



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

MARIA JOSELI MELO DE JESUS

**Desenvolvimento, caracterização e atividade antimicrobiana
de membranas bioativas de gelatina contendo ácido úsnico e
nanopartículas de prata**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à banca examinadora no
departamento de farmácia da
Universidade Federal de Sergipe.

Aluna: Maria Joseli Melo de Jesus
Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de
Souza Araújo.

São Cristóvão/SE
2017

Desenvolvimento, caracterização e atividade antimicrobiana de membranas bioativas de gelatina contendo ácido úsnico e nanopartículas de prata

Luciana Garcez Barretto Teixeira, Maria Joseli Melo de Jesus, Anny Kelly Tavares Jesus, Paula Santos Nunes, Juliana Cordeiro Cardoso², Sílvia Maria Egues Dariva², Juliana Faccin De Conto², José Joatan Rodrigues Júnior³, Charlene Regina Santos Matos, Malone Santos Pinheiro, Mairim Russo Serafini¹, Adriano Araújo de Souza Araújo¹

¹Núcleo de Pós-graduação em Medicina – Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

²Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes-ITP/UNIT, Av. Murilo Dantas, 300, CEP 49032-490, Sergipe-Brasil.

³Departamento de Física - Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar membranas de gelatina contendo ácido úsnico (UA) e nanopartículas de prata (AgNPs). Suspensões coloidais contendo AgNPs em diferentes tamanhos e concentrações foram utilizadas para a confecção das membranas testes. A membrana contendo apenas UA foi considerada como controle. A caracterização foi realizada por meio de potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), estudo eletroquímico, análise termogravimétrica (TG/DTG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria de absorção na região do

infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), capacidade de intumescimento, ensaio mecânico, microscopia de força atômica (AFM) e ICP-OES para determinar a concentração de prata nas amostras. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente aos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O tamanho das partículas da solução de gelatina contendo UA indicou partículas um tamanho médio em torno de 203 nm e potencial zeta -17,9 mV. As medidas eletroquímicas mostraram picos de oxidação em 0,7 V e 0,15 V, referente ao AU e AgNPs, respectivamente. Os resultados de análise térmica demonstraram eventos endotérmicos em torno de 225°C e decomposição a partir de 250°C. Os espectros de FTIR foram semelhantes e demonstraram que, de maneira geral, a incorporação de prata não afetou a estabilidade química do ácido úsnico. As imagens obtidas por MEV sugerem constituição uniforme. As membranas mantiveram intumescimento ascendente, ocorrendo ganho de massa gradativo e controlado em relação à massa inicial. As amostras incorporadas com AgNPs apresentaram aumento na espessura e diminuição no alongamento, quando comparadas a membrana controle. A topografia das membranas vista por AFM evidenciaram a porosidade e rugosidade das amostras. O potencial bactericida avaliado destacou que a membrana UA-AgNPC5 foi capaz de inibir 100% de colônias bacterianas estudadas.

Palavras-chaves: Queimaduras, membranas biológicas, ácido úsnico, nanopartículas de prata, antimicrobiano.

*Autor Correspondente

Departamento de Fisiologia – Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, 49000-100, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. E-mail: adriasa2001@yahoo.com.br, Tel./ Fax: 55-11-21056640.

1 Introdução

A queimadura é um tipo de lesão traumática grave que pode levar a deformidades, invalidez e até a morte. Por isso, é de grande interesse a busca por novos compostos que possam ser usados como agentes cicatrizantes e que atuem acelerando a dinâmica cicatricial, além de possibilitar um tratamento eficaz, de maior conforto e breve retorno à normalidade da vida do paciente (BRUNO et al., 2013).

Os biomateriais têm recebido destaque nas pesquisas sobre produtos eficazes para o tratamento de queimaduras ao longo dos últimos 30 anos. A busca por materiais que contenham componentes biorenováveis e que possam ser substituídos por produtos sintéticos é cada vez maior (CROISIER & JERÔME, 2013). A incorporação de elementos naturais, tais como gelatina, colágeno, quitosana e ácido hialurônico em curativos é comprovadamente eficaz e apresenta-se de maneira promissora para a regeneração de tecidos (ZAMAN et al., 2011). Estes curativos são projetados para absorver o exsudado, fornecer umidade ideal para a superfície da ferida, prevenir a maceração do tecido circundante, e controlar a colonização bacteriana (VELÁZQUEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015).

Membranas à base de gelatina são consideradas como um biomaterial potencialmente útil, uma vez que é derivada da desnaturação do colágeno, o principal constituinte do tecido conjuntivo da pele e permite a liberação controlada de drogas em tecidos-alvo (NUNES et al., 2011).

Metabólitos secundários produzidos por líquens são considerados como uma potencial fonte para o desenvolvimento de biofilmes devido a sua capacidade intrínseca de resistir a patógenos invasores (ARAÚJO et al., 2015; NITHYNAND et al., 2015; YANG et al., 2016). Nesse sentido, vários metabólitos liquênicos são investigados para o isolamento de novos compostos com fins terapêuticos. O ácido úsnico (UA), devido ao

seu potencial medicamentoso é um dos mais estudados (CONTADO, 2015; ZUGIC et al., 2016). Amplos estudos mostram que o UA exibe interessantes propriedades como antimicrobiano, antiviral, antiproliferativo e cicatrizante (BRUNO et al., 2013; TARESCO et al., 2015). No entanto, a incorporação de UA em membranas a base de gelatina é limitada devido à fraca solubilidade do metabólito em água (FRANCOLINI et al., 2013). Adicionalmente, muitos tipos de fármacos têm sido associados a lipossomas, pois estes atuam como um excelente sistema veicular (MARTINELLI et al., 2014). Nunes et al. (2011) preparou membranas a base de colágeno contendo ácido úsnico carregado em lipossomas e destacaram o importante potencial de aplicação clínica destas biomembranas como curativos dérmicos em feridas por queimadura.

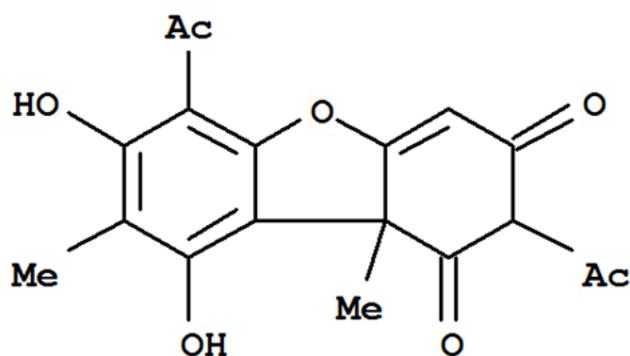


Figura 1. Estrutura molecular do ácido úsnico.

Adicionalmente, o uso rotineiro de antibióticos tópicos leva ao declínio progressivo da eficácia terapêutica devido à resistência a esta medicação (VELÁZQUEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015). Os íons de prata são conhecidos como agentes antimicrobianos eficazes por um longo tempo (ZHOU et al., 2012). No entanto, um grande número de microbiologistas têm estudado a propriedade antibacteriana destes íons em escala nanométrica, as nanopartículas de prata (AgNPs) e (ARCHANA et al., 2015;

GOREHAM et al., 2015). Lin et al. (2015) demonstrou significativa melhora da atividade antimicrobiana das suas membranas de quitosana/celulose quando associadas as AgNPs.

A atividade biocida de AgNPS depende das suas dimensões como tamanho, forma e superfície. Portanto, o desenvolvimento de AgNPS com características morfológicas e físico-químicas bem definidas e controladas para aplicação fisiológica em humanos é necessário para expandir suas aplicações biomédicas (Wei et al., 2015).

2 Material e Métodos

2.1 Preparação da Membrana

Membranas à base de gelatina foram preparadas por meio do processo de fundição utilizando gelatina em pó (1%) dispersos em 0,5 M de ácido acético com 20% de plastificante propilenoglicol, em relação ao peso seco de polímero.

UA-lipossomas carregados foram preparados com o método de evaporação rotativa convencional. Resumidamente, fosfatidilcolina foi dissolvido em clorofórmio de acordo com a proporção de fosfatidilcolina / ácido úsnico (Sigma-Aldrich CE 231-456-0) de 18:1 w/w. Os lipossomas carregados com ácido úsnico foram misturados com a dispersão de gelatina na proporção de 1: 4 (v/v). Após a evaporação do solvente, as membranas foram cortadas em forma de quadrado (5/5 centímetros) a fim de obter as membranas de gelatina contendo ácido úsnico (UAL). A caracterização das membranas foi descrito por Nunes et al. 2011.

2.2 Síntese das Nanopartículas de prata

Nesse trabalho usamos a rota de síntese de colóides de prata descrita por Lee e Meisel (1982). Os colóides de prata foram obtidos a partir da redução de nitrato de prata

(AgNO₃), dissolvido em água e citrato de sódio. Após a preparação da suspensão um excesso de citrato de sódio fica adsorvido à superfície das partículas e cria uma repulsão eletrostática evitando que elas aglomerem, conferindo estabilidade ao colóide.

A concentração estimada para esta suspensão é de 1.5×10^{-9} mg/mL de prata . O primeiro colóide formado possui nanopartículas com tamanhos que variam de 60 a 200 nm, sendo denominado colóide AgNPA. Parte desta suspensão foi submetida ao tratamento com laser para a obtenção de nanopartículas ainda menores, com cerca de 10 nm, sendo denominado colóide AgNPB. Trata-se de um processo de foto-ablação. As amostras foram irradiadas com o segundo harmônico, $\lambda = 532$ nm, de um laser de Nd:YAG, *Q-switched*, com uma taxa de repetição de 10 Hz por aproximadamente 1 hora, sendo a amostra agitada periodicamente, para garantir que toda ela seja irradiada uniformemente. As partículas absorvem o laser e por processos de múltiplas absorções têm elétrons ejetados, quando números grandes de elétrons são ejetados, a partícula perde a estabilidade e fragmenta-se, formando partículas menores com a forma aproximadamente esférica (FALCÃO-FILHO et al., 2007). O terceiro colóide a ser testado é denominado AgNPC, este é formado pelo mesmo método do primeiro e também composto por partículas com cerca de 60 a 200nm, porém em concentração de prata 5 vezes maior que as suspensões supracitadas.

Foram desenvolvidos quatro tipos de membranas: membranas contendo gelatina/ácido úsnico/lipossoma (UAL), consideradas como controle e as membranas testes contendo gelatina/ácido úsnico/lipossoma e AgNPs (UA-AgNP), criando 3 subgrupos testes de acordo com as suspensões coloidais utilizadas: AgNPA, AgNPB e AgNPC.

O processo de confecção da membrana contendo AgNPs utilizou a mesma metodologia, porém a solução gelatina/ácido úsnico/lipossoma foi dividida em béquers e

diferentes quantidades dos colóides de AgNPs foram adicionadas. As membranas confeccionadas com UA e o colóide AgNPA foram designadas como UA-AgNPA1, UA-AgNPA3 e UA-AgNPA5, em conformidade com os volumes de 1, 3 e 5 mL utilizados na composição, a mesma ordem foi seguida para o grupo que utilizou os colóide AgNPB. O último grupo utilizou UA e 5mL de AgNPs na formulação da membrana e por isso foi denominado UA-AgNPC5 (Figura 2).

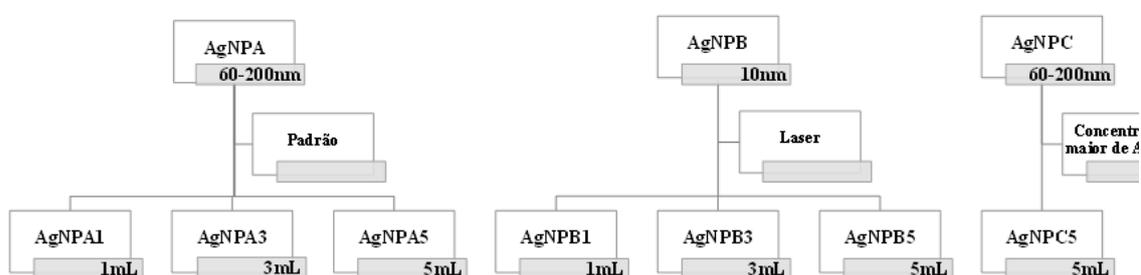


Figura 2. Fluxograma das membranas de acordo com as suspensões coloidais e volumes de AgNPs utilizados na composição.

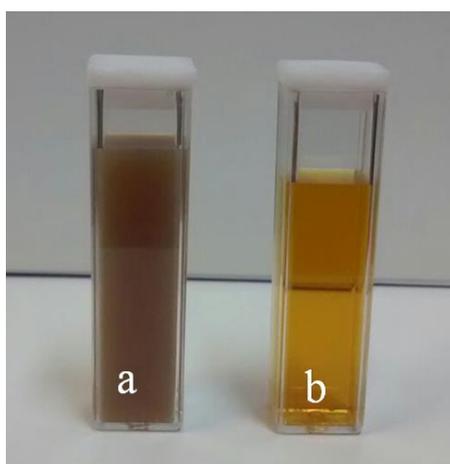


Figure 3. Ilustração dos colóides contendo nanopartículas de prata. a) AgNPA e b) AgNPB.

2.3 Distribuição de tamanho de partículas e de medição 3-ζ potencial

O tamanho de partícula e o potencial da superfície dos lipossomas carregados com ácido úsnico foram determinados utilizando Zetasizer® (Nano-ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido), a 25 °C. As amostras de lipossomas foram diluídas em água (1:10) para a contagem das partículas. A distribuição e o diâmetro médio das partículas, bem como o seu desvio padrão e o índice de polidispersão (PDI) foram avaliados. A modificação da superfície dos lipossomas carregados com ácido úsnico e dos colóides com AgNPs foi determinada por medição do potencial zeta de (ζ) por electroforese, utilizando o mesmo equipamento.

2.4 Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)

A morfologia das AgNPs foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM; JEM 1200 Ex Ii operando a 80 K). A amostra de suspensão aquosa foi depositado em uma grades Formvar/carbono e coradas negativamente com a solução de acetato de urânio (2% w/v).

2.5 Estudo Eletroquímico

Para as medidas eletroquímicas, foram analisadas as seguintes dispersões: solução preparada apenas com gelatina, o composto de UA incorporado em lipossomas, os colóides AgNPA, AgNPB e AgNPC e a solução final composta de gelatina/ácido úsnico/lipossoma contendo AgNPs. Para a preparação das soluções foi utilizado um volume total de 10 mL (10mM) de citrato de sódio (Sigma-Aldrich) e (90 mM) de cloreto de potássio (Sigma-Aldrich). Todas as soluções foram suficientemente estáveis na presença deste eletrólito durante a análise eletroquímica. A solução contendo os analitos

descritos foram desaeradas com N₂ por 15 minutos, sob agitação. As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica contendo um eletrodo auxiliar de fio de platina, um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um eletrodo de referência de Ag|AgCl|KCl (Sat.). Todos os potenciais foram determinados com respeito a seu eletrodo de referência e em potenciostato/galvanostato μ -Autolab, modelo Type III.

2.6 Análise Térmica

As curvas de DSC foram obtidas em uma célula de DSC-50 (Shimadzu) utilizando cadinhos de alumínio com cerca de 2 mg de amostras, sob atmosfera de azoto dinâmico (100 mL min⁻¹) a taxa e aquecimento de 10°C min⁻¹ em uma gama de temperaturas de 25 a 600°C. A célula DSC foi calibrada com índio (ponto de fusão 156,6 °C; $\Delta H_{fus} = 28,54 \text{ g}^{-1} \text{ J}$) e zinco (ponto de fusão 419,6°C).

As curvas TG/DTA foram obtidos com um modelo de termobalança TGA 50 (Shimadzu) na gama de temperatura 25-900°C, utilizando cadinhos de platina com ~ 3 mg de amostras, sob atmosfera de N₂ dinâmico (50 mL.min⁻¹) e da taxa de aquecimento 10°C min⁻¹. O aparelho foi previamente calibrado e/ou verificado usando o oxalato de cálcio padrão para TG (pureza 99,99%) e metal índio para DSC.

2.7 Espectrofotometria de Absorção na região do Infravermelho

Os dados de absorção de infravermelho foram obtidos no intervalo de 4000 - 400 cm⁻¹ em pastilhas de KBr, utilizando um espectrofotômetro FTIR Bomem, modelo MB-120, à temperatura ambiente.

2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os produtos secos foram montados em fita de cobre e visualizado com uma emissão de campo JEOL modelo JSM-7410-F microscópio eletrônico de varredura associado ao raio-X microanálise (SEM-EDX), com tensões aceleradas de 1 e 20 kV.

2.9 Capacidade de intumescimento

O intumescimento das membranas foi medido pela técnica de imersão, segundo o método descrito por (Hasani-Sadrabadi *et al.*, 2011). As membranas com área de 2x2 cm² foram imersas em tampão fosfato pH 7,4 com temperatura do meio de 37 ± 2°C. As amostras foram pesadas antes e após o intumescimento com o fluido, avaliadas em diferentes tempos (0, 20, 40, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos). Após cada tempo, as amostras foram retiradas do meio e o excesso de líquido da superfície foi removido com o auxílio de papel filtro e posteriormente pesadas. A quantidade de líquido absorvido pelas amostras foi expressa em ganho de massa em gramas e percentual de ganho de peso. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.10 Espessura das membranas

As membranas foram cortadas no formato quadrado (2x2 cm). A espessura de cada amostra (n = 10/grupo) foi registrada em cinco pontos usando um micrômetro digital (Micrometer MXRL externo, precisão ± 0,01 mm).

2.11 Ensaio Mecânico

Os ensaios mecânicos foram realizados utilizando um analisador de textura (TAXT-Stable Micro System). A resistência à tração (*TS*), alongamento (*E*) e módulo de Young (*YM*) foram determinados utilizando amostras das membranas de 25 mm x 10 mm em conformidade com a norma ASTM D882 (ASTM, 1995).

2.12 Análise microestrutural por Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de AFM foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica modelo Shimadzu SPM-9700. Cantilevers de nitreto de silício (Si₃N₄) em modo de contato (Modelo: Sini). A constante da mola e do raio da ponta informado pelo fabricante foi 0,06N/m e <15nm, respectivamente. A imagiologia foi realizada a temperatura ambiente usando o modo de contato.

2.13 Estudo microbiológico

2.13.1 Linhagens microbianas

Para determinação da atividade antimicrobiana foram selecionadas cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) devido ao valor epidemiológico desses microrganismos em infecções cutâneas. As linhagens bacterianas foram cedidas pelo Laboratório Central de Biomedicina da Universidade Tiradentes (UNITLab).

2.13.2 Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática

Foi preparada uma suspensão microbiana em solução salina estéril das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) utilizando como referência a escala 0.5 de MacFarland equivalente à 1.5×10^8 UFC/mL. Alíquotas de 100µL dessa suspensão foram adicionadas na superfície das membranas (2cm²), contidas em placas de petri estéril e previamente esterilizadas sob luz ultravioleta. Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica à 35°C, as membranas foram retiradas das placas e lavadas em solução

tampão PBS (0,03 Mmol). Utilizando alça bacteriológica calibrada (0,001 mL), foram retiradas alíquotas da suspensão bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em tampão PBS e semeadas em placas de ágar sangue. Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 35°C, sem restrições de aeração, por 24 horas, para obtenção do crescimento bacteriano e posterior contagem de colônias.

Foram avaliados dois parâmetros relacionados à atividade antimicrobiana: atividade bactericida ($T_0C - T_{24}T$) e atividade bacteriostática ($T_{24}C - T_{24}T$), onde T_0C e $T_{24}C$ são as concentrações de bactérias viáveis do controle ao tempo de 0 e 24 horas respectivamente, e $T_{24}T$ o número de bactérias viáveis das amostras testes depois de 24 horas de contato com o antimicrobiano (Yang *et al.*, 2012).

2.14 Determinação da concentração de prata

A determinação da concentração de prata no filme foi realizado usando os métodos padrão de plasma indutivamente acoplado, Espectrometria de Emissão Óptica - ICP-OES (Perkin Elmer, EUA, Optima 8000). As membranas foram pesadas com precisão e a partir das cinzas foi dissolvido em ácido nítrico e uma alíquota foi inserida no equipamento para análise. A temperatura da câmara foi fixada em 10°C, a potência de RF foi 1500W, a taxa de fluxo de gás transportador foi de 0,8 l/min.

3 Resultados e discussão

A incorporação de UA em lipossomas e a adição de AgNPs mostram-se promissores no desenvolvimento de membranas para o tratamento de queimaduras devido as suas propriedades antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana. A análise macroscópica

mostrou que as membranas preparadas apresentaram-se homogêneas, finas, flexíveis e com superfície regular independente da concentração de AgNPs utilizada.

3.1 Soluções utilizadas na composição da membrana

O tamanho das partículas da solução de gelatina contendo UA foi medido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Esta técnica mensura a intensidade no espalhamento de luz causada pelo movimento das partículas (MEHNERT & MÄDER, 2001). Através desta técnica foi possível confirmar a obtenção de partículas em tamanho nanométrico, como pode ser visto na Tabela 1. Observou-se que o aumento no tempo de ultrassom de 30 minutos para 60 minutos e 120 minutos, na preparação de lipossomas contendo ácido úsnico, resultou na diminuição do tamanho das partículas de 488,6 nm para 203,6 nm e 181,6 nm, respectivamente. Segundo Das et al. (2012), um tempo maior de sonicação proporciona maior energia para ocorrer a produção de partículas menores.

O potencial zeta refere-se à carga superficial das partículas e indica o grau de repulsão entre elas (DAS et al., 2012). Pode ser considerado um parâmetro útil para prever a estabilidade física de sistemas coloidais, pois altos valores de potencial zeta produzem grande repulsão eletrostática, prevenindo a agregação das partículas (RIDOLFI et al., 2012). As partículas obtidas mostraram potencial zeta igual a -21,0 mV, -17,9 mV e -19,0 mV para os tempos de sonicação de 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. Sendo assim, nota-se que não houve diferença significativa no potencial zeta com o tempo de ultrassom. O potencial zeta entre -15 e -30 mV demonstra que a preparação é estável e não apresenta tendência a flocular (KUMAR & RANDHAWA, 2013).

Tempo em cuba de ultra-som	Tamanho de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
30 minutos	488,6	-21,0
60 minutos	203,6	-17,9
120 minutos	181,6	-19,0

Tabela 1: Tamanho de partículas e potencial zeta de soluções contendo UA/lipossomas em diferentes tempos de ultra-som.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciou maiores informações sobre as amostras dos colóides de prata, mostradas na Figura 4. A Figura 3A mostra partículas com aparências distintas e com tamanhos entre 50-100 nm, observa-se a proximidade entre elas na Figura 3B, sugerindo a formação de aglomerados. O colóide AgNPB foi submetido ao tratamento com laser para obtenção de partículas entre 10-20 nm, porém é possível notar que essas partículas se aglomeram rapidamente formando estruturas cúbicas bem estruturadas (Figura 4C).

Stamplecoskie & Scaiano (2010) utilizaram a mesma metodologia de síntese para as AgNPs e identificaram nanopartículas com os tamanhos esperados. No entanto, nossos resultados demonstram que a dispersão das AgNPs não é completa e a presença de aglomerados é evidente em todas as amostras, sugerindo a semelhança entre todos os colóides após a incorporação nas preparações. Guzmán et al. (2009) afirmaram que o preparo das amostras para visualização no microscópio promove uma agregação das nanopartículas na etapa de secagem da amostra sobre a grade.

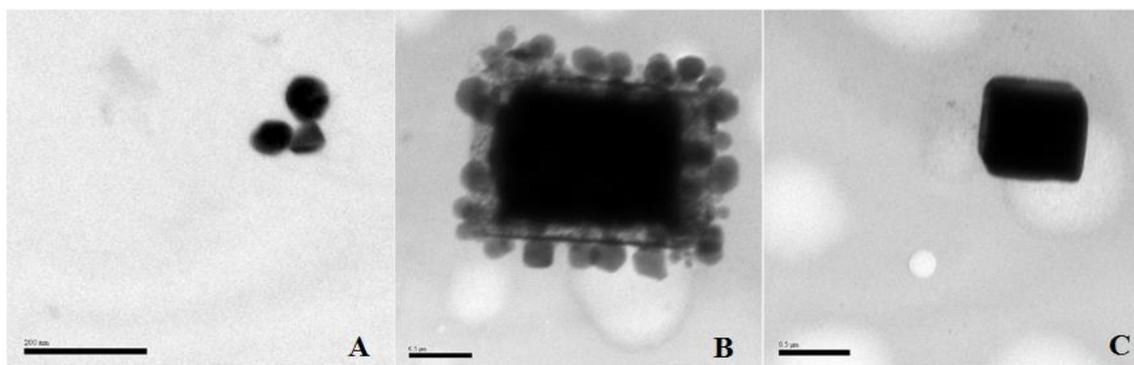


Figura 4. Imagens do TEM, a -AgNPA, b e c - AgNPB

Compreender a cinética da oxidação eletroquímica em nanoestruturas metálicas é extremamente importante considerando suas inúmeras aplicações. A estabilidade à oxidação é determinante para manter as propriedades úteis do metal (IVANOVA & ZAMBOTINI, 2009). O potencial oxidativo da solução composta por UA incorporado em lipossomas, colóides de AgNPs e das dissoluções das membranas UA-AgNPA são mostradas na Figura 5. Os resultados dos grupos UA-AgNPB e UA-AgNPC foram omitidos devido a semelhança entre os resultados.

As medidas eletroquímicas demonstraram o pico de oxidação em 0,7 V, referente ao UA. O estudo realizado por Kalachar et al. (2012) identificou um pico anódico para a oxidação do UA na mesma região e o descreve como relativamente largo e fraco, característica muito semelhante aos nossos resultados.

3.2 Membranas

As dispersões coloidais com AgNPs apresentaram pico oxidativo em 0,15 V, como já descrito anteriormente (WARD JONES et al., 2008). Os colóides possuem a mesma concentração de prata, porém retratam picos distintos, sendo possível notar maior intensidade na oxidação do colóide do grupo AgNPA, composto por partículas maiores. Estudos prévios já comprovaram a influência do tamanho das partículas metálicas sob

cada perfil voltamétrico (IVANOVA & ZAMBOTINI, 2009; GIOVANNI & PUMERA, 2012).

A solução composta apenas por gelatina não exibiu potencial oxidativo nesta análise, porém pode-se propor a sua interferência e de todos os componentes utilizados para a preparação da membrana nos seus picos de oxidação correspondentes. O pico anódico oxidativo do ácido úsnico, por exemplo, revela um potencial maior na sua oxidação, visto que ocorre em 0,85 V, quando já incorporado a membrana (Figura 5).

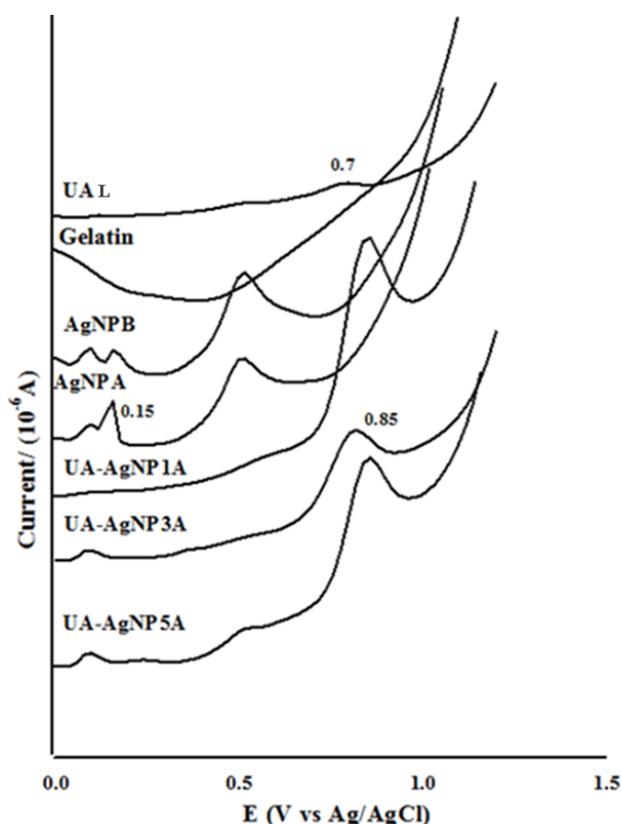


Figura 5. Estudo eletroquímico. Solução de gelatina; UA/lipossomas; Colóides AgNPA e AgNPB e membranas UA-AgNPA1, UA-AgNPA3 e UA-AgNPA5.

As curvas TG/DTG obtidas para as diferentes membranas mostraram-se similares, sendo caracterizadas por três perdas de massa nas seguintes faixas de temperatura: 25-150°C, 150°-435°C e 435-800°C, com percentuais aproximados de 10, 61 e 5%,

respectivamente. Comparando-se o percentual total de perda de massa entre as membranas contendo prata e a membrana controle (UAL) pode-se observar uma diferença em torno de 2% da perda de massa total. Nas curvas TG também observou-se diferença no teor de umidade entre a membrana controle ($\Delta m = 10,6\%$) e as membranas com prata ($\Delta m = 8,2\%$). As curvas DTG são mostradas na Figura 7 e certificam os dados supracitados.

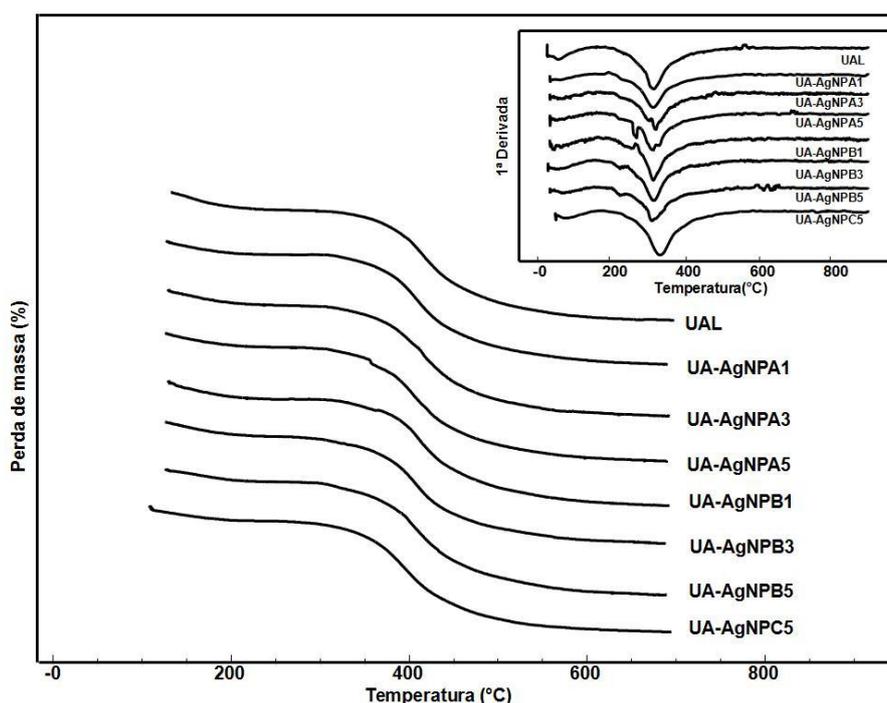


Figura 6. Curvas TG da membrana/controla UAL e membranas/testes UA-AgNPs em atmosfera dinâmica de azoto (100mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 10°C .

Corroborando os resultados de TG/DTG, as curvas DSC também se mostraram semelhantes para as diferentes concentrações de prata. Pequenas diferenças foram observadas principalmente na comparação entre o grupo UAL e os grupos contendo AgNPs. Assim como a TG, pode-se observar na membrana controle um evento endotérmico mais evidente caracterizando maior quantidade de água (Figura 7). De maneira geral as curvas DSC apresentaram um primeiro evento endotérmico

característico de perda de água seguido de uma etapa de estabilidade térmica, um evento endotérmico em torno de 225°C e a decomposição a partir de 250°C.

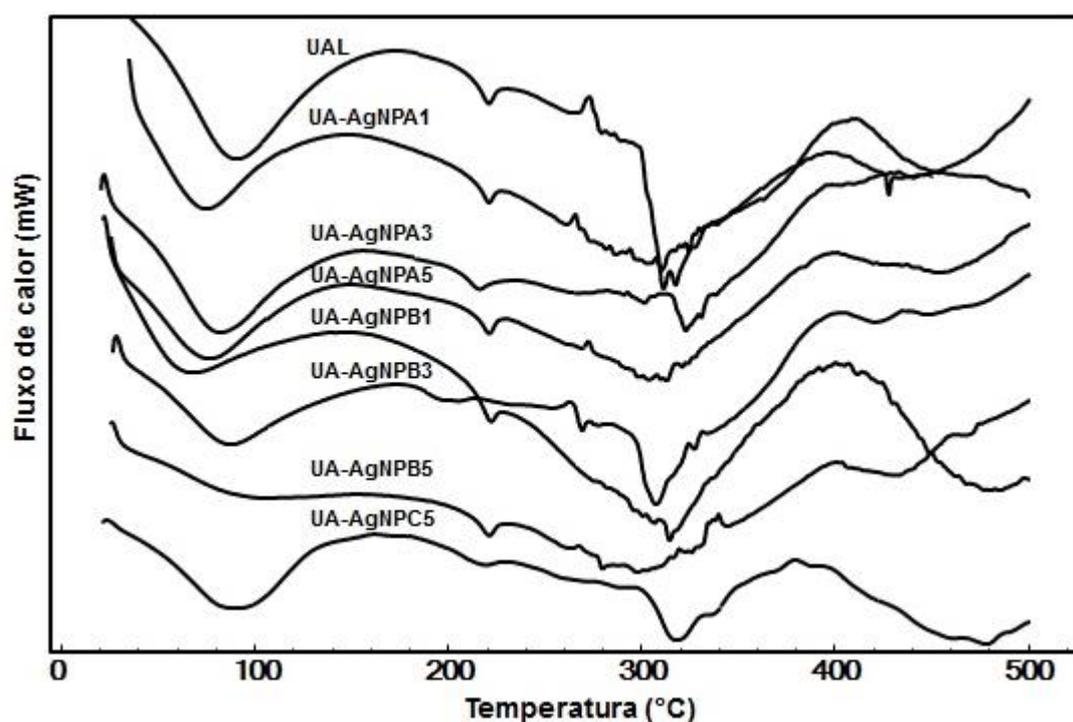


Figura 7. Curvas DSC da membrana/controlador UAL e membranas/testes UA-AgNPs em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

Os espectros de FTIR do UAL, UA-AgNPA, UA-AgNPB e UA-AgNPC são apresentados na Figura 8. A banda em 1629 cm^{-1} refere-se a grupos conjugados e grupos doadores de elétrons em anéis aromáticos. Nesta banda é possível verificar um deslocamento maior do pico na região espectral em virtude de ligações entre o átomo de prata e a proteína presente na matriz da membrana, principalmente na concentração UA-AgNPB5 (LI et al., 2011). A banda específica do UA foi observada por volta 1692 cm^{-1} , correspondente ao grupo cetona cíclico conjugado, já relatada em estudos anteriores (NUNES et al., 2010; KARABACAK et al., 2014). De maneira geral, o perfil dos espectros são similares àqueles da matriz inerte contendo apenas UA carregado em

lipossomas, o que sugere que a incorporação de AgNPs não afeta a estabilidade química das membranas. O estudo proposto por Lin et al. (2015) para filmes de celulose e quitosana, onde foi incorporado AgNP, mostrou resultado semelhante, uma vez que os espectros mostram-se similares aos filmes utilizados como controle.

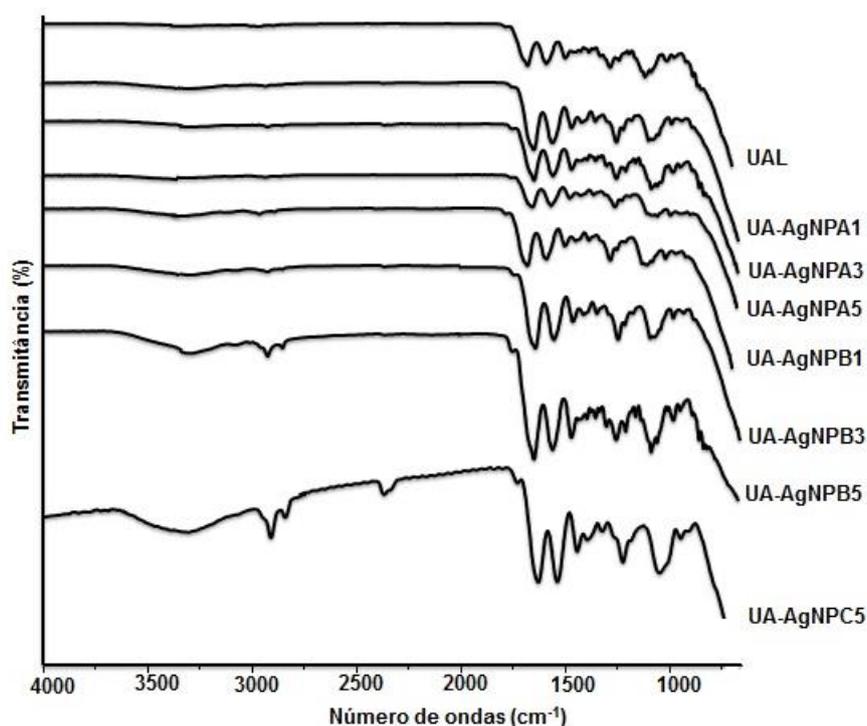


Figura 8. Espectros do infravermelho da membrana/controlado UAL e membranas/testes UA-AgNPs.

A morfologia das membranas UAL, UA-AgNPA5 e UA-AgNPC5 foi avaliada por MEV e são apresentadas na Figura 9. As imagens das amostras contendo AgNPs nas outras concentrações foram omitidas, pois mostraram grande semelhança entre elas. As análises da superfície demonstraram estruturas densas, formando redes com poros difusos. No estudo descrito por Nunes et al. (2010) membranas contendo colágeno e UA carregado em lipossomas também revelaram densidade e formações porosas no material. Detalhando a morfologia identificada nas imagens planas é possível notar membranas

mais rugosas nas amostras que possuem AgNPs. Filmes formados por uma rede de quitosana compostos de celulose e AgNPs também apresentaram imagens com maior rugosidade após a incorporação das nanopartículas (VIMALA et al., 2010). Lin et al. (2015) desenvolveram e caracterizaram filmes contendo AgNPs e também descreveram morfologia porosa e rugosa para o seu material, além de garantir seu potencial como cicatrizante. Estruturas rugosas já são consagradas quanto a sua importância no transporte de oxigênio durante a cicatrização da ferida. Além de absorver e manter grande quantidade de água na região (YU et al., 2007).

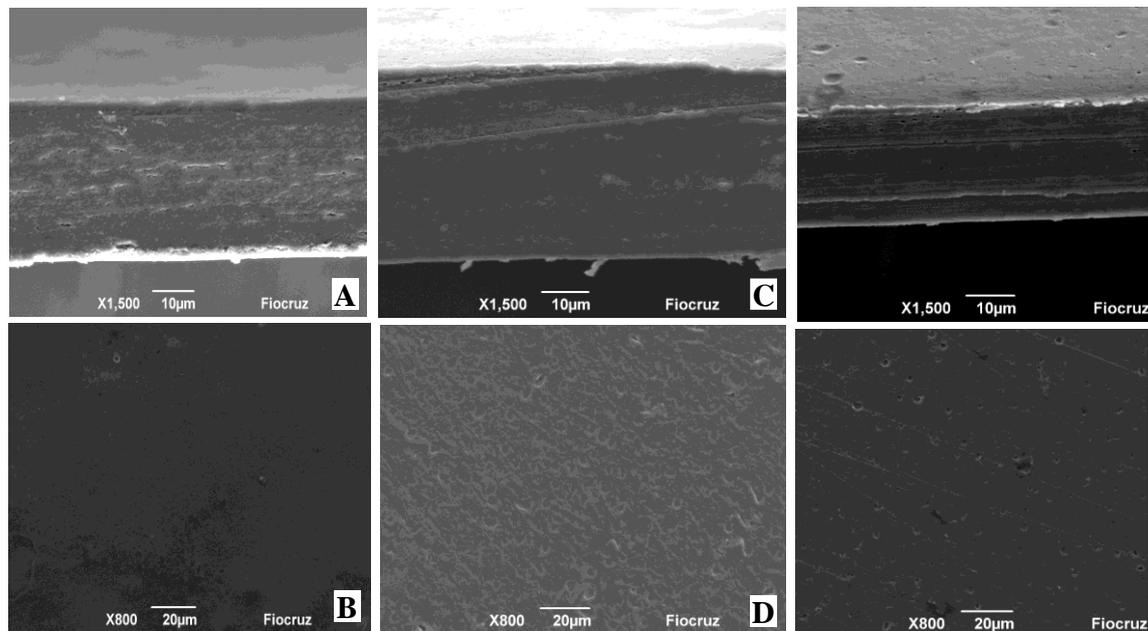


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura da membrana/control UAL (A – corte transversal x1500 e B plana x800), membranas/testes UA-AgNPA5 (C – corte transversal x1500 e D plana x800) e UA-AgNPC5 (E – corte transversal x1500 e F plana x800).

O estudo feito por microscopia de força atômica (AFM) permitiu avaliar a topografia formada nas membranas (YUVARAJAN et al., 2015). As imagens de AFM das membranas UAL, UA-AgNPA5 e UA-AgNPC5 são apresentadas na Figura 10. De

acordo com essa Figura é possível perceber uma topografia irregular e rugosa nas três amostras. Porém, a deposição molecular, individual ou por aglomerados confere à membrana composta por AgNPs uma estrutura ainda mais porosa e de maior rugosidade. Corroborando com os resultados de MEV, descrito anteriormente. Além disso, esta membrana demonstra uma superfície com formação de vesículas lipídicas, estruturas circulares difusas mais claramente observadas na membrana teste, o que sugere a incorporação de AgNPs ao composto. Diante da equivalência entre as membranas e a similaridade dos resultados, as imagens das demais amostras foram suprimidas.

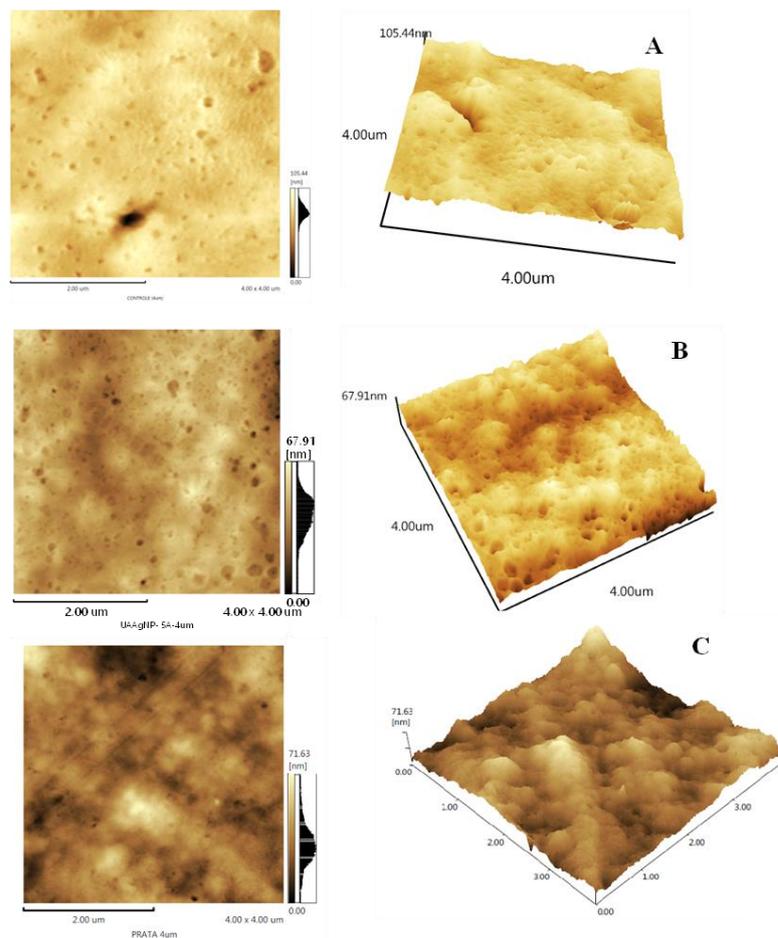


Figura 10. Microscopia de força atômica. A - UAL, B - UA-AgNPA5 e C - UA-AgNPC5.

O grau de intumescimento foi aplicado neste estudo para determinar o nível de hidratação das membranas obtidas. A Figura 11 mostra os resultados das membranas UA-AgNPA, UA-AgNPB e UA-AgNPC. As membranas sofreram influência do meio e apresentaram variação na fase inicial do intumescimento após a imersão com ganho de massa que variou de 400% a 800% no tempo de 20 min. A maioria das membranas mantiveram intumescimento ascendente, havendo ganho de massa gradativo e controlado em relação à massa inicial durante todo o ensaio. Porém, a membrana UA-AgNPA1 apresentou um decaimento da curva em cerca de 50 minutos, que indica perda de massa rápida, que se mantém por mais 100 minutos de teste. Além disso, é possível notar que a membrana correspondente a UA-AgNPB1 apresentou menor grau de intumescimento dentre as demais. No entanto, de maneira geral, podemos sugerir que a adição das AgNPs na membrana de gelatina propiciou aumento da capacidade de intumescimento, provavelmente pela presença de grupos hidrofílicos adicionais ao colágeno hidrolisado - gelatina, indicando a incorporação do composto utilizado.

A incorporação de AgNPs resulta na penetração de mais moléculas de água, a fim de neutralizar a acumulação de íons na pressão osmótica. Deste modo, tais nanopartículas podem expandir a rede polimérica, aumentando os poros e espaços livres e, como consequência, as amostras com prata absorvem mais água (YADOLLAHI et al., 2015).

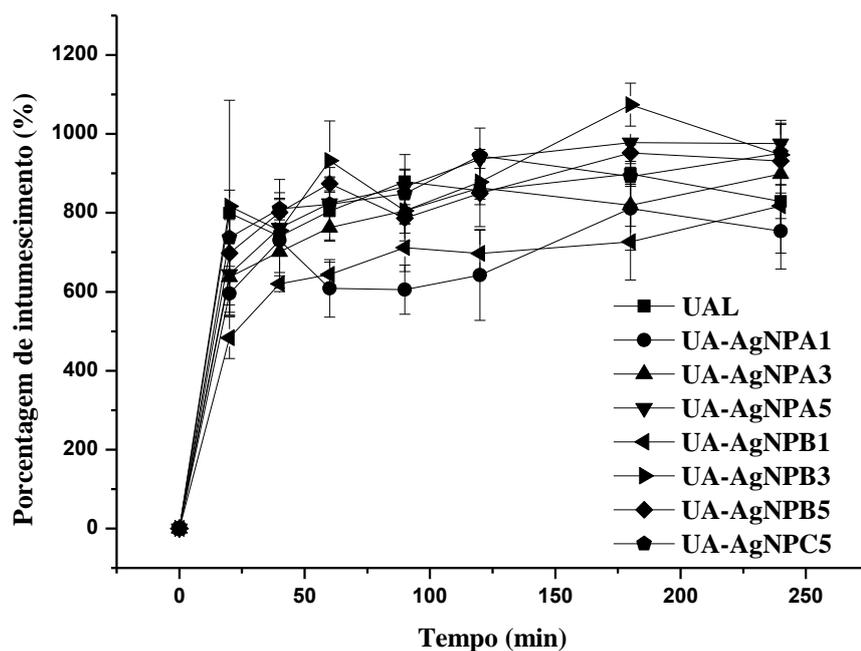


Figura 11. Capacidade de intumescimento da membrana/controlado UAL e membranas/testes UA-AgNPs.

A determinação de espessura e ensaio mecânico está exposto na Tabela 2. Os resultados mostram que, de maneira geral, a medida que se aumenta a concentração de prata nas membranas aumenta-se também sua espessura. Os valores que se referem ao alongamento demonstraram menor alongamento nas membranas testes, incorporadas com AgNPs. Em relação a tensão foi observada diferença significativa apenas para as amostras UA-AgNPA1, UA-AgNPA3 e a UA-AgNPB5. A membrana UA-AgNPA1 mostrou diferença significativa para todas as outras concentrações e controle. Referindo-se ao Módulo de Young é possível notar que existe diferença significativa quando comparadas a membrana controle e todas as outras membranas testes. Além disso, a amostra UA-AgNPA1 apresentou diferença entre ela e todas as outras concentrações de AgNPs.

Samples	Espessura (mm)	Alongamento (μm)	Tensão (MPa)	Módulo de Young (MPa)
UAL	$0,0230 \pm 0.003^*$	$0.7001 \pm 0.230^*$	49.6376 ± 28.8387	$868.652 \pm 252.45^*$
UA-AgNP1A	0.0449 ± 0.0107	1.1333 ± 0.5046	$64.7315 \pm 8.6064^*$	$473.4003 \pm 92.0884^*$
UA-AgNP1B	0.0487 ± 0.0058	1.5250 ± 0.9794	33.5748 ± 11.9764	255.1169 ± 80.2073
UA-AgNP3A	0.0450 ± 0.0038	0.8375 ± 0.5153	$24.7708 \pm 12.2673\#$	321.1245 ± 77.1957
UA-AgNP3B	0.0498 ± 0.0100	1.3375 ± 0.6116	33.4658 ± 10.7059	278.4638 ± 76.2386
UA-AgNP5A	0.0636 ± 0.0059	1.1750 ± 0.1488	28.8110 ± 3.1327	247.4968 ± 30.4549
UA-AgNP5B	0.0616 ± 0.0081	1.1375 ± 0.9665	$18.7656 \pm 9.3972\#$	254.6812 ± 201.4998

Tabela 2. Comparação entre os parâmetros de avaliação mecânica da membrana/controle UAL e membranas/testes UA-AgNPs.

Goreham et al. (2015) desenvolveram e caracterizaram membranas com bicamadas lipídicas e AgNPs e afirmaram que suas propriedades mecânicas não sofreram alteração com a presença de AgNPs. Archana et al. (2015) afirmaram que curativos devem apresentar boa resistência à tensão para que não sejam danificados durante sua manipulação, seus filmes de quitosana com adição de AgNPs apresentaram moderada resistência à tensão após a inclusão das nanopartículas metálicas. Vimala et al. (2010) estudaram filmes de quitosana contendo curcumina e AgNPs e mostraram que a adição desses componentes aumentou a resistência mecânica das membranas quando esses compostos foram incorporados.

A concentração da prata nas membranas foi determinada através das análises químicas realizadas por ICP-OES. A técnica de ICP-OES utiliza plasma acoplado indutivamente para produzir átomos excitados e íons que emitem radiação eletromagnética em comprimentos de onda característicos de um elemento em particular. A intensidade desta emissão é correlacionada às concentrações dos elementos no interior da amostra (STEFÁNSSON et al., 2007). Os resultados demonstram a presença das

AgNPs em todas as membranas e apontam um aumento gradativo em relação ao volume de prata inserido em cada uma, como previsto na metodologia. Os grupos UA-AgNPA e UA-AgNPB apresentam a mesma concentração de prata, porém as amostras compostas por 1mL apresentaram cerca de 0.0427 ± 0.0025 de AgNPs, as membranas que receberam 3mL possuem 0.185 ± 0.0030 de AgNPs e as com 5mL cerca de 1.4897 ± 0.0006 . A suspensão coloidal AgNPC se diferencia das demais devido a concentração maior de prata, este dado foi constatado nesta análise, demonstrando 2.4477 ± 0.0025 de AgNPs na formulação das suas amostras.

A ação antimicrobiana das membranas é apresentada por meio das atividades bactericida e bacteriostática das membranas UA-AgNPA5, UA-AgNPB5 e UA-AgNPC5 frente às bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados estão expostos nas Tabelas 3. A inibição bacteriana frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi de 100% para todas membranas testadas. Enquanto que contra *Staphylococcus aureus* as membranas UA-AgNPA5 e UA-AgNPB5 obtiveram cerca de 66% de atividade bacteriostática e 99% de atividade bactericida. Os resultados exibiram maior efeito para bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), provavelmente devido a diferenças nas suas paredes celulares. Microrganismos Gram-negativos apresentam uma camada de peptidoglicanos menos espessa que os Gram-positivos, facilitando a migração das AgNPs (ARCHANA et al., 2015). Adicionalmente, a UA-AgNPC5 apresentou resultado relevante com 100% de inibição frente a todas cepas estudadas.

O mecanismo de ação dos íons de prata frente aos microrganismos é parcialmente conhecida (YADOLLAHI et al., 2015). Porém, acredita-se que a atividade antimicrobiana das AgNPs é mediada pela formação de radicais livres que aderem à superfície da membrana celular das bactérias e induzem danos, tais como permeabilidade,

respiração e divisão celular. Além disso, uma ampla área de superfície das AgNPs pode proporcionar sítios de ação ainda mais eficazes para inibir a atividade bactericida (RIGO et al., 2012; LIU et al., 2015).

UA-AgNPA5					
Microrganismo	Viáveis (T ₀)	Viáveis Controle (T ₂₄)	Viáveis Teste (T ₂₄)	Atividade Bactericida	Atividade Bacteriostática
<i>P. aeruginosa</i>	1.5 x10 ⁷	0	0	100%	100%
<i>S. aureus</i>	1.5 x10 ⁷	2.94 x10 ⁵	9.8 x10 ⁴	99.35%	66.67%
<i>E. coli</i>	1.5 x10 ⁷	1.87 x10 ⁵	0	100%	100%
UA-AgNPB5					
Microrganismo	Viáveis (T ₀)	Viáveis Controle (T ₂₄)	Viáveis Teste (T ₂₄)	Atividade Bactericida	Atividade Bacteriostática
<i>P. aeruginosa</i>	1.5 x10 ⁷	0	0	100%	100%
<i>S. aureus</i>	1.5 x10 ⁷	2.94 x10 ⁵	9.1 x10 ⁴	99.39%	69.05%
<i>E. coli</i>	1.5 x10 ⁷	1.87 x10 ⁵	0	100%	100%
UA-AgNPC5					
Microrganismo	Viáveis (T ₀)	Viáveis Controle (T ₂₄)	Viáveis Teste (T ₂₄)	Atividade Bactericida	Atividade Bacteriostática
<i>P. aeruginosa</i>	1.5 x10 ⁷	0	0	100%	100%
<i>S. aureus</i>	1,5 x10 ⁷	1,47 x10 ⁵	0	100%	100%
<i>E. coli</i>	1,5 x10 ⁷	1,35 x10 ⁵	0	100%	100%

Tabela 3. Determinação dos parâmetros antimicrobianos: atividade bactericida e bacteriostática para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* - membrana/controle (UAL) e membranas/testes (UA-AgNPA5, UA-AgNPB5 e UA-AgNPC5).

É imprescindível ressaltar que o estudo referente a cepa *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou bactérias viáveis após 24 horas de teste, ou seja, houve 100%

de inibição inclusive pela membrana contendo apenas ácido úsnico, considerada como controle neste estudo. Karabacak et al. (2014) em estudo semelhante afirmou que o efeito antibacteriano do ácido úsnico está relacionado a danos na matrix mitocondrial das bactérias. Nunes et al. (2011) evidenciou que o ácido úsnico incorporado em matrizes filmogênicas de colágeno apresentaram ação modulatória positiva sobre a síntese de colágeno cicatricial. O potencial cicatrizante deste metabólito também foi descrito por Bruno et al. (2013). Nesse sentido, a efetiva propriedade antimicrobiana do UA e AgNPs somada a promoção a dinâmica cicatricial dada pela gelatina e UA parecem apontar o desenvolvimento de um produto com importante aplicabilidade clínica em feridas por queimaduras.

A comparação entre o crescimento microbiano na membrana controle (UAL) e as testes (UA-AgNPA5, UA-AgNPB5 e UA-AgNPC5) pode ser observada na Figura 12. É possível observar o maior número de colônias bacterianas (pontos brancos) na membrana controle (UAL), evidenciando a positiva ação da prata frente a proliferação de microorganismos.

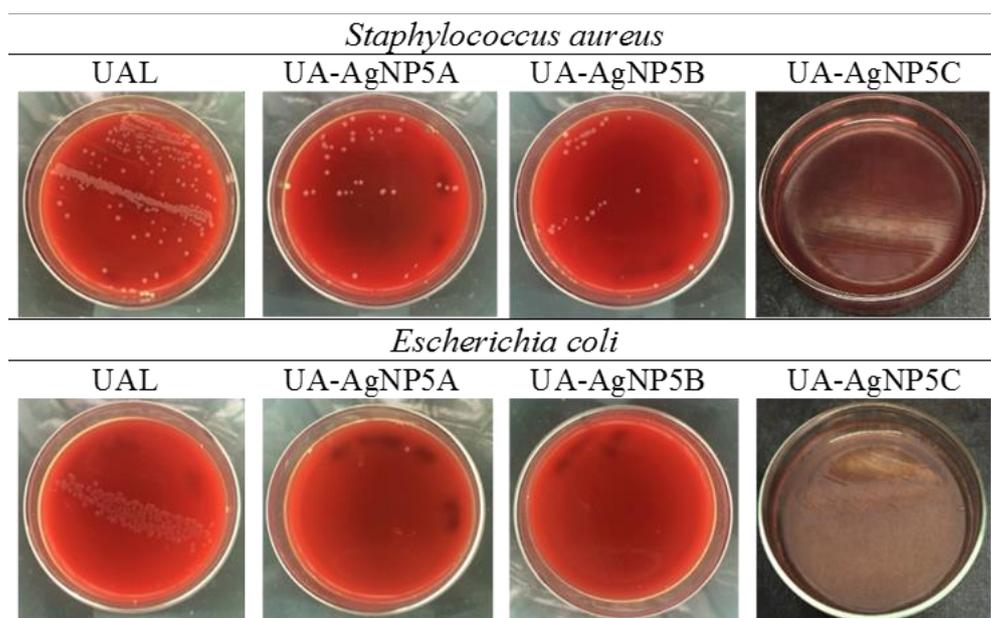


Figura 12. Determinação da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* - membrana/controle (UAL) e membranas/testes (UA-AgNPA5, UA-AgNPB5 e UA-AgNPC5).

4 Conclusão

O presente estudo mostra um método promissor para o desenvolvimento de membranas que combinam UA e AgNPs, com potencial ação cicatrizante e antimicrobiana. É possível afirmar que trata-se de um material nanoparticulado e as AgNPs foram incorporadas ao polímero como visto na análise térmica, ICP-OES e imagens colhidas por MET, MEV e AFM.

Os análogos dos compostos utilizados foram observados no espectro do infravermelho e análise eletroquímica indicando a presença dos compostos no sistema. Além disso, as membranas apresentam resistência mecânica adequada e eficaz capacidade de absorção de água. A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que as membranas produzidas são eficientes para todas as cepas estudadas. Considerando o perfil bastante semelhantes quando comparados os grupos testes, ou seja, compostos por colóides com AgNPs de tamanhos e concentrações diferentes, aliado a metodologia simples e de baixo custo envolvendo os grupos AgNPA e AgNPC, visto que não se faz necessário o tratamento com laser para a quebra das nanopartículas e contemplando os resultados sob os testes antimicrobianos obtidos pela membrana de maior concentração (UA-AgNPC5) sugere-se que este grupo seja mais favorável para o desenvolvimento das membranas bioativas de gelatina contendo UA e AgNPs. As análises físico-químicas das membranas reforçam a expectativa quanto ao potencial da sua utilização para ensaios biológicos e clínicos futuros.

5 Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq / Brasil) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe / FAPITEC-SE pelo apoio financeiro.

6 Referências

ABBOUD, E. C. et al. Silver-based dressings for the reduction of surgical site infection: Review of current experience and recommendation for future studies. **Burns**, v. 40, p. S30-S39, 2014.

AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 189-199, 2012.

AHMADJIAN, V. **The lichen symbiosis**. John Wiley & Sons, 1993.

ARAÚJO, A. A. et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. **Nat Prod Res**, p. 1-14, Feb 24 2015.

ARCHANA, D. et al. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 49-57, 2// 2015.

AZIZ, Z.; ABU, S.; CHONG, N. A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. **Burns**, v. 38, n. 3, p. 307-318, 2012.

BAČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2011.

BANYARD, D. A. et al. Regenerative Biomaterials: A Review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 135, n. 6, p. 1740-1748, 2015.

BOATENG, J. et al. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 63-71, 2015.

BOONKAEW, B. et al. Antimicrobial efficacy of a novel silver hydrogel dressing compared to two common silver burn wound dressings: Acticoat™ and PolyMem Silver®. **Burns**, v. 40, n. 1, p. 89-96, 2014.

BRUNO, M. et al. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.

CONTADO, C. Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem. **Front Chem**, v. 3, p. 48, 2015.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 4// 2013.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. **Chemical reviews**, v. 104, n. 9, p. 3893-3946, 2004.

DARGAVILLE, T. R. et al. Sensors and imaging for wound healing: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 30-42, 2013.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 47, n. 1, p. 139-151, 2012.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DRELICH, J. et al. Vermiculite decorated with copper nanoparticles: novel antibacterial hybrid material. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 22, p. 9435-9443, 2011.

FALCÃO-FILHO, E.; DE ARAÚJO, C. B.; RODRIGUES JR, J. High-order nonlinearities of aqueous colloids containing silver nanoparticles. **JOSA B**, v. 24, n. 12, p. 2948-2956, 2007.

FRANCOLINI, I. et al. Water Soluble Usnic Acid-Polyacrylamide Complexes with Enhanced Antimicrobial Activity against Staphylococcus epidermidis. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 4, p. 7356-69, 2013.

GIOVANNI, M.; PUMERA, M. Size dependant electrochemical behavior of silver nanoparticles with sizes of 10, 20, 40, 80 and 107 nm. **Electroanalysis**, v. 24, n. 3, p. 615-617, 2012.

GOREHAM, R. V. et al. Interaction of silver nanoparticles with tethered bilayer lipid membranes. **Langmuir**, v. 31, n. 21, p. 5868-74, Jun 2. 2015.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **Int J Chem Biomol Eng**, v. 2, n. 3, p. 104-111, 2009.

HASANI-SADRABADI, M. M. et al. Preparation and characterization of nanocomposite polyelectrolyte membranes based on Nafion® ionomer and nanocrystalline hydroxyapatite. **Polymer**, v. 52, n. 5, p. 1286-1296, 2011.

IVANOVA, O. S.; ZAMBORINI, F. P. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 1, p. 70-72, 2009.

KALACHAR, H. et al. Electrochemical studies on usnic acid from *Usnea pseudosinensis* using multi walled carbon nanotube modified pencil graphite electrode. **Int J Anal Bioanal Chem**, v. 2, p. 179-184, 2012.

KARABACAK, R. B.; TAY, T.; KIVANÇ, M. Preparation of novel antimicrobial polymer colloids based on (+)-usnic acid and poly (vinylbenzyl chloride). **Reactive and Functional Polymers**, v. 83, p. 7-13, 2014.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 562-568, 2013.

LEE, P.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982.

LI, S.-M. et al. Cellulose–silver nanocomposites: Microwave-assisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 441-447, 2011.

LIN, S. et al. Novel antimicrobial chitosan–cellulose composite films bioconjugated with silver nanoparticles. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 395-403, 8// 2015.

LIU, Y. et al. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles. **Int J Biol Macromol**, v. 79, p. 638-43, Aug 2015.

MARTINELLI, A. et al. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly(L-lactide) microparticles. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 88, n. 2, p. 415-23, Oct 2014.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2, p. 165-196, 2001.

NITHYANAND, P. et al. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. **Microbiological Research**, v. 179, p. 20-28, 10// 2015.

NUNES, P. S. et al. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 761593, 2011.

NUNES, P. S. et al. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 3, p. 1011-1014, 2010.

RIDOLFI, D. M. et al. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36-40, 2012.

RIGO, C. et al. Active silver nanoparticles for wound healing. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 4817-4840, 2013.

RIGO, C. et al. Active silver nanoparticles for wound healing. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 4817-4840, 2013.

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

STAMPLECOSKIE, K. G.; SCAIANO, J. C. Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 6, p. 1825-1827, 2010.

STEFÁNSSON, A.; GUNNARSSON, I.; GIROUD, N. New methods for the direct determination of dissolved inorganic, organic and total carbon in natural waters by Reagent-Free™ Ion Chromatography and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 582, n. 1, p. 69-74, 2007.

TARESCO, V. et al. Design and characterization of antimicrobial usnic acid loaded-core/shell magnetic nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 72-81, 7/1/ 2015.

VELÁZQUEZ-VELÁZQUEZ, J. L. et al. Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 604-611, 4/1/ 2015.

VIMALA, K. et al. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: a facile approach for superior antibacterial application. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 248-58, Mar 1 2010.

WARD JONES, S. E. et al. Particle size and surface coverage effects in the stripping voltammetry of silver nanoparticles: theory and experiment. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 46, p. 17820-17827, 2008.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discov Today**, v. 20, n. 5, p. 595-601, May 2015.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discov Today**, v. 20, n. 5, p. 595-601, May 2015.

YADOLLAHI, M.; FARHOUDIAN, S.; NAMAZI, H. One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 37-43, 2015.

YANG, G. et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 839-845, 1/4/ 2012.

YANG, Yi et al. Inhibitory Activity of (+)-Usnic Acid against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Motility. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.

YU, H. et al. Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. **Journal of applied polymer science**, v. 103, n. 1, p. 125-133, 2007.

YUVARAJAN, R. et al. Photoscopic characterization of green synthesized silver nanoparticles from *Trichosanthes tricuspidata* and its antibacterial potential. **J Photochem Photobiol B**, v. 149, p. 300-7, Aug 2015.

ZAMAN, H. U. et al. Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1369-1375, 10// 2011.

ZHOU, Y. et al. Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 5, p. 553-560, 2012.

ZUGIC, Ana et al. Evaluation of Anticancer and Antioxidant Activity of a Commercially Available CO₂ Supercritical Extract of Old Man's Beard (*Usnea barbata*). **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.