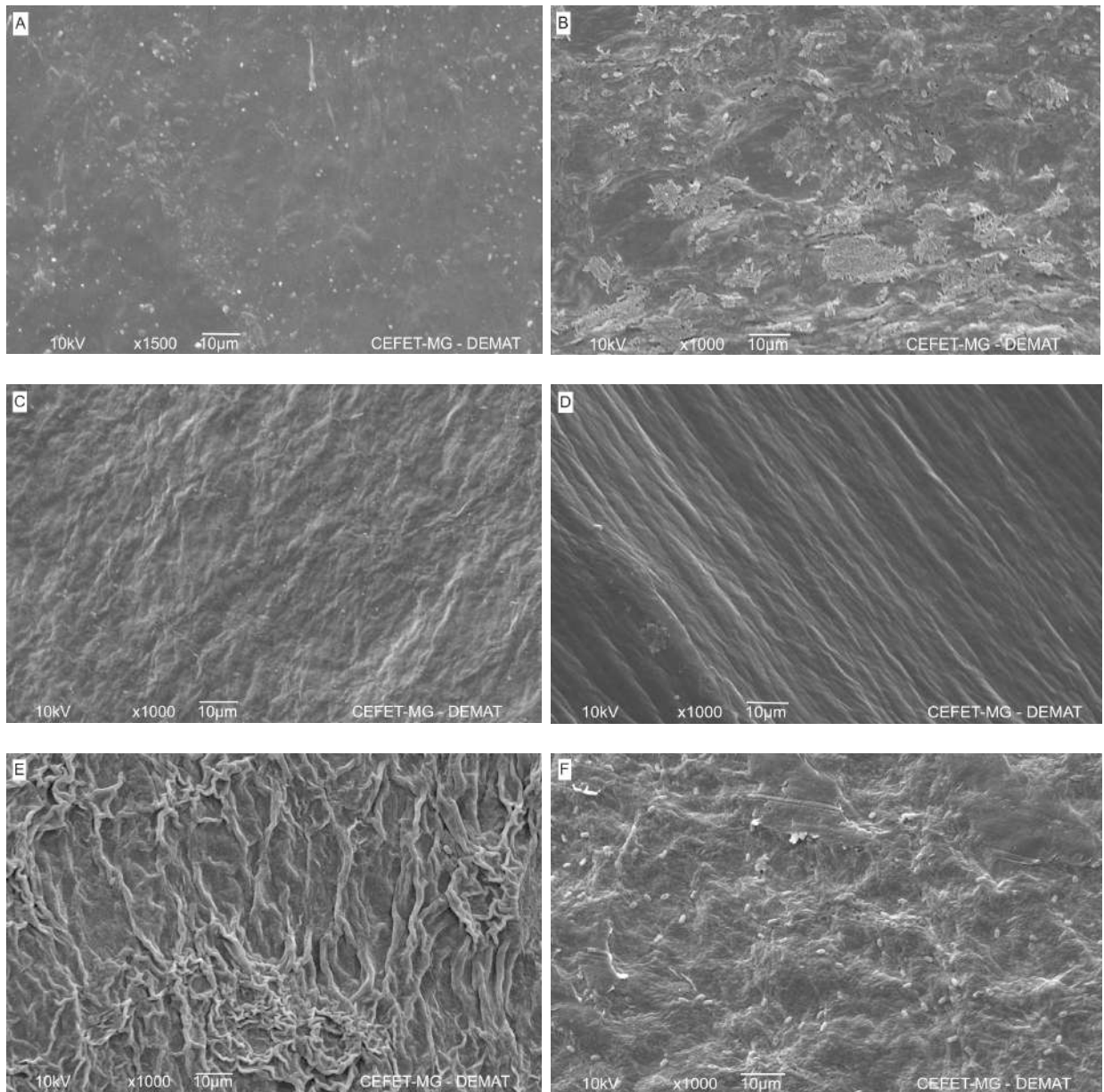
Figura 26 – Aspecto dos filmes de AS com CaCl_2 .

A) Filme AC; B) Filme $\text{A CaCl}_2\text{SI}$; C) Filme $\text{A CaCl}_2\text{I}$; D) Filme $\text{A CaCl}_2\text{S}$.
Elaborado pela própria autora.

Na figura 27 é possível verificar diferentes aspectos nas superfícies dos filmes de AS, GG e CaCl_2 através do MEV. Observa-se que as diferentes rotas influenciam na morfologia dos diferentes filmes obtidos. A figura 27A apresentou estrutura com padrão regular e presenças de particulado dando aspecto texturizado. Na figura 27B observa-se presença de poros irregulares dando impressão de material com baixa mistura com superfície mais rugosa. A figura 27C mostra que a adição de CaCl_2 promoveu diminuição do número de poros com presença de estrias distribuídas em orientação preferencial, textura mais regular que aquela mostrada em 27B, sugerindo que a reticulação pode ter ocorrido superficialmente. A figura 27D apresentou elevado número de estrias paralelas, mais finas que os demais filmes com material demonstrando elevado nível de organização sem poros, bastante homogêneo. A figura 27E apresentou padrão com semelhanças entre as imagens 27C e 27D com regiões de estrias alongadas mas em menor número que em “D”, separadas por regiões de aspecto que se aproxima de 27C. A figura 27F mostrou superfície com material apresentando alguns aglomerados provavelmente por esse filme conter maiores proporções de CaCl_2 em sua formulação, levando à rugosidade

maior que a apresentada em 27C, sem presença de estrias paralelas dando impressão de padrão próximo daquele mostrado em 27C, mas com leve alteração da superfície para o padrão mostrado em 27E.

Figura 27 – Aspecto dos filmes de goma gelana com alginato de sódio e CaCl_2 .



A) Filme GGC; B) Filme AGG; C) Filme AGGCaCl₂S; D) Filme GGCaCl₂I; E) AGGCaCl₂I; F) AGGCaCl₂SI.

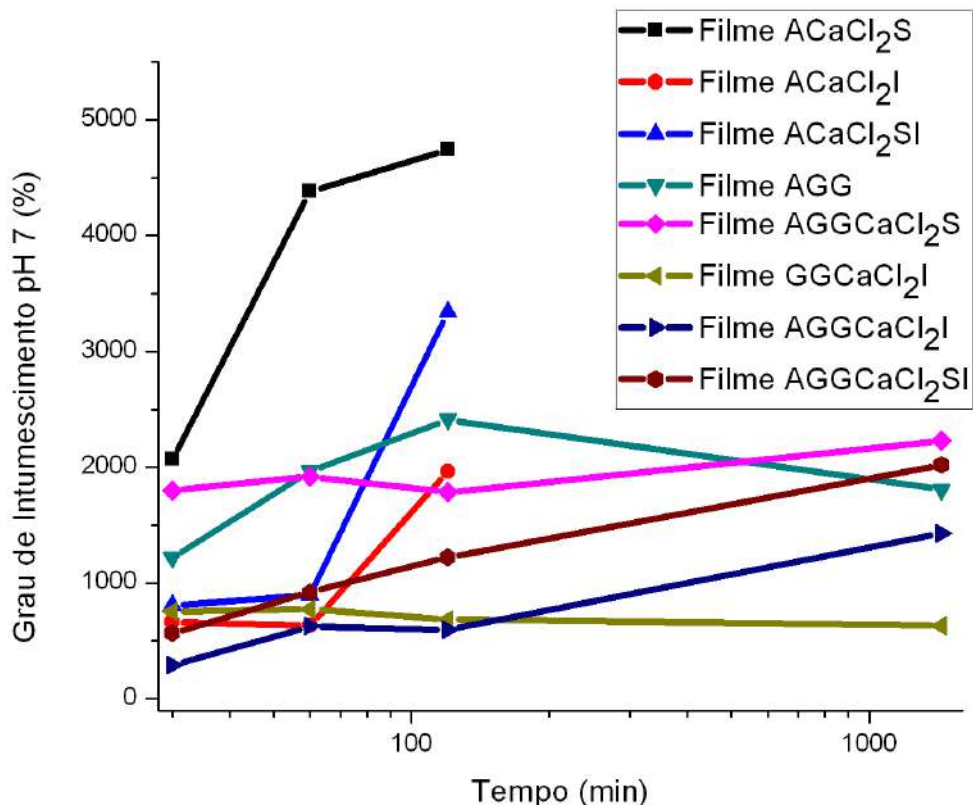
Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2.4 Perfil de hidratação dos filmes

O intumescimento de uma amostra inicia-se quando as moléculas do solvente entram na matriz polimérica hidratando os grupos hidrofílicos mais polares (primeiro estágio de hidratação), ocorrendo o intumescimento da rede polimérica como consequência da hidratação, que expõe os grupos hidrofóbicos reorganizando as moléculas de água nas proximidades, ocasionando um segundo estágio de hidratação. Posteriormente, moléculas adicionais de água entram nos interstícios da rede polimérica, ocupando o espaço existente entre as cadeias dessa rede, os microporos, macroporos abertos e fechados. Essa água adicional é chamada de água de preenchimento. O filme começa a se desintegrar, dependendo de sua composição, da temperatura, do pH do meio e do tempo de imersão (HOFFMAN, 2002).

A figura 28 apresenta as curvas do grau de intumescimento dos filmes em solução tampão pH $7 \pm 0,5$.

Figura 28 – Perfil de intumescimento dos filmes em solução tampão de pH ($7 \pm 0,5$).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

O ensaio de intumescimento realizado nos filmes de AS, GG e CaCl_2 apresentaram um padrão inicial de rápido aumento de volume ao exame visual. Os filmes AC e GGC não foram mostrados no gráfico do ensaio de intumescimento, pois os mesmos se degradam na água em curto período de tempo. De maneira geral, observa-se que os filmes sem a GG em sua composição apresentam maior grau de intumescimento comparados aos filmes que contém a GG. Porém, os filmes contendo GG mantiveram sua estrutura até tempo de 24h de imersão no meio utilizado para o ensaio (1.440min), enquanto os filmes sem GG degradaram completamente. Pode-se dizer que neste estudo a GG contribuiu para gerar capacidade máxima de intumescimento para períodos de até 24h (maior tempo analisado neste estudo), auxiliando na estrutura desses filmes para que os mesmos não se degradassem. A partir de 60 minutos os filmes AGGCaCl₂I e AGGCaCl₂S diminuíram o grau de intumescimento, porém aumentaram a taxa de intumescimento a partir de 120 minutos. A partir de 120 minutos o filme AGG teve diminuição na taxa de intumescimento e o filme GGCaCl₂I diminuiu a taxa de intumescimento a partir de 60 minutos, indicando ser este o tempo de capacidade máxima de intumescimento nestes filmes, sugerindo que a imersão em CaCl_2 promoveu travamento da estrutura superficial do filme limitando a capacidade do filme expandir e absorver mais volume na estrutura interna do filme. Apesar da imersão em CaCl_2 melhorar o aspecto dos filmes e a auxiliar provavelmente nas propriedades mecânicas destes filmes, ela diminuiu o grau de intumescimento, que era de se esperar, até pela morfologia já apresentada na microscopia da figura 26D. O único filme que aumentou gradativamente o grau de intumescimento foi o filme AGGCaCl₂SI, que antes de reagir com a solução de CaCl_2 na imersão recebeu na mistura o CaCl_2 capaz de promover estrutura interna mais porosa e regular, como observado na figura 27F. Essa estrutura mais definida pelo CaCl_2 reagido no volume pode ter limitado o travamento exclusivo na superfície como aquela figura 27E.

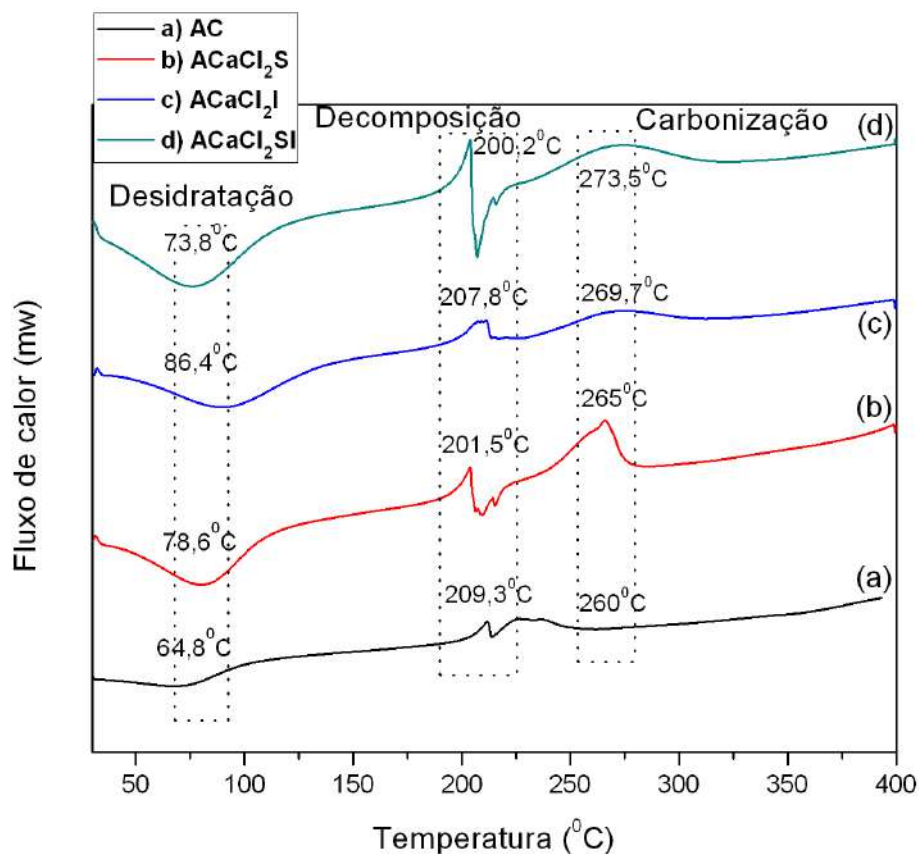
5.2.5 Análise térmica dos filmes

A curva de DSC dos filmes de AS e CaCl_2 obtidos é apresentada na figura 29, que evidenciou amplos picos endotérmicos para os filmes AC em 64,8⁰C, ACaCl₂S em 78,65⁰C, ACaCl₂SI em 73,8⁰C e para o filme ACaCl₂I, em 86,4⁰C. Esses picos endotérmicos foram associados à presença de moléculas de água na amostra, e

podem relacionar-se ao processo de desidratação da amostra. Esses resultados também estão compatíveis com os encontrados nos estudos de Sankalia et al. (2007). Observou-se picos de maior intensidade para os filmes ACaCl_2S e ACaCl_2SI , podendo associar à presença de CaCl_2 na solução dos mesmos. O filme ACaCl_2I apresentou maior temperatura de desidratação e menor intensidade de calor quando comparado aos filmes ACaCl_2S e ACaCl_2SI .

Um segundo pico exotérmico apresentou ápice em $209,3^\circ\text{C}$ para o filme AC, em $201,5^\circ\text{C}$ para o filme ACS, em $200,2^\circ\text{C}$ para o filme ACaCl_2SI e em $207,8^\circ\text{C}$ para o filme ACaCl_2I . Este pico pode ser associado ao processo de decomposição da amostra. Observa-se maior intensidade para os picos dos filmes ACaCl_2S e ACaCl_2SI podendo ser associada à presença de CaCl_2 na solução destes filmes, sendo o filme ACaCl_2SI de maior intensidade quando comparado ao filme ACaCl_2S , provavelmente devido a presença de maior proporção de CaCl_2 , tanto na solução quanto na imersão do mesmo, promovendo maior estabilidade da amostra.

Figura 29 – Curvas de DSC para os filmes de AS + CaCl_2 .



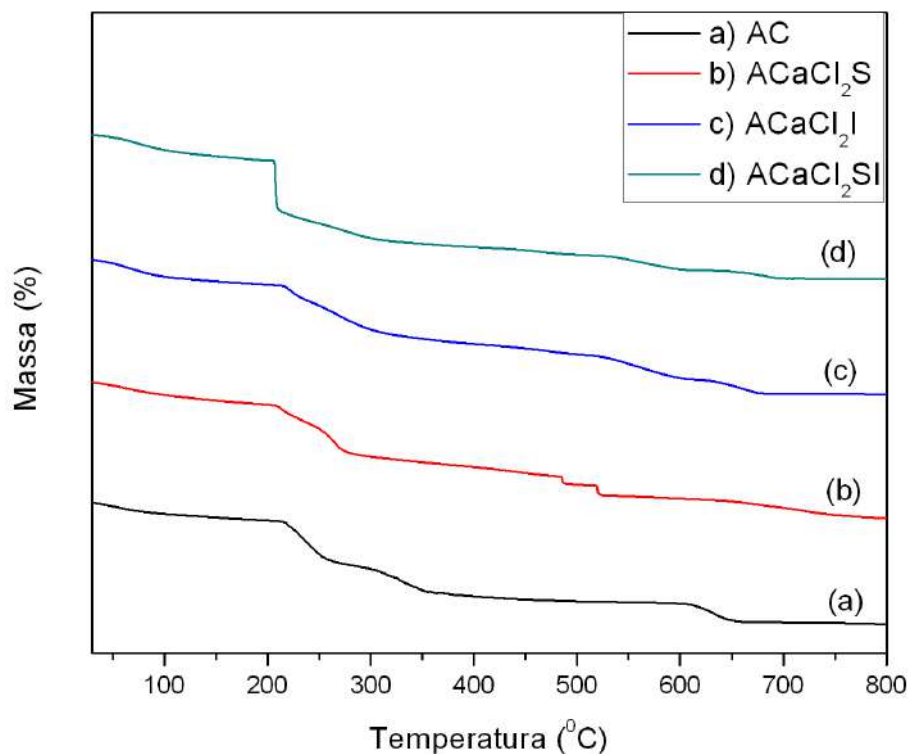
Fonte: Elaborado pela própria autora.

O pico $86,4^{\circ}\text{C}$ para o filme ACaCl_2I pode estar relacionado com a estrutura interna do filme gerando possibilidade de volume maior de água associado ao polímero, que necessita de maior fluxo de calor para remover a água. De outra forma a imersão das amostras com CaCl_2 promove novas ligações químicas que diminuem sítios de ligações com a água, sendo necessária diminuição do fluxo de calor para desidratar os filmes. De outro modo, os picos de degradação dos filmes com adição de CaCl_2 na solução são maiores, indicando maior dificuldade de romper o maior número de ligações estabelecidas na estrutura do polímero.

Um terceiro pico foi observado e pode ser atribuído à temperatura de carbonização das amostras, com máximo em 260°C para o filme AC, 265°C para o filme ACaCl_2S , $269,7^{\circ}\text{C}$ para o filme ACaCl_2I e $273,5^{\circ}\text{C}$ para o filme ACaCl_2SI . Os picos de carbonização também mostram maiores fluxos de calor para maiores proporções de CaCl_2 adicionadas aos sistemas. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Nery (2014).

Na figura 30 é possível observar a curva de *TGA* para os diferentes filmes obtidos.

Figura 30 – Curvas da *TGA* para os filmes de AS + CaCl_2 sob atmosfera de N_2 (30 a 900°C).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os filmes de AS e CaCl_2 apresentam três etapas de perda de massa (desidratação, decomposição térmica do AS e decomposição do Na_2CO_3). Os dados enfatizados foram em relação à desidratação e à decomposição térmica. Os valores dos intervalos de temperatura referentes aos eventos térmicos observados na *TGA* são comparáveis aos observados na *DSC*. Os resultados foram semelhantes aos resultados do polímero em pó. O filme ACaCl_2S apresentou perda de massa percentual semelhante ao filme controle (AC) na primeira etapa, ambos com 17% de perda em peso. Os filmes de AS que continham imersão em CaCl_2 (ACaCl_2I e ACaCl_2SI) também tiveram perda de massa percentual semelhante na primeira etapa (19% de perda em peso). Na segunda etapa, os filmes ACaCl_2S e ACaCl_2I apresentaram perda de massa semelhante (44% e 42%) e menor quando comparados ao filme AC - controle (51% de perda em peso). Já o filme ACaCl_2SI apresentou maior perda de massa percentual (58%) quando comparado ao filme controle.

A tabela 16 apresenta os valores de temperatura e perda de massa associado a cada evento térmico dos filmes de AS e CaCl_2 obtidos através das técnicas de *TGA* e *DSC*.

Tabela 16 – Resultado da *TGA* e *DSC* para análise do comportamento térmico das amostras dos filmes de AS + CaCl_2 .

Evento térmico	TGA		DSC
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Perda de massa (%)	Faixa de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Filme AC			
Desidratação	17,8 - 213,6	17	64,8
Decomposição térmica do alginato de sódio (Naalg)	213,6 - 571	51	209,3
Decomposição do carbonato de sódio (NaCO_3)	571 - 702	13	-
Filme ACaCl_2S			
Desidratação	19,8 – 194,8	17	78,6
Decomposição térmica do alginato de sódio (Naalg)	194,8 – 456,5	44	201,5

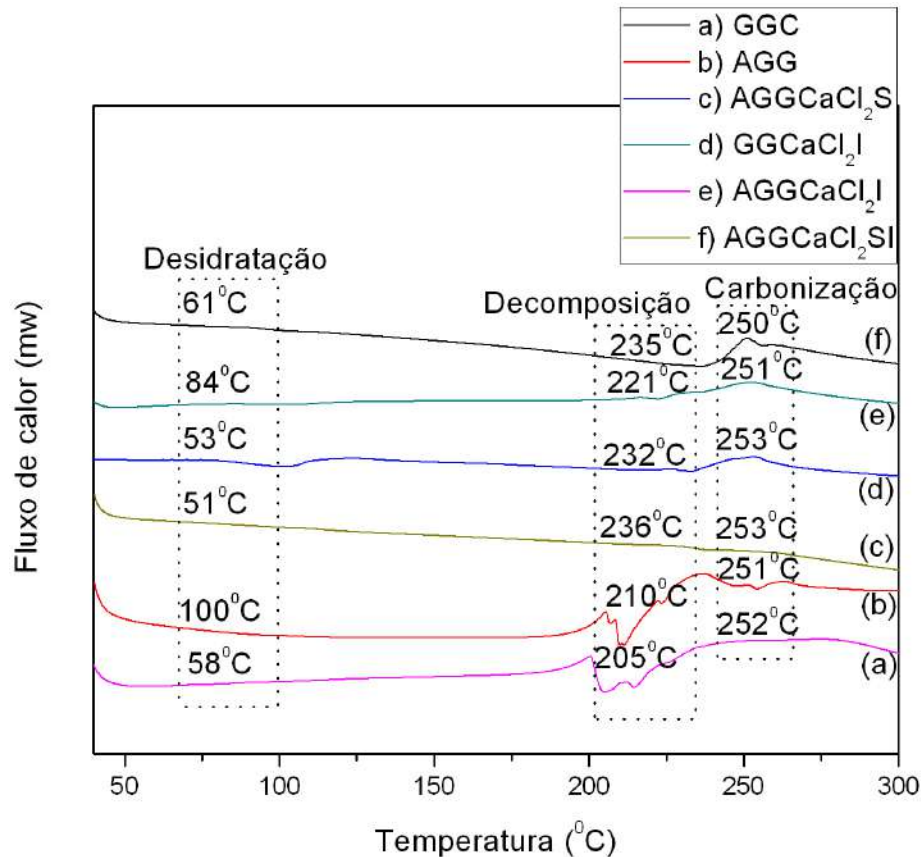
Decomposição do carbonato de sódio (NaCO ₃)	456,5 - 622	16	–
Filme ACaCl₂I			
Desidratação	17,9 - 180	19	86,4
Decomposição térmica do alginato de sódio (Naalg)	180 - 465	42	207,8
Decomposição do carbonato de sódio (NaCO ₃)	465 - 625	18	–
Filme ACaCl₂SI			
Desidratação	20,5 - 189	19	73,8
Decomposição térmica do alginato de sódio (Naalg)	189 - 490	58	200,2
Decomposição do carbonato de sódio (NaCO ₃)	490 - 667	12	–

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A curva de *DSC* dos filmes de AS, GG e CaCl₂ obtidos é apresentada na figura 31, que evidenciou pico endotérmico para o filme GGC em 61^oC, para o filme AGG em 100^oC, para o filme AGGCaCl₂S em 53^oC, para o filme GGCaCl₂I em 84^oC para o filme AGGCaCl₂I em 58^oC e para o filme AGGCaCl₂SI em 51^oC. Esses picos endotérmicos podem ser associados ao processo de desidratação da amostra, e apresentaram intensidade praticamente inexistente quando comparado aos filmes que continham apenas AS e CaCl₂ em sua composição. Esse fato pode ser explicado pela presença da GG nestes filmes, promovendo maior estabilidade térmica aos mesmos, indicando que a GG tem maior capacidade de fazer ligação entre as cadeias, além de ser mais cristalina com menor taxa de hidratação. Um segundo pico exotérmico apresentou ápice em 235^oC para o filme GGC, em 210^oC para o filme AGG, em 232^oC para o filme AGGaCl₂S, em 221^oC para o filme GGCaCl₂I, em 205^oC para o filme AGGCaCl₂I e em 236^oC para o filme AGGCaCl₂SI. Esse pico está associado ao processo de decomposição da amostra. Observa-se menor temperatura de decomposição térmica e maior intensidade de calor nos filmes AGG e AGGCaCl₂I, o que pode estar associado à materiais que não formaram ligações com os íons Ca pois não receberam as soluções de CaCl₂ em sua formulação.

Um terceiro pico foi observado com máximo em 250°C para o filme GGC, 251°C para o filme AGG, 253°C para o filme AGGCaCl₂S, 251°C para o filme GGCaCl₂I, 252°C para o filme AGGCaCl₂I e 253°C para o filme AGGCaCl₂SI. Esse pico foi atribuído à temperatura de carbonização das amostras.

Figura 31 – Curvas de DSC para os filmes de AS + GG + CaCl₂.

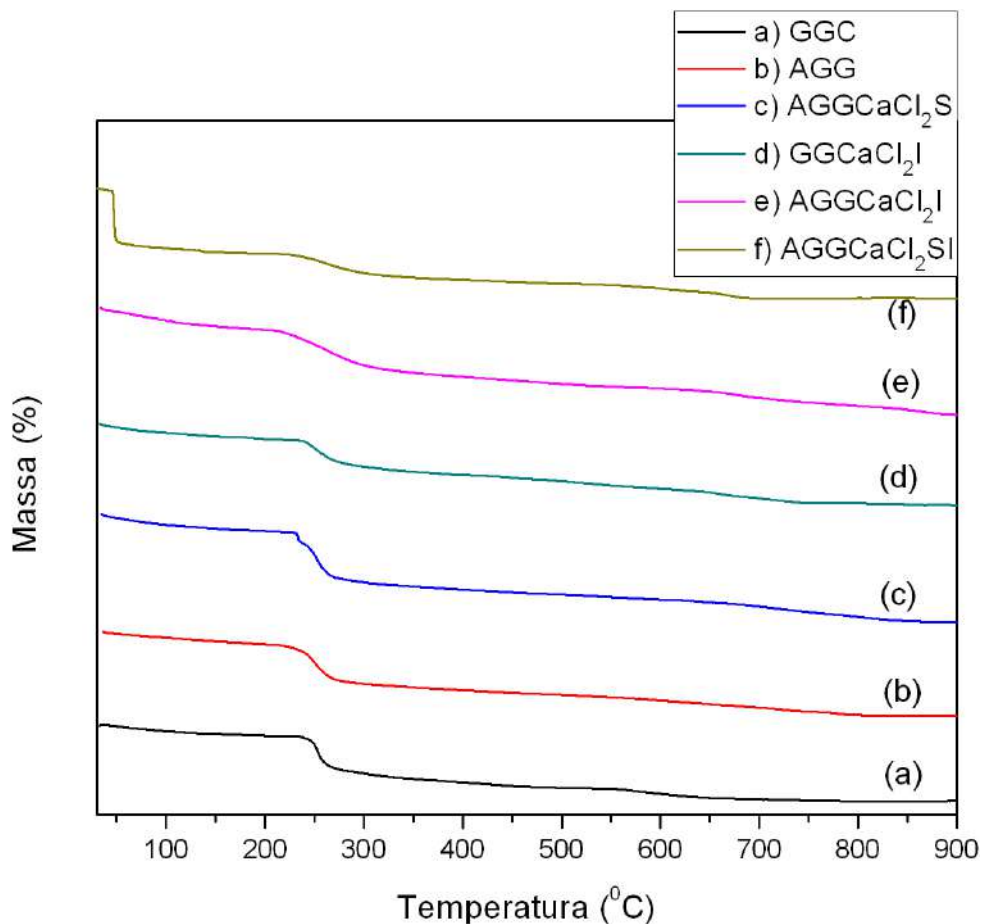


Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na figura 32 é possível observar a curva de TGA para os diferentes filmes contendo AS, GG e CaCl₂. Dois eventos térmicos acontecem, sendo o primeiro relacionado à desidratação e o segundo à decomposição. Os valores dos intervalos de temperatura referentes aos eventos térmicos observados na TGA são comparáveis aos observados na DSC. Os resultados foram semelhantes aos resultados do polímero em pó da GG e diferentes do polímero em pó de AS. Na primeira etapa, o filme GGC apresentou perda de massa percentual de 12%, o filme AGG de 13,5%, o filme AGGCaCl₂S de 15%. Os filmes GGCaCl₂I e AGGCaCl₂I apresentaram resultados semelhantes nesta etapa, sendo 18% em perda de peso para ambos. Já o filme AGGCaCl₂SI apresentou maior perda em peso, 53%. Na segunda etapa, os

filmes AGG e AGGCaCl₂S apresentaram perda de massa percentual semelhante (54,5% e 55%). O filme AGGCaCl₂I apresentou 51,5% em perda de massa estes filmes tiveram menor perda de massa quando comparados ao filme controle. O filme GGCaCl₂I teve a maior perda de massa percentual, 62% e o filme AGGCaCl₂SI teve a menor perda de massa percentual, 28,5% quando comparado aos outros filmes e também ao filme controle.

Figura 32 – Curvas da TGA de AS + GG + CaCl₂ sob atmosfera de N₂ (30 a 900°C).



A tabela 17 apresenta os valores de temperatura e perda de massa associado a cada evento térmico dos filmes de AS, GG e CaCl₂ obtidos através das técnicas de TGA e DSC.

Tabela 17 – Resultado da TGA e DSC para análise do comportamento térmico das amostras dos filmes de AS + GG + CaCl₂.

Evento térmico	TGA		DSC
	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Faixa de temperatura (°C)
Filme GGC			
Desidratação	32,30 - 203	12	61
Decomposição térmica	203 - 467	57	235
Filme AGG			
Desidratação	36,5 - 193	13,5	100
Decomposição térmica	193 - 475	54,5	210
Filme AGGCaCl₂S			
Desidratação	34,65 - 195	15	53
Decomposição térmica	195 - 526	55	232
Filme GGCaCl₂l			
Desidratação	32,24 – 197,5	18	84
Decomposição térmica	197,5 – 645,3	62	221
Filme AGGCaCl₂l			
Desidratação	33 – 185,3	18	58
Decomposição térmica	185,3 – 576,15	51,5	205
Filme AGGCaCl₂SI			
Desidratação	25,94 - 145	53	51
Decomposição térmica	145 - 595	28,5	236

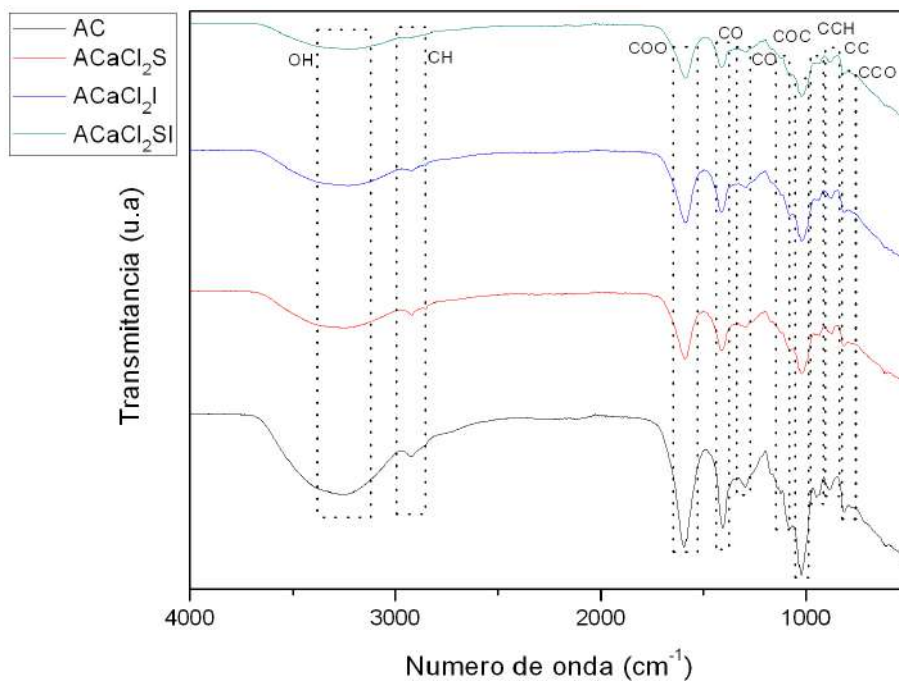
Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2.6 Análise dos grupos químicos dos filmes

O espectro de infravermelho dos filmes de AS e CaCl₂ (figura 33) mostrou ampla banda de absorção entre 3500cm⁻¹ a 3100cm⁻¹ referente ao estiramento do grupo O-H. A medida que a quantidade de CaCl₂ aumenta ocorre o alargamento dessa região, o que pode ser observado principalmente no filme ACaCl₂SI que contém maior proporção de CaCl₂. Entre 2965cm⁻¹ e 2913cm⁻¹ observa-se a banda referente ao estiramento do duplete simétrico e assimétrico do C-H de baixa intensidade nos filmes. Em 1592cm⁻¹ e 1394cm⁻¹ refere-se ao estiramento assimétrico de COO⁻, indicando que o Ca pode ter reagido nesses sítios COO⁻ do alginato para estabelecer ligações entre cadeias, observando diminuição da intensidade nesta região dos filmes que contém CaCl₂. Em 1294cm⁻¹ e 1073cm⁻¹ ao estiramento de C-

O, em 1119cm^{-1} e 843cm^{-1} ao estiramento de C-C, em 1018cm^{-1} ao estiramento de C-O-C, em 965cm^{-1} ao estiramento de C-O e em 912cm^{-1} ao de C-C-H e em 822cm^{-1} referente ao C-C-O. Observa-se nos filmes que, o aumento das proporções de CaCl_2 , ocorre uma diminuição da intensidade nessas regiões. Esses valores são semelhantes aos valores encontrados nos estudos de Nery (2014).

Figura 33 – Espectro FTIR dos filmes de AS e CaCl_2 .

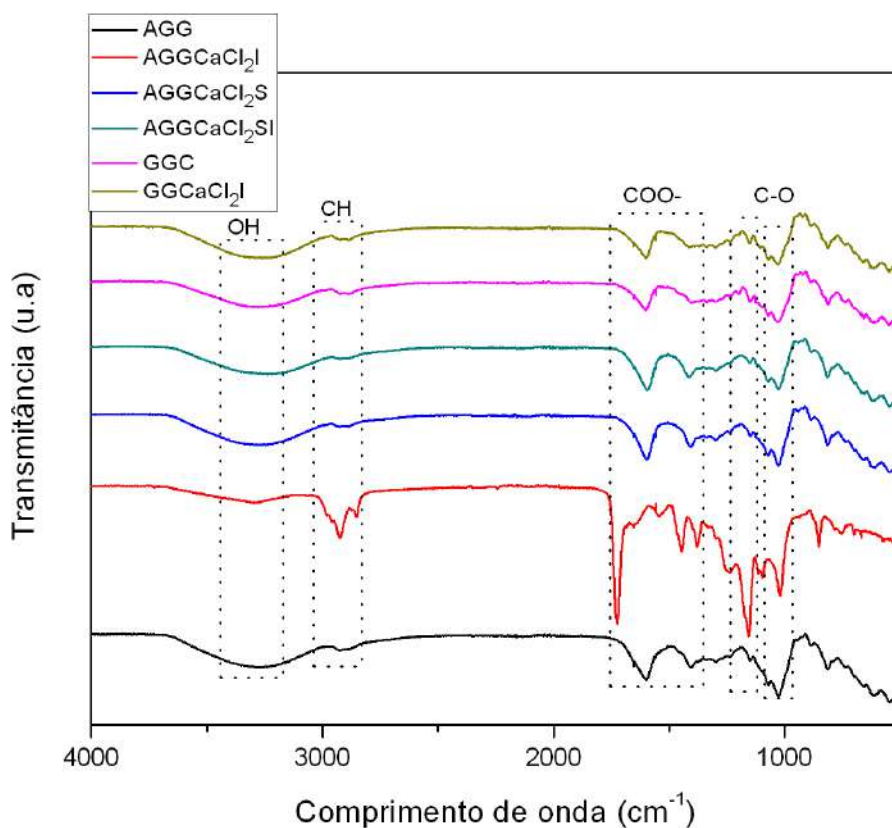


Fonte: Elaborado pela própria autora.

A figura 34 apresenta o espectro de infravermelho dos filmes de AS, GG e CaCl_2 . Observa-se ampla banda de absorção entre 3700cm^{-1} a 3100cm^{-1} referente ao estiramento do grupo O-H, em 2929cm^{-1} a 2895cm^{-1} referente ao estiramento do duplete simétrico e assimétrico do C-H, que teve intensidade maior no filme $\text{AGGCaCl}_2\text{I}$. As faixas de absorção entre 1721cm^{-1} e 1598cm^{-1} , e entre 1446cm^{-1} e 1396cm^{-1} referem-se ao estiramento do grupo COO^- , que teve maior intensidade nos filmes AGG e $\text{AGGCaCl}_2\text{I}$ quando comparados aos outros filmes obtidos. O estiramento do grupo C-O pode ser observado entre 1193cm^{-1} e 1155cm^{-1} e entre 1028cm^{-1} e 1020cm^{-1} . Há semelhança na intensidade e amplitude das bandas de absorção dos filmes que contém proporções de CaCl_2 na solução dos mesmos, demonstrando a importância da presença do CaCl_2 nestes filmes, desempenhando função reticulante na organização estrutural dos polímeros alginato de sódio e GG, o

que não pode ser observado quando comparados às bandas de absorção dos filmes AGG, que não recebeu CaCl_2 e $\text{AGGCaCl}_2\text{I}$, que recebeu CaCl_2 apenas na imersão, sugerindo neste caso, que proporção de CaCl_2 apenas na imersão não foi suficiente para desempenhar a função reticulante entre os polímeros.

Figura 34 – Espectro FTIR dos filmes de GG, AS e CaCl_2 .



Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2.7 Volumetria de complexação

A tabela 18 representa a quantidade de CaCl_2 absorvido pelas amostras que receberam imersão. Observa-se que o filme ACaCl_2SI absorveu maior quantidade de CaCl_2 (4,89%), corroborando com os resultados na análise do aspecto visual descrito no tópico 5.2.1, onde é encontrado um aspecto esbranquiçado na superfície do filme referente ao acúmulo de CaCl_2 na superfície deste filme. O filme ACaCl_2I também absorveu grande quantidade de CaCl_2 (4,23%). O filme GGCaCl_2I absorveu menor quantidade de CaCl_2 (3,09%). Os filme $\text{AGGCaCl}_2\text{SI}$ absorveu menor quantidade de CaCl_2 (3,14%) quando comparado ao filme $\text{AGGCaCl}_2\text{I}$ (4,06%), diferença de 23%. Esse fato pode ser explicado pela presença de CaCl_2 em maiores

proporções no filme AGGCaCl₂SI, demonstrando a interação dos polímeros na presença de CaCl₂, desempenhando função reticulante, promovendo interação polimérica neste estudo. O AS possui uma estrutura mais rígida, fazendo com que o volume interno livre seja maior e portanto, permite maior absorção de CaCl₂ pois possui mais sítios possíveis de ligação com o mesmo. A GG possui cadeias mais flexíveis quando comparada ao AS e apresentou maior cristalinidade, ficando assim com menor número de sítios de ligação com o Ca, absorvendo menor quantidade de CaCl₂.

Tabela 18 – Porcentagem de absorção de CaCl₂ pelos filmes que receberam imersão.

Amostra	% De absorção de CaCl ₂
ACaCl ₂ I	4,23
ACaCl ₂ SI	4,89
GGCaCl ₂ I	3,09
AGGCaCl ₂ I	4,06
AGGCaCl ₂ SI	3,14

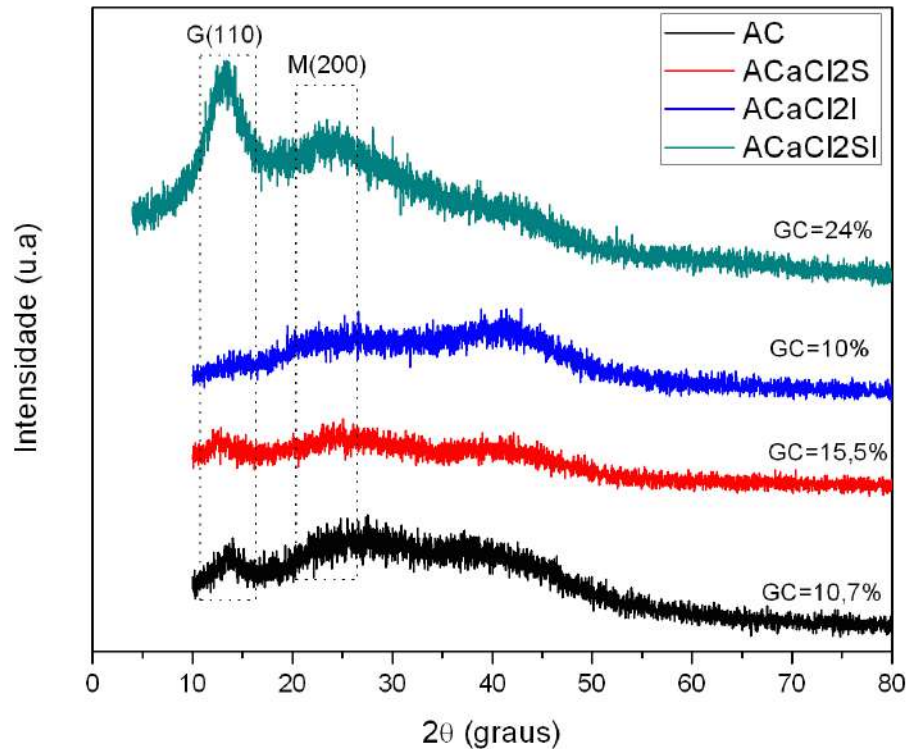
Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2.8 Determinação dos parâmetros de cristalinidade dos filmes

Através do programa Microcal Origin[®] versão 8.0 o grau de cristalinidade dos filmes foi estimado. A figura 35 apresenta o difratograma obtido. O filme AC apresenta grau de cristalinidade de 10,7%, o filme ACaCl₂SI de 24%, o filme ACaCl₂S de 15,5% e o filme de ACaCl₂I de 10%. Na análise do difratograma é possível observar que a área dos picos de alginato de sódio apresentam aumento dos picos quando relacionados ao CaCl₂.

O pico da difração do AS em torno de 13⁰ aumenta nos filmes compostos por alginato de sódio e CaCl₂, tendo grande intensidade em 2θ=13⁰ (d= 0, 657nm) no filme ACaCl₂SI e é praticamente inexistente no filme ACaCl₂I. Isso sugere que há interação entre o AS e o CaCl₂, favorecendo a organização estrutural, aumentando a cristalinidade do AS. Essa intensidade de reflexo de difração muda quando o conteúdo de íons Ca⁺ aumenta. Resultados semelhantes também foram observados nos estudos de Fábria, Slusarezyk, Gawlowski (2005).

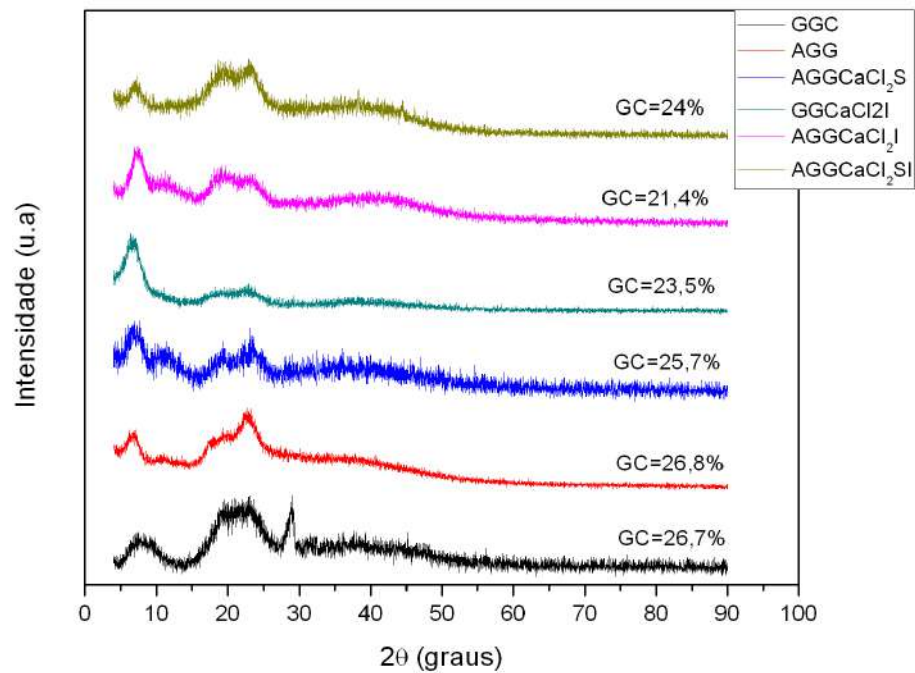
Figura 35 – Difração de raios X dos filmes de AS e CaCl_2 .



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A figura 36 apresenta o difratograma para os filmes de alginato de sódio, GG e CaCl_2 .

O filme GGC apresenta GC de 26,7%, o filme AGG de 26,8%, o filme $\text{AGGCaCl}_2\text{S}$ de 25,7%, o filme GGCaCl_2I de 23,5%, o filme $\text{AGGCaCl}_2\text{I}$ de 21,4% e o filme $\text{AGGCaCl}_2\text{SI}$ de 24%. Na análise do difratograma dos filmes obtidos é possível observar que as áreas dos picos apresentaram diminuição à medida que ocorreram combinação entre os polímeros AS e GG na presença de CaCl_2 , sugerindo que a interação molecular entre eles diminui a organização estrutural, reduzindo a cristalinidade dos mesmos. Estes resultados também foram observados nos estudos de Nery (2014) e Fan et al. (2006).

Figura 36 – DRX dos filmes de AS, GG e CaCl₂.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2.9 Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes

A tenacidade é a habilidade de um material em absorver energia até sua a fratura. Portanto, quanto mais frágil o material, menor é sua tenacidade. O módulo de elasticidade é a resistência do material à deformação elástica. Quanto maior o módulo de elasticidade, mais rígido será o material. A porcentagem de alongamento refere-se à ductilidade, sendo uma medida do grau de deformação plástica até a fratura. A tensão máxima de tração é influenciada pelo grau de cristalinidade e pela tenacidade (CANEVALORO, 2002).

Na tabela 19 estão apresentados os valores obtidos das propriedades mecânicas avaliadas.

Tabela 19 – Tenacidade, Limite de Resistência à Tração, Módulo de Elasticidade, % de alongamento dos filmes e Limite de escoamento dos filmes obtidos.

Amostras	Tenacidade (MJ/m ³)	Limite de resistência à tração (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)	% de alongamento	Limite de escoamento (MPa)
AC	205,7 ± 199,4	43,3 ± 10,7	0,13 ± 0,03	5,7 ± 3,5	32,1 ± 6,5
ACaCl₂S	205,0 ± 149,3	56,7 ± 17,9	0,14 ± 0,02	5,4 ± 2,8	40,1 ± 10,1
ACaCl₂I	32,7 ± 43,2	22,7 ± 24,9	0,08 ± 0,08	2,3 ± 0,8	10,1 ± 3,4
ACaCl₂SI	122,0 ± 70,0	59,5 ± 27,5	0,18 ± 0,05	4,2 ± 2,0	50,0 ± 16,8
GGC	15,0 ± 13,7	12,9 ± 10,7	0,07 ± 0,02	2,1 ± 0,5	18,9 ± 0,8
AGG	266,9 ± 401,5	42,2 ± 30,9	0,08 ± 0,01	6,8 ± 6,6	29,2 ± 9,2
AGGCaCl₂S	200,2 ± 184,4	65,2 ± 39,2	0,14 ± 0,06	5,4 ± 1,3	52,4 ± 5,2
GGCaCl₂I	186,5 ± 84,4	37,6 ± 15,5	0,05 ± 0,01	7,3 ± 2,9	32,7 ± 16,4
AGGCaCl₂I	358,1 ± 240,7	67,5 ± 18,5	0,16 ± 0,0	7,7 ± 3,1	34,0 ± 3,3
AGGCaCl₂SI	382,2 ± 280,9	93,3 ± 35,1	0,21 ± 0,05	6,9 ± 3,	58,7 ± 10,2

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os principais resultados a serem discutidos foram selecionados na tabela 19 e reorganizados na tabela 20. De acordo com os resultados encontrados, os filmes obtidos com as blendas AS/GG, combinados a maiores proporções de CaCl₂, apresentaram valores maiores de limite de resistência à tração quando comparados aos filmes controle de AS e GG puros, sendo que o filme GGC apresentou o menor valor de resistência à tração. Esses resultados podem estar relacionados com a reação do CaCl₂ na superfície dos filmes. Pois, as amostras preparadas com GG submetidas à imersão podem formar estrutura da camada externa com maior densidade de ligações. Esse processo pode resultar em aumento da resistência dos filmes, quando comparado com os filmes preparados com AS, que produziram estrutura menos cristalina para o mesmo processo de imersão. De fato, quanto mais cristalina a estrutura, maior deverá ser a densidade e a rigidez do material.

Tabela 20 – Tenacidade, Limite de Resistência à Tração, Módulo de Elasticidade, % de alongamento dos filmes e Limite de escoamento dos filmes controle e AS+GG com maiores proporções de CaCl₂.

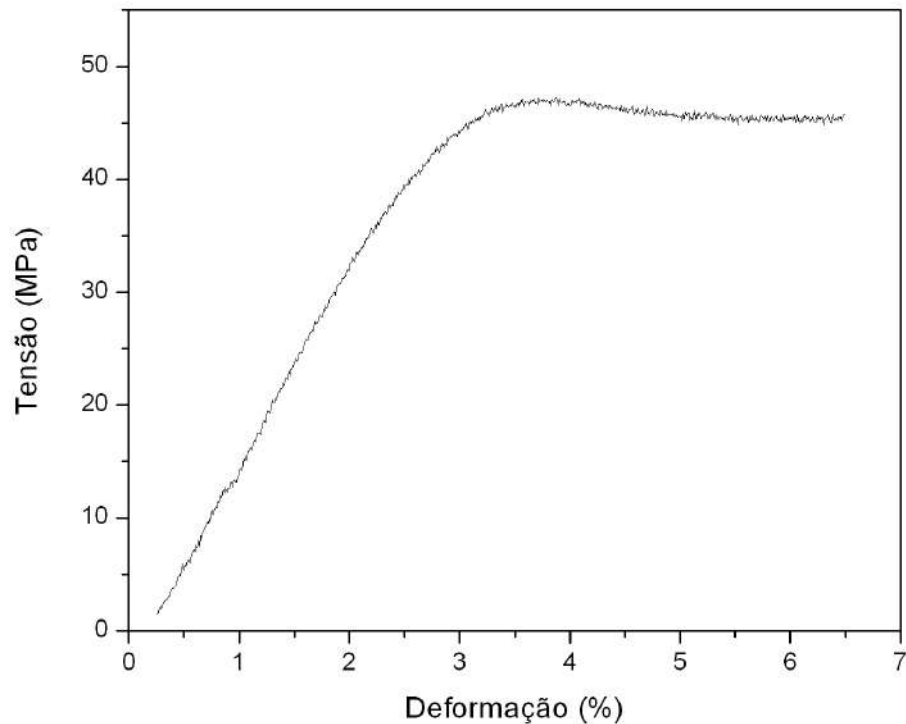
Amostras	Tenacidade (MJ/m ³)	Limite de resistência à tração (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)	% de alongamento	Limite de escoamento (MPa)
AC	205,7 ± 199,4	43,3 ± 10,7	0,13 ± 0,03	5,7 ± 3,5	32,1 ± 6,5
GGC	15,0 ± 13,7	12,9 ± 10,	0,07 ± 0,02	2,1 ± 0,5	18,9 ± 0,8
AGG	266,9 ± 401,5	42,2 ± 3 0,9	0,08 ± 0,01	6,8 ± 6,6	29,2 ± 9,2
AGGCaCl₂S	200,2 ± 184,4	65,2 ± 39,2	0,14 ± 0,06	5,4 ± 1,3	52,4 ± 5,2
AGGCaCl₂I	358,1 ± 240,7	67,5 ± 18,5	0,16 ± 0,0	7,7 ± 3,1	34,0 ± 3,3
AGGCaCl₂SI	382,2 ± 280,9	93,3 ± 35,1	0,21 ± 0,05	6,9 ± 3,7	58,7 ± 10,2

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Nos filmes preparados com as misturas dos dois polímeros, verifica-se que a medida que as proporções de CaCl₂ aumentam a resistência à tração também apresenta incremento. Com relação à tenacidade, os filmes contendo os dois polímeros e as maiores proporções de CaCl₂ (AGGCaCl₂SI) apresentaram maiores valores quando comparados aos demais filmes, sendo que a presença da GG nos filmes influenciou os valores da tenacidade, de forma a levar ao seu incremento. Percebe-se que, a medida que há misturas dos dois polímeros e aumento das proporções de CaCl₂ há aumento nos valores da porcentagem do alongamento, do módulo de elasticidade e do limite de escoamento, indicando que o uso de CaCl₂ nestes polímeros possa atuar como agente de reticulação melhorando as propriedades mecânicas desses materiais. O limite de escoamento seguiu o mesmo padrão de comportamento relacionado às outras propriedades mecânicas. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Coutinho et al. (2010), porém naquele trabalho os autores estudaram GG associada ao Metacrilato, utilizando CaCl₂ como agente de reticulação.

A figura 37 apresenta o gráfico do comportamento mecânico padrão dos filmes obtidos.

Figura 37 – Comportamento mecânico dos filmes obtidos.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2.10 Caracterização biológica dos filmes *in vitro*

Segundo Kamoun et al. (2013) e Liakos et al. (2013), alginato tem sido largamente utilizado em aplicações biomédicas como curativos, scaffolds ou materiais cirúrgicos, e é altamente capaz de aderir-se em uma lesão. Os alginatos ativam macrófagos humanos e geram sinal pró-inflamatório que inicia a cicatrização de feridas (LIAKOS et al., 2013). No presente estudo, os filmes estudados são compostos por AS, GG e CaCl_2 onde estão relacionados na tabela 21.

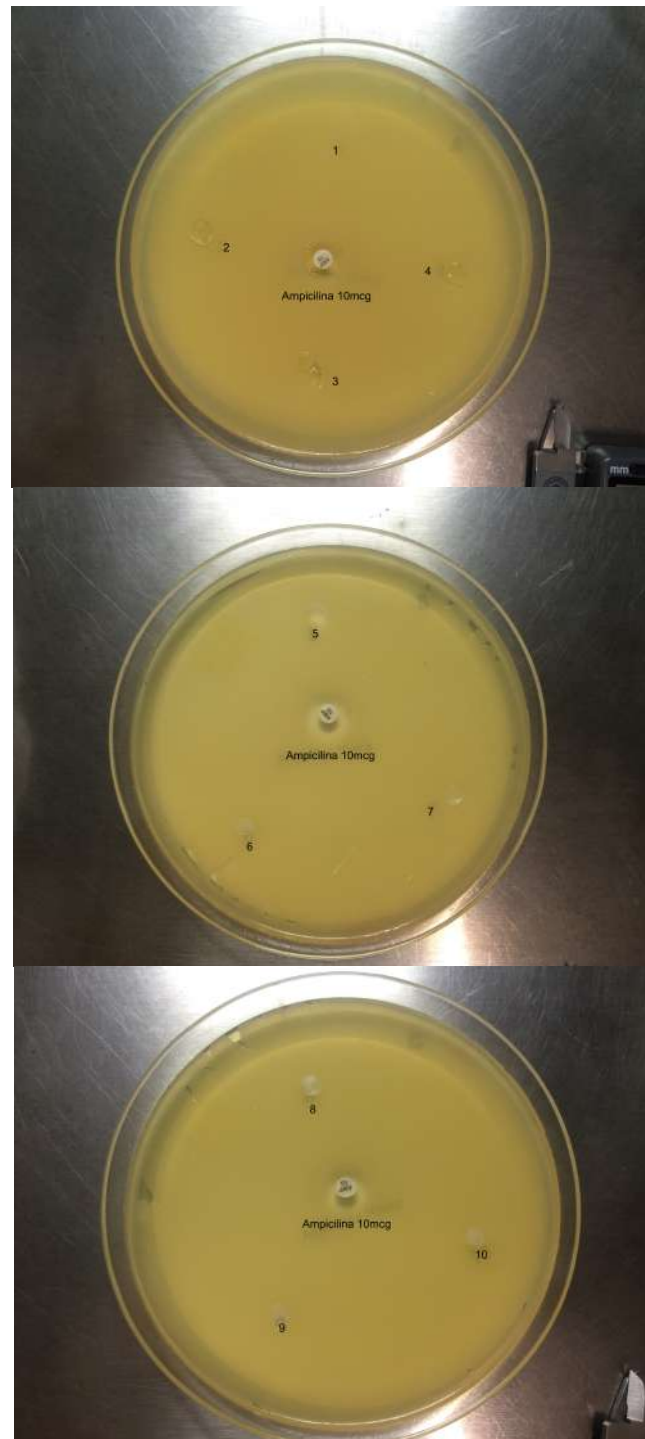
Tabela 21 – Descrição das amostras para o ensaio de Antibiograma.

Amostra	Filme
Amostra 1	AC
Amostra 2	ACaCl ₂ S
Amostra 3	ACaCl ₂ I
Amostra 4	ACaCl ₂ SI
Amostra 5	GGC
Amostra 6	AGG
Amostra 7	AGGCaCl ₂ S
Amostra 8	GGCaCl ₂ I
Amostra 9	AGGCaCl ₂ I
Amostra 10	AGGCaCl ₂ SI

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A figura 38 demonstra o comportamento dos filmes e do disco antibiótico na presença da *Escherichia coli*. Observa-se que as amostras 1, 2, 3 e 4 diluíram ao meio ágar Mueller Hinton e não apresentaram diâmetro de inibição para a bactéria Gram negativa *Escherichia coli*. Já as amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 não apresentaram diâmetro de inibição, mas não diluíram ao meio ágar Mueller Hinton. Porém o antibiótico Ampicilina 10mcg formou halo de inibição com diâmetro de $12,61 \pm 0,96$ mm em todas as placas contendo micro-organismo *Escherichia coli*, onde pode dizer que, de acordo com a tabela 10, este micro-organismo teve sensibilidade intermediária ao antibiótico Ampicilina. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Rodrigues et al. (2008), que estudaram filmes compostos por alginato de sódio e quitosana, onde os mesmos não apresentaram diâmetro de inibição. Esse resultado sugere que o comportamento dos materiais estudados frente ao microrganismo não apresentou reações ao mesmo.

Figura 38 – Atividade antimicrobiana dos diferentes filmes obtidos para a bactéria *Escherichia coli*.

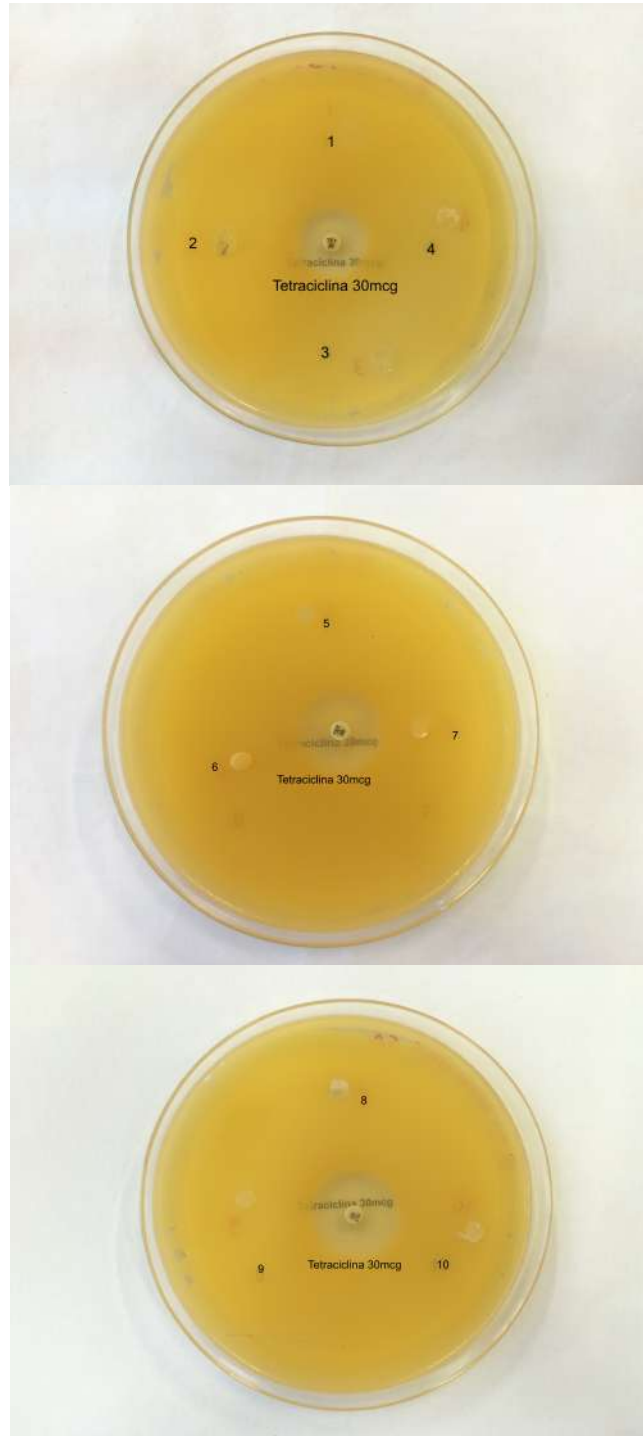


1) Filme AC; 2) Filme ACaCl₂S; 3) Filme ACaCl₂I; 4) Filme ACaCl₂SI. 5) Filme GGC; 6) Filme AGG; 7) Filme AGGCaCl₂S; 8) Filme GGCaCl₂I; 9) AGGCaCl₂I; 10) AGGCaCl₂SI.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na figura 39 estão representadas amostras na presença da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Figura 39 – Atividade antimicrobiana dos diferentes filmes obtidos para a bactéria *Staphylococcus aureus*.



1) Filme AC; 2) Filme A CaCl_2S ; 3) Filme A CaCl_2I ; 4) Filme A CaCl_2SI . 5) Filme GGC; 6) Filme AGG; 7) Filme AGG CaCl_2S ; 8) Filme GG CaCl_2I ; 9) AGG CaCl_2I ; 10) AGG CaCl_2SI .

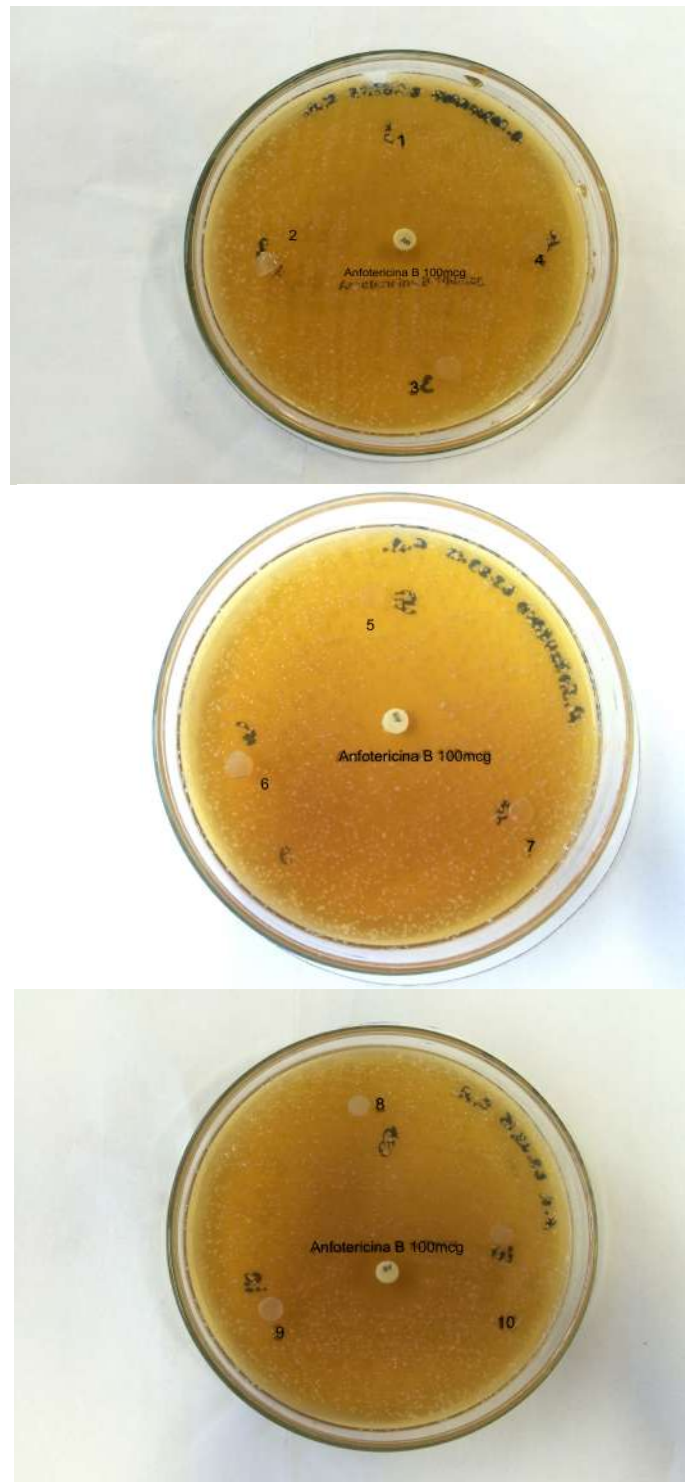
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Observa-se que a amostra 1 diluiu ao meio ágar Mueller Hinton e as amostras 2, 3 e 4 intumesceram. Ambas amostras não apresentaram diâmetro de inibição para esta bactéria. Já as amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mantiveram seu formato discoide, porém não apresentaram halo de inibição. O disco antibiótico Tetraciclina 30mcg formou um halo de inibição com diâmetro de $27,52 \pm 2,85\text{mm}$ em todas as placas contendo micro-organismo *Staphylococcus aureus*. Pode-se dizer que este micro-organismo foi sensível ao antibiótico Tetraciclina de acordo com a tabela 10. Resultados diferentes foram encontrados no estudo de Nery (2014), onde o filme de alginato de sódio puro, na presença da bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou diâmetro de inibição $12,62 \pm 1,34$.

As amostras deste estudo foram submetidas também à análise na presença do fungo *Candida albicans* (figura 40). Este fungo apresenta semelhança com as células do ser humano por se tratarem de células eucariotas. Os filmes estudados com o fungo *Candida albicans* apresentaram resultados semelhantes aos da bactéria *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Não apresentaram halo de inibição, sendo este resultado de vital importância neste estudo, pois pode-se sugerir que os polímeros estudados não são agressivos às células. O disco antibiótico Anfotericina B 100mcg formou halo de inibição com diâmetro de $20,19 \pm 1,44\text{mm}$ em todas as placas contendo micro-organismo *Candida albicans*.

Os mesmos métodos utilizados para a avaliação de bactérias têm sido aplicados para a avaliação de fungos. Porém, a padronização desses métodos está sendo muito mais difícil devido a grande dificuldade encontrada na realização de estudos clínicos. A resposta clínica parece, em alguns casos, estar mais relacionada ao grau de imunidade do paciente do que a sensibilidade “*in vitro*” do microrganismo. Isto dificulta muito a definição dos valores limites para classificação da amostra em sensível, intermediária ou resistente (CARVALHO, 2015).

Figura 40 – Atividade antimicrobiana dos diferentes filmes obtidos para a bactéria *Candida albicans*.



1) Filme AC; 2) Filme ACaCl₂S; 3) Filme ACaCl₂; 4) Filme ACaCl₂SI. 5) Filme GGC; 6) Filme AGG; 7) Filme AGGCaCl₂S; 8) Filme GGCaCl₂; 9) AGGCaCl₂; 10) AGGCaCl₂SI.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Através da tabela 22 e da figura 41 pode-se verificar os diâmetros dos halos de inibição dos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Anfotericina B. Percebe-se que o

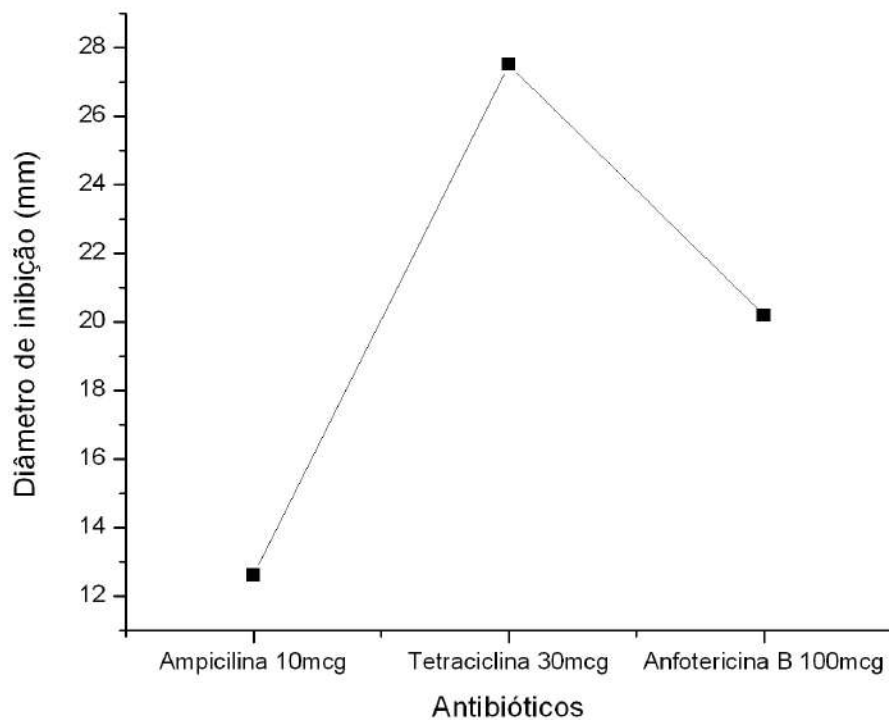
disco antibiótico Tetraciclina apresentou maior diâmetro de inibição ($27,52 \pm 2,85$), seguindo pelo disco antibiótico Anfotericina B ($20,19 \pm 1,44$) e posteriormente pelo disco antibiótico Ampicilina ($12,61 \pm 0,96$).

Tabela 22 – Diâmetro de inibição obtidos através dos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Anfotericina B.

Antibiótico	Diâmetro de inibição (mm)
Ampicilina 10mcg	$12,61 \pm 0,96$
Tetraciclina 30mcg	$27,52 \pm 2,85$
Anfotericina B 100mcg	$20,19 \pm 1,44$

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 41 – Gráfico do diâmetro do halo de inibição dos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Anfotericina B.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Esses resultados são úteis para auxiliar na análise de características de toxicidade e viabilidade inicial do uso dos materiais em questão em sistemas biológicos, evitando inclusive o sacrifício indevido de animais.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos filmes de alginato de sódio (AS), goma gelana (GG) e cloreto de cálcio (CaCl_2), onde os filmes receberam diferentes proporções de CaCl_2 . A caracterização da matéria-prima comprovou a composição química dos materiais auxiliando nas análises e comparações com os diferentes filmes obtidos.

A caracterização física, química, mecânica e biológica dos filmes foram realizadas visando a utilização destes como biomaterial para aplicação na regeneração dos discos intervertebrais.

A caracterização visual evidenciou que a presença de CaCl_2 aumenta a rugosidade na superfície dos filmes. Os filmes de AS e GG produzidos com CaCl_2 foram em sua maioria homogêneos, transparentes e visualmente atrativos. O uso do CaCl_2 como agente compatibilizante foi necessário para se conseguir adequado manuseio dos filmes. Estes filmes obtidos foram flexíveis, completamente solúveis em água e apresentaram superficialmente textura rugosa.

A espessura média dos filmes variou de 63 a 166 μm , porém somente os filmes AC, AGGCaCl₂S, GGCaCl₂I, AGGCaCl₂SI estão dentro dos valores sugeridos como ideais para potencial aplicação no tratamento de lesões. Além disso, diferentes proporções de CaCl_2 podem interferir na espessura dos filmes.

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que a presença de CaCl_2 tanto na solução quanto na imersão dos filmes apresenta superfície menos rugosa, demonstrando que o CaCl_2 promove maior estabilidade à estrutura obtida, desempenhando função compatibilizante e reticulante entre o AS e a GG.

Através do grau de intumescimento constatou-se que os filmes sem a GG em sua composição apresentam maior grau de intumescimento e que os filmes contendo GG não perderam sua estrutura ao tempo de 24h de intumescimento, podendo dizer que neste estudo, a GG contribuiu para gerar capacidade máxima de intumescimento até 24h auxiliando na estrutura desses filmes para que os mesmos não se degradassem.

O comportamento térmico evidenciou que diferentes proporções de CaCl_2 alteram a temperatura de desidratação e degradação térmica dos filmes.

A técnica de espectroscopia de infravermelho evidenciou provável interação entre o AS e GG na presença de CaCl_2 , pois ocorrem mudanças no espectro dos diferentes filmes obtidos.

Em relação ao GC, a medida que a quantidade de proporções de CaCl_2 aumenta, o GC aumenta para filmes contendo alginato de sódio e promove a interação entre os polímeros.

Os filmes obtidos com as blendas AS/ GG, combinados a maiores proporções de CaCl_2 , apresentaram valores maiores de limite de resistência à tração.

Nos filmes preparados com as misturas dos dois polímeros, verifica-se que a medida que as proporções de CaCl_2 aumentam a resistência à tração também apresenta incremento.

A presença da GG nos filmes influenciou os valores da tenacidade, de forma a levar ao seu incremento. A medida que há misturas dos dois polímeros e aumento das proporções de CaCl_2 há aumento nos valores da porcentagem do alongamento, do módulo de elasticidade e do limite de escoamento, indicando que o uso de CaCl_2 nestes polímeros possa atuar como agente de reticulação melhorando as propriedades mecânicas desses materiais.

Através da atividade antimicrobiana os filmes obtidos não apresentaram diâmetros de inibição, sendo este resultado de grande importância para este estudo, demonstrando que os polímeros AS e GG não apresentam reações de caráter tóxico frente ao microrganismo, inclusive ao semelhante à célula humana.

Os resultados mostraram que os diferentes filmes obtidos, quando submetidos aos ensaios de caracterização apresentaram diferenças moduláveis nas propriedades físicas, químicas, mecânicas, morfológicas e biológicas, evidenciando que diferentes proporções de CaCl_2 são capazes de modular essas propriedades.

De acordo com os objetivos propostos para o presente estudo, os filmes contendo AS, GG e CaCl_2 apresentam características que os habilitam a estudos adicionais visando sua utilização como biomaterial para auxiliar na regeneração de lesões nos discos intervertebrais.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir para estudos mais profundos desses materiais como biomateriais destinados ao tratamento de lesões no disco intervertebral.

Sugestões para trabalhos futuros podem basear-se no aprimoramento das características do hidrogel:

- fazer hidrogéis com volume comparado aos discos intervertebrais;
- construir *scaffolds* com estes materiais e verificar o comportamento dos mesmos;
- avaliação da utilização destes filmes para a liberação controlada de fármacos;
- tratamento térmico destes hidrogéis;
- avaliação do comportamento quanto à adesão e proliferação celular *in vitro* e avaliação da interação material/hospedeiro *in vivo* para verificar o comportamento desses materiais mais próximo ao real.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO-GONZÁLES, J. S. et al. Optical, microstructural, functional and nanomechanical properties of aloe vera gel/gellan gum edible films. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 11, n. 2, p. 193-210, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v11n2/v11n2a1.pdf>>. Acesso em 6 May. 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) por CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **M2-A8**: Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão – Norma aprovada, 8ª edição. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>, acesso em: 8 mar. 2015.

AS GRANDES GOMAS: uma revisão. Artigo 1. **Net**, Revista Aditivos e Ingredientes n. 79, p. 25-38, 2011. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/297.pdf>. Acesso em 11 fev. 2013.

ABREU, F. O. M. S. et al. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling of alginate-chitosan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, Brazil, n. 74, p. 283-289, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861708001045>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

BAHR JÚNIOR, R. **Estudo do processo de fabricação de pastas tixotrópicas por estímulo à nucleação e sua aplicação para a produção de compósitos de baixa densidade**. 2012. 144f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

BARBIR, A. et al. Effects of enzymatic digestion on compressive properties of rat intervertebral discs. **Journal of Biomechanics**, Burlington, n. 43, p. 1067-1073, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20116063>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

BEJARANO, L. et al. Síntesis y estudio de hidrogeles obtenidos a partir de acrilamida, poli(ácido acrílico) y ácido maleico como potenciales remediadores de contaminantes metálicos en aguas residuales. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 207-312, 2008. Disponível em: <<http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/SPECIAL08/bejarano.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

BEKIN, S. et al. Synthesis, characterization and bending behavior of electroresponsive sodium alginate/poly (acrylic acid) interpenetrating network films under an electric field stimulus. **Sensors and Actuators B**, v. 202, p. 878-892, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400514007400>>. Acesso em: 16 Apr. 2015.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triplehelix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, Oxford, v. 25, n. 25, p. 5675-

5680, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

BRON, J. L. et al. Engineering alginate for intervertebral disc repair. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, n. 4, p. 1196-1205, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783128>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

CALLISTER JÚNIOR, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos LTDA, 2012, 817p.

CANEVALORO, S. V. **Ciências dos Polímeros**. 1. ed., São Paulo: Editora Liber, 2002.

CANILHA, L. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 20, p. 32-41, jan. 2006. Disponível em: <http://revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/20/art04.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2013.

CARVALHO, L. C. F. Microbiologia. **Net**, [Maranhão], abr. 2015. Disponível em: <<http://microbiologia.comunidades.net/index.php>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, Singapore, v. 242, p. 259-262, Aug. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176259>>. Acesso em: 23 ago. 2013.

CHEUNG, K. M. C.; AL GHAZI, S. Current understanding of low back pain and intervertebral disc degeneration: epidemiological perspectives and phenotypes for genetic studies. **Current Orthopedic**, Hong Kong, n. 22, p. 237-244, 2008. Disponível em: <[http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ycuor/article/S0268-0890\(08\)00083-2/abstract](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ycuor/article/S0268-0890(08)00083-2/abstract)>. Acesso em: 6 maio 2013.

COSTA JÚNIOR, E. S. C. **Desenvolvimento de matriz de quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. 151f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica) - Faculdade de Engenharia Metalúrgica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

COSTA JÚNIOR, E. S. C.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, set. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000600034&script=sci_arttext>. Acesso em: 17 mar. 2014.

COTTA, A. J. B. **Titulometria de complexação** – determinação da dureza total de água. Espírito Santo: Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), Ed. da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 2013, 1p.

COUTINHO, D. F. et al. Modified gellan gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties. **Biomaterials**, Portugal, v. 31, p. 7494-7502, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933815/>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

CURATEC. Curatec hidrogel com Alginato. **Net**. Disponível em: <<http://curatec.com.br/loja/hidrogeis/hidrogel-com-alginato/hidrogel-com-alginato-25-g.html>>. Acesso em 11 fev.2013.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An introduction to tissue-biomaterial interactions**. New Jersey: Willey-Liss, 2002, 228p.

DIAMOND, S., BORENSTEIN, D. Chronic low back pain in a working-age adult. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, Washington, v. 20, p. 707-720, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979534>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

ERTESVAG, H; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, Norway, v. 59, p. 85-91, Jan. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001791>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

FABIA, J.; SLUSAREZYK, C.; GAWLOWSKI, A. Supermolecular structure of alginate fibres for medical applications studied by means of waxes and saxs methods. **Fibres e Textiles in Eastern Europe**, v. 13, n. 5, p. 114-117, Jan./Dec. 2005. Disponível em: http://fibtex.lodz.pl/53_28_114.pdf. Acesso em: 29 de julho 2014.

FAGUNDES, I. Patologia dos tecidos: ósseo, sanguíneo e cartilaginoso. **Net**, Vitória da Conquista, Bahia, out. 2012. Disponível em: <<http://patologiasdostecidos.blogspot.com.br/2012/10/hernia-de-disco.html>>. Acesso em: 24 ago. 2013.

FAN, L. et al. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, Wuhan, v. 65, p. 447- 452, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861706000580>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

FERNANDES, D. M. S. **Volúmetria de complexação**: determinação de dureza de água. Ceará: Ed. do IFCE, 2014, 14p.

FIGUEIRA, F. C.; HOTZA, D.; BERNARDIN, A. M. Obtenção de granilhas por gelificação de suspensões cerâmicas. **Cerâmica**, p. 457-464, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ce/v60n356/v60n356a02.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

FINOTELLI, P. V. et al. Ca alginate as scaffold for iron oxide nanoparticles synthesis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 759-764,

2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66322008000400013&script=sci_abstract>. Acesso em: 24 jun. 2013.

GASEROD, O. et al. The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, Norwegian, v. 175, n. 2, p. 237-246, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517398002774> >. Acesso em: 14 Apr. 2015.

GELLAN GUM: handling/processing. **Technical evaluation report compiled by ICF Consulting for the USDA National Organic Program**, 10 Feb. 2006, 6p. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5057602>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

GEORGE, M.; ABRAHAM T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, Trivandrum, v. 114, p. 1–14, May 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828914>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

GIRATA, A. K. **Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

GONÇALVES, M. C. Microscopia eletrônica de varredura. In: CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 165-175.

GRANER, C. A. F.; TAMBURINI JUNIOR, R. **Roteiros de aulas práticas: disciplina de química analítica quantitativa**. Belo Horizonte: Ed. da UFMG, 2013, 41p.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Seattle, v. 54, p. 3-12, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X01002393> >. Acesso em: 16 mar. 2014.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, São Paulo, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980. Disponível em: <http://www.abratec.com.br/download/nomenclatura_anal_termica.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2014.

KAMOUN, E. A. et al. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: characterization and bio-evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, Egypt, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213004310>>. Acesso em: 29 oct. 2014.

LABORCLIN. **Manual para antibiograma: Difusão em disco (Kirby e Bauer)**. [S. L.], 2011, v.5, n.4, 29p.

LANGER, R; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, Cambridge, v. 260, p. 920-926, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493529>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

LEONE, G. et al. Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement. **Journal Biomedical Materials Research**, part A, Siena, n. 84, p. 391-401, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618483>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

LI, Z. et al. On-site alginate gelation for enhanced cell proliferation and uniform distribution in porous scaffolds. **Journal Biomedical Materials Research**, part A, Washington, n. 86, p. 552-559, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18186056>>. Acesso em: 06 maio 2013.

LIAKOS, I. et al. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulates in sodium alginate with antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, Italy, v. 463, p. 137-145, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211443>>. Acesso em: 29 oct. 2014.

LIMA, G. F. Aditivos alimentares: definições, tecnologias e reações adversas. **Veredas Favip**, Pernambuco, v. 4, n. 2, p. 101-107, jul. 2011. Disponível em: <<http://veredas.favip.edu.br/ojs/index.php/veredas1/article/view/24>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

LORENZO, G.; ZARITZKY, N.; CALIFANO, A. Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. **Food Hydrocolloids**, Argentina, v. 30, p. 672-680, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X12001865>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

MACHADO, A. M. O.; GALES, A. C. Interpretação de dados microbiológicos. In: Uso racional de antimicrobianos e resistência microbiana – ATM racional, 2008. Disponível em: < Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/control/rede_rm/cursos/atm_racional/inicio.htm>. Acesso em: 8 mar. 2015.

MACHADO, L. D. B., MATOS, J. R. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 229-261.

MANCINI, M.; MORESI, M.; RANCINI, R. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. **Journal of Food Engineering**. Italy, v. 39, p. 369-378, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877499000229#>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

MANDAL, B.; RAY, S. K. Synthesis of interpenetrating network hydrogel from poly (acrylic acid-co-hydroxyethyl methacrylate) and sodium alginate: modeling and kinetics study for removal of synthetic dyes from water. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 257-269, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23987343>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B. Análise térmica - termogravimetria. In: CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 209-228.

MENEGUSSI, L. R. et al. Behaviour of Pseudoisocyanine in Macromolecular and Hydrotropic Solutions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 8, p. 1455-1461, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532014000800017&script=sci_arttext>. Acesso em: 26 fev. 2015.

MOHAMED, R. R.; SABAA, M. W. Synthesis and characterization of antimicrobial crosslinked carboxymethyl chitosan nanoparticles loaded with silver. **International Journal of Biological Macromolecules**. Egypt, v. 69, p. 95-99, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014003213>>. Acesso em: 08 mar. 2015.

MUNDARGI, R. C. et al. Novel thermo-responsive semi-interpenetrating network microspheres of gellan gum-poly (n-isopropylacrylamide) for controlled release of atenolol. **Journal of Applied Polymer Science**, India, v. 116, p. 1832-1841, Jan. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.31551/abstract>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

NERURKAR, N. L.; ELLIOTT, D. M.; MAUCK, R. L. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. **Journal of Biomechanics**, v. 43, p. 1017-1030, 2010. Disponível em: <[http://www.jbiomech.com/article/S0021-9290\(09\)00687-3/abstract](http://www.jbiomech.com/article/S0021-9290(09)00687-3/abstract)>. Acesso em: 30 Apr. 2015.

NERY, J. C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. 2014, 81p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, CEFET-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

NETTER, Frank H. **Atlas de anatomia humana**. Porto Alegre: Artmed, 1998, 514p.

NUNAMAKER, E.A.; PURCELL, E.K.; KIPKE, D.R. *In vivo* stability and biocompatibility of implanted calcium alginate disks. **Journal Biomedic Materials Research**, part A, Michigan, n. 83, p. 1128-1137, 2007. Disponível em: <http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/57402/31275_ft.pdf?sequence=1>. Acesso em: 24 jun. 2013.

OREFICE, R. L. et al. *In vitro* bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive glass phase. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.11, n.11, p.78-85, 2000. Disponível em: <http://www.jbcs.sbq.org.br/imagebank/pdf/v11n1a14.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2015.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials: an introduction**. 3. ed. New York: Springer, 2010, 561p.

PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**. Trivandrum, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

Disponível em: <<http://medind.nic.in/taa/t04/i1/taat04i1p18.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

PAVLATH, A. E. et al. Ionomeric films of alginic acid. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 1, p. 61-63, 1999. Disponível em: <<http://naldc.nal.usda.gov/download/14861/PDF>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

PEREIRA, R. D. et al. Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration. **Tissue Engineering: Part C**. Portugal, v. 17, n. 10, p. 961-972, 2011. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/14233/1/Pereira%2520et%2520al%25202011_Tissue%2520Eng%2520C.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2015.

PEREIRA, R. D. et al. Gellan gum-based hydrogel bilayered scaffolds for osteochondral tissue engineering. **Key Engineering Materials**. Switzerland, v.587, p. 255-260, 2014. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/28184/1/17837-KEM.587.255.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2015.

PETITE, H. Tissue-engineered bone regeneration. **Nature Biotechnology**. New York, v. 18, n. 9, p. 959-963, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973216>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, India, v. 93, p. 670-678, Jan. 2013. Disponível em: <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/an-insight-into-the-emerging-exopolysaccharide-gellan-gum-as-a-novel-HJkaleb950>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

PRANDEL, Luis. Raios X. In: **Fisicattus**, 2006. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/fisicattus/raiox.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

RAJSHARAD, C.; KAMBLE, S. **Aqueous film coating composition containing sodium alginate and preparation thereof**. n. PCT/IN2006/000034, 29 nov. 2005, 31 jan. 2006, 7 jun. 2007.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science**. 2. ed. USA: Califórnia, 2004. 867p.

REITMAIER, S. et al. Hydrogels for nucleous replacement-facing the biomechanical challenge. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Germany, n. 14, p. 67-77, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963748>>. Acesso em: 06 maio 2013.

RAYMOND, C. R.; PAUL, J. S.; MARIAN, E. Q. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. Ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009, 917p.

RODRIGUES, A. P. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões**. 2008. 152f. Teses (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

SACCHETIN, P. S. C. **Incorporação de *Flavobacterium columnare* inativado em micropartículas de alginato e quitosana para a imunização de tilápia no nilo (*Oreochromis niloticus*) por via oral**. 2009. 138f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

SANCHES, F. Cirurgia minimamente invasiva da coluna vertebral. **Net**, Disponível em: <<http://www.colunars.com.br/textos.asp?frameview=1&link=7&id=5>>. Acesso em 12 fev. 2013.

SANKALIA, M. G. et al. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 215-232. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641106001639>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SEGATO, M. P. **Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio**. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química analítica) – Instituto de química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SHALABY, S. W.; BURG, K. J. L. **Absorbable and biodegradable polymers**. USA: Florida, 2004. 289p.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Terapêuticas**. São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007. Disponível em: <<http://http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n3/a04v43n3.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2014.

SILVA, R. V. P.; MOTA, L. O.; MORAES, R. S. **Volumetria de complexação: dosagem de cálcio e magnésio com EDTA**. Bahia: Ed. da UFBA, 2010, 6p.

SILVA, M. J. S. F.; TÓFANI, S. F. B.; CARDEAL, Z. L. **Análise quantitativa prática**. Belo Horizonte: Ed. da UFMG, 2013, 80p.

SILVA-CORREIA, J. et al. Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Guimarães, n. 5, p. 97-107, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21604382>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

SILVA-CORREIA, J. et al. Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: in vitro and in vivo study. **Adv. Healthcare**

Mater, Guimarães, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184642>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extrato de plantas: comparação entre duas técnicas de difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Maranhão, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/pag_124a128_metodologia_atividades_239.pdf>. Acesso em: 20 maio 2014.

SILVESTRE, C.L et al. Morfologia dos discos intervertebrais e abordagem clínica das discopatias: uma revisão bibliográfica. **Net**, Pernambuco: Universidade Salgado de Oliveira, 2005. Disponível em: <www.fisioweb.com.br>. Acesso em: 25 fev. 2013.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002, 836p.

SOARES, J. P. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclética Química**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 57-63, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-46702004000200009&script=sci_arttext>. Acesso em: 07 maio 2014.

STEVENS, M. P. **Polymer chemistry: an introduction**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2009, 551p.

SUNDARRAJAN, P. et al. One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, [S.l.], v. 33, n. 10, p. 3218-3224, 2012. Disponível em: <http://www.google.com.br/search?q=desacetilação&rlz=1C5CHFA_enBR522BR522&oq=desacetilação&aqs=chrome..69i57j0l5.10391j0j8&sourceid=chrome&espv=210&es_sm=91&ie=UTF8#q=One+Pot+Synthesis+and+Characterization+of+Alginate+Stabilized+Semiconductor+Nanoparticles>. Acesso em: 30 mar. 2014.

TAGLIARI, M. P. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando liberação tópica**. 2012. 229f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

THAKAM, F. G.; MUTHU, J. Alginate based hybrid copolymer hydrogels—Influence of pore morphology on cell–material interaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 235-244, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486171400561X>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

THU, H.; NG, S. Gelatine enhances drug dispersion in alginate bilayer film via the formation of crystalline microaggregates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 99-106, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856162>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Polímeros**, v.

21, n. 3, p. 1-12, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282011005000034&script=sci_arttext>. Acesso em: 26 fev. 2015.

URBAN, J.P.G.; ROBERTS, S. Degeneration of the intervertebral disc. **Arthritis Res. Ther.**, [S.l.], n. 5, p. 120-130, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165040/>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Belo Horizonte, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282010000100012>. Acesso em: 24 jun. 2013.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterias. **Biomaterials**, EUA, n. 30, p. 5897-5909, Aug. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651435>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

YANG, J-S.; XIE, Y-J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: a review. **Carbohydrate Polymers**. China, v. 84, p. 33-39, Nov. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486171000946X>>. Acesso em: 19 maio. 2014.

ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 462-467, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405005169>>. Acesso em: 26 Jan. 2015.

ZAHEDI, P. et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. **Polymers Advanced Technologies**, [S.l.], v. 21, p. 77-95, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pat.1625/abstract>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

ZAM, W. et al. Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: effects of formulation parameters on loading efficiency. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 741-748, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v50n4/1984-8250-bjps-50-04-00741.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2013.