

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**POLÍMEROS COM SAIS IMIDAZÓLICOS: MATERIAIS INOVADORES COM
PROPRIEDADES ANTIBIOFILME FRENTE A
ISOLADOS DE *CANDIDA***

CLARISSA MARTINS LEAL SCHREKKER

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre
Fevereiro/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**POLÍMEROS COM SAIS IMIDAZÓLICOS: MATERIAIS INOVADORES COM
PROPRIEDADES ANTIBIOFILME FRENTE A
ISOLADOS DE *CANDIDA***

Clarissa Martins Leal Schrekker
Farmacêutica Especialista em Diagnóstico Laboratorial

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola
e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente

Área de concentração: Industrial

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Fevereiro/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Martins Leal Schrekker, Clarissa

Polímeros com Sais Imidazólicos: Materiais Inovadores com Propriedades Antibiofilme Frente a Isolados de Candida / Clarissa Martins Leal Schrekker. -- 2016.

219 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Biomateriais com propriedade antibiofilme. 2. Candida spp. 3. Sais imidazólicos. 4. Biomateriais de PEAD, PHB e PLA. 5. Biocompatibilidade. I. Meneghello Fuentefria, Alexandre, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico ao meu esposo Henri e
aos meus pais Nomitor e Cleri

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e aos Professores deste Programa por todo o conhecimento repassado e ao apoio da CAPES fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Alexandre Fuentesfria, meu Orientador, muito obrigada, pela oportunidade de orientação, confiança, e generosidade em compartilhar seus conhecimentos.

Agradeço aos Professores da Banca Examinadora, pela disponibilidade, ajuda e pelas valiosas sugestões que contribuíram com a pesquisa realizada.

Aos Professores parceiros deste estudo, Prof. Mário Teixeira do Instituto Federal Catarinense (SC), ao Pesquisador Dr. Luigi Ambrosio e a Pesquisadora Dr.a. Maria Raucci do Institute of Polymers, Composites and Biomaterials, CNR (Itália), Prof. Jonder Moraes do Instituto de Física, Prof.a. Raquel Mauler e ao Prof. Henri Schrekker do Instituto de Química, da UFRGS, agradeço pela colaboração neste estudo, e ao apoio que fizeram este estudo ser amplo e Multidisciplinar.

As colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. Em especial ao Igor que aceitou comigo o desafio de realizar as pesquisas no Laboratório MUMIC (recém criado), no Campus do Vale. Os desafios foram muitos, mas foram vencidos!

À todos os colegas do Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise (TECNOCAT) da UFRGS, em especial Aline Dalbem, Joice Klitzke, Balaji Selukar e Yuri Sokolovicz, que foram essenciais no desenvolvimento deste estudo.

Aos meus familiares Astrid e Peter Koot, Daan Schrekker, Tim Schrekker, Henri Abram Schrekker e Els Duindam, com carinho e amor muito obrigada pelo apoio e incentivo recebido.

Aos meus familiares Daniela Leal, minhas sobrinhas amadas Julia e a nossa guerreira Manuela e meu sobrinho amado Yhuri, com amor muito obrigada pelo apoio e incentivo.

Aos meus queridos irmãos Claudio Leal e Mauro Leal, vocês sempre foram meus grandes incentivadores, sempre apoiaram-me em todas as minhas decisões, essa conquista é de vocês também, vocês são essenciais em minha vida. Muito obrigada!

Aos meus amados pais, Cleri e Nomitor Leal, não existem palavras para expressar a minha gratidão por tudo que vocês fizeram por mim e ainda fazem. Vocês são os meus maiores exemplos de vida, e se hoje estou aqui defendendo este Mestrado é graças a vocês, que em todos os momentos me apoiaram e incentivaram a sempre continuar e nunca desistir dos meus sonhos. Com muito amor, obrigada por tudo!!!

Ao meu esposo, Henri Schrekker, como agradecer em palavras por tudo que você representa para eu e por tudo que você faz por mim. As palavras seriam poucas para te dizer o quanto você é importante para mim, e o quanto você é, e foi importante nesta jornada da vida que estamos passando juntos. Essa conquista também é tua! Muito obrigado por sempre incentivar-me, apoiar em todos os momentos e ajudar-me a construir esse sonho que hoje tornou-se realidade e uma grande conquista, você fez parte dela. Com todo o meu amor, muito Obrigada!!!

POLÍMEROS COM SAIS IMIDAZÓLICOS: MATERIAIS INOVADORES COM PROPRIEDADES ANTIBIOFILME FRENTE A ISOLADOS DE *CANDIDA*¹

Autora: Clarissa Martins Leal Schrekker
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

RESUMO

As *Candida* spp. têm grande habilidade para colonizar e formar biofilmes em dispositivos médicos e biomateriais, provocando infecções nos hospedeiros humanos. O Polietileno de Alta Densidade (PEAD), Polihidroxibutirato (PHB) e o Ácido Polilático (PLA) apresentam propriedades interessantes para aplicações em dispositivos médicos. Os sais imidazólicos (SI) apresentam propriedades avançadas, inclusive antifúngicas, podendo ser utilizados como aditivos nestes polímeros. Neste estudo, foram preparados filmes poliméricos com diferentes teores dos SI cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImCl**) e metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImMeS**), através dos processos de mistura no estado fundido (PEAD e PHB) e de Solvent Casting (PLA). Para avaliar se esses biomateriais apresentavam atividade antibiofilme foram realizados ensaios Antibiofilme, testados frente a isolados de *Candida* spp. Para determinar a porcentagem de impedimento da formação do biofilme foram realizados ensaios de Menor Concentração Antibiofilme, frente a isolados de *Candida tropicalis*. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas para verificar se ocorre o impedimento da formação do biofilme nos biomateriais. Foram avaliadas a citotoxicidade dos SI, a adesão celular e a biocompatibilidade celular de células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) nos filmes de PEAD, PHB e PLA. Foram realizados ensaios histopatológicos dos biomateriais em pele de orelha de suínos para verificar se ocorre lesões microscópicas. Os filmes de PEAD, PHB e PLA foram caracterizados para avaliar a morfologia, a presença dos SI na superfície e as propriedades físico-químicas dos mesmos. Os filmes de PEAD, PHB e PLA com diferentes teores dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** apresentaram atividade antibiofilme frente a isolados de *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Com o ensaio MCA foi possível verificar que com o aumento do teor dos SI (**C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**) no PLA e PHB ocorre em geral um aumento na porcentagem de impedimento da formação do biofilme, sendo que isso em geral não ocorre com o PEAD. As micrografias de MEV mostraram o efetivo impedimento da formação do biofilme. Em geral os SI não apresentaram citotoxicidade em baixas concentrações. Os biomateriais mostraram uma boa adesão celular e são biocompatíveis com CTMh. Na avaliação histopatológica de pele da orelha suína com os biomateriais não foram observadas lesões microscópicas agudas. Em combinação com as boas propriedades morfológicas, físico-químicas e mecânicas, estes biomateriais são promissores para serem utilizados na confecção de dispositivos médicos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (p.). Fevereiro, 2016.

POLYMERS WITH IMIDAZOLIUM SALTS: INNOVATIVE MATERIALS WITH ANTIBIOFILM PROPERTIES AGAINST *CANDIDA* ISOLATES

Author: Clarissa Martins Leal Schrekker
Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

ABSTRACT

Candida spp. have great ability to colonize and form biofilms on medical devices and biomaterials, causing infections in human hosts. High-density polyethylene (HDPE), Polyhydroxybutyrate (PHB) and Polylactic acid (PLA) exhibit interesting properties for applications in medical devices. Imidazolium salts (IS) have advanced properties, including antifungal, which could be explored as additives in these polymers. In this study, polymer films with different IS (1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride (**C₁₆MImCl**) and 1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate (**C₁₆MImMeS**)) contents were prepared, using either the melt blending (HDPE and PHB) or the solvent casting process (PLA). The antibiofilm assay with *Candida* spp. isolates was performed to assess the antibiofilm activity of these biomaterials. Inhibition percentages of biofilm formation of *Candida tropicalis* isolates were determined by the minor antibiofilm concentration (MAC) assay. Scanning electron microscopy was applied to verify the inhibition of biofilm formation on these biomaterials. The cytotoxicity of IS and the cell adhesion and biocompatibility of human mesenchymal stem cells (hMSC) of the HDPE, PHB and PLA films was studied. Histopathologic assays were performed with these biomaterials on ear pigskin to verify the occurrence of microscopic lesions. The HDPE, PHB and PLA films were characterized to understand their surface morphology, the presence of IS on the surface and the physicochemical properties thereof. The polymer films with different concentrations of the IS **C₁₆MImCl** and **C₁₆MImMeS** presented antibiofilm activity against isolates of *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. albicans*. The MAC assay enabled to determine that an increasing IS (**C₁₆MImCl** and **C₁₆MImMeS**) content in the PLA and PHB biomaterials promoted, in general, an increase in the inhibition percentage of biofilm formation, which was not observed for the HDPE films. The SEM micrographs showed the effective prevention of biofilm formation on the IS containing biomaterials. Lower concentrations of the IS showed no cytotoxicity. The biomaterials presented good cell adhesion percentages and biocompatibility with hMSC. Furthermore, no acute microscopic lesions were identified in the histopathological evaluation after contact between the biomaterials and ear pigskin. In combination with the good morphological, physicochemical and mechanical properties, these biomaterials can be considered as promising for use in the manufacturing of medical devices.

¹ Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, (p.). February, 2016.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
2.2.1	Objetivo Específico 1	3
2.2.2	Objetivo Específico 2	3
2.2.3	Objetivo Específico 3	3
2.2.4	Objetivo Específico 4	3
2.2.5	Objetivo Específico 5	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Biofilmes	4
3.1.1	Estrutura do Biofilme e Fenótipo	6
3.1.2	Formação do Biofilme	8
3.1.3	Quorum Sensing	9
3.1.4	Biofilmes de <i>Candida</i>	10
3.1.5	Biofilme e Resistência Fúngica	12
3.1.6	Biofilmes em Dispositivos Médicos	18
3.5	Polímeros para Dispositivos Médicos	20
3.5.1	Dispositivos Médicos contendo Fármacos	24
3.5.2	Sistemas Implantáveis	25
3.5.3	Sistemas Terapêuticos Transdérmicos (Adesivos)	26
3.5.4	Sistemas de Desempenho Terapêutico Avançado	27
3.5.5	Polietileno de Alta Densidade	28
3.5.6	Polihidroxibutirato	30
3.5.7	Ácido Polilático	33
3.5.8	Técnicas de Caracterização dos Polímeros	37
3.5.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	37
3.5.8.2	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de raios X por Dispersão em Energia	37
3.5.8.3	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	38
3.5.8.4	Microscopia de Força Atômica	39
3.5.8.5	Análises de Difração de raios X	40

3.5.8.6	Cromatografia de Permeação em Gel	40
3.5.8.7	Calorimetria Diferencial por Varredura	41
3.5.8.8	Análises Termogravimétricas	41
3.5.8.9	Análises Dinâmico-Mecânicas	42
3.5.8.10	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X	43
3.5.8.11	Ângulo de Contato da Água	44
3.6	Sais Imidazólicos e Líquidos Iônicos	44
3.7	Atividade Antibiofilme	46
3.7.1	Terapia de Bloqueio Antifúngica	47
3.7.2	Materiais com Propriedade Antibiofilme	48
3.8	Polímeros com Sais Imidazólicos	50
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	Materiais	53
4.2	Cepas leveduriformes	54
4.3	Preparação de filmes de Polietileno de Alta Densidade com Sais Imidazólicos	55
4.4	Preparação de filmes de Polihidroxibutirato com Sais Imidazólicos	56
4.5	Preparação de filmes de Ácido Polilático com Sais Imidazólicos	56
4.6	Ensaio Antibiofilme	57
4.7	Ensaio Menor Concentração Antibiofilme	59
4.8	Citotoxicidade de Sais Imidazólicos	60
4.9	Análises de adesão e proliferação celular em filmes de PEAD, PHB e PLA com SI	61
4.9.1	Cultura de Células <i>In vitro</i>	61
4.9.2	Adesão Celular – Análise Morfológica das Células-Tronco Mesenquimais Humanas em Microscopia Confocal	62
4.9.3	Teste de Viabilidade Celular	62
4.10	Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PEAD, PHB e PLA	64
4.10.1	Preparação da Pele de Suínos	64
4.10.2	Estudo <i>Ex vivo</i> de Penetração na Pele de Suínos	64
4.10.3	Avaliação Histopatológica	65

4.11	Técnicas de Caracterização dos Polímeros de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático	66
4.11.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	66
4.11.1.1	Morfologia da Superfície dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	66
4.11.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	66
4.11.2	Microscopia de Força Atômica dos filmes de Polihidroxitirato sem os SI e Ácido Polilático com e sem os SI	67
4.11.3	Análises de Difração de raios X dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	68
4.11.4	Cromatografia de Permeação em Gel dos Filmes de Ácido Polilático com e sem os SI	68
4.11.5	Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	69
4.11.6	Análises Termogravimétricas dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	69
4.11.7	Análises Dinâmico-Mecânicas dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	70
4.11.8	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de raios X por Dispersão em Energia dos Filmes de Ácido Polilático com e sem os SI	70
4.11.9	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X dos Filmes de Ácido Polilático com e sem o SI C ₁₆ MImMeS	71
4.11.10	Ângulo de Contato da Água dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI	71

5	RESULTADOS	73
5.1	Filmes de Polietileno de Alta Densidade com Sais Imidazólicos	73
5.1.1	Preparação de Filmes de Polietileno de Alta Densidade com Sais Imidazólicos	73
5.1.2	Ensaio Antibiofilme	73
5.1.3	Ensaio Menor Concentração Antibiofilme	77
5.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de Polietileno de Alta Densidade	85
5.1.5	Citotoxicidade de Sais Imidazólicos	86
5.1.6	Análises de Adesão e Proliferação em Filmes de Polietileno de Alta Densidade com Sais Imidazólicos	89
5.1.6.1	Adesão Celular – Análise Morfológica em Microscopia Confocal	89
5.1.6.2	Teste de Viabilidade Celular	91
5.1.7	Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PEAD	92
5.1.8	Técnicas de Caracterização dos Polímeros Polietileno de Alta Densidade	93
5.1.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura – Morfologia da Superfície dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade	93
5.1.8.2	Análises de Difração de raios X	94
5.1.8.3	Propriedades térmicas dos filmes de Polietileno de Alta Densidade (Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Análises Termogravimétricas)	96
5.1.8.4	Análises Dinâmico-Mecânicas	96
5.1.8.5	Ângulo de Contato da Água	97
5.2	Filmes de Polihidroxibutirato com Sais Imidazólicos	98
5.2.1	Preparação de Filmes de Polihidroxibutirato com Sais Imidazólicos	98
5.2.2	Ensaio Antibiofilme	98
5.2.3	Ensaio Menor Concentração Antibiofilme	101
5.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de	

	Polihidroxitirato	109
5.2.5	Análises Biológicas de Filmes de Polihidroxitirato com Sais Imidazólicos	110
5.2.5.1	Adesão Celular – Análise Morfológica em Microscopia Confocal	110
5.2.5.2	Teste de Viabilidade Celular	112
5.2.6	Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PHB	112
5.2.7	Técnicas de Caracterização dos Polímeros Polihidroxitirato	113
5.2.7.1	Microscopia Eletrônica de Varredura – Morfologia da Superfície dos Filmes de Polihidroxitirato	113
5.2.7.2	Microscopia de Força Atômica	114
5.2.7.3	Análises de Difração de raios X	114
5.2.7.4	Propriedades térmicas dos filmes de Polihidroxitirato (Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Análises Termogravimétricas)	116
5.2.7.5	Análises Dinâmico-Mecânicas	117
5.2.7.6	Ângulo de Contato da Água	117
5.3	Filmes de Ácido Polilático com Sais Imidazólicos	118
5.3.1	Preparação de Filmes de Ácido Polilático com Sais Imidazólicos	118
5.3.2	Ensaio Antibiofilme	118
5.3.3	Ensaio Menor Concentração Antibiofilme – Microdinâmico	121
5.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de Ácido Polilático	129
5.3.5	Análises Biológicas de Filmes de Ácido Polilático com Sais Imidazólicos	130
5.3.5.1	Adesão Celular – Análise Morfológica em Microscopia Confocal	130
5.3.5.2	Teste de Viabilidade Celular	132
5.3.6	Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PLA	133
5.3.7	Técnicas de Caracterização dos Polímeros Ácido Polilático	134

5.3.7.1	Microscopia Eletrônica de Varredura – Morfologia da Superfície dos Filmes de Ácido Polilático	134
5.3.7.2	Microscopia de Força Atômica	137
5.3.7.3	Análises de Difração de raios X	139
5.3.7.4	Cromatografia de Permeação em Gel	141
5.3.7.5	Propriedades térmicas dos filmes de Ácido Polilático (Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Análises Termogravimétricas)	142
5.3.7.6	Análises Dinâmico-Mecânicas	143
5.3.7.7	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X	144
5.3.7.8	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de raios X por Dispersão de Energia	146
5.3.7.9	Ângulo de Contato da Água	146
6.	DISCUSSÃO	148
6.1	Preparação dos Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI	148
6.2	Atividade Antibiofilme dos Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI	149
6.3	Citotoxicidade de SI	151
6.4	Biocompatibilidade dos Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI	152
6.5	Morfologia e Hidrofilicidade da Superfície dos Filmes de PEAD, PHB e PLA	153
6.6	Cristalinidade dos Filmes de PEAD, PHB e PLA	155
6.7	Propriedades Térmicas dos Filmes de PEAD, PHB e PLA	155
6.8	Propriedades Dinâmico-Mecânicas dos Filmes de PEAD, PHB e PLA	156
6.9	Presença e Distribuição dos SI na Superfície do PLA	156
6.10	Comparação entre os Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com os SI	157
7.	CONCLUSÃO	160
8.	REFERÊNCIAS	162
9.	ANEXOS	170
9.1	Anexo I – MEV – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de PEAD, PHB e PLA	170

9.2	Anexo II – MEV – Morfologia da Superfície dos Filmes de PLA	172
9.3	Anexo III – Curvas de DSC dos Biomateriais	177
9.4	Anexo IV – Curvas de ATG dos Biomateriais	180
9.5	Anexo V – Análises de ADM dos Biomateriais	182

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Cepas, código e origem das <i>Candida</i> spp. testadas neste estudo.....	54
Tabela 2. Códigos das Amostras e SI (% Massa) de Filmes de PEAD.....	55
Tabela 3. Códigos das Amostras e SI (% Massa) de Filmes de PHB.....	56
Tabela 4. Códigos das Amostras e SI (%Massa) de Filmes de PLA	57
Tabela 5. Códigos das Amostras de Filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem SI C₁₆MImCI e C₁₆MimMeS	65
Tabela 6. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no PEAD e PEAD.CI frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	74
Tabela 7. Resultado do Ensaio Antibiofilme realizado no PEAD e PEAD.MeS frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	75
Tabela 8. Razão das áreas dos picos 2 θ 17,0/19,5°	95
Tabela 9. Propriedades térmicas dos filmes de PEAD determinadas por DSC e ATG.....	96
Tabela 10. Propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes de PEAD.....	97
Tabela 11. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no PHB e PHB.CI frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	99
Tabela 12. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no PHB e PHB.MeS frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	100
Tabela 13. Propriedades térmicas dos filmes de PHB.....	116
Tabela 14. Propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes de PHB.....	117
Tabela 15. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no PLA e PLA.CI frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	119
Tabela 16. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no PLA e PLA.MeS frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	120
Tabela 17. As massas molares médias em massa (M_w), o número médio massas molares (M_n) e os índices de polidispersão (PDI) dos filmes de PLA.....	142
Tabela 18. Propriedades térmicas dos filmes de PLA.....	143
Tabela 19. Propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes de PLA.....	144
Tabela 20. Comparação das propriedades entre os biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI.....	159

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desenvolvimento do biofilme microbiano: (1) Fixação inicial, (2) aderência microbiana, (3) formação de microcolônia, (4) maturação e desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme; e (5) liberação/lançamento de células capazes de formar novos biofilmes (Capelletti, 2006).....	9
Figura 2. Sais Imidazólicos C₁₀MImCl , C₄MImCl , C₁₆MImCl , C₁₆MImMeS e (C₁₀)₂MImCl utilizados nesta pesquisa.....	53
Figura 3. Filmes de PEAD com o SI C₁₆MImCl	73
Figura 4. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10 ⁻¹ , dos biomateriais de PEAD , PEAD.CI.0125 , PEAD.CI.0250 , PEAD.CI.0500 , PEAD.MeS.0125 , PEAD.MeS.0250 e PEAD.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 72A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de PEAD.SI . O valor de P foi <0,0001, considerado muito significativo para todos os biomateriais de PEAD.SI . PEAD vs PEAD.CI.0125 *** P<0,001 , PEAD vs PEAD.CI.0250 *** P<0,001 , PEAD vs PEAD.CI.0500 *** P<0,001 , PEAD vs PEAD.MeS.0125 *** P<0,001 , PEAD vs PEAD.MeS.0250 *** P<0,001 e PEAD vs PEAD.MeS.0500 *** P<0,001 . (B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10 ⁻¹ , dos biomateriais de PEAD , PEAD.CI.0125 , PEAD.CI.0250 e PEAD.CI.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> RL17. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 16 amostras de PEAD.SI . O valor de P foi 0,0003 considerado significativo para os biomateriais de PEAD.SI . PEAD vs PEAD.CI.0125 ** P<0,01 e PEAD vs PEAD.CI.0500 *** P<0,001	75
Figura 5. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10 ⁻¹ , dos biomateriais de PEAD , PEAD.CI.0250 e PEAD.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida parapsilosis</i> RL11. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 12 amostras de PEAD.SI . O valor de P foi 0,0008, considerado significativo para os biomateriais de PEAD.SI . PEAD vs PEAD.CI.0250 *** P<0,001 e PEAD vs PEAD.MeS.0250 * P<0,05 (B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10 ⁻¹ , dos biomateriais de PEAD , PEAD.CI.0250 e PEAD.CI.0250 frente ao isolado de <i>Candida parapsilosis</i> RL20. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 12 amostras de PEAD.SI . O valor de P foi 0,0032 considerado significativo para os biomateriais de PEAD.SI . PEAD vs PEAD.CI.0250 ** P<0,01 e PEAD vs PEAD.MeS.0250 ** P<0,01	76
Figura 6. Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10 ⁻¹ , dos biomateriais de PEAD , PEAD.CI.0125 , PEAD.CI.0250 , PEAD.CI.0500 , PEAD.MeS.0125 , PEAD.MeS.0250 e PEAD.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida albicans</i> CA04. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de PEAD.SI .	

O valor de P foi 0,0009, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0250** * P<0,05, **PEAD vs PEAD.CI.0500** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** P<0,001 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** ** P<0,01.....77

Figura 7. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PEAD.CI.0125** (barras azuis); **PEAD.CI.0250** (barras vermelhas); e **PEAD.CI.0500** (barras verdes).....79

Figura 8. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PEAD.MeS.0125** (barras azuis); **PEAD.MeS.0250** (barras vermelhas); e **PEAD.MeS.0500** (barras verdes).....79

Figura 9. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17P. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI.** O valor de P foi <0,0001, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** P<0,001 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 94P. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI.** O valor de P foi <0,0001 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0125** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** P<0,01 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001.....80

Figura 10. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI.** O valor de P foi <0,0001, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0125** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** P<0,001 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250**

e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0250** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** P<0,01 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001.....81

Figura 11. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi <0,0001, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** * P<0,05, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** P<0,01 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72P. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** P<0,001 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001.....82

Figura 12. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 57A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi <0,0001, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** * P<0,05 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** ** P<0,01. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 102A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0001 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0250** * P<0,05, **PEAD vs PEAD.CI.0500** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *

P<0,05 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** ** P<0,01.....83

Figura 13. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250 e PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL15. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0007, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0125** * P<0,05, **PEAD vs PEAD.CI.0250** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** ** P<0,01, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** P<0,01 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250 e PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL16. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0002 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0500** * P<0,05, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** * P<0,05 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001.....84

Figura 14. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250 e PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC750. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0491, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0125** * P<0,05, **PEAD vs PEAD.CI.0500** * P<0,05 e **PEAD vs PEAD.MeS.0125** * P<0,05. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250 e PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC950. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PEAD.SI. PEAD vs PEAD.CI.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** P<0,001, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** P<0,001 e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** P<0,001.....85

Figura 15. Micrografias de MEV do (A) **PEAD** (com formação de biofilme), (B) **PEAD.CI.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme) e (C) **PEAD.MeS.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 2 µm.....86

Figura 16. Citotoxicidade do **C₄MImCl** após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).....87

Figura 17. Citotoxicidade do **C₁₀MImCl** após 24 hs (barras cinzas

escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).....	87
Figura 18. Citotoxicidade do (C₁₀)₂MImCl após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).....	88
Figura 19. Citotoxicidade do C₁₆MImCl após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).....	88
Figura 20. Citotoxicidade do C₁₆MImMeS após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).....	89
Figura 21. Micrografias de Microscopia Confocal do (A) PEAD , (B) PEAD.CI.0125 , (C) PEAD.CI.0250 , (D) PEAD.CI.0500 , (E) PEAD.MeS.0125 , (F) PEAD.MeS.0250 e (G) PEAD.MeS.0500 (barra de escala = 100 µm), após crescimento celular das CTMh nos biomateriais de PEAD com e sem os SI.....	90
Figura 22. Adesão celular de CTMh, após 48 hs de incubação (Ensaio do Azul de Alamar), sobre os filmes de PEAD . Como controle da viabilidade (100%) das células foi utilizada as CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos.....	91
Figura 23. Proliferação celular de CTMh em 7 (barras azuis), 10 (barras vermelhas), 14 (barras verdes) e 21 dias (barras roxas) de tempo de cultivo (Ensaio do Azul de Alamar) sobre os filmes de PEAD.....	92
Figura 24. Avaliação histopatológica de pele de orelha de suíno em contato com filmes de PEAD com SI (C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS) e tratada com solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 (controle negativo em aumentos de 100 e 400 vezes de magnitude): Aumento de 100 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (1A) tampão PBS pH 7,0; (1B) PEAD ; (1C) PEAD.CI.0250 ; (1D) PEAD.CI.0500 ; (1E) PEAD.MeS.0250 ; e (1F) PEAD.MeS.0500 . Aumento de 400 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (2A) tampão PBS pH 7,0; (2B) PEAD ; (2C) PEAD.CI.0250 ; (2D) PEAD.CI.0500 ; (2E) PEAD.MeS.0250 ; e (2F) PEAD.MeS.0500	93
Figura 25. Micrografias de MEV do (A) PEAD ; (B) PEAD.CI.0500 ; e (C) PEAD.MeS.0500 (barra de escala = 1 µm).....	93
Figura 26. Difrátogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 6-30°: PEAD (linha preta); PEAD.CI.0125 (linha vermelha); PEAD.CI.0250 (linha azul) e PEAD.CI.0500 (linha verde).....	94
Figura 27. Difrátogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 6-30: PEAD (linha preta); PEAD.MeS.0125 (linha vermelha); PEAD.MeS.0250 (linha azul) e PEAD.MeS.0500 (linha verde).....	95
Figura 28. Ângulos de contato de água para filmes de PEAD: PEAD.CI (quadro preto) e PEAD.MeS (ciclo vermelho).....	98
Figura 29. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10 ⁻¹ , dos biomateriais de PHB , PHB.CI.0125 , PHB.CI.0250 , PHB.CI.0500 , PHB.MeS.0125 , PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 72A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de PHB.SI . O valor de P foi <0,0001, considerado muito significativo para todos os biomateriais de PHB.SI . PHB vs PHB.CI.0125 *** P<0,05, PHB vs PHB.CI.0250 *** P<0,05, PHB vs PHB.CI.0500 *** P<0,05, PHB vs PHB.MeS.0125 *** P<0,05, PHB vs PHB.MeS.0250 *** P<0,05 e PHB vs PHB.MeS.0500 *** P<0,05. (B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida	

<p> pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1}, dos biomateriais de PHB, PHB.CI.0250 e PHB.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida albicans</i> CA04. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de PHB.SI. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0250 *** $P<0,05$ e PHB vs PHB.MeS.0250 *** $P<0,05$..... </p>	100
<p> Figura 30. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1}, dos biomateriais de PHB, PHB.CI.0250 e PHB.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida parapsilosis</i> RL11. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de PHB.SI. O valor de P foi 0,0022, considerado significativo para os biomateriais de PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0250 ** $P<0,05$ e PHB vs PHB.MeS.0250 *. (B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1}, dos biomateriais de PHB, PHB.CI.0250 e PHB.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida parapsilosis</i> RL20. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de PHB.SI. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0250 *** $P<0,05$ e PHB vs PHB.MeS.0250 *** $P<0,05$..... </p>	101
<p> Figura 31. Ensaio <i>in vitro</i> Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para PHB.CI.0125 (barras azuis); PHB.CI.0250 (barras vermelhas); e PHB.CI.0500 (barras verdes)..... </p>	103
<p> Figura 32. Ensaio <i>in vitro</i> Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para PHB.MeS.0125 (barras azuis); PHB.MeS.0250 (barras vermelhas); e PHB.MeS.0500 (barras verdes)..... </p>	103
<p> Figura 33. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 17P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de PHB.SI. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.CI.0250 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.CI.0500 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.MeS.0125 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.MeS.0250 *** $P<0,001$ e PHB vs PHB.MeS.0500 *** $P<0,001$. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 94P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de PHB.SI. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.CI.0250 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.CI.0500 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.MeS.0125 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.MeS.0250 *** $P<0,001$ e PHB vs PHB.MeS.0500 *** $P<0,001$..... </p>	104
<p> Figura 34. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, </p>	

representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** ** $P<0,01$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$ 105

Figura 35. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi 0,0007, considerado significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** * $P<0,05$, **PHB vs PHB.CI.0250** ** $P<0,01$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** * $P<0,05$, **PHB vs PHB.MeS.0250** ** $P<0,01$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$ 106

Figura 36. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 57A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi 0,0005 considerado significativo para os

biomateriais de **PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125** ** $P < 0,01$, **PHB vs PHB.CI.0250** ** $P < 0,01$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** ** $P < 0,01$.

(B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 102A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$107

Figura 37. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL15. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$.

(B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL16. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125** ** $P < 0,01$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** * $P < 0,05$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$108

Figura 38. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC750. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI. PHB vs PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$.

(B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500** frente

ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> ATCC950. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de PHB.SI . O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de PHB.SI . PHB vs PHB.CI.0125 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.CI.0250 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.CI.0500 *** $P<0,001$, PHB vs PHB.MeS.0125 *** $P<0,001$ e PHB vs PHB.MeS.0250 *** $P<0,001$	109
Figura 39. Micrografias de MEV do (A) PHB (biofilme formado), (B) PHB.CI.0500 (sem crescimento fúngico e de biofilme) e (C) PHB.MeS.0500 (sem crescimento fúngico e de biofilme); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A: Barra de escala = 2 μm	110
Figura 40. Micrografias de Microscopia Confocal do (A) PHB e (B) PHB.CI.0250 (barra de escala = 200 μm), após crescimento celular.....	111
Figura 41. Adesão celular de CTMh, após 48 hs de incubação (Ensaio do Azul de Alamar), sobre os filmes de PHB. Como controle da viabilidade (100%) das células foi utilizada as CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos.....	111
Figura 42. Proliferação celular de CTMh em 7 (barras azuis), 10 (barras vermelhas), 14 (barras verdes) e 21 dias (barras roxas) de tempo de cultivo (Ensaio do Azul de Alamar) sobre os filmes de PHB.....	112
Figura 43. Avaliação histopatológica de pele de orelha de suíno em contato com filmes de PHB com SI ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$) e tratada com solução tampão PBS pH 7,0 (controle negativo em aumentos de 100 e 400 vezes de magnitude): Aumento de 100 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (1A) tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0; (1B) PHB ; (1C) PHB.CI.0250 ; (1D) PHB.CI.0500 ; (1E) PHB.MeS.0250 ; e (1F) PHB.MeS.0500 . Aumento de 400 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (2A) tampão PBS pH 7,0; (2B) PHB ; (2C) PHB.CI.0250 ; (2D) PHB.CI.0500 ; (2E) PHB.MeS.0250 ; e (2F) PHB.MeS.0500	113
Figura 44. Micrografias de MEV do (A) PHB ; (B) PHB.CI.0500 ; e (C) PHB.MeS.0500 (barra de escala = 1 μm).....	113
Figura 45. Imagem de MFA do PHB (R_a = Rugosidade média aritmética em nm).....	114
Figura 46. Difrátogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 5-45°: PHB (linha preta); PHB.CI.0125 (linha vermelha); PHB.CI.0250 (linha azul) e PHB.CI.0500 (linha verde).....	115
Figura 47. Difrátogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 5-45°: PHB (linha preta); PHB.MeS.0125 (linha vermelha); PHB.MeS.0250 (linha azul) e PHB.MeS.0500 (linha verde).....	115
Figura 48. Ângulos de contato de água para filmes de PHB: PHB.CI (quadro preto) e PHB.MeS (ciclo vermelho).....	118
Figura 49. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de PLA , PLA.CI.0125 , PLA.CI.0250 , PLA.CI.0500 , PLA.MeS.0125 , PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 72A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de PLA.SI . O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de PLA.SI . PLA vs PLA.CI.0125 *** $P<0,05$, PLA vs PLA.CI.0250 *** $P<0,05$, PLA vs PLA.CI.0500 *** $P<0,05$,	

PLA vs PLA.MeS.0125 *** P<0,05, PLA vs PLA.MeS.0250 *** P<0,05 e PLA vs PLA.MeS.0500 *** P<0,05. (B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10⁻¹, dos biomateriais de PLA, PLA.CI.0250 e PLA.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida albicans</i> CA04. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 12 amostras de PLA.SI. O valor de P foi 0,0001 considerado muito significativo para todos os biomateriais de PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0250 *** P<0,05 e PLA vs PLA.MeS.0250 *** P<0,05.....	120
Figura 50. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10⁻¹, dos biomateriais de PLA, PLA.CI.0250 e PLA.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida parapsilosis</i> RL11. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 12 amostras de PLA.SI. O valor de P foi 0,0003 considerado significativo para os biomateriais de PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0250 ** P<0,05 e PLA vs PLA.MeS.0250 *** P<0,05. (B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10⁻¹, dos biomateriais de PLA, PLA.CI.0250 e PLA.MeS.0250 frente ao isolado de <i>Candida parapsilosis</i> RL20. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 12 amostras de PLA.SI. O valor de P foi 0,0002 considerado muito significativo para todos os biomateriais de PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0250 *** P<0,05 e PLA vs PLA.MeS.0250 *** P<0,05.....	121
Figura 51. Ensaio <i>in vitro</i> Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para PLA.CI.0125 (barras azuis); PLA.CI.0250 (barras vermelhas); e PLA.CI.0500 (barras verdes).....	123
Figura 52. Ensaio <i>in vitro</i> Menor Concentração Antibiofilme(Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para PLA.MeS.0125 (barras azuis); PLA.MeS.0250 (barras vermelhas); e PLA.MeS.0500 (barras verdes).....	123
Figura 53. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 17P. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de PLA.SI. O valor de P foi <0,0001 considerado significativo para os biomateriais de PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125 *** P<0,001, PLA vs PLA.CI.0250 *** P<0,001, PLA vs PLA.CI.0500 *** P<0,001, PLA vs PLA.MeS.0250 *** P<0,001 e PLA vs PLA.MeS.0500 *** P<0,001. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> 94P. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de PLA.SI. O valor de P foi 0,0004 considerado significativo para os biomateriais de PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125 ** P<0,01, PLA vs PLA.CI.0250 ** P<0,01, PLA vs PLA.CI.0500 *** P<0,001, PLA vs PLA.MeS.0250 ***	

P<0,001 e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** P<0,001.....124

Figura 54. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi <0,0001, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0250** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0500** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** P<0,001 e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** P<0,001. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0250** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0500** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** P<0,001 e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** P<0,001.....125

Figura 55. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0250** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0500** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** P<0,001 e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** P<0,001. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72P. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0250** *** P<0,001, **PLA vs PLA.CI.0500** *** P<0,001, **PLA vs PLA.MeS.0125** ** P<0,01, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** P<0,001 e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** P<0,001.....126

Figura 56. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 57A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi <0,0001 considerado muito significativo

para todos os biomateriais de **PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P < 0,001$. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 102A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** ** $P < 0,01$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P < 0,001$127

Figura 57. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL15. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P < 0,001$. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL16. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P < 0,001$128

Figura 58. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC750. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI. PLA vs PLA.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P < 0,001$. (B) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorvância dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250 e**

PLA.MeS.0500 frente ao isolado de <i>Candida tropicalis</i> ATCC950. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de PLA.SI . O valor de P foi <0,0001 considerado muito significativo para todos os biomateriais de PLA.SI . PLA vs PLA.CI.0125 *** P<0,001, PLA vs PLA.CI.0250 *** P<0,001, PLA vs PLA.CI.0500 *** P<0,001, PLA vs PLA.MeS.0125 *** P<0,001, PLA vs PLA.MeS.0250 *** P<0,001 e PLA vs PLA.MeS.0500 *** P<0,001.....	129
Figura 59. Micrografias de MEV do (A) PLA (biofilme formado), (B) PLA.CI.0500 (sem crescimento fúngico e de biofilme) e (C) PLA.MeS.0500 (sem crescimento fúngico e de biofilme); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A: Barra de escala = 2 µm.....	130
Figura 60. Micrografias de Microscopia Confocal do (A) PLA ; (B) PLA.CI.0125 ; (C) PLA.CI.0250 ; (D) PLA.CI.0500 ; (E) PLA.MeS.0125 ; (F) PLA.MeS.0250 ; e (G) PLA.MeS.0500 (barra de escala = 100 µm), após crescimento celular.....	131
Figura 61. Adesão celular de CTMh, após 48 hs de incubação (Ensaio do Azul de Alamar), sobre os filmes de PLA. Como controle da viabilidade (100%) das células foi utilizada as células CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos.....	132
Figura 62. Proliferação celular de CTMh em 7 (barras azuis), 14 (barras vermelhas) e 21 dias (barras verdes) de tempo de cultivo (Ensaio do Azul de Alamar) sobre os filmes de PLA.....	133
Figura 63. Avaliação histopatológica de pele de orelha de suíno em contato com filmes de PLA com SI (C ₁₆ MImCl e C ₁₆ MImMeS) e tratada com solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 (controle negativo em aumentos de 100 e 400 vezes de magnitude): Aumento de 100 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (1A) tampão PBS pH 7,0; (1B) PLA ; (1C) PLA.CI.0250 ; (1D) PLA.CI.0500 ; (1E) PLA.MeS.0250 ; e (1F) PLA.MeS.0500 . Aumento de 400 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (2A) tampão PBS pH 7,0; (2B) PLA ; (2C) PLA.CI.0250 ; (2D) PLA.CI.0500 ; (2E) PLA.MeS.0250 ; e (2F) PLA.MeS.0500	134
Figura 64. Micrografias de MEV do (A) PLA (barra de escala = 100 µm); (B) PLA (barra de escala = 2 µm); (C) PLA.CI.0125 (barra de escala = 2 µm); (D) PLA.CI.0250 (barra de escala = 2 µm); (E) PLA.CI.0500 (barra de escala = 100 µm); (F) PLA.CI.0500 (barra de escala = 2 µm); (G) PLA.CI.2000 (barra de escala = 100 µm); (H) PLA.CI.2000 (barra de escala = 2 µm); (I) PLA.CI.5000 (barra de escala = 100 µm); (J) PLA.CI.5000 (barra de escala = 2 µm); (K) PLA.CI.10000 (barra de escala = 100 µm); (L) PLA.CI.10000 (barra de escala = 2 µm).....	136
Figura 65. Micrografias de MEV do (A) PLA (barra de escala = 100 µm); (B) PLA (barra de escala = 2 µm); (C) PLA.MeS.0125 (barra de escala = 2 µm); (D) PLA.MeS.0250 (barra de escala = 100 µm); (E) PLA.MeS.0250 (barra de escala = 2 µm); (F) PLA.MeS.0500 (barra de escala = 100 µm); (G) PLA.MeS.0500 (barra de escala = 2 µm); (H) PLA.MeS.2000 (barra de escala = 100 µm); (I) PLA.MeS.2000 (barra	

de escala = 2 μm); (J) PLA.MeS.5000 (barra de escala = 100 μm); (K) PLA.MeS.5000 (barra de escala = 2 μm); (L) PLA.MeS.10000 (barra de escala = 2 μm).....	137
Figura 66. Imagens de MFA do PLA , PLA.CI.0125 e PLA.CI.0500 (R_a = Rugosidade média aritmética).....	138
Figura 67. Imagens de MFA do PLA , PLA.MeS.0250 , PLA.MeS.0500 , PLA.MeS.2000 e PLA.MeS.5000 (R_a = Rugosidade média aritmética).....	139
Figura 68. Difratoformas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 12-31°: PLA (linha preta); PLA.CI.0125 (linha vermelha); PLA.CI.0250 (linha azul); PLA.CI.0500 (linha verde); PLA.CI.2000 (linha rosa); PLA.CI.5000 (linha amarela escura); e PLA.CI.10000 (linha azul marinho).....	140
Figura 69. Difratoformas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 6-25°: PLA (linha preta); PLA.MeS.0125 (linha vermelha); PLA.MeS.0250 (linha azul); PLA.MeS.0500 (linha verde); PLA.MeS.2000 (linha rosa); PLA.MeS.5000 (linha amarela escura); e PLA.MeS.10000 (linha azul marinho).....	141
Figura 70. Identificações atômicas para PLA e C₁₆MImMeS usadas nas análises de EFEX. EFEX do PLA : regiões de (A) C 1s e (B) O 1s. EFEX do PLA.MeS.10000 : regiões de (C) C 1s, (D) O 1s, (E) N 1s e (F) S 2p.....	145
Figura 71. Análise de superfície através de MEV/EDS do (A) PLA.CI.10000 –Átomo de oxigênio = vermelho – Átomo de cloro = verde; e do (B) PLA.MeS.10000 – Átomo de oxigênio = amarelo – Átomo de enxofre = vermelho.....	146
Figura 72. Ângulos de contato de água relacionado ao teor do SI: PLA.CI (quadro preto) e PLA.MeS (ciclo vermelho).....	147
Figura 73. Micrografias de MEV do (A) PEAD (células leveduriformes) (barra de escala = 100 μm), (B) PEAD (biofilme formado) (barra de escala = 100 μm), (C) PEAD (biofilme formado) (barra de escala = 10 μm) e (D) PEAD (biofilme formado com matriz polimérica extracelular) (barra de escala = 2 μm); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A.....	170
Figura 74. Micrografias de MEV do (A) PEAD , (B) PEAD.CI.0500 e (C) PEAD.MeS.0500 ; após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A: Barra de escala = 100 μm	170
Figura 75. Micrografias de MEV do (A) PHB (biofilme formado) (barra de escala = 100 μm), (B) PHB (biofilme formado) (barra de escala = 10 μm) e (C) PHB (biofilme formado com matriz polimérica extracelular) (barra de escala = 2 μm); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A.....	171
Figura 76. Micrografias de MEV do (A) PHB , (B) PHB.CI.0500 e (C) PHB.MeS.0500 ; após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A: Barra de escala = 100 μm	171
Figura 77. Micrografias de MEV do (A) PLA (células leveduriformes) (barra de escala = 100 μm), (B) PLA (biofilme formado) (barra de escala = 10 μm) e (C) PLA (biofilme formado com matriz polimérica extracelular) (barra de escala = 2 μm); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A.....	171

Figura 78. Micrografias de MEV do (A) PLA , (B) PLA.CI.0500 e (C) PLA.MeS.0500 ; após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme <i>C. tropicalis</i> 72A: Barra de escala = 100 µm.....	171
Figura 79. Micrografia de MEV do PLA.CI.0500 (barra de escala = 100 µm).....	172
Figura 80. Micrografia de MEV do PLA.CI.0500 (barra de escala = 2 µm).....	172
Figura 81. Micrografia de MEV do PLA.CI.2000 (barra de escala = 100 µm).....	173
Figura 82. Micrografia de MEV do PLA.CI.5000 (barra de escala = 100 µm).....	173
Figura 83. Micrografia de MEV do PLA.CI.10000 (barra de escala = 100 µm).....	174
Figura 84. Micrografia de MEV do PLA.MeS.0250 (barra de escala = 100 µm).....	174
Figura 85. Micrografia de MEV do PLA.MeS.0250 (barra de escala = 2 µm).....	175
Figura 86. Micrografia de MEV do PLA.MeS.0500 (barra de escala = 100 µm).....	175
Figura 87. Micrografia de MEV do PLA.MeS.0250 (barra de escala = 100 µm).....	176
Figura 88. Micrografia de MEV do PLA.MeS.2000 (barra de escala = 100 µm).....	176
Figura 89. Micrografia de MEV do PLA.MeS.2000 (barra de escala = 2 µm).....	177
Figura 90. Curvas de DSC: PEAD (linha preta), PEAD.CI.0125 (linha vermelha); PEAD.MeS.0125 (linha azul); PEAD.CI.0250 (linha verde); PEAD.MeS.0250 (linha rosa); PEAD.CI.0500 (linha amarela escura) e PEAD.MeS.0500 (linha azul marinho).....	177
Figura 91. Curvas de DSC: PHB (linha preta), PHB.CI.0125 (linha vermelha); PHB.MeS.0125 (linha azul); PHB.CI.0250 (linha verde); PHB.MeS.0250 (linha rosa); PHB.CI.0500 (linha amarela escura) e PHB.MeS.0500 (linha azul marinho).....	178
Figura 92. Curvas de DSC das amostras de PLA com (A) C₁₆MImCl : PLA (linha preta), PLA.CI.0125 (linha vermelha); PLA.CI.0250 (linha azul); PLA.CI.0500 (linha ciano escuro); PLA.CI.2000 (linha rosa); PLA.CI.5000 (linha amarela escura) e PLA.CI.10000 (linha azul marinho); e (B) com C₁₆MImMeS : PLA (linha preta), PLA.MeS.0125 (linha vermelha); PLA.MeS.0250 (linha azul); PLA.MeS.0500 (linha ciano escuro); PLA.MeS.2000 (linha rosa); PLA.MeS.5000 (linha amarela escura) e PLA.MeS.10000 (linha azul marinho).....	179
Figura 93. Curvas de ATG: PEAD (linha preta), PEAD.CI.0125 (linha vermelha); PEAD.MeS.0125 (linha azul); PEAD.CI.0250 (linha verde); PEAD.MeS.0250 (linha rosa); PEAD.CI.0500 (linha amarela escura) e PEAD.MeS.0500 (linha azul marinho).....	180
Figura 94. Curvas de ATG: PHB (linha preta), PHB.CI.0125 (linha vermelha); PHB.MeS.0125 (linha azul); PHB.CI.0250 (linha verde); PHB.MeS.0250 (linha rosa); PHB.CI.0500 (linha amarela escura) e PHB.MeS.0500 (linha azul marinho).....	180

Figura 95. Curvas de ATG das amostras de PLA com C ₁₆ MImCl: PLA (linha preta), PLA.CI.0125 (linha vermelha); PLA.CI.0250 (linha azul); PLA.CI.0500 (linha ciano escuro); PLA.CI.2000 (linha rosa); PLA.CI.5000 (linha amarela escura) e PLA.CI.10000 (linha azul marinho).....	181
Figura 96. Curvas de ATG das amostras de PLA com C ₁₆ MImCl: PLA (linha preta), PLA.MeS.0125 (linha vermelha); PLA.MeS.0250 (linha azul); PLA.MeS.0500 (linha ciano escuro); PLA.MeS.2000 (linha rosa); PLA.MeS.5000 (linha amarela escura) e PLA.MeS.10000 (linha azul marinho).....	181
Figura 97. Módulo de armazenamento (A), módulo de perda (B) e rigidez (C): PEAD (linha preta); PEAD.CI.0125 (linha vermelha); PEAD.MeS.0125 (linha azul); PEAD.CI.0250 (linha ciano escuro); PEAD.MeS.0250 (linha rosa); PEAD.CI.0500 (linha amarelo escuro) e PEAD.MeS.0500 (linha azul marinho).....	182
Figura 98. Módulo de armazenamento (A), tan delta (B), módulo de perda (C) e rigidez (D): PHB (linha preta); PHB.CI.0125 (linha vermelha); PHB.MeS.0125 (linha azul); PHB.CI.0250 (linha ciano escuro); PHB.MeS.0250 (linha rosa); PHB.CI.0500 (linha amarelo escuro) e PHB.MeS.0500 (linha azul marinho).....	183
Figura 99. Módulo de armazenamento (A e D), módulo de perda (B e E) e rigidez (C e F): A-C: PLA (linha preta); PLA.CI.2000 (linha vermelha); PLA.CI.5000 (linha azul) e PLA.CI.10000 (linha ciano escuro). D-F: PLA (linha preta); PLA.MeS.2000 (linha vermelha); PLA.MeS.5000 (linha azul) e PLA.MeS.10000 (linha ciano escuro).....	183

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Ácido Polilático
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
SI	Sais Imidazólicos
LI	Líquidos Iônicos
C ₁₆ MImCl	Cloreto de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólico
C ₁₆ MImMeS	Metanossulfonato de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólico
MCA	Menor Concentração Antibiofilme
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleíco
pO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
QS	Quorum Sensing
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CYP51	14- α -Esterol demetilase
DIU	Dispositivos Intrauterinos
PU	Poliuretanos
PGA	Poli(Ácido Glicólico)
PCL	Poli(Caprolactona)
PLGA	Copolímeros dos Ácidos Lático e Glicólico
PHA	Poliésteres de Hidroxiácidos
PAA	Poli(Ácido Acrílico)
PEO	Poli(Óxido de Etileno)
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Poli(Vinil Pirrolidona)
PEGF	Ésteres de Poliglicerol de Ácidos Graxos
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
FDA	Food and Drug Administration
PEVA	Polietileno-co-Acetato de Vinila

PVA	Poli(Álcool Vinílico)
PP	Polipropileno
PHEMA	Poli(Metacrilato de 2-Hidroxietila)
PAN	Poliacrilonitrila
PAMAM	Poli(Amidoamina)
PPI	Poli(Imina Propileno)
PEHAM	Poli(Éter Hidroxilamina)
AL	Ácido Lático
PS	Poliestireno
PET	Politereftalato de Etileno
PA	Poliamida
MEV/EDS	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia
MFA	Microscopia de Força Atômica
Å	Angstrons
DRX	Análises de Difração de Raios X
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
DSC	Calorimetria Diferencial por Varredura
T _g	Temperatura de Transição Vítrea
T _m	Temperatura de Fusão
T _c	Temperatura de Cristalização
X _c	Porcentual de Cristalinidade
ΔH _f	Entalpia de Fusão
ATG	Análises Termogravimétricas
ADM	Análises Dinâmico-Mecânicas
E	Módulo Elástico
tan δ	Fator de Perda
EFEX	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X
BF ₄ ⁻	Ânion tetrafluoroborato
F ₃ (SO ₂) ₂ N ⁻	Ânion bis(trifluorometanosulfonil)imida
H ₃ CSO ₃ ⁻	Ânion metanossulfonato
PF ₆ ⁻	Ânion hexafluorofosfato
C ₁₂ MImBF ₄	Tetrafluoroborato de 1- <i>n</i> -dodecil-3-metilimidazólico
β-CD	β-Ciclodextrina

TBA	Terapia de Bloqueio Antifúngica
CIMs	Concentração Inibitória Mínima de Células Sésseis
IDSA	Infectious Disease Society of America
Ti/SiO ₂	Compósito de Titânio e Sílica
AgNP	Nanopartículas de Prata
TECNOCAT	Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise
PNCq	Programa Nacional de Controle de Qualidade
ATCC	American Type Culture Collection
TSB	Caldo Triptona de Soja
UV	Ultravioleta
Log	Logaritmo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/Cm ²	Unidades Formadoras de Colônia por Centímetro ao Quadrado
RPMI	Culture Medium Roswell Park Memorial Institute
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio
DMEM	Culture Medium Dulbeccos's Modified Eagle's
FMN	Desidrogenase Flavina Mononucleotídeo
FAD	Desidrogenase Flavina Adenina Dinucleotídeo
NAD	Desidrogenase Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina
α-MEM	Meio Eagle's Alpha Minimum Essential
CMM	Centro de Microscopia e Microanálise
T _d	Temperatura de Degradação
C ₄ MImCl	Cloreto de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólico
C ₁₀ MImCl	Cloreto de 1- <i>n</i> -decil-3-metilimidazólico
(C ₁₀) ₂ MImCl	Cloreto de 1,3-di- <i>n</i> -decil-2-metilimidazólico
CTMh	Células-Tronco Mesenquimais Humanas
PBS	Tampão Fosfato Salino
hs	Horas
min	Minutos
rpm	Rotação por Minuto
kgf	Quilogramas Força
log M	Média Logarítmica
M _w	Massas Molares Média em Massa
M _n	Massas Molares Média em Número

PDI

Índice de Polidispersão (M_w/M_n)

MUMIC

Grupo Multidisciplinar em Química Médica e Microbiológica

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* (principalmente *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*) têm grande habilidade para colonizar e formar biofilmes em dispositivos médicos (Liu et al., 2015; Seddiki et al., 2015), como por exemplo, em catéteres (Oncu, 2014), próteses (Fox et al., 2015) e implantes (Dias et al., 2015), provocando infecções nos hospedeiros humanos (Ramage et al., 2009; Cruz et al., 2012; Ramage et al., 2005; Costa et al., 2013). A fim de, resolver este grave problema de saúde pública, busca-se alternativas como o desenvolvimento de biomateriais com atividade antibiofilme e propriedades avançadas, utilizando o PEAD, PHB e PLA com sais imidazólicos (Ramage et al., 2009; Cruz et al., 2012).

O Polietileno de Alta Densidade (PEAD), Polihidroxitirato (PHB) e o Ácido Polilático (PLA) apresentam propriedades interessantes para aplicações em biomateriais como dispositivos médicos. O PEAD é altamente cristalino, a linearidade da cadeia faz com que a orientação, alinhamento e empacotamento das cadeias sejam mais eficientes, proporcionando maior cristalinidade e densidade ao polímero. O PEAD apresenta excelentes propriedades mecânicas e biológicas, o que faz deste polímero ser extremamente adequado para aplicações médicas (Pourdanesh et al. 2014).

O PHB é um poliéster alifático da classe dos polihidroxicanoatos, o qual pode ser produzido por mais de 300 espécies de bactérias, sendo um polímero biodegradável e biocompatível (Xavier et al., 2015). Além disso, o PHB tem ótimas propriedades elastoméricas (Xavier et al., 2015), estabilidade mecânica (Chen & Wu, 2015), atividade antimicrobiana (Fan et al., 2015), antifúngica (Kulma et al., 2015) e antitrombogênica (Fan et al., 2015).

O PLA apresenta características únicas, que incluem biodegradabilidade (Davachi & Kaffashi, 2015), biocompatibilidade (Bishai et al., 2014), ótima processabilidade termoplástica (Davachi & Kaffashi, 2015) e ecologicamente benigno (Davachi & Kaffashi, 2015). O PLA apresenta ótimas propriedades mecânicas e biológicas (Hamad et al., 2015), sendo um polímero muito utilizado como biomaterial (Davachi & Kaffashi, 2015).

A incorporação de aditivos nos polímeros em dispositivos médicos temporários ou permanentes pode ser usada para reduzir infecções ou para melhorar a aceitação do material orgânico implantado, minimizando a possibilidade

de rejeição (Sobczac et al., 2013; Siedenbiedel & Tiller, 2012). Os sais imidazólicos (SI) são derivados catiônicos do heterocíclico imidazol neutro e são conhecidos por apresentarem várias propriedades avançadas, podendo ser utilizados como aditivos nos polímeros PEAD, PHB e PLA (Borowiecki et al., 2013; Schrekker et al., 2008). Muitos destes SI podem ser classificados como líquidos iônicos (LI) por apresentarem-se no estado fundido a 100 °C. Os SI são substâncias atrativas para várias aplicações químicas e farmacêuticas, sendo que as propriedades físicas e químicas podem ser ajustadas através de modificações estruturais, tanto no cátion como no ânion (Schrekker et al., 2013; Riduan & Zhang, 2013), ou por incorporação de um grupo funcional específico nos íons constituintes (Pendleton & Gilmore, 2015).

Aproximadamente 65% das infecções humanas causadas por *Candida* spp. envolvem a formação de biofilmes, os quais estão relacionados ao aumentado uso de dispositivos médicos que contribuem para o desenvolvimento de infecções nosocomiais, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Wisplinghoff et al., 2014; Pannanusorn et al., 2013). Geralmente, a erradicação *in vivo* do biofilme requer a administração de agentes antimicrobianos e antifúngicos em concentrações tóxicas (Azizi et al., 2015), além disso, os biofilmes de *Candida* são resistentes aos agentes antifúngicos mais comumente utilizados, como anfotericina B e azóis. Então, o tratamento recomendado inclui a remoção do dispositivo médico contaminado, sendo que este processo pode resultar em complicações médicas que podem ocasionar o óbito do paciente. (Morace et al., 2014; Ramage et al., 2014; Coad et al., 2014).

Neste contexto, o desenvolvimento de novos biomateriais que apresentem propriedades antibiofilme, biocompatibilidade celular e boas propriedades químicas é de extrema importância. Desta forma, neste estudo foi utilizado o PEAD, PHB e PLA, com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** como aditivos em diferentes teores, a fim de verificar a atividade antibiofilme frente espécies patogênicas de *Candida*. Além disso, foram estudados a citotoxicidade dos SI e a biocompatibilidade dos polímeros com SI, realizou-se uma avaliação histopatológica em pele suína com os polímeros com SI e foi avaliado o efeito da incorporação dos SI nos polímeros, na hidrofobicidade e morfologia de superfície e nas propriedades térmicas e dinâmico-mecânicas, a fim de obter-se biomateriais para serem utilizados no desenvolvimento de dispositivos médicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O desenvolvimento de um polímero com sal imidazólico que possua propriedades antibiofilme frente as espécies patogênicas de *Candida*, apresentando biocompatibilidade celular, sendo não citotóxico, com propriedades físico-químicas e mecânicas avançadas e que possa ser utilizado na confecção de dispositivos médicos mais seguros e eficientes.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Mimetizar *in vitro* as condições de formação do biofilme fúngico leveduriforme nos polímeros e testar a capacidade antibiofilme dos polímeros com SI.

2.2.2 Determinar, *in vitro*, a capacidade de impedimento da formação de biofilme dos polímeros, em espécies de *Candida* através da técnica de microplaca denominada Menor Concentração Antibiofilme (MCA).

2.2.3 Caracterização morfológica da ação antibiofilme dos polímeros com SI sobre a superfície das células de *Candida* spp. através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2.2.4 Avaliar a citotoxicidade dos SI em células de fibroblastos de camundongos e a biocompatibilidade celular dos polímeros com SI em Células-Tronco Mesenquimais Humanas (CTMh).

2.2.5 Avaliação histopatológica aguda da pele de orelha de suínos em contato com os polímeros modificados com SI.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biofilmes

Os biofilmes estão envolvidos em uma grande variedade de infecções microbianas do ser humano. Por definição, os biofilmes são comunidades biológicas complexas de micro-organismos, com um elevado grau de organização, caracterizadas por células que estão aderidas a uma superfície ou interface e embebidas em uma matriz extracelular de substâncias extrapoliméricas de origem microbiana produzindo uma estrutura tridimensional organizada espacialmente (Ramage et al., 2014; Jass et al., 2003).

Além disso, os biofilmes são constituídos por células microbianas que exibem um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes quando comparadas as células livres e pela substância extracelular polimérica, também denominada matrix extracelular que pode corresponder de 50 % a 90 % do total de carbono orgânico do biofilme e ser considerada como a estrutura mais abundante no biofilme, podendo variar de acordo com suas propriedades químicas e físicas. A variabilidade fenotípica pode ser caracterizada pela alta frequência, reversibilidade e por demonstrar diferenças nas propriedades de superfície celular e nos aspectos morfológicos das colônias fúngicas. Como consequência, leva a alteração na aderência às células epiteliais, na suscetibilidade antifúngica, na atividade fungicida de neutrófilos. Ocorrendo mudanças no comportamento da superfície da célula, aparência da colônia e metabolismo, atributos bioquímicos e moleculares para a levedura se tornar mais virulenta e eficaz durante a infecção. A mudança fenotípica é uma parte muito importante da adaptabilidade do patógeno para a mudança de ambiente durante a invasão do organismo humano. A capacidade de infectar muitos tecidos é fundamental para o sucesso do ataque e disseminação dentro do hospedeiro (Seddiki et al., 2015; Ramage et al., 2014; Jass et al., 2003).

Os biofilmes residem em uma matriz feita essencialmente de polissacarídeos, mas contendo também ácido desoxirribonucleíco (DNA) e proteínas. Um biofilme também pode ser considerado um hidrogel, um polímero complexo contendo uma quantidade de água que corresponde a várias vezes seu peso seco. Uma comunicação química entre as células, chamada *quorum sensing*, permite aos micro-organismos (bactérias e fungos) coordenarem sua atividade e

agruparem-se em comunidades que fornecem benefícios não muito diferentes daqueles organismos multicelulares (Pannanusorn et al., 2013; Dias et al., 2015).

Portanto, os biofilmes não são somente camadas limosas, mas sistemas biológicos, organizados em uma comunidade funcional coordenada. Esta comunidade pode ser de uma única espécie ou de grupos diversos de micro-organismos. Dentro da comunidade de um biofilme, os micro-organismos são capazes de compartilhar nutrientes e são protegidos de fatores danosos do meio ambiente, como a dessecação. A proximidade estreita entre os micro-organismos dentro do biofilme também pode ter a vantagem de facilitar a transmissão de informação genética por conjugação, por exemplo (Tortora et al., 2012; Cruz et al. 2012).

O biofilme começa a se formar quando um micro-organismo (bactéria ou fungo) livre nadador (planctônico) se fixa em uma superfície. Se este micro-organismo crescesse em uma monocamada uniformemente fina, esta ficaria superlotada, os nutrientes não seriam disponíveis na parte mais profunda e resíduos tóxicos se acumulariam. Os micro-organismos nas comunidades de biofilmes algumas vezes evitam esses problemas formando estruturas em forma de pilares com canais entre eles através dos quais a água pode introduzir nutrientes e retirar resíduos. Isso constitui um sistema circulatório primitivo. Micro-organismos individuais e agregados eventualmente deixam o biofilme formado e se movem para um novo local, para onde o biofilme vai se estender. Esse biofilme geralmente é composto de uma camada superficial de cerca de 10 µm de espessura, com pilares que se elevam até 200 µm acima dela (Lockhart, 2014; Ramage et al., 2009).

Os biofilmes são um importante fator de preocupação para a saúde humana. Por exemplo, as espécies de *Candida* em um biofilme, provavelmente sejam 1.000 vezes mais resistentes aos microbicidas. Especialistas do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimam que 70% das infecções humanas causadas por espécies de *Candida* envolvam a formação de biofilmes. A maioria das infecções nosocomiais (infecções hospitalares) está relacionada à presença de biofilmes nos cateteres médicos (Zambrano et al., 2014; Nett et al., 2014). De fato, os biofilmes se formam em quase todos os dispositivos médicos, incluindo próteses, cateteres, implantes, válvulas mecânicas-cardíacas, entre outros (Seddiki et al., 2015; Ramage et al., 2014). Os biofilmes, que podem incluir aqueles formados por *Candida* spp., são encontrados em muitas doenças, tais como as infecções

relacionadas ao uso de lentes de contato e candidemia (Dias et al., 2015; Ramage et al., 2009).

Uma abordagem para prevenir a formação de biofilme é a aplicação de antimicrobianos e antifúngicos sobre as superfícies nas quais os biofilmes podem se formar. Como os sinais químicos que permitem o *quórum sensing* são essenciais para a formação de biofilmes, pesquisas estão sendo realizadas para esclarecer o funcionamento desses sinais e talvez os bloquear (Fox et al., 2015; Ramage et al., 2014).

3.1.1 Estrutura do Biofilme e Fenótipo

Existe uma grande diversidade de estruturas e arquiteturas no biofilme. Isso é influenciado pelas propriedades físicas (propriedades de superfície, pH, carga) e condições do meio ambiente (temperatura, umidade, etc.), nutrientes e estado fisiológico do micro-organismo e, certamente o conteúdo microbiano. Independente desta diversidade, a estrutura do biofilme tem um número comum de características que têm sido usadas para identificação (Kolecka et al., 2015). As características primárias e comuns do biofilme incluem um substrato para o qual o micro-organismo (bactéria ou fungo) se anexa, um filme condicionado, a matriz do biofilme, e a fase líquida ou gasosa. O substrato pode ser um material abiótico, como plásticos (dispositivos médicos, como por exemplo, cateteres, próteses, etc.), ligas de titânio ou cerâmicas (dental ou implantes ortopédicos) e hidrogéis (lentes de contato). Alternativamente, o substrato pode ser de origem biótica, por exemplo, superfícies de células de tecidos colonizadas por biofilmes de micro-organismos, como os pulmões de pacientes com fibrose cística, tecidos cardíacos em endocardites e células epiteliais da bexiga com cistite (Jass et al., 2003; Madigan et al., 2010).

Na formação do biofilme, primeiramente origina-se uma camada composta de glicoproteínas e lipídios, formada em qualquer material colocado em contato com um ambiente onde haja líquido, como por exemplo, a película formada em superfícies de cateteres a partir de proteínas da urina, que formam um filme e condições para os micro-organismos se aderirem. A natureza da formação do filme é dependente das propriedades do substrato e da composição química do meio líquido e isto influencia o mecanismo envolvido nos eventos de adesão (Ramage et al., 2014; Jass et al., 2003).

A matriz do biofilme é uma parte muito importante desta estrutura, pois contém células microbianas, exopolissacarídeos e água. O maior componente da matriz do biofilme é formado por água e acredita-se que a mesma constitua aproximadamente 95-99% do biofilme. O conteúdo microbiano é somente 2-5%, cercado por exopolissacarídeos que podem atingir até 2% do total da matriz. Outras substâncias também são encontradas na matriz do biofilme, como DNA, RNA, proteínas e enzimas, atingindo níveis de aproximadamente 2% no total (Jass et al., 2003; Tortora et al., 2012; Ramage et al., 2014). Os exopolissacarídeos são altamente hidratados, como biopolímeros gel que imobilizam o micro-organismo criando a estrutura tridimensional característica do biofilme e agregados microbianos. A composição dos exopolissacarídeos é importante não somente para a adesão e estabilização da matriz do biofilme, mas também para criar heterogeneidade e aumentar a disponibilidade de nutrientes dentro do biofilme. Os exopolissacarídeos contém microambientes com carga positiva ou negativa, proporcionando hidrofobicidade com distribuição não uniforme, criando assim nichos especializados dentro do biofilme. Em ambientes ricos de nutrientes, verifica-se que os micro-organismos tendem a aumentar a produção de exopolissacarídeos, juntamente com um aumento no número de células, o que pode levar a estruturas mais densas no biofilme. Sob condições de poucos nutrientes, no entanto, os biofilmes são menos densos e com canais de água mais dispersos, criando uma oportunidade para aumentar a transferência de fluido em massa. As diferentes estruturas descritas acima são o resultado de uma combinação de fatores físicos, disponibilidade de nutrientes e diversidade da população (Jass et al., 2003).

Os biofilmes formados em dispositivos médicos totalmente implantados expostos ao sangue do paciente, incluem na sua estrutura grande parte das proteínas de coagulação do hospedeiro e as células imunológicas que destinam-se a isolar a infecção do resto do corpo. Alternativamente, biofilmes formados em catéteres e lentes de contato serão compostos de proteínas locais do hospedeiro e poucos fatores de coagulação, resultando assim em estruturas muito diferentes. Em biofilmes médicos, pode ser mais apropriado descrevê-los pelo fenótipo microbiano e propriedades fisiológicas, em vez da estrutura que pode variar dependendo da espécie de *Candida* envolvida na formação do biofilme. As estruturas do biofilme são influenciadas pelas propriedades físicas, temperatura, nutrientes, estado fisiológico das leveduras, entre outros fatores (Jass et al., 2003; Ramage et al., 2014).

3.1.2 Formação do Biofilme

A estrutura típica de um biofilme é formada por várias etapas (Figura 1). Inicialmente, uma fixação transitória de células microbianas ocorre (colonizadores primários) devido às interações com os substratos envolvendo flagelos, pili, fímbria, e as proteínas da membrana externa do micro-organismo. Este estágio é seguido por uma fixação permanente das células microbianas para a superfície (Oleskin et al., 2010). Subsequentemente, células microbianas são espalhadas sobre o substrato colonizado. Isto é acompanhado pela formação de agregados celulares locais, com uma matriz intracelular com cavidades características e a cobertura do biofilme incluindo uma parte da matriz, bem como estruturas bicamadas lipídicas (Ramage et al., 2009). O desenvolvimento da maioria dos biofilmes inclui a fase caracterizada pela fixação de novas células microbianas (colonizadores secundários) para o substrato das células primárias, as quais resultam na formação de biofilmes com multicamadas (Jass et al., 2003; Oleskin et al., 2010).

Eventualmente, uma espécie de biofilme único ou múltiplo com uma estrutura desenvolvida é formado; este biofilme pode apresentar uma estrutura lamelar padrão ou conter formações em forma de pilar. A fase final do ciclo de vida de um biofilme é a dispersão a qual ocorre entre 24 e 96 hs (dependendo do isolado de *Candida*, das condições ambientais e dos agentes regulatórios), envolvendo o rompimento das células fixadas no substrato, a qual é causada pela síntese de surfactantes e enzimas que degradam a matriz, incluindo os seus componentes (adesinas) diretamente responsáveis pela fixação das células ao substrato e de uma célula para à outra. A dispersão do biofilme também envolve a supressão das sínteses de novas adesinas (Jass et al., 2003; Oleskin et al., 2010). A dispersão ocorre quando as células microbianas são liberadas para o meio exterior e retornam para o modo de existência planctônico. Acredita-se que à diminuição do oxigênio e dos nutrientes disponíveis no interior do biofilme maduro possa levar à dispersão, mediada por comunicação intercelular, de células-filhas menos aderidas à matriz do biofilme (Ramage et al. 2005).

O processo de formação do biofilme é influenciado por fatores ambientais como por agentes regulatórios formados por células microbianas. Condições de cultivo (pH, temperatura, concentração de nutrientes do substrato, pO₂, osmolaridade, grau de hidrofiliicidade/hidrofobicidade, força de cisalhamento, etc.) produzem seus efeitos nos biofilmes microbianos (Oleskin et al., 2010).

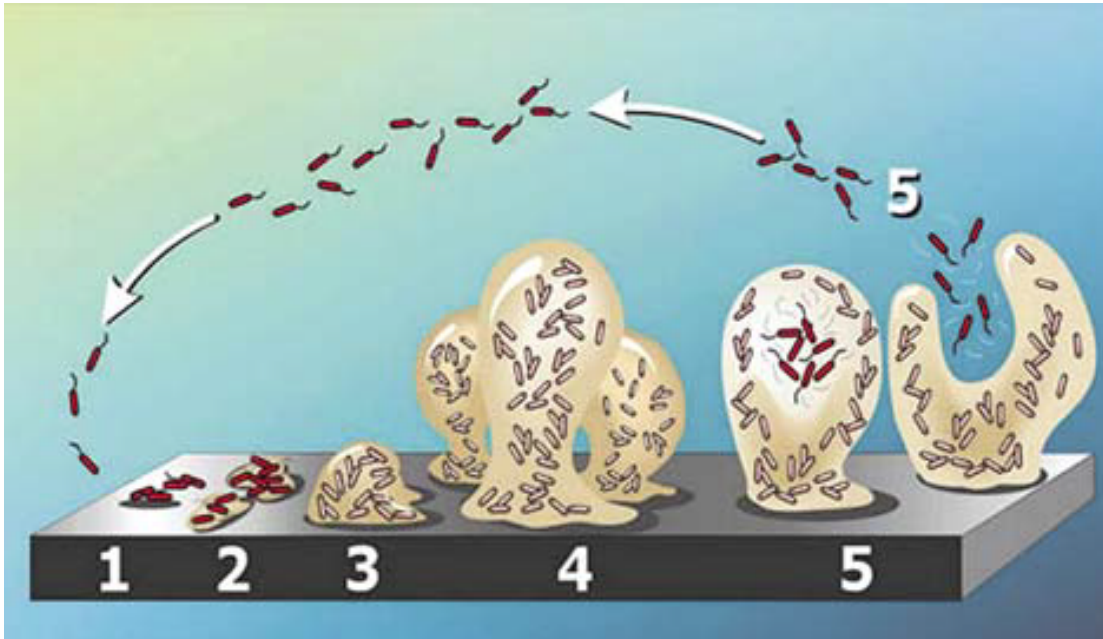


Figura 1. Desenvolvimento do biofilme microbiano: (1) Fixação inicial, (2) aderência microbiana, (3) formação de microcolônia, (4) maturação e desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme; e (5) liberação/lançamento de células capazes de formar novos biofilmes (Capelletti, 2006).

3.1.3 Quorum Sensing

O *Quorum Sensing* (QS) é o mecanismo de comunicação através do qual as leveduras regulam a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular. É quando populações microbianas funcionam cooperativamente, atuando de uma maneira multicelular quando um determinado nível populacional crítico é atingido. A percepção da densidade celular resulta de uma comunicação intercelular mediada pela secreção de sinais moleculares sintetizados pelas células individuais. Estas moléculas são detectadas por receptores específicos o que permite as células identificar o tamanho da população através da concentração dos sinais, e quando o nível crítico é atingido elas passam a agir em grupo como um único organismo multicelular. Este nível crítico caracteriza, um “*quórum*” onde as ações passam a ser tomadas em conjunto. Através do aumento da densidade dependente da acumulação de pequenas moléculas difusíveis, os micro-organismos detectam o tamanho da população local, e uma vez que o nível circulante de moléculas do QS chegam a um limiar de concentração, uma mudança na expressão gênica ocorre. Isto pode conduzir a mudanças no modo de crescimento microbiano, por exemplo, morfologia e na formação do biofilme, e na expressão de fatores de virulência (Dixon & Hall, 2015; Balaban, 2008).

O QS tem potencial para ser patogênico por dois meios: primeiro, através do controle do tamanho da população e dos fatores de virulência, ou em segundo lugar, em alguns casos através das moléculas do QS sendo tóxicas para as células hospedeiras. Devido ao seu essencial envolvimento em virulência, os mecanismos do QS estão sendo alvos de terapias antimicrobianas não letais. As moléculas do QS, especialmente peptídeos estão sendo investigados para a sua utilização em vários domínios terapêutico, como na imunologia, nas doenças dos sistema nervoso central e na oncologia. Por exemplo, os peptídeos do QS interagem com as células cancerosas, realizando uma permeação entre a barreira sangue-cérebro atingindo o parênquima cerebral. (Dixon & Hall, 2015).

Originalmente, foi pensado que o QS era específico para bactérias, mas a investigação da densidade celular em *Candida albicans* levou à descoberta que o farnesol atua como moléculas do QS neste organismo eucarioto. O farnesol tem a propriedade de inibir a conversão levedura-micélio sem interferir na sua taxa de crescimento celular. Embora pouco se saiba sobre o papel do farnesol na patogenicidade da *C. albicans*, há evidências de que esta molécula aumente a virulência da levedura, sem alterar a taxa de crescimento da mesma (Jass et al., 2003; Balaban, 2008). Desde a descoberta do farnesol, moléculas do QS tem sido descritas em outras espécies fúngicas, as quais são envolvidas na regulação do crescimento, resistência ao estresse, morfogênese e formação do biofilme (Dixon & Hall). Até agora, moléculas do QS identificadas em fungos incluem peptídeos, por exemplo, peptídeo 1 em *Cryptococcus neoformans*, oxilipinas em *Aspergillus nidulans* e álcoois e derivados de álcool, como o tirosol, um composto fenólico que induz filamentação na *Candida albicans*. Embora os fungos não tenham mostrado que produzem análogos dos autoindutores bacterianos, pesquisas sobre o QS em fungos ainda estão no início, e é provável que existam muitos sistemas do QS para serem descobertos (Dixon & Hall, 2015; Balaban, 2008).

3.1.4 Biofilmes de *Candida*

Espécies de *Candida* são parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis e são considerados patógenos oportunistas quando eles colonizam diferentes tecidos e causam micoses sistêmicas, quando o sistema imune do hospedeiro está deprimido. A mudança para um patógeno comensal requer uma adaptação eficaz das espécies de *Candida* para um ambiente em particular no

hospedeiro humano a fim de colonizá-lo. Tem sido observado que fontes de carbono, as quais variam em diferentes tecidos, são um fator crítico para a colonização das *Candida* spp. e a formação do biofilme. Por exemplo, a superfície da pele e mucosas contêm baixas quantidades de açúcares, enquanto que, a corrente sanguínea pode conter altos níveis de glicose. Isto é importante para a *C. albicans*, que requer glicose ou frutose para invadir o trato geniturinário, enquanto que a *C. glabrata* requer lactato para proliferar no trato intestinal. Além disso, para a adaptação nutricional, as espécies de *Candida* expressam fatores de virulência que lhes permitem infectar o hospedeiro, tais como adesinas, hidrolases, tigmotropismo, formação de biofilme e resposta ao estresse oxidativo (Fujarte et al., 2015).

Infecções nas mucosas e infecções relacionadas em associação ao uso de dispositivos médicos podem ser causadas por biofilmes de *Candida*. A formação do biofilme de *Candida* inicialmente ocorre com a aderência da levedura em uma superfície abiótica ou biótica, seguida da coagregação de células e colonização durante as primeiras 11 hs. O primeiro passo é mediado pelas adesinas expressas por células das leveduras, que são associadas com coagregação (Seddiki et al., 2015). Após a aderência, a fase de maturação e alongamento hifal são iniciados, com a regulação da diferenciação morfológica e a habilidade para formar estruturas coerentes. Durante a maturação as células são encaixadas através de uma matriz extracelular, composta de polissacarídeos, *N*-acetilglucosamina, proteínas, hexosaminas, fósforo e ácido urônico. Os polissacarídeos são induzidos rapidamente na formação do biofilme e na codificação de bombas de efluxo. O último passo para o processo de formação do biofilme representa a dispersão de células, que vão formar outras comunidades (Seddiki et al., 2015).

A organização do biofilme formado pelas espécies de *Candida* protege as células de danos químicos e fatores físicos, permite a cooperação metabólica e a regulação da expressão gênica baseada na comunidade, restringe a penetração antimicrobiana via matriz extracelular e aumenta a comunicação das células (Seddiki et al., 2015). Mudanças na expressão ou atividade dos genes durante a maturação do biofilme podem ser controladas em resposta à acumulação de moléculas de comunicação celular, um fenômeno denominado *quorum-sensing*. Farnesol e tirosol apresentam importante papel no quorum-sensing por ação negativa e positiva, respectivamente: farnesol inibe a *C. albicans* de entrar no estágio hifal, enquanto que o tirosol promove formação do tubo germinativo (Seddiki et al., 2015).

O processo de formação de biofilme por *Candida* é similar entre as espécies, mas a estrutura presente no biofilme apresenta muitas propriedades únicas. Estudo recente, avaliou a estrutura do biofilme das *Candida* spp. na superfície de catéteres coletados de pacientes, através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Através de MEV foi verificado que os biofilmes de *Candida* spp. apresentam estruturas complexas, que variam dependendo do isolado testado. O biofilme da *Candida albicans* é composto por uma mistura heterogênea de blastoconídios, pseudohifas e hifas incorporadas em uma substância extracelular polimérica. Os biofilmes formados por *Candida dubliniensis* mostram uma estrutura similar, mas exibem mais filamentos, grandes agregados de células e mais material na matriz extracelular. Em contraste, *Candida glabrata* forma uma fina camada compacta de biofilme, consistindo de células leveduriformes incorporadas dentro de uma matriz extracelular. A *Candida tropicalis* desenvolve um biofilme com uma estrutura complexa contendo coagregados de microcolônias de blastoconídios com uma espessa camada polimérica extracelular. Os biofilmes da *Candida parapsilosis* são compactos com multicamadas cobrindo toda a superfície do substrato. O biofilme produzido pela *Candida krusei* é destituído de formas filamentosas sendo caracterizado por uma espessa multicamada envolta por um volumoso material extracelular (Seddiki et al., 2015).

É relatado que em 65% das doenças infecciosas causadas por *Candida* spp. são devidas à presença de biofilmes na superfície de tecidos, órgãos e dispositivos médicos. Biofilmes de *Candida* induzem candidíase aguda oral (pseudomembrana ou eritematosa), candidíase vaginal, candidíase invasiva, estomatite protética, podendo causar infecções nosocomiais (Seddiki et al., 2015). A *Candida albicans* é o patógeno mais frequente isolado de pacientes com candidíase disseminada. Contudo, devido ao uso indiscriminado de antibióticos e antimicóticos de amplo espectro e dispositivos médicos, torna-se difícil tratar as infecções causadas por *Candida* spp. relacionadas a biofilmes, pois muitos destes patógenos são resistentes às drogas baseadas em azóis. (Fujarte et al., 2015).

3.1.5 Biofilme e Resistência Fúngica

O aumento da prevalência de terapias imunossupressoras com antimicrobianos de amplo espectro por um período prolongado como no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), do câncer, além do aumentado

uso de dispositivos médicos, nutrição parenteral total, insuficiência renal aguda em pacientes em hemodiálise, têm levado a um aumento nas infecções causadas por *Candida* spp. (Liao et al., 2015; Dühning et al., 2015). Estas espécies fúngicas são conhecidas por formar biofilmes em várias superfícies, os quais são responsáveis por várias infecções, inclusive aquelas associadas a dispositivos médicos, como candidemia. A candidemia ou candidíase invasiva é definida pela presença de espécies de *Candida* na corrente sanguínea. Cateteres intravasculares frequentemente são colonizados por *Candida* spp., que têm a capacidade de desenvolver estruturas aderentes de biofilmes na superfície destes biomateriais; especialmente em unidades de tratamento intensivo (Ramage et al., 2014). Cateteres associados a infecções do trato urinário podem causar graves complicações, especialmente em pacientes cronicamente cateterizados (Shenderovich et al., 2015). As *Candida* spp. são reportadas como a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas nos hospitais, principalmente em pacientes imunodeprimidos. A taxa de mortalidade por candidíase invasiva é extremamente alta, de 63,5% de 224 pacientes internados com choque séptico e com hemocultura positiva para *Candida* sp. que acabam morrendo (Ramage et al., 2014).

A resistência dos biofilmes fúngicos para uma ampla variedade de agentes antimicrobianos está claramente associada com a organização das células do biofilme dentro de uma extensa matriz exopolimérica. Essa organização no biofilme de *Candida* é capaz de impedir e moderar as concentrações de agentes antimicrobianos e antibióticos, que não conseguem penetrar ou romper essa extensa matriz exopolimérica (Jass et al., 2003). Células sésseis são altamente resistentes aos antifúngicos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, o que faz dos biofilmes uma fonte permanente de infecções (Fujarte et al.; 2015).

A terapia ou profilaxia antimicrobiana promove o aparecimento de resistência selecionando os micro-organismos capazes de sobreviver e reproduzir na presença de um determinado fármaco. Entre os micro-organismos ocorre uma competição natural pela sobrevivência, através da sua capacidade de produzir e processar metabólitos tóxicos para outros micro-organismos, e ao mesmo tempo, implementar uma série de estratégias para resistir a ação destas substâncias antimicrobianas (Jass et al., 2003).

A resistência a agentes antimicrobianos ocorre quando a Concentração Mínima Inibitória (CIM) do micro-organismo isolado aumenta, causando falha

terapêutica. Estudos demonstraram que a resistência a antifúngicos é devida a eventos multifatoriais, envolvendo modificações moleculares, muitas vezes relacionadas com o mecanismo de ação da droga em si, bem como a modulação da expressão do gene. No entanto, atualmente a definição de resistência a drogas antifúngicas é muito mais complexa e a possível falha terapêutica pode depender de muitos fatores. A falha do tratamento antifúngico para biofilmes, pode estar relacionado ao hospedeiro (estado imunitário, local da infecção, a gravidade da infecção, presença de outros materiais, formação de abscesso e a adesão ao regime de tratamento); ao fármaco (atividade fungistática ou fungicida, dosagem, farmacocinética e interações medicamentosas); e ao fungo responsável pela infecção (organização celular em leveduras ou hifas, morfologia, fenótipo, sorotipo, estabilidade genômica e carga de fungos) (Morace et al., 2014).

A resistência pode ser estendida a diferentes moléculas da mesma classe, de acordo com uma maior ou menor afinidade das moléculas alvo. A resistência cruzada a diferentes classes de drogas pode ser detectada na presença de mecanismos celulares não específicos de extrusão de substâncias tóxicas, como bombas de efluxo. Além disso, a capacidade de formar biofilmes representa um problema adicional no contexto de resistência aos medicamentos antifúngicos (Fernandes et al., 2015).

Infecções associadas a biofilme são difíceis de tratar devido a sua alta resistência para um amplo espectro de drogas antifúngicas, incluindo amfotericina B e azóis (Liao et al., 2015; Fernandes et al., 2015). As principais drogas utilizadas no tratamento antifúngico são (Morace et al., 2014; Lockhart, 2014):

a) Equinocandinas: As equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) pertencem à classe química dos lipopeptídeos e exercem seu efeito antifúngico através de uma inibição não competitiva da 1,3- β -D-glicano sintase, uma proteína complexa de múltiplas subunidades, responsável pela síntese de um componente essencial da parede celular do fungo, chamado de 1,3- β -D-glicana (Morace et al., 2014; Lockhart, 2014).

O mecanismo de ação característico torna esta classe de drogas muito útil na terapia de infecções invasivas provocadas por leveduras resistentes a azóis. As equinocandinas são fungicidas contra leveduras. Casos de falha terapêutica, em particular com caspofungina, a primeira equinocandina utilizada para terapia, são

reportadas na literatura especialmente para infecções causadas por *Candida*. Altos valores de CIM têm sido detectados *in vitro* entre as cepas de *Candida* responsáveis por doenças invasivas em pacientes que não respondem à terapia com equinocandinas. Essas cepas exibem uma reduzida susceptibilidade para equinocandinas, mostrando mutação nos genes *FKS* (*FKS1*, *FKS2* e *FKS3*), que são correlacionadas com substituições nos aminoácidos da 1,3-β-D-glicana sintase, o alvo das equinocandinas (Lockhart, 2014; Evans, 2005).

As bombas de efluxo não parecem ter um papel de destaque nos mecanismos de resistência, já que as equinocandinas não são substratos adequados para a maior parte das bombas de efluxo. A ocorrência de mutações pontuais no gene *FKS1*, mais frequentemente associada à substituição de aminoácidos em duas regiões das proteínas, se correlacionam com a resistência adquirida com *C. albicans* e espécies afins. Nem todas as mutações *FKS1* determinam aumentos semelhantes nos valores de CIM para todas as três equinocandinas. Os aumentos mais significativos são relatados na presença de grupos de aminoácidos na glicogênio sintase anti-fósforo (Ser645) (Lockhart, 2014; Evans, 2005).

Em alguns casos, a resistência de cepas de *Candida albicans* a equinocandinas tem também sido associada com o aumento dos níveis de quitina da parede celular, tanto na ausência como na presença de mutações *FKS*. Mutações nos genes *FKS* são especificamente envolvidas na resistência à classe das equinocandinas pelas espécies de *Candida*, por conseguinte, cepas resistentes às equinocandinas podem ser totalmente susceptíveis aos azólicos e anfotericina B (Morace et al., 2014; Lockhart, 2014).

b) (Tri)azóis: Drogas antifúngicas que pertencem à classe dos azóis, são inibidores do citocromo P450 14-α-esterol desmetilase (CYP51), uma enzima essencial na biossíntese do ergosterol, o principal constituinte da membrana citoplasmática fúngica. Esta enzima remove o grupo 14 α-metil do lanosterol, o qual é um dos últimos passos no caminho da biossíntese do ergosterol. O gene codificador é geralmente classificado como *ERG11* nas *Candida* spp. Os imidazóis (dois átomos de nitrogênio no anel azol, por exemplo, miconazol e cetoconazol) e triazóis (três átomos de nitrogênio no anel, por exemplo, fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) pertencem a esta classe (Evans, 2005).

Os triazóis são menos tóxicos e mais específicos que os imidazóis e podem ser utilizados no tratamento sistêmico de micoses, enquanto que a utilização de imidazóis, com exceção do cetoconazol, é limitada a aplicações tópicas. Os átomos de nitrogênio são essenciais no mecanismo de ação dos azóis; eles ligam-se ao grupo heme da enzima e interagem com o aminoácido dessa estrutura. Azóis também podem ser substratos para as enzimas do citocromo P450, embora com uma afinidade diferente, e portanto podem interagir com outros medicamentos que são metabolizados pelas mesmas enzimas (Morace et al., 2014; Evans, 2005).

A resistência a azóis tem sido reportada para vários fungos, mas o fenômeno tem sido particularmente estudado em cepas de *Candida albicans* isoladas de casos de candidíase mucocutânea de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tratados por um longo período com fluconazol. Muitos dos mecanismos moleculares de resistência do fluconazol identificados em *Candida albicans* foram subsequentemente envolvidos na resistência à classe dos azóis em outros patógenos fúngicos oportunistas importantes. Existem dois mecanismos moleculares principais de resistência aos azóis identificados em *C. albicans*. O primeiro mecanismo envolve a expressão do gene *erg11* e/ou mutações no gene. O *erg11* codifica o alvo para a enzima alvo e a supra-regulação pode resultar na resistência devido a uma relação não ótima da enzima-droga, enquanto que mutações sequenciais podem causar uma diminuição da afinidade da enzima na direção da droga. O segundo mecanismo descrito é o aumento da expressão das bombas de efluxo por proteínas transmembrana presentes em todos os organismos vivos, com importantes funções de desintoxicação, resultando na falha de acumulação intracelular do fármaco (Morace et al., 2014; Evans, 2005).

Embora as bombas de efluxo sejam numerosas nas células fúngicas, somente algumas tem sido associada à resistência aos medicamentos e, particularmente para a resistência a azóis. Nas *Candida albicans*, a bomba de efluxo associada com resistência ao fluconazol, é o produto do gene *mfr1*, conferindo resistência para toda a classe de azóis, sendo envolvidos produtos dos genes *cdr1* e *cdr2*. Bombas de efluxo com funções parecidas têm sido reportadas em cepas clínicas de *Candida glabrata* (*cgcdr1*, *cgcdr2* e *cgsnq2*), *Candida dubliniensis* (*cdcdr1*, *cdcdr2* e *cdmdr1*) e *Candida tropicalis* (*ctmdr1*). Mutações no gene *erg11* têm sido demonstradas na resistência a azóis em cepas de *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Mutações em outros genes *erg*, em particular

erg3, envolvidos nos caminhos da biossíntese do ergosterol, podem também estar implicadas na resistência aos azóis (Morace et al., 2014; Lockhart, 2014).

c) 5-Flucitosina: 5-Flucitosina é usada somente em combinação com outras drogas antifúngicas (anfotericina B ou triazóis) para o tratamento de infecções invasivas causadas por leveduras. Inicialmente desenvolvida como um agente anti-tumor, 5-flucitosina atua como um antimetabólito que compete com uracil para a síntese do RNA e interfere com a timidilato sintetase fúngica, a qual é a enzima chave na biossíntese do DNA. A atividade antifúngica é possível pela citosina fúngica que facilita a entrada da droga dentro da célula fúngica, onde a citosina desaminase converte a molécula da citosina para 5-fluorouracil, o qual é ativo farmacologicamente (Morace et al., 2014).

A utilização deste fármaco como monoterapia é limitada pela presença da resistência primária (inata ou intrínseca) e pela resistência secundária (induzida ou adquirida no decorrer da terapia). Resistência inata e/ou adquirida à 5-flucitosina pode ser causada por mutações na enzima permease codificada pelo gene *fcy2*, ou pela perda da atividade, a qual resulta na absorção deficiente da droga. A resistência também está relacionada com as alterações em outras enzimas envolvidas no mecanismo de ação: a citosina desaminase, codificada pelo gene *fcy1*, responsável pela conversão de 5-fluorouracil para o uracil fosforibosiltransferase, codificado pelo gene *fur1*, o qual catalisa a conversão de 5-fluorouracil para 5-fluorouridina monofosfato. Mutações no gene *fur1* são responsáveis pela elevada resistência a 5-flucitosina com CIM $\geq 521\mu\text{g/mL}$ em cepas de *Candida lusitanae*, enquanto que mutações nos genes *fcy1* e *fcy2* podem conferir resistência para ambos, 5-flucitosina e fluconazol, com baixos CIM (Evans, 2005).

d) Polienos: Os polienos (anfotericina B, nistatina e natamicina) ligam-se aos esteróis, em particular ao ergosterol do fungo, causando a formação de poros na membrana da célula que, especialmente em leveduras, levam à lise e à morte da célula. Nas novas formulações (lipossomal e lipídicas), a anfotericina B é o antifúngico mais amplamente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas graves em hospedeiros imunocomprometidos ou em pacientes severamente enfermos. De um ponto de vista microbiológico, a resistência a polienos é difícil de

detectar *in vitro*, porque é influenciada pelo método do ensaio, tipo de meio e espécies fúngicas. Alguns isolados de *Candida glabrata* e *Candida krusei* esporadicamente são relatados por terem resistência a anfotericina B e polienos, ao passo que a *Candida lusitanae* apresenta resistência intrínseca a polienos (Morace et al., 2014; Evans, 2005).

A falta total de ergosterol na membrana fúngica, uma estrutura que impede a ligação aos polienos, ou as alterações na via biossintética do ergosterol que conduzem a substituição do ergosterol por outros esteróis com menor afinidade para os polienos, têm sido hipotetizada como as possíveis causas de resistência a polienos (Morace et al., 2014). O surgimento da resistência fúngica continua sendo de fato, um fenômeno muito complexo, a ser estudado (Lockhart, 2014; Evans, 2005).

3.1.6 Biofilmes em Dispositivos Médicos

Os dispositivos médicos, feitos a partir de biomateriais, são utilizados na medicina para substituir ou restaurar uma estrutura ou função que está ausente ou não funcional, devido a um trauma, doença ou defeito congênito (Evans, 2005). Dispositivos médicos providenciam um ambiente adequado para o desenvolvimento de biofilmes. Os biofilmes nos dispositivos médicos apresentam uma matriz extracelular polimérica em associação com a superfície, alterando as taxas de crescimento microbiano (Jass et al., 2003). Os dispositivos médicos são o principal fator de risco para infecções sistêmicas por *Candida* spp., porque eles atuam como ponto de entrada para os patógenos, sendo substrato para o crescimento de biofilmes fúngicos. Esses biofilmes fúngicos formados nos dispositivos médicos exibem resistência a drogas antifúngicas e providenciam proteção contra as defesas do hospedeiro humano. Os biofilmes podem afetar o funcionamento do dispositivo médico ou a integridade do mesmo. O tratamento indicado para as infecções humanas causadas pela formação do biofilme, envolve o uso de fármacos antifúngicos sistêmicos e, em muitos casos, a remoção do dispositivo médico do paciente, o que pode ocasionar complicações médicas. Além disso, estes biofilmes são particularmente relevantes devido ao seu impacto na saúde humana (Raman et al., 2014).

As infecções humanas causadas por biofilmes, como candidemia, podem resultar do uso de uma grande variedade de dispositivos médicos, como por

exemplo, catéteres (Dias et al., 2015; Fox et al., 2015; Oncu, 2014), próteses (Dias et al., 2015; Fox et al., 2015), tubos endotraqueais (Dias et al., 2015; Fox et al., 2015), implantes (Dias et al., 2015; Fox et al., 2015), tecidos na engenharia de tecidos (Dias et al., 2015) e sistemas de liberação de drogas (Fox et al., 2015) que podem ser habitados por leveduras, mais comumente espécies de *Candida* que são encontradas em culturas puras (embora biofilmes polimicrobianos possam ocorrer, especialmente em dispositivos médicos utilizados por longos períodos) (Jass et al., 2003). As taxas de infecções variam consideravelmente com a posição do dispositivo, se ele é usado para infusão constante de fluídos (por exemplo, catéter intravenoso) ou se está totalmente implantado (por exemplo, uma prótese de joelho), a idade do paciente e outros fatores de risco (Evans, 2005; Estivil et al., 2011).

Infecções relacionadas ao uso de catéteres, utilizados para administração de fluídos, produtos derivados do sangue, medicamentos, soluções de nutrição parenteral total ou monitoramento hemodinâmico, são a maior causa de morbidade e mortalidade entre pacientes hospitalizados e envolvem a formação de biofilmes microbianos na superfície dos catéteres em muitos dos casos. Esses biofilmes formam-se nestes dispositivos médicos em um período que varia de 24 a 96 hs. Espécies de *Candida* são mais comumente isoladas de superfícies de catéteres, causando em muitos casos infecções sanguíneas. Os biofilmes em catéteres apresentam duas camadas morfológicas distintas: uma camada basal de levedura fina que ancora o biofilme na superfície e uma camada mais espessa de hifas rodeadas por uma matriz extracelular. A germinação fúngica e as mudanças na superfície do substrato influenciam a formação do biofilme. As espécies de *Candida* são também conhecidas por formar biofilmes em catéteres urinários e intrauterinos, entre outros (Chandra et al., 2012). Catéteres urinários são dispositivos de látex ou silicone tubulares, que são inseridos através da uretra para a bexiga para coletar a urina durante cirurgias, medir a quantidade de urina excretada, prevenir a retenção urinária, ou controlar a incontinência urinária. Quando estes catéteres são introduzidos no interior da uretra ou bexiga, as leveduras se aderem e formam biofilme. Dispositivos intrauterinos (DIU) podem ser feitos de materiais não absorvíveis como polietileno impregnado com sulfato de bário, ou designados a liberar uma substância quimicamente ativa como cobre ou um agente progestacional. Estes dispositivos normalmente têm uma cauda, a fim de localizar o dispositivo para remoção, e estas caudas são compostas de monofilamentos de

plástico fechado por uma bainha de nylon. O uso de DIU tem provocado inflamação pélvica com formação de biofilme, causada por micro-organismos como *Candida albicans* (Jass et al., 2003).

Próteses de válvulas cardíacas podem ser categorizadas como válvulas mecânicas ou biopróteses (válvulas de tecido). Endocardite pode ser provocada pelo uso de próteses de válvulas cardíacas e por micro-organismos que se aderem ao dispositivo provocando o aparecimento de infecção, e subsequentemente, a formação do biofilme por *Candida* (Jass et al., 2003).

Próteses vocais são inseridas em pacientes após tratamento cirúrgico devido a câncer da laringe ou hipofaringe (laringectomia), a fim de melhorar a voz. Biofilmes formados em próteses vocais contribuem para o desenvolvimento de infecções graves, sendo que os organismos mais frequentemente isolados destes dispositivos médicos são *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Na prótese vocal de silicone e borracha ocorre a proliferação da levedura e a colonização do biofilme fúngico em pacientes laringectomizados, causando mal funcionamento do mecanismo da válvula e necessitando a remoção a cada 3-4 meses (Chandra et al., 2012).

A formação de biofilme em dispositivos médicos pode provocar a destruição de tecidos em torno das próteses de válvulas cardíacas, resultando em vazamentos e destruição do material, obstrução de catéteres urinários ou afrouxamento das próteses corporais, como por exemplo, do quadril e joelho, entre outros problemas graves de saúde. Além disso, os biofilmes podem ser responsáveis pelo mal funcionamento de um grande número de dispositivos médicos por diferentes mecanismos ainda não totalmente elucidados (Jass et al., 2003).

3.5 Polímeros para Dispositivos Médicos

Os polímeros representam uma das classes de materiais mais versáteis disponíveis para aplicações em diversas áreas, incluindo a química e farmacêutica. Polímeros naturais, naturais modificados e sintéticos são empregados como excipientes farmacêuticos para a formulação de cosméticos e medicamentos de liberação convencional e de liberação modificada. Nos dias atuais, polímeros são desenvolvidos para atuarem como moduladores e direcionadores da liberação de fármacos em sítios específicos no organismo. Polímeros biodegradáveis,

bioadesivos, biomiméticos e hidrogéis responsivos tem sido amplamente utilizados (Balaban, 2008; Villanova & Oréfice, 2010).

Na maioria das vezes, respostas terapêuticas eficazes e seguras são conseguidas administrando-se medicamentos tradicionais. Outras vezes, o regime terapêutico ideal requer a administração de um sistema de liberação de fármacos, como um dispositivo médico e/ou de sistemas de desempenho terapêutico avançado. Nestes casos, os polímeros exercem ação direta na liberação dos fármacos. Neste contexto, é importante conhecer a terminologia empregada para caracterizar os polímeros, o que pode auxiliar no esclarecimento da aplicabilidade dos materiais em dado sistema de liberação (Balaban, 2008).

Polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles que sofrem degradação macromolecular *in vivo*, por ação de enzimas, micro-organismos ou células. O termo biodegradação descreve os processos envolvendo quebra de cadeia e modificações da massa molar e da solubilidade do polímero. Processos biológicos, físicos e químicos podem atuar na biodegradação (Balaban, 2008; Villanova & Oréfice, 2010).

Polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos de duas maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos) (Balaban, 2008). A bioadesão é uma propriedade explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência de um medicamento ou dispositivo médico no organismo. Em consequência, a biodisponibilidade dos fármacos pode ser melhorada. Outra vantagem é que a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica dos fármacos e dos dispositivos médicos (Balaban, 2008; Villanova & Oréfice, 2010).

Os polímeros ditos bioativos e biomiméticos também vêm sendo pesquisados. Materiais biomiméticos são definidos como aqueles que podem interagir, seletivamente, com o microambiente biológico, mimetizando-o. Já os polímeros bioativos são aqueles capazes de interagir com receptores celulares, via reconhecimento biológico, proporcionando respostas específicas. Poliésteres alifáticos como o polihidroxibutirato (PHB), de origem natural e sintética, têm sido estudados na preparação de materiais biomiméticos (Jass et al., 2003).

Os polímeros terapêuticos são aqueles aos quais são atribuídas propriedades terapêuticas. O controle da funcionalização e arquitetura de polímeros

sintéticos permite que estes se liguem a receptores específicos, presentes em patógenos ou células, promovendo reconhecimento ou comunicação, respectivamente, desencadeando a modulação de respostas inflamatórias, adesão celular ou transdução de sinais. Polímeros contendo fármacos como aditivos também são, frequentemente, denominados terapêuticos (Jass et al., 2003). Entre as propriedades apresentadas anteriormente, duas merecem destaque: a biodegradação e a bioadesão (Villanova & Oréfice, 2010).

A biodegradação dos polímeros é um atributo explorado na modulação da liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo desapareça depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada. O polihidroxibutirato e o ácido polilático são dois polímeros biodegradáveis amplamente utilizados na produção de dispositivos médicos biodegradáveis como implantes, sistemas de liberação de drogas, entre outros. Os produtos de degradação formados são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (Villanova & Oréfice, 2010).

Os principais grupos funcionais suscetíveis à hidrólise são os ésteres, orto-ésteres, anidridos, carbonatos, amidas, uretanas e outros. Portanto, podem sofrer biodegradação, via hidrólise química ou enzimática, os poliésteres alifáticos, as poliamidas, os poliuretanos (PU), os poli(orto ésteres), os polianidridos, os polifosfoésteres e as polifosfazonas, entre outros (Salwiczec et al., 2014). Os poliésteres alifáticos são os polímeros que sofrem biodegradação em meio biológico, mais explorados em sistemas de liberação de fármacos. São eles: ácido polilático (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL) e copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA). Este último, apresenta um menor tempo para completa degradação *in vivo*, implicando em menor probabilidade de reações adversas, decorrentes, muitas das vezes, de fragmentos cristalinos liberados, cujo tempo de degradação seja excessivamente longo (Villanova & Oréfice, 2010; Salwiczec et al., 2014).

Polímeros de origem natural (biopolímeros) são passíveis de degradação *in vivo* por hidrólise ou ataque enzimático. Os polihidroxialcanoatos-poliésteres de hidroxiácidos (PHA) são biopolímeros estereoregulares, opticamente ativos, produzidos por rota biossintética, a partir de fontes naturais. O polihidroxibutirato (PHB) e o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) têm sido estudados

na preparação de sistemas de liberação de fármacos. A utilização destes polímeros pode representar um custo menor, quando comparado a outros polímeros biodegradáveis convencionais (Villanova & Oréfice, 2010; Salwiczec et al., 2014).

Na bioadesão, o mecanismo de adesão de polímeros à mucosa ainda não foi totalmente esclarecido. Acredita-se que os seguintes eventos estejam envolvidos: adsorção, espalhamento do material bioadesivo sobre a mucosa e interpenetração entre cadeias do polímero e da mucosa (Jass et al., 2003; Salwiczec et al., 2014).

De modo geral, as características que favorecem a bioadesividade são: 1. elevada massa molar; 2. capacidade de dispersão em água; 3. presença de grande número de grupos carboxila e/ou hidroxila; 4. habilidade de formar ligações de hidrogênio; 5. flexibilidade da cadeia polimérica; e 6. presença de superfície negativamente carregada, embora alguns polímeros catiônicos sejam bioadesivos. Tais propriedades facilitam a interpenetração das cadeias poliméricas pela mucina, principal proteína do muco, permitindo o estabelecimento de interações físicas e mecânicas. Um alto conteúdo de carboxilas promove o intumescimento e possibilita a formação de ligações de hidrogênio. Interações dos tipos eletrostáticas, hidrofóbica e atração de van der Waals podem ocorrer. O pH do local, para favorecer a formação de ligações de hidrogênio, deve ser aquele que fornecerá baixa ionização do polímero. Outro importante parâmetro que determinará a bioadesão é o ângulo de contato-polímero/muco (Evans, 2005; Salwiczec et al., 2014).

Os principais exemplos de polímeros mucoadesivos são o poli(ácido acrílico) (PAA) e a quitosana. Outros são: poli(óxido de etileno) (PEO), polietileno glicol (PEG), poli(vinil pirrolidona) (PVP), ésteres de poliglicerol de ácidos graxos (PEGF), poli(lisina), carbômeros, alginato de sódio, goma carragena, sulfato de condroitina, pectina e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Diferentes moléculas ligantes são imobilizadas covalentemente em polímeros e copolímeros para explorar a bioadesão ou direcionar estas para regiões específicas (Salwiczec et al., 2014). Atenção especial tem sido dada para a preparação de tiômeros através da inclusão de cisteína em polímeros naturais e sintéticos. Os grupos sulfidríla da cisteína interagem com a mucina através da formação direta de ligação dissulfeto ou por oxidação dos grupos sulfidríla. Tiômeros obtidos a partir da imobilização de grupos tióis no PAA, quitosana, hialuronato de sódio e hidroxipropilcelulose apresentaram

capacidade mucoadesiva aumentada (Evans, 2005; Villanova & Oréfice, 2010; Salwiczec et al., 2014).

Uma das primeiras formulações bioadesivas comercializadas foi a ORABASE®, preparada a partir de pectina e derivados da celulose, utilizada na incorporação de fármacos administrados na mucosa oral. Outros medicamentos bioadesivos, comercialmente disponíveis, são o gel bucal Peroxidín®, empregado no tratamento de doenças periodontais localizadas, e o Acidform®, um gel vaginal capaz de prevenir a gravidez e inibir o desenvolvimento local de patógenos. Tais medicamentos são baseados na hidroxietilcelulose e na goma xantana, respectivamente (Evans, 2005).

3.5.1 Dispositivos Médicos contendo Fármacos

Certos tipos de dispositivos médicos contendo fármacos representam uma tecnologia emergente, explorada pelas áreas química e farmacêutica. Um dispositivo combinado compreende dois ou mais componentes, química e/ou fisicamente associados ou misturados, que dão origem a uma produto único. Em outras palavras, são dispositivos médicos que não têm a intenção principal de funcionar como reservatório de fármacos, mas podem conter estes últimos, visando uma ação farmacológica adjuvante (Villanova & Oréfice, 2010; Salwiczec et al., 2014).

Um exemplo é a incorporação de antibióticos em implantes temporários ou permanentes, na tentativa de reduzir infecções e melhorar a aceitação orgânica do material implantado, minimizando a possibilidade de rejeição (Jass et al., 2003). O Septopal® é um dispositivo, comercialmente disponível, apresentado na forma de cordão, composto por esferas de copolímero de metacrilato de metila e acrilato de metila unidas por um fio cirúrgico. As esferas contêm sulfato de gentamicina, um agente antibiótico que pode ser usado no tratamento de infecções de ossos e tecidos moles. As esferas não degradáveis podem ser utilizadas a curto ou longo prazo, sendo removidas manualmente ou através de intervenções cirúrgicas, respectivamente. Os stents, utilizados para dilatar a artéria coronária, podem ser recobertos com fármacos antiproliferativos que, ao serem liberados localmente, reduzem a possibilidade de reoclusão e aceleram a revascularização local. O primeiro “stent farmacológico” foi aprovado para uso pelo Food and Drug

Administration (FDA/USA) no ano de 2003 (Jass et al., 2003; Villanova & Oréfice, 2010).

Outros exemplos de dispositivos contendo fármacos são: implantes ortopédicos, sistemas implantáveis, catéteres venosos, catéteres urinários, entre outros. Antimicrobianos, anti-inflamatórios e antineoplásicos são as principais classes terapêuticas utilizadas na preparação ou recobrimento dos dispositivos poliméricos. Alguns exemplos de preparações comerciais contendo poli(ácido acrílico) são: os anti-inflamatórios de uso tópico Cataflan®, Emulgel® e Feldene®. O VivaGel® é um gel vaginal microbicida, preparado a partir de dendrímeros baseados na lisina, contendo grupos ácidos sulfônicos superficiais. O medicamento visa o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. O polioxietileno é utilizado com niossomas de doxorrubicina (Adriblastina®RD) no tratamento anticancerígeno. A encapsulação desses pró-fármacos poliméricos em niossomas com cerca de 200 nm, proporcionou um sistema de depósito para o fígado, a partir do qual o fármaco no fígado permanece por um período de mais de 24 horas. (Jass et al., 2003; Evans, 2005).

3.5.2 Sistemas Implantáveis

Os implantes são destinados à inserção de forma invasiva, em tecidos ou órgãos. Entre os anos 60 e 80 foram desenvolvidos os primeiros sistemas implantáveis para liberação de fármacos. Diversos polímeros, biodegradáveis e não biodegradáveis, são utilizados no preparo de sistemas implantáveis. Os biodegradáveis mais utilizados são o ácido polilático (PLA), o poli(caprolactona) (PCL) e os copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA). Já o polietileno-co-acetato de vinila (PEVA), o poli(álcool vinílico) (PVA), derivados da celulose, o silicone e polímeros acrílicos são materiais não biodegradáveis, cuja principal desvantagem é a necessidade de remoção posterior (Jass et al., 2003; Villanova & Oréfice, 2010; Schaffazick et al., 2003).

O Progestasert®, implante intrauterino contendo progesterona, possui liberação controlada por membranas não biodegradáveis de poli(etileno-co-acetato de vinila) (PEVA). O Zoladex® LA é um medicamento para implante subcutâneo, contendo o fármaco (acetato de goserelina) disperso em uma matriz de PLGA que, após controlar a liberação do fármaco por 3 meses, é biodegradado e eliminado dos organismos. O desenvolvimento de implantes intravítreos merece destaque, pois,

além de sustentarem a liberação, reduzem significativamente, a absorção sistêmica do fármaco administrado pela via oftálmica (Jass et al., 2003; Villanova & Oréfice, 2010).

3.5.3 Sistemas Terapêuticos Transdérmicos (Adesivos)

Sistemas terapêuticos transdérmicos são medicamentos preparados para aplicação sobre a pele, visando ação sistêmica do fármaco, que podem ser apresentados como adesivos. De modo geral, os adesivos contêm o fármaco disperso em um reservatório ou em uma matriz. O sistema é composto por duas camadas poliméricas: a externa, que previne a perda de fármaco e sua exposição ao ambiente, e a interna, que controla a liberação. Ainda, pode haver uma camada adesiva responsável por fixar o sistema na pele (Jass et al., 2003; Villanova & Oréfice, 2010; Schaffazick et al., 2003).

O primeiro adesivo desenvolvido e aprovado para uso tópico pelo FDA em 1979 veiculava escopolamina, para a prevenção de náuseas e vômitos. O sistema foi preparado a partir do PEVA ou do polipropileno (PP) poroso e liberava o fármaco por um período de três dias. Nos medicamentos atuais, a liberação pode ser sustentada por até 30 dias. Na preparação de sistemas matriciais, os mais utilizados são o PEG reticulado, poli(2-etil hexil acrilato), PAA, polímeros híbridos baseados em PVP e etilcelulose. Em sistemas reservatórios é predominante o uso do PEVA, poliuretanos e silicone. Os diferentes polímeros originam membranas conformáveis com diferentes graus de adesividade, translucência e capacidade oclusiva, além de níveis de transmissão de vapor-d'água e taxa de liberação do fármaco variáveis (Balaban, 2008; Villanova & Oréfice, 2010).

Adesivos conhecidos como sensíveis à pressão são materiais especiais utilizados, uma vez que aderem rápida e permanentemente às superfícies, com uma leve pressão. Nos sistemas transdérmicos, estes adesivos são usados para garantir o contato efetivo entre o sistema terapêutico transdérmico e a área de aplicação, pois apresentam boas propriedades adesivas iniciais, e a longo prazo, fácil remoção, flexibilidade, insensibilidade à presença de água e compatibilidade com a pele. Os adesivos sensíveis à pressão são preparados empregando, principalmente, o poli(1-buteno), poliisobutileno, poli(acrilatos), poli(dimetil siloxano) e seus copolímeros (Jass et al., 2003; Villanova & Oréfice, 2010; Salwiczek et al., 2014).

3.5.4 Sistemas de Desempenho Terapêutico Avançado

Cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido, principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, carreadores micrométricos e nanométricos, capazes de modular a liberação com alto grau de reprodutibilidade, surgiram como alternativas eficazes. Os primeiros medicamentos injetáveis comercializados na forma de microesferas foram o Parlodel® LAR e o Sandostatin® LAR, ambos baseados em matrizes de copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) (Villanova & Oréfice, 2010; Salwiczek et al., 2014; Schaffazick et al., 2003).

As nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoesferas são carreadores de fármacos, sistemas que apresentam aplicações promissoras, principalmente, na vetorização de anticancerígenos, proteínas, antifúngicos, peptídeos, vacinas tumorais e material para terapia gênica administrados pela via parenteral e, também, administração de antibióticos pela via oral. Os principais polímeros empregados na preparação de nanocarreadores são os naturais modificados, derivados da albumina, colágeno, ácido hialurônico, gelatina, alginato, além dos polímeros sintéticos poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA), poli(álcool vinílico) (PVA), PAA, poli(etileno-co-acetato de vinila) (PEVA), polietileno glicol (PEG) e a poliacrilamida. Os nanocarreadores poliméricos biodegradáveis, preparados a partir do PLA, poli(ácido glicólico) (PGA), PLGA, poli(caprolactona) (PCL) e poli(ortoésteres) têm atraído atenção especial (Jass et al., 2003; Salwiczek et al., 2014).

Os conjugados poliméricos são sistemas obtidos pela polimerização direta do polímero e do fármaco, que é liberado após quebra hidrolítica ou enzimática do agregado. Quando a formação do conjugado envolve a presença de ligação covalente entre o ativo e a matriz polimérica, o sistema é vantajoso para administração via parenteral. Já no caso de simples mistura fármaco-polímero, a administração oral é privilegiada. Polímeros como o PEO, PVA, poliacrilonitrila (PAN) e PLA são usualmente empregados para a preparação de ambos os tipos de sistemas (Evans, 2005; Villanova & Oréfice, 2010).

Polímeros dendríticos ou dendrímeros são nanoestruturas formadas pela presença de cadeias e múltiplas ramificações a partir de um núcleo. Possuem arquitetura globular bem definida, massa molar controlada, baixa polidispersidade, valências múltiplas e alto grau de ramificações e funcionalização superficial.

Polímeros empregados na preparação de dendrímeros são a poli(amidoamina) (PAMAM), poli(imina propileno) (PPI) e a poli(éter hidroxilamina) (PEHAM). O VivaGel® é um gel vaginal microbicida, preparado a partir de dendrímeros baseados na lisina, contendo grupos ácidos sulfônicos superficiais. O medicamento encontra-se na fase II de estudos clínicos e visa o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (Villanova & Oréfice, 2010).

As micelas são partículas coloidais esféricas de compostos anfifílicos formadas espontaneamente em solução. São sistemas autoestruturados que contêm frações dos fármacos covalentemente ligadas ou encapsuladas, cuja principal vantagem é a preparação de medicamentos parenterais contendo ativos de baixa hidrossolubilidade. Existem diferentes tipos de sistemas micelares, entre eles, as micelas propriamente ditas, as vesículas (lipoplexos) e os complexos polieletrólíticos (poliplexos) (Jass et al., 2003; Balaban, 2008; Schaffazick et al., 2003).

As micelas poliméricas propriamente ditas são partículas coloidais esféricas com um núcleo hidrofóbico e o exterior hidrofílico. Podem ser caracterizadas como estruturas de copolímeros em bloco montadas sobre um núcleo contendo o fármaco. As micelas podem ter a superfície funcionalizada para responderem a estímulos do ambiente. Polímeros e copolímeros empregados na preparação de micelas são obtidos a partir de PEG, PCL, ácido polilático (PLA), poli(histidina), entre outros (Jass et al., 2003; Balaban, 2008; Schaffazick et al., 2003).

Os núcleos polieletrólítico ou complexo polieletrólítico podem ser preparados pela deposição camada-a-camada de polímeros sobre um suporte inerte passível de biodegradação. A técnica é baseada na adsorção de espécies carregada sobre um substrato de carga oposta, alternando as camadas. Carreadores poliméricos hidrofílicos ionizáveis, capazes de ligarem-se a biomoléculas de carga oposta, são ditos poliplexos (Villanova & Oréfice, 2010; Schaffazick et al., 2003).

3.5.5 Polietileno de Alta Densidade

O polietileno de alta densidade (PEAD) é um polímero cristalino, flexível, cujas propriedades são acentuadamente influenciadas pela quantidade relativa das fases amorfa e cristalina. As menores unidades cristalinas, lamelas, são planares e consistem de cadeias perpendiculares ao plano da cadeia principal e dobradas em zig-zag, para cada 5 a 15 nm, embora haja defeitos que são pouco frequentes

(Coutinho et al., 2003). O PEAD é inerte face à maioria dos produtos químicos comuns, devido a sua natureza parafínica, seu alto peso molecular e sua estrutura parcialmente cristalina. Em temperaturas abaixo de 60 °C, é pouco solúvel em todos os solventes (Niechajev, 2012; Lim et al., 2014).

O polietileno linear é altamente cristalino (acima de 90%), pois apresenta um baixo teor de ramificações. Esse polímero contém menos que uma cadeia lateral por 200 átomos de carbono da cadeia principal, sua temperatura de fusão cristalina é aproximadamente 132 °C e sua densidade está entre 0,95 e 0,97 g/cm³. O peso molecular numérico médio fica na faixa de 50.000-250.000 m/m. As cadeias do PEAD são dobradas e os segmentos entre as dobras contêm cerca de 100 átomos de carbono (Lim et al., 2014).

A linearidade das cadeias, e conseqüentemente, a maior densidade do PEAD fazem com que a orientação, o alinhamento e o empacotamento das cadeias sejam mais eficientes; as forças intermoleculares (van der Waals) possam agir mais intensamente, apresentando maior cristalinidade. Sendo maior a cristalinidade, a fusão poderá ocorrer em temperaturas mais altas (Reznickova et al., 2015).

As propriedades elétricas são pouco afetadas pela densidade e pelo peso molecular do polímero, já as propriedades mecânicas sofrem uma forte influência do peso molecular, do teor de ramificações, da estrutura morfológica e da orientação (Lim et al., 2014; Reznickova et al., 2015). O peso molecular tem influência sobre as propriedades do PEAD, principalmente devido ao seu efeito na cinética de cristalização, cristalinidade final e ao caráter morfológico da amostra. O efeito do peso molecular depende de sua extensão. O peso molecular também exerce influência sobre a resistência ao impacto. Amostras com baixo peso molecular são frágeis e quebram sob baixas deformações, porém com aumento do peso molecular, a resistência aumenta e é bastante alta para o PEAD (Coutinho et al., 2003).

Um aumento no teor de ramificações reduz a cristalinidade e é acompanhado por variação significativa das características mecânicas, uma vez que causa um aumento no alongamento na ruptura e uma redução da resistência a tração (Reznickova et al., 2015).

A orientação das cadeias poliméricas exerce um forte efeito sobre as propriedades mecânicas do polímero. Materiais fabricados com PEAD altamente orientado são aproximadamente dez vezes mais resistentes do que os fabricados a partir do polímero não orientado, pois a orientação aumenta com o empacotamento

das cadeias e, conseqüentemente, aumenta a rigidez do polímero (Coutinho et al., 2003).

À temperatura ambiente, o PEAD não é solúvel em nenhum solvente conhecido, apesar de muitos solventes, como xileno, por exemplo, causarem um efeito de inchamento. Sob altas temperaturas, o PEAD se dissolve em alguns hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. O PEAD é relativamente resistente ao calor. Processos químicos sob alta temperatura, em meio inerte ou no vácuo, resultam em ruptura e formação de ligações cruzadas nas cadeias poliméricas. Sob elevadas temperaturas, o oxigênio ataca a macromolécula, reduzindo seu peso molecular. Sob baixas temperaturas pode ocorrer degradação foto-oxidativa (especialmente com luz $\lambda < 400$ nm). O PEAD é ligeiramente permeável a compostos orgânicos, tanto em fase líquida como gasosa. A permeabilidade à água e gases inorgânicos é baixa. É menos permeável a gases dióxido de carbono (CO_2), oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2). Em condições normais, os polímeros etilênicos não são tóxicos, podendo inclusive ser usados em contato com produtos farmacêuticos e alimentares (Coutinho et al., 2003).

O PEAD tem sido utilizado em várias aplicações biológicas, como em implantes faciais, como um substituto para o esqueleto em regeneração óssea (Niechajev, 2012; Lim et al., 2014), implantes ósseos tangíveis no corpo humano (Pourdanesh et al., 2014), engenharia de tecidos (scaffolds) (Reznickova et al., 2015), reconstrução da cartilagem nasal (Durbec et al., 2014) e em catéteres (Sobczac et al., 2013; Siedenbiedel et al., 2012). Um exemplo de um biomaterial utilizado como implante é o Medpor, que é fabricado de PEAD, poroso e com alta biocompatibilidade, utilizado como substituto do esqueleto. A implantação de PEAD na região facial é um procedimento seguro, realizado com frequência. O Medpor mostrou ser o melhor material aloplástico utilizado como substituto facial ósseo (Niechajev, 2012).

3.5.6 Polihidroxitirato

O polímero polihidroxitirato é o poliéster alifático mais estudado pertencente à classe dos polihidroxicanoatos, exibindo ótima biocompatibilidade, termoplasticidade, sendo biodegradável e podendo ser produzido por mais de 300 espécies de bactérias, ou sintetizado. O PHB pode ser biodegradado em ambientes aeróbios e anaeróbios, sem formação de quaisquer produtos tóxicos. O

polihidroxibutirato é um homopolímero derivado do 3-hidroxibutirato, sendo um poliéster do ácido D(-)-3-hidroxibutírico, o qual foi primeiramente descoberto em bactérias por Lemoigne em 1925. O PHB é acumulado em grânulos intracelulares de uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sob condições de limitação de nutrientes, que não sejam fonte de carbono. O processo de separação e purificação dos grânulos de polihidroxialcanoatos é baseado no uso combinado ou independente de solventes, não solventes, agentes surfactantes e preparados enzimáticos. As operações de separação e purificação podem ser precedidas pelo rompimento mecânico das células de bactérias e seguidas por uma operação de secagem dos grânulos. O PHB apresenta importantes características, como ser insolúvel em água e resistente à degradação hidrolítica, boa resistência ao UV, mas fraca resistência a ácidos e bases, solúvel em clorofórmio e outros hidrocarbonetos clorados, apropriado para uso médico devido ao fato de ser biocompatível, afunda na água, facilitando a biodegradação anaeróbica em sedimentos, não tóxico e menos pegajoso do que os polímeros tradicionais quando derretido (Chen & Wu, 2005; Bugnicourt et al., 2014).

O peso molecular do PHB varia de acordo com o organismo, as condições de crescimento e o método de extração. O PHB é aparentemente produzido por micro-organismos (como *Ralstonia eutrophus* ou *Bacillus megaterium*) em resposta a condições de estresse fisiológico e pode ser produzido tanto por cultura pura ou cultura mista de bactérias. O polímero é principalmente um produto da assimilação de carbono (de glicose ou amido) e é empregado por micro-organismos como uma forma de armazenamento de energia molecular, para ser metabolizado quando outras fontes comuns de energia não estiverem disponíveis. A biossíntese microbiana do PHB começa com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para acetoacetil-CoA, a qual é subsequentemente reduzida para hidroxibutiril-CoA. Este último composto é então usado como um monômero para polimerizar PHB (Chen & Wu, 2005; Bugnicourt et al., 2014).

Produzido biologicamente, o PHB é um polímero semicristalino e estéreo-regular (60-70% de cristalinidade e isotático com 100% configuração R) que permite um alto nível de degradabilidade. O PHB é um polímero linear com velocidade de cristalização rápida entre 80 °C e 100 °C e lenta abaixo de 60 °C ou acima de 130 °C, de modo que desta forma o material, permanece amorfo e pegajoso por horas. O PHB pode ser processado, principalmente através de moldagem por injeção,

extrusão, extrusão em filmes e corpos ocos. O PHB é um material frágil devido à recristalização, com envelhecimento que ocorre à temperatura ambiente. O PHB isostático apresenta uma série de propriedades comparáveis a polímeros a base de petróleo (como por exemplo, polipropileno), tal como a temperatura de fusão elevada (175 °C) e resistência a tração relativamente alta (30-35 MPa). Devido à sua origem natural, o PHB é livre de heterogeneidades, como resíduos de catalisador ou outras impurezas que podem atuar como núcleos heterogêneos, promovendo o início da cristalização. Isto afeta a cristalização cinética do polímero, o que frequentemente começa a partir de núcleos homogêneos. A lenta cristalização cinética do PHB permite sintonizar o nível de cristalinidade, o qual, por sua vez, é esperado por afetar também as cadeias rígidas amorfas acopladas com cristais. Através da adição de um agente de nucleação, o número de pequenas esferulitas aumenta. O estado físico da camada amorfa em contato com os cristais em crescimento influencia o mecanismo de cristalização do PHB. Além disso, o PHB decompõe-se termicamente a temperaturas ligeiramente acima do seu ponto de fusão (Bugnicourt et al., 2014).

Misturando polihidroxialcanoatos e, em particular, o PHB com outros polímeros, aditivos ou com plastificantes, pode-se melhorar o processamento deste polímero e reduzir a fragilidade dos mesmos. Muitas misturas que contêm polihidroxibutirato e polihidroxialcanoatos foram estudadas e também alguns tipos de plastificantes têm sido propostos. A literatura reporta o uso de plastificantes de materiais que são baratos e disponíveis no mercado, e geralmente de origem natural, como glicerol, glicerol triacetato, 4-nonilfenol, 4,4-diidroxidifenil metano, acetil tributil citrato, éster salicílico, triacetina, PEG, entre outros. As propriedades térmicas de misturas de PHB com PEG 400 em diferentes proporções (2, 5, 10, 40%) preparada por *Casting* (processo realizado com soluções dos polímeros em clorofórmio) foram investigadas. Nesse processo houve uma redução na resistência à tração e um melhor alongamento do polímero prevenindo a quebra do mesmo. A temperatura de fusão foi reduzida para esta mistura de PHB com PEG 400 (Bugnicourt et al., 2014).

Na medicina, o PHB é compatível com o sangue e tecidos de mamíferos. O monômero do PHB é um metabólito normal presente no sangue humano. Como o corpo reabsorve o PHB, ele pode ser usado como um implante cirúrgico, como fios de costura em cirurgias para a cicatrização de feridas e vasos sanguíneos. Em farmacologia, o PHB pode ser usado como microcápsulas, comprimidos, em terapias

ou como materiais para aplicação celular (Bugnicourt et al., 2014). O PHB pode ser usado como biomaterial nos dispositivos médicos, como em aplicações na engenharia de tecidos (Chen & Wu, 2005; Fan et al., 2015; Kulma et al., 2015; Belkhir et al., 2015; Lei et al., 2015), implantes médicos (Gredes et al., 2015), membranas (Gredes et al., 2015), sutura cirúrgica (Fan et al., 2015; Kulma et al., 2015; Belkhir et al., 2015), placas (Gredes et al., 2015), grânulos (Gredes et al., 2015), regeneração óssea (Gredes et al., 2015; Kose et al., 2003; Karahaliloglu et al., 2015), micro- e nanopartículas para encapsular drogas (Fan et al., 2015; Gredes et al., 2015) e medicina regenerativa (Pacheco et al., 2015).

Estudos realizados com o PHB *in vivo* demonstraram que estes biomateriais favorecem a produção de um tecido ósseo consistente em resposta à adaptação, sem evidência de uma resposta inflamatória crônica indesejável, após o período de 12 meses de implantação deste biomaterial. O osso foi formado rapidamente perto do biomaterial com uma estrutura altamente organizada, sendo que 80% da superfície do implante ficou em oposição direta ao osso formado. O PHB não mostrou quebra estrutural *in vivo* durante o período de implantação do estudo (Chen & Wu, 2005).

3.5.7 Ácido Polilático

O ácido polilático (PLA), um dos mais bem conhecidos poliésteres biodegradáveis, tem sido amplamente utilizado na medicina e na indústria química e farmacêutica. Primeiramente, o PLA com baixo peso molecular foi sintetizado por Carothers in 1932. Em 1954, a DuPont sintetizou PLA com alto peso molecular em um processo que foi patenteado. Dois métodos foram utilizados para produzir o substrato ácido láctico (AL): a síntese química baseada na matéria-prima petroquímica e a fermentação de carboidratos. Embora o primeiro método era o mais conhecido dos químicos, a fermentação de materiais naturais contendo hidratos de carbono, tais como arroz, milho, etc., foi o principal método utilizado para produzir AL e, subsequentemente, PLA (Hamad et al., 2015; Jamshidian et al., 2010).

Recentemente, o PLA tem desempenhado um papel eficaz em aplicações médicas, pois fornece excelentes propriedades a um baixo custo, em comparação com outros polímeros biodegradáveis tradicionais. A biodegradação do PLA foi estudada em animais e no corpo humano em aplicações médicas como implantes,

suturas cirúrgicas, materiais de liberação de drogas, entre outros. Nestes ambientes, o PLA é inicialmente degradado por hidrólise e oligômeros solúveis são formados e metabolizados pelas células. O PLA é um polímero semi-cristalino ou amorfo com uma temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão de aproximadamente 55 °C e 180 °C, respectivamente. O PLA pode ser processado por extrusão, moldagem por injeção, *casting*, termoformagem e por fiação de fibras (Belkhir et al., 2015; Huang et al., 2015). A síntese mais utilizada para a produção de PLA é através da polimerização por abertura de anel do lactídeo (dímero cíclico do ácido láctico) na presença de um catalisador. Este método consiste de três etapas: policondensação de monômeros do ácido láctico para PLA de baixo peso molecular, despolimerização de PLA para o lactídeo e polimerização catalítica por abertura do anel do lactídeo intermediário resultando em PLA com peso molecular controlado. Recentemente, Cargill desenvolveu um novo método para preparar PLA com alto peso molecular através do lactídeo utilizando um processo livre de solventes e um novo processo de destilação e utilizando uma gama de bio-copolímeros de PLA degradáveis constituídos por *meso* lactídeos ou D-Lactídeo (Hamad et al., 2015; Jamshidian et al., 2010).

Os efeitos da composição (L- e D-isômeros) e as propriedades reológicas do PLA foram reportadas no final de 1990. Dois tipos de PLA foram investigados, como PLA amorfo contendo 82% L-lactídeo e 18% D-lactídeo e PLA semi-cristalino contendo 95% L-lactídeo e 5% D-lactídeo. Os resultados mostraram que a viscosidade de cisalhamento do PLA aumenta com o aumento do isômero L na mistura dos isômeros L/D, devido à aumentada cristalinidade do PLA. Outro estudo investigou o efeito da estrutura do PLA nas propriedades reológicas utilizando dois tipos diferentes de PLA, com cadeia linear e ramificada. Os resultados mostraram que a viscosidade do PLA com cadeia ramificada foi mais alta que aquela de cadeia linear no comportamento Newtoniano, entretanto a viscosidade do PLA de cadeia ramificada foi mais baixa no comportamento não-Newtoniano (Jamshidian et al., 2010).

O PLA tem boas propriedades mecânicas (particularmente módulo de elasticidade Young, resistência à tração e força de flexão) comparado com polímeros tradicionais como polipropileno (PP), poliestireno (PS) e polietileno (PE). No entanto, o alongamento de quebra e a resistência ao impacto do PLA são inferiores aos do PP, PE, politereftalato de etileno (PET) e poliamida (PA). Embora a

resistência a tração e o módulo de Young (boa rigidez) do PLA seja comparado ao PET, a fraca resistência limita seu uso em aplicações que requerem deformação plástica em níveis maiores de estresse. Estes fatores têm motivado o interesse no endurecimento do PLA. Vários agentes de endurecimento do PLA têm sido utilizados, como por exemplo, o polietileno glicidil metacrilato, apresentando bons resultados (Hamad et al., 2015).

As propriedades de barreira do PLA processado são superiores ao do PE, PP e semelhante ao PS, mas inferiores ao PET. Os coeficientes de permeabilidade de CO₂, O₂, N₂ e água gasosa (H₂O_(g)) para o PLA são menores do que as do PS, mas maiores do que as do PET. Em geral, a cristalinidade do PLA afeta fortemente as propriedades de barreira deste polímero, onde a diminuição na cristalinidade é um aspecto negativo nas propriedades de barreira. Muitos estudos têm reportado processos para melhorar as propriedades de barreira do PLA. O PLA foi tratado com um antioxidante fenólico sintético e foi possível constatar que as propriedades térmicas e mecânicas foram melhoradas, sendo que esse antioxidante não teve efeito sobre as propriedades de barreira de oxigênio do PLA (Hamad et al., 2015; Jamshidian et al., 2010).

Atualmente o PLA está sendo usado em várias aplicações médicas, como scaffolds (Belkhir et al., 2015; Davachi & Kaffashi, 2015; Bishai et al., 2014), sistema de liberação de drogas, (Belkhir et al., 2015; Davachi & Kaffashi, 2015; Hamad et al., 2015; Grumezescu et al., 2014), dispositivos de fixação óssea (Belkhir et al., 2015; Hamad et al., 2015; Makarov et al., 2013; Han et al., 2014), parafusos cirúrgicos (Davachi & Kaffashi, 2015; Grumezescu et al., 2014), malhas (Davachi & Kaffashi, 2015), microesferas (Davachi & Kaffashi, 2015), microcápsulas (Davachi & Kaffashi, 2015; Grumezescu et al., 2014), revestimentos finos (Davachi & Kaffashi, 2015; Grumezescu et al., 2014) e na engenharia de tecidos (Huang et al., 2015; Wang et al., 2015; Salerno et al., 2015; Mi et al., 2013).

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que busca a solução de problemas médicos críticos, tais como a perda de tecidos e a falência de órgãos, utilizando o desenvolvimento e aplicação dos conhecimentos em química, engenharia e ciências da vida. O PLA e seus copolímeros são uma família de poliésteres alifáticos lineares mais frequentemente utilizados em engenharia de tecidos. As aplicações médicas do PLA surgiram a partir da sua biocompatibilidade

no corpo humano pela simples hidrólise do éster, produzindo compostos de degradação não prejudiciais e não tóxicos (Hamad et al., 2015).

O PLA e seus copolímeros têm sido utilizados em uma gama de aplicações relatadas ao tratamento de feridas, como suturas cirúrgicas, cicatrização de feridas de extração dentária e prevenção de aderências pós-operatórias. Stents (endoprótese expansível, caracterizada como um tubo) feitos de PLA têm sido utilizados no tratamento de lesões ureterais. Esses stents são degradados pelo corpo, não sendo necessário a remoção deste dispositivo médico (Hamad et al., 2015).

Em sistemas de liberação de drogas, o fármaco pode ser liberado continuamente por diferentes períodos de tempo, até um ano. Diferentes tipos de polímeros são utilizados nestas aplicações, incluindo polímeros biodegradáveis. Polímeros biodegradáveis como o PLA, são utilizados como sistemas de liberação de drogas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, melhor encapsulamento e baixa toxicidade. A polimérica liberação do fármaco ocorre em uma das três formas: erosão, difusão e inchaço. No caso de poliésteres biodegradáveis que consistem em monômeros conectados uns aos outros por ligações ésteres, a degradação começa após a penetração da água dentro do dispositivo. A quebra de ligações ésteres ocorre aleatoriamente através da clivagem hidrolítica do éster, levando à subsequente erosão do dispositivo. Para os polímeros biodegradáveis foram propostos dois mecanismos de erosão diferentes: homogênea ou erosão em massa e heterogênea ou erosão da superfície (Hamad et al., 2015).

O PLA e seus copolímeros na forma de nanopartículas são utilizados no processamento de encapsulamento de fármacos, tais como corticóides, psicóticos, hormônios, dermatoterapia, proteínas, entre outros. Diferentes métodos são utilizados para obter estas nanopartículas, tais como evaporação do solvente, deslocamento de solvente e difusão da emulsão do solvente (Hamad et al., 2015).

Os polímeros biodegradáveis são utilizados em aplicações ortopédicas, a fim de evitar um segundo procedimento cirúrgico para remover o dispositivo médico. Tradicionalmente, o titânio era utilizado nesta aplicação, mas neste caso, era necessário um segundo procedimento cirúrgico para remover o dispositivo de titânio. Historicamente, o PLA foi utilizado para produzir vários dispositivos médicos biodegradáveis como parafusos, pinos de fixação e suturas. Atualmente estes dispositivos médicos biodegradáveis de PLA são altamente utilizados na clínica

médica, no caso onde a alta rigidez mecânica ou força não é necessária. O PLA é um dos mais promissores candidatos para várias aplicações industriais em dispositivos médicos, devido a excelente biocompatibilidade e ótimas propriedades deste material (Hamad et al., 2015; Jamshidian et al., 2010).

3.5.8 Técnicas de Caracterização dos Polímeros

3.5.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), uma imagem é formada por feixes bem finos de elétrons os quais varrem a superfície de uma amostra, em uma série de linhas e quadros. A qualquer momento, a amostra é bombardeada com elétrons em uma área muito pequena. Tais elétrons podem ser elasticamente refletidos, sem perda de energia (elétrons retroespalhados), os quais podem ser absorvidos originando elétrons secundários de baixa energia (junto com os raios X) ou ainda podem ser absorvidos, originando luz visível (Li et al., 2015).

Todos esses efeitos podem ser usados para formar a imagem. Dessa forma, o contraste da imagem será determinado pela morfologia da amostra. Uma imagem de alta resolução pode ser obtida devido ao pequeno diâmetro do feixe de elétrons primário. O microscópio eletrônico de varredura não contém objetivas, lentes intermediárias ou projetores para magnificar a imagem. A magnificação é o resultado da razão entre a área escaneada na amostra e a área da tela da televisão. A microscopia eletrônica de varredura é a melhor técnica e a mais amplamente usada em análises de superfícies (Li et al., 2015).

3.5.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de raios X por Dispersão de Energia (MEV/EDS)

A MEV/EDS é uma técnica analítica usada para a análise elementar ou caracterização química de uma amostra. Se baseia na investigação de uma amostra através de interações entre partículas ou radiação eletromagnética e matéria, analisando os raios X emitidos pela matéria em resposta à incidência de partículas carregadas. Suas capacidades de caracterização são devidas em grande parte ao princípio fundamental que cada elemento tem uma estrutura atômica única, de

modo que os raios X emitidos são característicos desta estrutura que identificam o elemento (Hui & Chouvy, 2013).

Para estimular a emissão de raios X característicos a partir de uma amostra, um feixe de alta energia de partículas carregada, tais como elétrons ou prótons, ou um feixe de raios X, é focado na amostra a ser estudada. Em repouso, um átomo dentro da amostra contém elétrons no estado fundamental (ou não excitado) em discretos níveis de energia ou camadas eletrônicas ligadas ao núcleo. O feixe incidente pode excitar um elétron em uma camada interna e ejetá-lo a partir da camada, criando um buraco de elétrons. Um elétron de uma camada exterior tem alto consumo de energia e a diferença de energia entre a camada de alta energia e a de baixa energia pode ser liberada na forma de raios X. O número e a energia de raios X emitida de uma amostra pode ser medida por um espectrômetro de dispersão de energia. Como as energias de raios X são características da diferença de energia entre as duas camadas e da estrutura atômica do elemento emissor, a EDS permite que a composição elementar da amostra seja medida (Hui & Chouvy, 2013).

3.5.8.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A Microscopia confocal de varredura a laser é uma técnica utilizada para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal (Tang et al., 2015).

A Microscopia confocal de varredura a laser permite a obtenção de imagens de alta resolução através de cortes ópticos, posteriormente agrupados para se fazer a reconstrução tridimensional da tipografia de objetos complexos. Ela possibilita a eliminação de informações fora de foco da imagem, o que favorece a aquisição de amostras mais espessas, como biofilmes bacterianos e fúngicos, estruturas fúngicas específicas, células humanas e animais, tecidos dentários e outros tipos celulares. A Microscopia confocal pode ser empregada para a observação do estado fisiológico das células e tecidos, construção de imagens em 3D e observação de células e tecidos marcados com fluorocromos por imunofluorescência (Tang et al., 2015; Carlsson et al., 1985).

3.5.8.4 Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica, também conhecida como microscopia de varredura de força, é um instrumento óptico-mecânico capaz de detectar forças na ordem de piconewtons (10^{-12} N). Tem sido utilizada largamente no estudo de polímeros, devido a sua capacidade de fornecer informações que não eram passíveis de se obter com o uso da microscopia eletrônica de varredura. Por conseguir obter imagens de superfície de materiais sob as mais variadas condições (ar, vácuo e em meio líquido), se tornou um dos equipamentos mais completos para estudo de materiais em micro- e nanoescalas (Chyasnavichyus et al., 2015; Sousa & Scuracchio, 2014).

Apresenta várias vantagens em relação às microscopias eletrônica de varredura e de transmissão, para estudo de polímeros, entre elas: dispensar o uso de vácuo ou de recobrimento da amostra, a possibilidade de se realizar medidas diretas de altura e rugosidade, além de, para estruturas ordenadas, poder obter imagens com resolução atômica. As imagens obtidas com os diferentes tipos de Microscopia de força atômica são relacionadas com a natureza das forças envolvidas: repulsão coulômbica (modo contato), força de van der Waals (modo de não contato e contato intermitente) força magnética, força de atrito, entre outras (Chyasnavichyus et al., 2015; Sousa & Scuracchio, 2014).

O princípio de funcionamento do Microscópio de força atômica é fundamental para entender sua gama de aplicações. Ele trabalha de forma semelhante a uma agulha de toca-disco (vinil), onde, no lugar da agulha (probe), se encontra o cantiléver, que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de poucas micra. Para percorrer a amostra de forma a se obter uma imagem, é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (x,y,z), com precisão de Angstrons (Å). Durante a varredura, é utilizado um sistema de alinhamento, onde um feixe de laser incide sobre o cantiléver e refletindo em um sensor, de quatro quadrantes, fornece informação de posição para o sistema de realimentação e controle. Este corrige a posição do cantiléver de forma a manter contato com a amostra, durante a varredura e permite a obtenção da imagem (Chyasnavichyus et al., 2015; Sousa & Scuracchio, 2014).

3.5.8.5 Análises de Difração de raios X

A análise por difração de raios X é uma técnica de análise qualitativa que permite obter informações sobre materiais, como a composição química, a identificação de estruturas e fases cristalinas de materiais cristalinos, sejam eles naturais ou artificiais. Permite caracterizar materiais cristalinos. A técnica possibilita também evidenciar os vários tipos de estruturas (ordenadas ou não) que podem aparecer em um material polimérico, permitindo distinguir se esse polímero é cristalino ou amorfo. Em um cristal, unidades de átomos estão paralelamente repetidas em intervalos equidistantes. Quando um retículo cristalino dessa natureza é exposto a um feixe monocromático de raios X, os átomos presentes nessa estrutura vibram, provocando um efeito de difração dos raios X. Este efeito só é observado se houver uma interferência construtiva (orientação em fase) das ondas difratadas pelos átomos. Para que isso aconteça, a diferença de caminho ótico dos raios X incidentes deve ser igual a um múltiplo inteiro de comprimento de onda (n) da radiação utilizada (Boiko et al., 2015; Morançais et al., 2015).

A condição para a existência dos raios X difratados é a Lei de Bragg: $n\lambda = 2d\sin\theta$, onde n é a ordem de difração, λ é o comprimento da radiação monocromática, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de incidência da radiação em relação à amostra. A obediência à Lei de Bragg leva ao espalhamento dos raios X difratados em determinados ângulos de difração, originando picos, os quais correspondem aos respectivos planos (hkl) da amostra em determinada condição de difração. Dessa forma, a partir da equação de Bragg e, conhecendo-se o comprimento de onda e o ângulo de incidência da radiação utilizada, pode-se determinar a distância interplanar d associada aos planos hkl de uma determinada estrutura cristalina (Boiko et al., 2015).

3.5.8.6 Cromatografia de Permeação em Gel

A Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), também conhecida como Cromatografia por Exclusão de Tamanho ou Cromatografia de Gel de Filtração é uma técnica cromatográfica que separa moléculas dissolvidas com base no seu tamanho, bombeando-as através de colunas especializadas que contêm no seu interior um material microporoso (Szmereková & Králik, 1984).

À medida que a amostra é separada e eluída da coluna, ela pode ser caracterizada por um único detector de concentração (calibração convencional) ou

por uma série de detectores (calibração universal e detecção tripla). GPC é usada para caracterizar polímeros naturais e sintéticos, biopolímeros, proteínas ou nanopartículas (Pathaweeisariyakul et al., 2015).

Quando a separação por GPC é acoplada a detectores de espalhamento de luz, concentração e viscosímetro juntos (detecção tripla), a técnica proporciona a distribuição do peso molecular absoluto, do tamanho molecular e da viscosidade intrínseca, assim como informações sobre a estrutura macromolecular, a conformação de agregação e ramificação (Pathaweeisariyakul et al., 2015).

3.5.8.7 Calorimetria Diferencial por Varredura

A técnica da calorimetria diferencial por varredura mede a diferença de energia térmica entre uma pequena quantidade de amostra (cerca de 10 mg) e um material de referência, durante um processo no qual tanto a amostra quanto a referência são submetidas a um programa controlado de temperatura. Nessa análise, o diferencial de energia medido corresponde ao conteúdo de calor (entalpia) ou calor específico da amostra (Peelman et al., 2015).

Esta técnica é frequentemente usada em conjunto com a análise termogravimétrica para determinar se o evento é endotérmico (fusão, vaporização e sublimação) ou exotérmico (degradação oxidativa). É também usada para determinar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f), temperatura de cristalização (T_c), porcentual de cristalinidade (X_c) e entalpia de fusão (ΔH_f) de polímeros, além de permitir o estudo da cinética de reações químicas, como, por exemplo, reações de oxidação e decomposição de substâncias (Peelman et al., 2015).

O equipamento para a análise requer duas células equipadas com termopares, além de um forno programável, com registrador e controlador de gás. A automação é ainda mais ampla devido à natureza mais complicada da instrumentação e da realização dos cálculos (Hourston et al., 1997).

3.5.8.8 Análises Termogravimétricas

A estabilidade térmica de materiais poliméricos é usualmente determinada por análise termogravimétrica. Quando o aquecimento acontece sob um gás inerte (nitrogênio), ocorre uma degradação não-oxidativa, enquanto que o uso de ar ou oxigênio permite a degradação oxidativa dos materiais. A ATG mede a contínua

perda de massa de uma pequena quantidade de amostra (cerca de 10 mg) em uma atmosfera controlada (ar ou nitrogênio), à medida que ocorre o aumento de temperatura em uma taxa linear programada. Nesse tipo de análise, a perda de massa é devida a alguns eventos, tais como a volatilização de líquidos e a decomposição e a evolução de gases a partir da decomposição de sólidos. O início da volatilização é proporcional ao ponto de ebulição do líquido e o resíduo que permanece à alta temperatura representa o conteúdo porcentual de cinzas na amostra (Peelman et al., 2015; Xu et al., 2016).

O instrumental básico requerido para esse tipo de análise é bastante simples: Uma balança de precisão, forno programável e registrador. Instrumentos modernos, entretanto, são automatizados e incluem um software para o tratamento e a interpretação dos dados. Além disso, adaptações de atmosferas contendo ar, nitrogênio ou oxigênio, podem ser realizadas para cada amostra (Peelman et al., 2015).

O gráfico obtido neste tipo de análise é um termograma, o qual mostra a perda de massa devido à dessorção dos gases ou decomposição da amostra em função da temperatura. A análise termogravimétrica é de fato, uma técnica bastante simples para analisar quantitativamente o conteúdo de cargas em um determinado polímero, sendo uma ferramenta muito útil no estudo de materiais poliméricos (Peelman et al., 2015; Xu et al., 2016).

3.5.8.9 Análises Dinâmico-Mecânicas

A análise dinâmico-mecânica tem como um dos principais objetivos relacionar as propriedades macroscópicas, tais como as propriedades mecânicas, às relaxações moleculares associadas a mudanças conformacionais e às deformações microscópicas geradas a partir de rearranjos moleculares. As propriedades mecânicas dos materiais são avaliadas a partir de uma solicitação, na forma de uma deformação ou na aplicação de uma tensão, com o monitoramento da resposta do material, expressa como tensão ou como deformação, respectivamente. A análise dinâmico-mecânica mede o módulo dinâmico (em fase ou fora de fase) em um experimento de deformação oscilatória durante uma varredura programada de temperatura a frequências controladas. O intervalo de temperatura varia de -150 °C a 300 °C, com frequências que oscilam entre 0,033 a 90 Hz. O tamanho das

amostras geralmente utilizadas nos testes flexurais são da ordem de 1 x 10 x 40 mm, sendo ligeiramente inferiores em testes de cisalhamento (Dupont, 2004).

Os termogramas obtidos fornecem informações a respeito do módulo elástico (E) e fator de perda ($\tan \delta$) versus a temperatura. O pico da $\tan \delta$ é uma medida particularmente discriminatória da temperatura de transição vítrea (T_g), embora este seja o centro de relaxação, enquanto que no experimento de calorimetria diferencial por varredura, a temperatura de início da relaxação da T_g é usualmente indicada. Este tipo de análise possui também uma capacidade de multiplexação de frequências, as quais podem ser usadas para calcular energias de ativação usando-se softwares de superposição tempo-temperatura (Dupont, 2004).

3.5.8.10 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X (EFEX)

A técnica de EFEX, também conhecida por Espectroscopia de Elétrons para Análise Química, é uma técnica experimental de análise que encontra grande aplicação em áreas onde o estudo físico-químico de amostras mostre-se importante. Em especial, é de grande valia em trabalhos na área da física do estado sólido. Fornece uma análise total elementar, exceto para o hidrogênio e hélio, de qualquer superfície sólida que é estável no vácuo ou pode ser feita por arrefecimento em vácuo estável (Qian & Gerson, 2015).

Na prática uma técnica de análise de superfície, a espectroscopia EFEX fundamenta-se no efeito fotoelétrico. Em essência, esta técnica consiste em se radiar uma amostra com raios X e em coletar os fotoelétrons por ela emitidos em um analisador de elétrons, dispositivo esse capaz de resolvê-los em função das respectivas velocidades (energias cinéticas) e de, então contá-los. Um gráfico de contagem de elétrons x velocidade (corrente x energia cinética) é estabelecido por varredura, geralmente através de um mecanismo de coleta de dados automatizado, e um espectro de EFEX é obtido (Qian & Gerson, 2015).

Os espectros EFEX permitem identificar quantitativamente, em profundidades da ordem de dezenas de nanômetros e a fração centesimal de camada atômica, todos os elementos químicos na superfície da amostra, suas concentrações relativas, o ambiente químico dos elementos, seus estados de oxidação e, em casos específicos, permitem inclusive inferir a morfologia da superfície em análise (Qian & Gerson, 2015).

3.5.8.11 Ângulo de Contato da Água

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do chamado ângulo de contato θ . O formato que uma gota de líquido assume em contato com uma superfície sólida depende do ângulo θ que a gota de líquido faz com a superfície sólida. O líquido molhará completamente a superfície quando $\theta = 0^\circ$ porque a nova superfície criada possui energia de superfície γ menor do que a superfície original sólido-gás. No outro extremo, a ausência completa de molhamento ocorre quando $\theta = 180^\circ$. O molhamento parcial existe no intervalo de ângulos de contato compreendidos entre $0^\circ < \theta < 90$ (Liu et al., 2015; Delcheva et al., 2015).

O molhamento de um sólido por um líquido ocorre quando a interação entre as moléculas do líquido com a interface sólida é maior do que a interação das moléculas entre si. Em geral, as energias γ sólido-líquido são menores do que as correspondentes γ sólido-vapor e γ líquido-vapor porque numa interface sólido-líquido quase todas as ligações atômicas e moleculares são completadas. Esta compatibilidade existe quando compostos são formados na interface (Liu et al., 2015).

O molhamento (ou não-molhamento) é severamente alterado pela presença de contaminantes adsorvidos na superfície sólida. De fato, uma das maiores dificuldades na medida de ângulo de contato é a obtenção de superfícies limpas e homogêneas. As superfícies sólidas diferem das superfícies líquidas pelo grau de heterogeneidade mesmo após os mais cuidadosos procedimentos de polimento. O valor do ângulo também dependerá se o líquido está avançando molhando uma superfície seca ou se está recuando de uma superfície já molhada. O grau de vibração a que é submetido o sistema também afetará a medida do ângulo de contato (Liu et al., 2015; Delcheva et al., 2015).

3.6 Sais Imidazólicos e Líquidos Iônicos

Os sais imidazólicos (SI) são derivados catiônicos do heterocíclico imidazol neutro, via alquilação de ambos os átomos de nitrogênio e são conhecidos por apresentarem várias propriedades avançadas (Borowiecki et al., 2013; Schrekker et al., 2008; Donato et al., 2009). Muitos dos SI podem ser classificados como líquidos iônicos (LI), sais que apresentam-se líquidos abaixo e a 100°C . Os LI fazem parte da grande classe dos sais imidazólicos, que são todos os compostos

constituídos tipicamente por um cátion orgânico, juntamente com um ânion orgânico ou inorgânico e uma unidade imidazólica. Os LI são usados em uma ampla variedade de aplicações devido as suas atrativas propriedades físicas e químicas, as quais incluem alta estabilidade térmica, ser líquido em uma ampla faixa de temperatura, ampla janela eletroquímica, alta condutividade e mobilidade iônica, fácil reciclagem e um bom solvente para uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (Schrekker et al., 2008; Donato et al., 2009; Schrekker et al., 2013).

Os SI são substâncias que podem ser utilizadas em várias aplicações químicas e farmacêuticas, devido as suas propriedades físicas e químicas que permitem modificações estruturais, tanto no cátion como no ânion (Schrekker et al., 2013; Riduan & Zhang, 2013) ou por incorporação de um grupo funcional específico nos íons constituintes (Pendleton & Gilmore, 2015). Várias atividades biológicas e aplicações dos SI tem sido identificadas, como antimicrobiana (Riduan & Zhang, 2013; Pendleton & Gilmore, 2015; Smiglak et al., 2014), antifúngica (Smiglak et al., 2014; Liu et al., 2013, McCann et al., 2013), antitumor (Riduan & Zhang, 2013), antioxidante (Riduan & Zhang, 2013), antifibrosa (Riduan & Zhang, 2013), bioengenharia (liberação droga/gene ou biosensores) (Riduan & Zhang, 2013; Pendleton & Gilmore, 2015; Smiglak et al., 2014), anti-inflamatória, entre outras (Fang et al., 2010).

Recentemente, um conjunto de quatorze LI imidazólicos foram testados *in vitro* para verificar a atividade antifúngica contra espécies de leveduras emergentes. Os sais metilimidazólicos *N*-substituídos, incluindo os *N*-substituintes $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 3, 5, 9, 13, 15$); $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ ($n = 1, 3$); $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ ($n = 1, 3$) e os aniões cloreto (Cl^-), tetrafluorborato (BF_4^-), bis(trifluorometanosulfonil)imida ($(\text{F}_3\text{CSO}_2)_2\text{N}^-$), metanossulfonato H_3CSO_3^- e hexafluorofosfato (PF_6^-), foram sintetizados e testados contra 32 isolados clínicos de leveduras provenientes de infecções nosocomiais. Os seis sais imidazólicos *N*-alquil-substituídos com $n = 9, 13, \text{ ou } 15$, independente do ânion, mostraram atividade inibitória em baixas concentrações contra isolados de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Trichosporon asahii*. No geral, o LI $\text{C}_{16}\text{MimCl}$ mostrou o melhor espectro entre os seis LI identificados, apresentando a maior atividade inibitória contra todos os isolados com um CIM de $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, independente do tipo de isolado. O tratamento com os LI mostrou que não existem efeitos citotóxicos e genotóxicos em leucócitos humanos (Schrekker et al., 2013).

Estudo realizado com uma série de LI de cloretos de 1-alkil-3-metilimidazólico e 1-alkilquinolínico mostraram possuir amplo espectro e atividade antimicrobiana contra várias bactérias; Gram-positivas e Gram-negativas, e fungos, onde foi possível verificar que a atividade biológica está relacionada ao tamanho da cadeia alkil. Quanto maior a cadeia alkil, melhor é a atividade biológica. Os biofilmes microbianos, os quais protegem os micro-organismos de antissépticos, desinfetantes e antibióticos, foram quebrados pelos LI contendo longas cadeias alkil (Smiglak et al., 2014).

A descontaminação de superfícies e esterilização é um dos grandes desafios de ambientes clínicos, como hospitais, devido a bactérias como *Staphylococcus aureus* e fungos, os quais são muito difíceis de eliminar das superfícies de dispositivos médicos que são feitos principalmente de polímeros. Em estudo recente, foi realizada a preparação de dois LI funcionais docusato de 1-etilperidínio e docusato de tributil(2-hidroxietil) fosfônio, os quais foram usados como aditivos plastificantes para produção de polímeros e ao mesmo tempo testados como agentes antimicrobianos e antibiofilme, apresentando bons resultados para um espectro de bactérias resistentes a antibióticos (Smiglak et al., 2014).

O LI imiscível em água tetrafluoroborato de 1-*n*-dodecil-3-metilimidazólico ($C_{12}MImBF_4$) e seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD) foi sintetizado e testado para avaliar a eficiência antimicrobiana dos compostos obtidos, contra *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Candida albicans* (M 885 ATCC 10231) e seus isolados clínicos. Como resultado, foi verificado que ambos $C_{12}MImBF_4$ e o complexo $C_{12}MImBF_4/\beta$ -CD possuem alta atividade antimicrobiana, como revelado por valores de zonas de inibição parecidos contra todos os micro-organismos testados. Estudos de toxicidade foram realizados em *Danio rerio* (zebrafish), mostrando que o líquido iônico puro $C_{12}MImBF_4$ é pouco tóxico, enquanto que o complexo $C_{12}MImBF_4/\beta$ -CD não é tóxico, tendo grande potencial para ser aplicado como antimicrobiano (Hodyna et al., 2016).

3.7 Atividade Antibiofilme

Ocorre quando uma substância ou material (por ex. polímero) com uma substância inserida (aditivo) têm a capacidade de atuar contra o biofilme fúngico,

reduzindo ou impedindo a adesão e formação do biofilme em uma superfície inerte (Dharmaparakash et al., 2015; Banat et al., 2014; Campoccia et al., 2013).

3.7.1 Terapia de Bloqueio Antifúngica

A terapia de bloqueio antifúngica (TBA) utiliza instilação (administração gota a gota de uma medicação direto no corpo) prolongada de uma solução contendo altas concentrações de agentes antimicrobianos ou antissépticos dentro de um dispositivo médico, como um catéter intravascular, usualmente em conjunto com antibióticos sistêmicos, na tentativa de esterilizar o dispositivo médico (Walraven & Lee, 2013).

Muitas infecções que ocorrem nos pacientes pelo uso de dispositivos médicos, como catéteres, são relacionadas com a formação de biofilmes intraluminais, os quais são difíceis de tratar. Nos biofilmes relatados (células sésseis), os CIM são dramaticamente elevados quando comparados com os CIM de células planctônicas (onde não ocorre a formação do biofilme, mas ocorre a infecção). Espécies de *Candida* são a terceira causa mais comum de infecções sanguíneas com altos níveis de mortalidade, comparadas com *Pseudomonas* (segunda causa) e excedendo as taxas de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* (primeira causa). Os biofilmes de *Candida* são caracterizados pela aumentada resistência à terapia antifúngica convencional, em particular anfotericina B e fluconazol (Walraven & Lee, 2013; Toulet et al., 2012). Mecanismos responsáveis pela intrínseca resistência aos fármacos pelos biofilmes de *Candida* incluem: a limitada penetração do fármaco na matriz do biofilme, incluindo ligações do fármaco para as substâncias da matriz exopolimérica relacionadas com a beta-glicana; aumento rápido da expressão de genes de resistência antifúngica, particularmente daqueles que codificam as bombas de efluxo de azóis e a presença de uma subpopulação de células resistentes à presença do fármaco. Assim, a aumentada resistência antifúngica dos biofilmes é complexa, com fenótipo pleiotrópico devido a vários mecanismos de interação, sendo de difícil erradicação nos dispositivos médicos (Walraven & Lee, 2013).

Além disto, na clínica médica a reinserção do dispositivo médico (por exemplo catéter) pode ser uma técnica desafiadora e representa aumentado risco de morbidade e mortalidade dos pacientes. Os pacientes podem estar criticamente doentes requerendo acesso intravenoso para a administração da medicação, ou em

nutrição parenteral total; eles podem estar severamente trombocitopênicos ou coagulopáticos ou ter limitado acesso venoso. Dependendo da localização da reinserção do dispositivo médico, podem ocorrer complicações no paciente, como arritmias cardíacas, hemorragias, entre outras (Walraven & Lee, 2013).

Então, a estratégia básica da TBA é utilizar concentrações locais de agentes antimicrobianos extremamente altas nos pacientes em tratamento com dispositivos médicos para “bloquear” a infecção. As soluções utilizadas são de 100 a 1000 vezes mais concentradas que aquelas usadas sistematicamente. A TBA tem sido recentemente recomendada pela Infectious Disease Society of America (IDSA) como um guia prático de procedimentos de primeira opção para o gerenciamento de infecções sanguíneas relacionadas ao uso de catéteres e dispositivos médicos invasivos, causadas por bactérias e fungos como espécies de *Candida*, quando a retenção do dispositivo médico, como catéter é indicado (Walraven & Lee, 2013). Estudo recente, mostrou a utilização de mais de 40% de etanol por 30 minutos em catéteres infectados por *Candida* como um tratamento adjunto útil aos antibióticos sistêmicos na esterilização e erradicação da infecção relacionada ao uso de catéteres preservando desta forma o acesso venoso central e não sendo necessária a remoção do dispositivo médico (Oncu, 2014).

Contudo, em pacientes neutropênicos com infecções sanguíneas causadas por espécies de *Candida*, é recomendado a remoção do catéter ou do dispositivo médico utilizado. Devido a isto, a terapia de bloqueio antifúngica surge como uma alternativa no controle de infecções causadas por bactérias e fungos como *Candida*, mas ainda não é uma solução para a erradicação desse problema, pois em muitos casos clínicos essa terapia não funciona e, ainda é necessário a remoção do dispositivo médico do paciente (Ko et al., 2010).

3.7.2 Materiais com Propriedade Antibiofilme

As *Candida* spp. podem colonizar superfícies de uma grande variedade de materiais naturais e sintéticos, como polímeros, cerâmicas, composições metálicas, entre outros. Isto eventualmente leva à formação e ao estabelecimento de biofilmes fúngicos que proliferam e causam consequências adversas principalmente em pacientes com dispositivos médicos. Na tentativa de reduzir ou de evitar os biofilmes, as superfícies dos materiais utilizados para a fabricação dos produtos vulneráveis ao crescimento fúngico, como dispositivos médicos, estão sendo

revestidas com substâncias antifúngicas e antimicrobianas, apresentando propriedades antibiofilme. Ou seja, estes materiais impedem a adesão e a formação do biofilme fúngico nas suas superfícies (Coad et al., 2014).

Implantes ósseos com porosidade aberta permitem a osseointegração rápida, mas também apresentam um risco aumentado de infecções associadas a formação de biofilmes. Estudo recente projetou um material de implante consistindo de dióxido de silício ou sílica (SiO_2) mesoporoso com barreira de difusão (porosidade de 6,4 nm) com controle de liberação de drogas, integrado em uma estrutura macroporosa de suporte de carga Ti (titânio poroso). O material compósito Ti/ SiO_2 (titânio e sílica) desenvolvido junto com um teste *in vitro* consistindo de discos de Ti/ SiO_2 com toremifeno inserido em microplacas de 12 poços foi testado para verificar a atividade antibiofilme e a liberação do composto toremifeno utilizado como uma molécula de amplo espectro antibiofilme. Foi verificado controle de liberação da substância toremifeno e atividade antibiofilme contra isolados patogênicos humanos de *Candida albicans* e bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Porphyromonas gingivalis*. Testes realizados *in vivo* confirmaram a atividade antibiofilme contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. Todas estas espécies patogênicas são conhecidas por formar biofilmes em dispositivos médicos e implantes (Braem et al., 2015).

A substância penta prata hexaiodato (Ag_5I_6) foi estudada para verificar se a mesma apresentava atividade antibiofilme. Para testar esta atividade, curativos revestidos com duas camadas exteriores de polietileno de alta densidade e um núcleo de poliéster, com uma bandagem adesiva elástica de algodão, foram impregnados com Ag_5I_6 e comparados com curativos comercialmente disponíveis, contendo clorexidina, iodo e biguanida de polihexametileno. Os materiais foram testados para determinar a capacidade de prevenir a aderência de micro-organismos planctônicos e a capacidade de eliminar/romper biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Apenas os curativos contendo Ag_5I_6 foram capazes de prevenir e eliminar micro-organismos planctônicos para todas as espécies testadas. Além disso, curativos contendo Ag_5I_6 foram mais eficazes que os curativos comerciais testados na prevenção da aderência microbiana, na morte rápida de micro-organismos planctônicos e na habilidade para eliminar/romper biofilmes maduros. Assim, Ag_5I_6 pode ser um

valioso agente antimicrobiano e antibiofilme para ser usado em dispositivos médicos, incluindo curativos, vários tipos de catéteres e implantes (Incani et al., 2015).

Nanopartículas metálicas biofabricadas são biocompatíveis, baratas e possuem uma imensa utilidade no domínio da biomedicina e ciências dos materiais. As nanopartículas de prata (AgNP) foram sintetizadas utilizando um extrato metanólico de *Syzygium cumini*. As nanopartículas exibiram atividade antimicrobiana contra vários patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus* sp. e *Candida albicans*. AgNP mostraram potencial para inibir a formação do biofilme de uma variedade de micro-organismos. As nanopartículas não apresentaram citotoxicidade em células humanas embrionárias do rim (Gupta et al., 2014).

Os poliésteres [poli(alquenos succinatos)] foram testados para verificar se possuíam atividade antibiofilme. Estes materiais apresentaram atividade antibiofilme para isolados de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, com potencial para reduzir substancialmente a incidência de infecções associadas a dispositivos médicos, como catéteres e fios para suturas. Estes novos biopolímeros mostraram potencial para serem utilizados na fabricação ou revestimento de dispositivos médicos, pois apresentam características inovadoras, como preparação simples e barata, boas propriedades de resistência mecânica e térmica e capacidade antibiofilme sem qualquer funcionalização de superfície específica ou na encapsulação de agente antimicrobiano. Além disso, os poliésteres mostraram ser altamente biocompatíveis, promovendo a adesão e proliferação de células-tronco humanas mesenquimais, induzindo alterações morfológicas, as quais são dependentes das características estruturais do polímero, tornando-os candidatos promissores para serem utilizados como dispositivos médicos e no campo da engenharia de tecidos (Jäger et al., 2015).

3.8 Polímeros com Sais Imidazólicos

A utilização de polímeros com SI, na pesquisa científica, vem surgindo como uma tecnologia emergente na tentativa de obter-se materiais com propriedades antimicrobianas e antibiofilme, representando uma classe interessante de polímeros funcionais para aplicações avançadas (Liu et al., 2012; Anderson & Long, 2010).

A contaminação de dispositivos médicos com bactérias resistentes a meticilina, como *Staphylococcus aureus*, é de grande preocupação clínica. O poli(vinil cloreto) é largamente utilizado na produção de dispositivos médicos, como catéteres. A flexibilidade do tubo do catéter ou outros dispositivos médicos é derivada da adição de plastificantes. Em pesquisa realizada, foram utilizados dois LI funcionais, docusato de 1-etilpiridínio e docusato de tributil(2-hidroxietil)fosfônio, os quais singularmente proporcionaram efeito plastificante, e exibiram atividade antimicrobiana e antibiofilme para um amplo espectro de bactérias resistentes a antibióticos. A plastificação do poli(vinil cloreto) foi adaptada como uma função da concentração do líquido iônico. Foi verificado que o comportamento antimicrobiano eficaz de ambos os LI é originário da estrutura química do ânion ou cátion presentes (Choi et al., 2011).

Novo material de revestimento antimicrobiano, baseado em SI, tem sido preparado ligando os SI em algodão fabricado utilizando oligômeros de siloxano como agentes de acoplamento. Três diferentes SI (cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-(6-hidroxi-hexil)imidazólico, brometo de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico e dimetil-5-sulfoisofalato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico) ligados em oligômeros siloxano foram conectados em algodão utilizando ligações iônicas ou covalentes. Todos os revestimentos preparados mostraram alta atividade antimicrobiana dos sais imidazólicos, contra bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* e Gram negativas como *Escherichia coli*. Também foi verificado que a atividade antimicrobiana é mantida principalmente após quatro ciclos de lavagem, mostrando ser um ótimo material para ser utilizado como um dispositivo médico (Izmaylov et al., 2015).

Estudo recente reportou a utilização da classe de materiais poliméricos imidazólicos de cadeia curta com estruturas anfifílicas com alta efetividade contra leveduras de *Candida albicans* e para o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Estes materiais removem os biofilmes de *Candida albicans* formados e demonstram uma alta atividade para um amplo espectro de infecções por bactérias (Liu et al., 2012).

Tratamentos *in vitro* para ceratites causadas por biofilmes de *Candida albicans* foram realizados com o polímero imidazólico na cadeia principal e o oligômero imidazólico de cadeia curta linear, demonstrando a inibição do crescimento do fungo com baixos valores CIM e a remoção do biofilme fúngico. Os estudos *in vivo*, realizados em camundongos indicaram que a solução tópica de

polímeros imidazólicos na cadeia principal é segura e eficaz, tal como a anfotericina B, o agente mais comumente utilizado para o tratamento de ceratites por *Candida albicans* (Liu et al., 2013).

Dentro deste contexto, é possível verificar que poucos estudos têm relatado com sucesso o preparo de materiais poliméricos com propriedades antimicrobianas e antibiofilme para aplicações em dispositivos médicos, como próteses, catéteres, implantes entre outros. Ainda é necessário muito estudo e aprimoramento, a fim de obter-se um material polimérico com propriedades avançadas.

Neste estudo, foi utilizado o PEAD, PHB e PLA com SI, a fim de, obter-se biomateriais com propriedades antibiofilme frente a *Candida* spp., apresentando biocompatibilidade celular, sendo não citotóxicos, com boas propriedades térmicas e dinâmico-mecânicas, a fim de, serem utilizados como dispositivos médicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os seguintes polímeros foram utilizados; Polietileno de Alta Densidade (PEAD, Braskem S.A., HA 7260), Polihidroxibutirato (PHB, Biomer® P226) e o Ácido Polilático (PLA, Corbion Purac, PURAPOL L100IXS). Antes da utilização do PEAD e do PHB, esses polímeros foram secos durante 5 hs a 60 °C, utilizando bomba de vácuo, a fim de reduzir a degradação durante o processamento. Os sais imidazólicos (SI, Figura 2) cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImCl**, CJC CHINA JIE CHEMICAL), 1-*n*-butil-3-metilimidazólico (**C₄MImCl**, Sigma-Aldrich), cloreto de 1-*n*-decil-3-metilimidazólico (**C₁₀MImCl**, Sigma-Aldrich) e 1,3-di-*n*-decil-2-metilimidazólico (**(C₁₀)₂MImCl**, CJC CHINA JIE CHEMICAL) foram adquiridos dos fornecedores indicados e o metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImMeS**) foi sintetizado no TECNOCAT de acordo com procedimento relatado na literatura (Schrekker et al., 2008). Antes da utilização, os SI foram secos durante 5 hs a 60 °C, utilizando bomba de vácuo, a fim de remover resíduos de água. Todos os procedimentos relatados acima referentes ao PEAD, PHB e PLA e aos SI foram realizados em parceria com o Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise (TECNOCAT), do Instituto de Química, localizado no Campus do Vale da UFRGS.

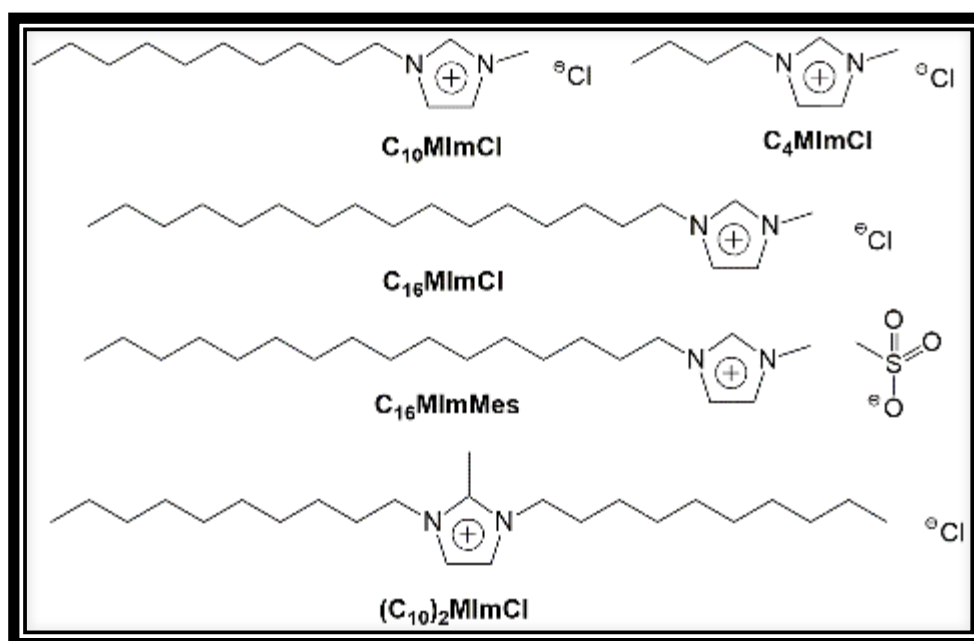


Figura 2. Sais Imidazólicos **C₁₀MImCl**, **C₄MImCl**, **C₁₆MImCl**, **C₁₆MImMeS** e **(C₁₀)₂MImCl** utilizados nesta pesquisa.

4.2 Cepas leveduriformes

Para este estudo foram selecionadas quinze cepas leveduriformes (12 *Candida tropicalis*, uma *C. albicans*, duas *C. parapsilosis* formadoras de biofilme) todas depositadas na Micoteca localizada no Laboratório de Micologia Aplicada, da Faculdade de Farmácia, Campus Saúde, da UFRGS (Tabela 1). Os isolados de *Candida* são oriundos de biofilmes. As cepas leveduriformes são provenientes do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCq), coleção de culturas Americana (ATCC/ EUA), de origem clínica e de biofilmes de catéteres. Todas as cepas estão identificadas fenotipicamente por meios cromogênicos e confirmados por microcultivo e através do sistema automatizado Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek., Hazelwood, Mo.), que apresenta uma especificidade acima de 99% na identificação de isolados clínicos. Alguns isolados clínicos estão também identificados genotipicamente através do sequenciamento de genes do DNA ribossomal.

Tabela 1. Cepas, código e origem das *Candida* spp. testadas neste estudo.

Espécie	Código	Origem do Isolado
1. <i>Candida tropicalis</i>	72A	Mucosa Oral
2. <i>Candida tropicalis</i>	72P	Mucosa Oral
3. <i>Candida tropicalis</i>	94P	Mucosa Oral
4. <i>Candida tropicalis</i>	102A	Mucosa Oral
5. <i>Candida tropicalis</i>	57A	Mucosa Oral
6. <i>Candida tropicalis</i>	17A	Mucosa Oral
7. <i>Candida tropicalis</i>	17P	Mucosa Oral
8. <i>Candida tropicalis</i>	RL15	Ponta de Catéter
9. <i>Candida tropicalis</i>	RL16	Aspirado Traqueal
10. <i>Candida tropicalis</i>	RL17	Aspirado Traqueal
11. <i>Candida tropicalis</i>	ATCC* 750	Aspirado Traqueal
12. <i>Candida tropicalis</i>	ATCC* 950	Aspirado Traqueal
1. <i>Candida albicans</i>	CA04	Mucosa oral
1. <i>Candida parapsilosis</i>	RL11	Urina
2. <i>Candida parapsilosis</i>	RL20	Ponta de Catéter

* ATCC – American Type Culture Collection.

4.3 Preparação de filmes de PEAD com Sais Imidazólicos

Nesse estudo, foram escolhidos para serem utilizados os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** nos polímeros, pois já foram testados anteriormente apresentando atividade antifúngica para isolados de *Candida tropicalis* e não apresentaram toxicidade em leucócitos humanos (Schrekker et al., 2013). PEAD foi misturado no estado fundido com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (0,00; 0,125; 0,250 e 0,500 %m/m) usando uma Câmara de Misturas Haake Polylabsystem (Tabela 2). O SI foi adicionado após 1 min. do polímero fundir e os componentes foram então misturados durante 6 min. a uma velocidade rotatória de 60 rpm e 190 °C. O equilíbrio de torque foi registrado continuamente no computador. As amostras processadas foram esfriadas até a temperatura ambiente, secas ao ar e moídas no Moinho SEIBT. Antes de prensar o PEAD em filmes, as amostras foram secas à vácuo durante 5 hs a 60 °C. Inicialmente, o material foi fundido por cerca de 4 min. a 190 °C e prensado por 30 segundos a 4 kgf. Todas as amostras foram prensadas formando filmes com uma espessura de 0,5 mm, utilizando uma prensa hidráulica Carver Monarch 3710. As amostras foram acondicionadas em um ambiente de laboratório padrão dentro de um dessecador por 24 hs antes de realizar os ensaios microbiológicos e caracterizações químicas. Para comparação, o PEAD puro foi também processado sob as mesmas condições citadas acima. Os filmes de PEAD foram preparados no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

Tabela 2. Códigos das Amostras e SI (% Massa) de Filmes de PEAD.

Código da Amostra	SI (% Massa)
PEAD	Puro
PEAD.CI.0125	C₁₆MImCl (0,125)
PEAD.CI.0250	C₁₆MImCl (0,250)
PEAD.CI.0500	C₁₆MImCl (0,500)
PEAD.MeS.0125	C₁₆MImMeS (0,125)
PEAD.MeS.0250	C₁₆MImMeS (0,250)
PEAD.MeS.0500	C₁₆MImMeS (0,500)

4.4 Preparação de filmes de PHB com Sais Imidazólicos

PHB foi misturado no estado fundido com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (0,00; 0,125; 0,250 e 0,500 %m/m) usando uma Câmara de Misturas da marca Haake Polyabsystem (Tabela 3). O SI foi adicionado após 1 min. do polímero fundir e os componentes foram então misturados durante 6 min. a uma velocidade rotatória de 100 rpm e 165 °C. O equilíbrio de torque foi registrado continuamente no computador. As amostras processadas na Câmara de Misturas foram esfriadas até a temperatura ambiente, secas ao ar e moídas no Moinho (Marca SEIBT). Antes de prensar o PHB em filmes, as amostras foram secas a vácuo durante 5 hs à 60 °C. Inicialmente, o material foi fundido por cerca de 4 min. à 190 °C e prensado por 30 segundos a 4 kgf. Todas as amostras foram prensadas formando filmes com uma espessura de 0,5 mm, utilizando uma prensa hidráulica Carver Monarch 3710. As amostras foram acondicionadas em um ambiente de laboratório padrão dentro de um dessecador por 24 hs antes de realizar os ensaios microbiológicos e caracterizações químicas. Para comparação, o PHB puro foi também processado sob as mesmas condições citadas acima. Os filmes de PHB foram preparados no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

Tabela 3. Códigos das Amostras e SI (% Massa) de Filmes de PHB.

Código da Amostra	SI (% Massa)
PHB	Puro
PHB.Cl.0125	C₁₆MImCl (0,125)
PHB.Cl.0250	C₁₆MImCl (0,250)
PHB.Cl.0500	C₁₆MImCl (0,500)
PHB.MeS.0125	C₁₆MImMeS (0,125)
PHB.MeS.0250	C₁₆MImMeS (0,250)
PHB.MeS.0500	C₁₆MImMeS (0,500)

4.5 Preparação de filmes de PLA com Sais Imidazólicos

Os filmes de PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (0,00; 0,125; 0,250; 0,500; 2,00; 5,00 e 10,0 %m/m) foram preparados pelo método de Solvent Casting (Tabela 4). Foi aplicado ultrassom por 15 min. para dissolver os SI em clorofórmio (5 mL). Separadamente, 1,0 g de PLA foi dissolvido em 25 mL de clorofórmio. Após

completa dissolução do PLA, a solução com o SI foi adicionada na solução do PLA. A solução final foi deixada agitando durante pelo menos 4 hs à temperatura ambiente (23 °C), a qual foi então vertida para uma Placa de Petri e mantida durante a noite à temperatura ambiente. Finalmente o filme foi removido da Placa de Petri e colocado para secar à vácuo em um dissecador durante pelo menos 8 hs à temperatura ambiente. Para comparação, o PLA puro também foi processado sob as mesmas condições citadas acima. Os filmes de PLA foram preparados no TECNOCAT, localizado no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

Tabela 4. Códigos das Amostras e SI (%Massa) de Filmes de PLA

Código da Amostra	SI (% Massa)
PLA	Puro
PLA.CI.0125	C₁₆MImCl (0,125)
PLA.CI.0250	C₁₆MImCl (0,250)
PLA.CI.0500	C₁₆MImCl (0,500)
PLA.CI.2000	C₁₆MImCl (2,000)
PLA.CI.5000	C₁₆MImCl (5,000)
PLA.CI.10000	C₁₆MImCl (10,000)
PLA.MeS.0125	C₁₆MImMeS (0,125)
PLA.MeS.0250	C₁₆MImMeS (0,250)
PLA.MeS.0500	C₁₆MImMeS (0,500)
PLA.MeS.2000	C₁₆MImMeS (2,000)
PLA.MeS.5000	C₁₆MImMeS (5,000)
PLA.MeS.10000	C₁₆MImMeS (10,000)

4.6 Ensaio Antibiofilme

O Ensaio Antibiofilme foi realizado para verificar se os polímeros de PEAD, PHB e PLA apresentavam atividade antibiofilme frente a cepas de *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*, conhecidas por formarem biofilmes em dispositivos médicos. Colônias de *Candida* spp. puras e jovens foram repicadas e crescidas em Placas de Petri com Ágar Sabouraud com Cloranfenicol da Kasvi obtido comercialmente, à 36 °C por 24 hs, na estufa. Repique das colônias das leveduras foram adicionadas para 6 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) para

preparar um inóculo 10^6 UFC/ mL (100% Transmitância TSB e 90% Transmitância Inóculo, valores verificados no Turbidimêtro), o qual foi incubado na estufa por 36 °C por 24 hs. Amostras dos polímeros PEAD, PHB e PLA (cortados no tamanho de 1 x 1 cm), com e sem os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (com diferentes concentrações), foram colocadas na Bancada de Fluxo Laminar Vertical com UV (Ultravioleta) por 30 min. para esterilização, após foram colocadas em tubos Falcon de 15 mL com uma mistura de 9 mL de água peptonada e 1 mL do inóculo em TSB e incubadas na estufa por 96 hs, para que houvesse o crescimento do biofilme.

Após 96 hs de incubação, as amostras dos polímeros foram lavadas com água peptonada para remover as células fracamente aderentes. Os polímeros foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL (esterilizados previamente) com 50 mL de água peptonada. Os tubos Falcon foram colocados em banho de ultra-som (Sonicador), aplicando a frequência de 40 kHz por 10 min. Então, foram realizadas Diluições Decimais a partir das soluções com os polímeros que estavam nos tubos Falcon de 50 mL (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e 20 μ L de cada diluição foi colocada em Placas de Petri com Agar Sabouraud com Cloranfenicol. As Placas de Petri foram incubadas a 36 °C por 24 hs. O controle positivo deste ensaio foi realizado com filmes de PEAD, PHB e PLA sem os SI, seguindo a técnica citada acima. Os ensaios foram realizados em quadruplicata O número de unidades formadoras de colônia por centímetro ao quadrado (UFC/cm²) foi determinado e os valores obtidos foram transformado em log M (Média do logaritmo). (Malheiros et al., 2010). As seguintes fórmulas foram utilizadas para realizar os cálculos do ensaio Antibiofilme:

1°) Passo: UFC (Unidade formadora de colônia) x 50 mL (Volume H₂O Peptonada) x Diluição= UFC/mL.

2°) Passo: UFC/mL x 50mL (Volume H₂O Peptonada) ÷ área do polímero cm² = UFC/cm².

3°) Passo: UFC/cm² → Log M.

Neste ensaio as amostras de PEAD foram testadas frente aos seguintes isolados de leveduras: *Candida tropicalis* 72A (**PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250**, **PEAD.MeS.0500**); *C. tropicalis* RL17 (**PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**); *C. parapsilosis* RL11 (**PEAD.CI.0250**, **PEAD.MeS.0250**); *C. parapsilosis* RL20 (**PEAD.CI.0250**,

PEAD.MeS.0250) e *C. albicans* CA04 (**PEAD.CI.0250**, **PEAD.MeS.0250**). As amostras de PHB foram testadas frente aos seguintes isolados de leveduras: *C. tropicalis* 72A (**PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250**, **PHB.MeS.0500**); *C. parapsilosis* RL11 (**PHB.CI.0250**, **PHB.MeS.0250**); *C. parapsilosis* RL20 (**PHB.CI.0250**, **PHB.MeS.0250**) e *C. albicans* CA04 (**PHB.CI.0250**, **PHB.MeS.0250**). As amostras de PLA foram testadas frente aos seguintes isolados de leveduras: *C. tropicalis* 72A (**PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250**, **PLA.MeS.0500**); *C. parapsilosis* RL11 (**PLA.CI.0250**, **PLA.MeS.0250**); *C. parapsilosis* RL20 (**PLA.CI.0250**, **PLA.MeS.0250**) e *C. albicans* CA04 (**PLA.CI.0250**, **PLA.MeS.0250**). Esses ensaios foram realizados no laboratório MUMIC, localizado no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

A análise estatística utilizada para os ensaios Antibiofilme foi o One-Way Analysis of Variance (ANOVA) utilizando o teste de comparação múltiplo de Dunnett. $P < 0,05$ foi considerado para representar uma diferença significativa na análise utilizada. Todos os dados foram expressos como o valor médio \pm desvio padrão.

4.7 Ensaio Menor Concentração Antibiofilme (MCA)

A capacidade dos filmes de PEAD, PHB e PLA, com e sem os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (com diferentes concentrações), de impedir o crescimento dos biofilmes de *Candida tropicalis* (formadora de biofilmes) foi determinada pelo Ensaio de Menor Concentração Antibiofilme, seguindo os protocolos CLSI M27-A3 e CLSI M38-A2, com modificações. Colônias de *Candida* puras e jovens foram repicadas e cultivadas em Placas de Petri com Ágar Sabouraud com Cloranfenicol a 36 °C por 24 hs, na estufa. As colônias das leveduras foram inoculadas em 6 mL de solução Salina estéril (0,9%) para preparar o inóculo 10⁶ UFC/mL (100% Transmitância para Salina 0,9% e 90% Transmitância para o inóculo fúngico, valores que foram verificados no Turbidimêtro). Os filmes de PEAD, PHB e PLA (cortados em circunferência com diâmetro de 5 mm) foram colocados na Bancada de Fluxo Laminar Vertical com UV (Ultravioleta) para esterilização por 30 min. Alíquotas de 20 µL do inóculo foram transferidas para uma microplaca de 96 poços e complementadas com 180 µL do Culture Medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI), juntamente com os filmes de PEAD, PHB e PLA, que foram incubados a 36

°C por 24 h (tempo necessário para crescer o biofilme em um polímero com área de 5 mm).

Após isto, a solução dos poços da placa de 96 poços foi removida, os polímeros foram lavados com 1 mL de Salina estéril (0.9%) (fora dos poços) para remover as células não aderentes. Subsequentemente, os polímeros foram colocados em outra placa de 96 poços, seguindo-se da adição de 160 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Após três horas, a solução de MTT foi removida e os filmes de PEAD, PHB e PLA foram tratados com 160 µL de Isopropanol (a fim de reter em solução de isopropanol as células dos biofilmes) por 15 min. Os filmes de PEAD, PHB e PLA sem os SI, com 20 µL do inóculo e 180 µL de RPMI, foram utilizados como controle positivo do ensaio. Como controle negativo do ensaio, 200 µL do meio RPMI foi utilizado. Os ensaios foram realizados em quadruplicata (Trafny et al., 2013).

As intensidades de absorção nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm foram determinadas em um Leitor de Microplacas Biochrom EZ 400, utilizando 100 µL de amostra de cada solução de Isopropanol (Trafny et al., 2013).

A seguinte fórmula foi utilizada para determinar a porcentagem de impedimento da formação do biofilme nas amostras de PEAD, PHB e PLA: $100 - [(Média do Teste) \div (Média do Controle Positivo)] \times 100$.

Esses ensaios foram realizados no laboratório MUMIC, localizado no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

A análise estatística utilizada para os ensaios MCA foi o One-Way Analysis of Variance (ANOVA) utilizando o teste de comparação múltiplo de Dunnett. $P < 0,05$ foi considerado para representar uma diferença significativa na análise utilizada. Todos os dados foram expressos como o valor médio \pm desvio padrão.

4.8 Citotoxicidade de Sais Imidazólicos

Os SI apresentados na Figura 2 foram dissolvidos em uma solução de DMEM (Culture Medium Dulbecco's Modified Eagle's) em diferentes concentrações (500-350-200-100-50-10-1) µg/mL. Estas soluções foram colocadas em uma incubadora a 37 °C para dissolver o SI e, em seguida, na irradiação UV por 2 hs para esterilização. Após, 350 µL de cada solução foram pipetadas em placas estéreis para cultura celular de 48 poços (Falcon EUA), previamente semeadas com 10.000 células da linhagem celular L929 (fibroblastos de camundongos). A solução

de DMEM sem os SI foi utilizada como controle negativo (atóxico). Então, a incubação das placas foi conduzida a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade do ar por 24, 48 e 72 hs de exposição (Raucci et al., 2012).

Alamar Blue™ foi utilizado como indicador redox para avaliar a biocompatibilidade. Este ensaio quantifica o indicador redox, o qual muda para um produto fluorescente em resposta a redução química de enzimas mitocondriais, tais como a desidrogenase flavina mononucleotídeo (FMN), a desidrogenase flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a desidrogenase dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD), fornecendo uma indicação quantitativa da atividade metabólica das células vivas. Além disso, um fenômeno redox fornece uma indicação quantitativa da atividade metabólica das células vivas. Após tempos pré-determinados de 24, 48 e 72 hs, o meio foi removido. Uma alíquota de 200 µL de Alamar Blue™ diluído (1:10) no meio, sem vermelho de fenol (a presença de vermelho de fenol poderia causar deslocamentos nos valores da absorbância nas medidas colorimétricas), foi adicionada para cada poço e incubada por um período de 4 hs a 37 °C e 5% CO₂ (95% umidade do ar). Em seguida, 100 µL de cada solução foram transferidos para uma placa de 96 poços para análise colorimétrica (repetições dos ensaios = n = 4). Os poços sem quaisquer células foram usados para corrigir qualquer interferência de fundo do indicador redox. A absorbância foi medida a 570 nm e a 600 nm (para a correção de interferências) (Espectrofotômetro Victor X3, Perkin Elmer) (Raucci et al., 2012). Esses ensaios foram realizados no Institute of Polymers, Composites and Biomaterials, National Research Council of Italy, Nápoles, Itália.

4.9 Análises de adesão e proliferação celular em filmes de PEAD, PHB e PLA com SI

4.9.1 Cultura de Células *In vitro*

Os ensaios biológicos foram realizados utilizando uma linhagem de Células-Tronco Mesenquimais Humanas (CTMh), as quais foram obtidas na empresa LONZA (Milão, Itália). As CTMh foram cultivadas em frascos de cultura de células de 75 cm² utilizando o meio Eagle's Alpha Minimum Essential (α-MEM) suplementado com Soro Bovino Fetal a 10% e uma solução de antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL e penicilina 100 U/mL, Sigma Chem. Co) e 2 mM de L-glutamina. As CTMh foram utilizadas até a quinta passagem em todos os

procedimentos experimentais e incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar (Raucci et al., 2012). Esses ensaios foram realizados no Institute of Polymers, Composites and Biomaterials, National Research Council of Italy, Nápoles, Itália.

4.9.2 Adesão Celular – Análise Morfológica das Células-Tronco Mesenquimais Humanas em Microscopia Confocal

O espalhamento das células e a interação das CTMh com os materiais foram determinados por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (LSM 510, Carl Zeiss), utilizando um corante rastreador celular. Para este objetivo, 20.000 células foram semeadas nos filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS, por 48 hs a 37 °C; após este tempo de incubação, as células não aderidas foram removidas cuidadosamente realizando três lavagens com o meio Tampão Fosfato-Salino, pH = 7,4 e então o material foi incubado no meio com o rastreador verde de células clorometil diacetato fluoresceína (concentração de 5 µM), sem vermelho de fenol, à 37 °C por 30 min. A cultura celular foi lavada com PBS e incubada por 1 h em meio completo e, em seguida, observada em Microscópio Confocal. Como controle da viabilidade (100%) das células, foi utilizada as CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos (Raucci et al., 2012). Neste ensaio foram utilizados os biomateriais de **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250, PEAS.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0250, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500**. Todos os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão para n = 3. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o “one-way ANOVA”. As diferenças entre os grupos foram consideradas como sendo estatisticamente significativa quando o P < 0,05. Esses ensaios foram realizados no Institute of Polymers, Composites and Biomaterials, National Research Council of Italy, Nápoles, Itália.

4.9.3 Teste de Viabilidade Celular

Para avaliar a biocompatibilidade celular as CTMh foram plaqueadas em triplicata a uma concentração de 10.000 células/mL nos filmes de PEAD, PHB e PLA, com e sem os SI. Os filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI, foram

esterilizados em etanol por 4 hs, subsequentemente, por radiação UV por 2 hs. O pH foi equilibrado ao pH fisiológico de 7,4 por incubação no α -MEM por 24 hs. Os meios celulares foram removidos depois de serem cultivados por 2, 7, 10, 14 e 21 dias, e a viabilidade celular *in vitro* foi determinada pelo ensaio Alamar Blue (AbD Serotec, Milão, Itália.) (Raucci et al., 2012). O controle utilizado foi as CTMh semeadas nas placas de cultura de tecidos.

O ensaio Alamar Blue (AB) foi utilizado como indicador redox para avaliar a biocompatibilidade. Uma alíquota de 500 μ L de Alamar Blue diluído 1:10 no meio, sem vermelho de fenol, foi adicionada para cada poço e incubada por 4 hs à 37 °C, 5% CO₂. Após, 200 μ L desta solução foram transferidas para uma microplaca de 96 poços para análise colorimétrica. Os poços sem nenhuma célula foram usados para corrigir qualquer interferência do indicador redox. A densidade óptica foi medida imediatamente em um Espectrofotômetro (Victor X3, Perkin Elmer) nos comprimentos de onda de 540 e 600 nm. A viabilidade das células foi correlacionada com a magnitude da redução do corante e foi expressa como porcentagem de redução AB (% de redução AB), de acordo com o protocolo do fabricante. Além disso, a adesão de células foi também avaliada através da análise quantitativa (ensaio de azul de Alamar) durante 48 hs de cultura de células. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (células semeadas nas placas de cultura de tecidos) (Raucci et al., 2012). Neste ensaio foram utilizados os biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250**, **PEAS.MeS.0500**, **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250**, **PHB.MeS.0500**, **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250**, **PLA.MeS.0500**. Todos os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão para n = 3. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o “one-way ANOVA”. As diferenças entre os grupos foram consideradas como sendo estatisticamente significativa quando o P < 0,05. Esses ensaios foram realizados no Institute of Polymers, Composites and Biomaterials, National Research Council of Italy, Nápoles, Itália.

4.10 Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno Tratada com os Filmes de PEAD, PHB e PLA

4.10.1 Preparação da Pele de Suínos

A pele de orelha de suínos foi obtida a partir de animais abatidos de acordo com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil), respeitando o bem-estar animal. Os pelos foram cuidadosamente retirados por um aparador elétrico. Em seguida, o material biológico foi submetido ao teste de penetração. Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia, do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.

4.10.2 Estudo *Ex vivo* de Penetração na Pele de Suínos

Esse ensaio foi realizado em células de difusão de Franz que são utilizadas para medir a difusão de substâncias químicas através de membranas. Essa células consistem de dois compartimentos sendo um o compartimento doador e outro o compartimento receptor. Entre os compartimentos deposita-se a membrana. As amostras de pele de suínos foram montadas em células de difusão de Franz (Logan Instrument Corp., NJ, EUA) com a área de difusão de aproximadamente 1,75 cm². O lado epidérmico da pele foi exposto a uma solução Tampão Fosfato-Salino (PBS) pH 7,0 (controle negativo) por um período de 6 hs. Os filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem SI testados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Códigos das Amostras de Filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$.

Código da Amostra	SI (% Massa)
PEAD	- (0,00)
PEAD.CI.0250	$C_{16}MImCl$ (0,250)
PEAD.CI.0500	$C_{16}MImCl$ (0,500)
PEAD.MeS.0250	$C_{16}MImCl$ (0,250)
PEAD.MeS.0500	$C_{16}MImCl$ (0,500)
PHB	- (0,00)
PHB.CI.0250	$C_{16}MImCl$ (0,250)
PHB.CI.0500	$C_{16}MImCl$ (0,500)
PHB.MeS.0250	$C_{16}MImMeS$ (0,250)
PHB.MeS.0500	$C_{16}MImMeS$ (0,50)
PLA	- (0,00)
PLA.CI.0250	$C_{16}MImCl$ (0,250)
PLA.CI.0500	$C_{16}MImCl$ (0,500)
PLA.MeS.0250	$C_{16}MImMeS$ (0,250)
PLA.MeS.0500	$C_{16}MImMeS$ (0,50)

O lado epidérmico da pele, então foi, submetida ao contato com estes filmes com e sem os SI por um período de 6 hs. Todos os testes foram realizados em triplicata. Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia, do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.

4.10.3 Avaliação Histopatológica

Amostras do tecido epitelial da orelha de suíno submetido ao teste 4.10.2 foram utilizados para avaliar a formação de dano tecidual devido a ação dos filmes contendo os SI. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica com aumento de 100x e 400x (Obatomi et al.,1998). Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia, do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.

4.11 Técnicas de Caracterização dos Polímeros de PEAD, PHB e PLA

4.11.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.11.1.1 Morfologia da Superfície dos Filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI

Os filmes de PEAD, PHB e PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** e sem os SI, cortados no tamanho de 5 x 5 mm foram colocados em uma Bancada de Fluxo Laminar por 30 min. para esterilização. Os filmes de PEAD, PHB e PLA foram colocados em um suporte de amostras (stubs) coberto com uma fita de carbono (PELCO Carbon Conductive Tab). Um equipamento EVO-50HV Carl Zeiss foi utilizado para aplicar um revestimento de ouro sobre as amostras que estavam em stubs. As amostras foram metalizadas com ouro para aumentar a condutividade elétrica, e após foi realizada a leitura das amostras no equipamento de MEV. As imagens foram capturadas em diversas ampliações e regiões diferentes utilizando o equipamento de MEV EVO 50-Carl Zeiss AG, operando a 5 kV, analisando a superfície das amostras dos filmes de PEAD, PHB e PLA. Essas análises foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM), localizado no Campus do Vale, na UFRGS. Foram utilizados os seguintes filmes poliméricos: **PEAD, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.CI.2000, PLA.CI.5000, PLA.CI.10000, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500, PLA.MeS.2000, PLA. MeS.5000, PLA.MeS.10000.**

4.11.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxibutirato e Ácido Polilático com e sem os SI

Os filmes de PEAD, PHB e PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** e sem os SI, cortados no tamanho de 5 x 5 mm foram colocados em uma Bancada de Fluxo Laminar por 30 min. para esterilização. Foi preparado um inóculo de 10⁶ UFC/mL com solução Salina 0,9%, do isolado clínico *Candida tropicalis* 72A. Após, os filmes de PEAD, PHB e PLA foram colocados em uma placa de 24 poços contendo 2,8 mL de TSB e 0,2 mL de inóculo a 10⁶ UFC/mL. A placa de 24 poços foi

então colocada na estufa a 36 °C por 72 hs para que ocorresse o crescimento do biofilme.

Após o ensaio, as células planctônicas foram removidas através de três lavagens com uma Solução 0,1 M de cacodilato de sódio (dimetilarsenato de sódio) com o auxílio de dois pipetadores, os quais foram utilizados para a adição e remoção simultânea. Assim, a exposição ao ar foi evitada. Foi adicionado 500 µL de uma solução a 2,5% glutaraldeído em 0,1 M cacodilato de sódio e 1,0 M sacarose, esperou-se 10 min. para o tratamento do biofilme. Duas lavagens com 0,1 M cacodilato de sódio foram realizadas para remover o fixador. As amostras foram serialmente desidratadas em etanol (30 (1x), 50 (1x), 70 (1x), 95 (1x) e 100%v/v (2x)), por 5 min. cada, e secadas em um aparelho secador de ponto-crítico usando CO₂ líquido (oito trocas). Os filmes de PEAD, PHB e PLA com a levedura foram colocados em um suporte de amostras (stubs) coberto com uma fita de carbono (PELCO Carbon Conductive Tab). Um equipamento EVO-50HV Carl Zeiss foi utilizado para aplicar um revestimento de ouro sobre as amostras que estavam em stubs. As imagens foram capturadas em diversas ampliações e regiões diferentes utilizando o equipamento de MEV EVO 50-Carl Zeiss AG, localizado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM), no Campus do Vale, na UFRGS. Nesta análise foram utilizados os seguintes filmes poliméricos: **PEAD, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0500 e PLA.MeS.0500.**

4.11.2 Microscopia de Força Atômica dos Filmes de Polihidroxibutirato sem os SI e Ácido Polilático com e sem os SI

Imagens de superfície dos filmes de PHB sem os SI e PLA com e sem os SI foram realizadas por Microscopia de Força Atômica (MFA). As imagens foram obtidas no modo de batimento com o equipamento Agilent Technologies 5500 Scanning Probe Microscope. Varreduras foram realizados com a sonda NANOSENSORS NT – MDT feita de nitreto de silício (modelo: NSG01), operando a uma frequência de 87-230 kHz, velocidade de varredura de 0,5 linhas/segundo, ângulo de 0° e resolução de 256 pontos/linha. Foram utilizados pontos definidos de 1,0725, 1,3222 e 1,4165 V, de acordo com as respectivas regiões 1, 2 e 3. O software Gwyddion foi usado para o tratamento das imagens. O software Picoview 1.14.4 foi utilizado para obter imagens após os tratamentos. Nesta análise foram

utilizados os seguintes filmes: **PHB, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500, PLA.MeS.2000 e PLA.MeS.5000**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

4.11.3 Análises de Difração de raios X dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxibutirato e Ácido Polilático com e sem os SI

As análises foram realizadas com filmes de PEAD, PHB e PLA em um difratômetro Siemens D500, utilizando radiação Cu-K α ($\lambda = 0,15406$ nm, 40 kV, 17,5 mA). Padrões de difração foram coletados dos filmes de PEAD, PHB e PLA na gama de 5-45° e escala 2 θ . Nesta análise foram utilizados as seguintes amostras: **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.CI.2000, PLA.CI.5000, PLA.CI.10000, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500, PLA.MeS.2000, PLA.MeS.5000 e PLA.MeS.10000**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Física, Campus do Vale, da UFRGS.

4.11.4 Cromatografia de Permeação em Gel dos Filmes de Ácido Polilático com e sem os SI

As análises foram realizadas com filmes de PLA com e sem os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, utilizando o equipamento Viscotek, modelo LV 2001, equipado com um detector de índice de refração Viscotek TDA 302, e coluna PS/DVB. Clorofórmio foi usado na fase móvel a uma taxa de vazão de 1 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 45 °C. Todas as curvas de eluição foram calibradas com um padrão de poliestireno (PS). As massas molares médias em massa (M_w), as massas molares médias em número (M_n) e os índices de polidispersão ($PDI = M_w/M_n$) das amostras de PLA foram calculados como referência da calibração universal versus padrões de poliestireno. Foram utilizados nesta análise os seguintes filmes: **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.10000, PLA.MeS.0250 e PLA.MeS.10000**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

4.11.5 Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI

As análises de Calorimetria Diferencial por Varredura dos filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio, utilizando um TA Instruments DSC Q20 V24.10 Build 122 com panelinhas com tampa do tipo TZero. Amostras de cerca de 5,7 mg foram cortadas dos filmes poliméricos. A unidade de medição foi submetida a um fluxo de 50,0 mL N₂/min. As amostras foram aquecidas e resfriadas entre 25 °C e 200 °C, usando uma taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min. As propriedades térmicas foram determinadas no esfriamento do primeiro ciclo e no aquecimento do segundo ciclo, após a eliminação da histórica térmica no aquecimento do primeiro ciclo. Nesta análise foram utilizados as seguintes amostras: **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.CI.2000, PLA.CI.5000, PLA.CI.10000, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500, PLA.MeS.2000, PLA.MeS.5000 e PLA.MeS.10000**. A seguinte fórmula (Equação 1) foi utilizada para calcular o grau de cristalinidade:

$$X_c (\%) = \left(\frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^\circ \cdot F_p} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

4.11.6 Análises Termogravimétricas dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxitirato e Ácido Polilático com e sem os SI

As análises termogravimétricas foram realizadas com filmes de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, utilizando um TA Instruments QA-50. Os filmes poliméricos foram aquecidos de 25 °C até 600 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min. Todos os experimentos foram conduzidos sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de gás de 60 mL/min. As amostras dos polímeros (10,0 mg) foram colocadas em um cadinho de platina e um cadinho de platina vazio foi utilizado como referência em todas as medições. Nesta análise

foram utilizados as seguintes amostras: **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.CI.2000, PLA.CI.5000, PLA.CI.10000, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500, PLA.MeS.2000, PLA.MeS.5000 e PLA.MeS.10000**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

4.11.7 Análises Dinâmico-Mecânicas dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxibutirato e Ácido Polilático com e sem os SI

Para estas análises foi utilizado um Dynamic Mechanical Analyzer Q800 da TA Instruments. Amostras retangulares de PEAD, PHB e PLA com e sem os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** com comprimento de 11 mm e largura de 6 mm foram testadas no modo de tensão Multi-Frequency-Strain. A tensão aplicada foi de 125%. As mudanças em módulo foram testadas entre 30-90 °C com uma taxa de aquecimento de 3 °C/min. e força estática constante de 0,01 N. O módulo de armazenamento (E'), bem como o fator de perda $\tan \delta = E''/E'$, com E'' como módulo de perda, foram registrados. A temperatura de transição vítrea foi realizada à temperatura no meio da queda do módulo de armazenamento. Nesta análise foram utilizados as seguintes amostras: **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.CI.2000, PLA.CI.5000, PLA.CI.10000, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500, PLA.MeS.2000, PLA.MeS.5000 e PLA.MeS.10000**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

4.11.8 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de raios X por Dispersão em Energia dos Filmes de Ácido Polilático com e sem os SI

As imagens de MEV/EDS foram realizadas com os filmes de PLA com SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, os quais foram colocados em um suporte de amostras cobertos com uma fita de carbono (PELCO Carbon Conductive Tab). As amostras

foram atomizadas com carbono. As micrografias foram obtidas usando o equipamento EVO MA10 – Carl Zeiss, operando a 10,0 kV, conectado a um detector de elétrons secundários e a um espectrômetro de energia dispersiva de raios X (EDS) para mapeamento elementar em um equipamento Oxford Instrument modelo X-ACT. As imagens foram obtidas na ampliação de 250 vezes. Nesta análise foram utilizados os seguintes filmes: **PLA.CI.10000** e **PLA.MeS.10000**. Essas análises foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM), no Campus do Vale, na UFRGS.

4.11.9 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X dos Filmes de Ácido Polilático com e sem o SI C₁₆MImMeS

Esta análise foi utilizada para monitorar os estados químicos dos átomos da superfície de filmes de **PLA** com e sem a adição de 10 % m/m do SI **C₁₆MImMeS**. As medições de Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X foram obtidas utilizando um equipamento VSW HA 100 Hemispherical Electron Analyzer, operando no modo FAT com passe de energia de 44 eV e em geometria normal de emissão. Os espectros foram excitados com uma fonte Al K- α raio X (1486,6 eV).

O pico Ag 3d_{5/2} a 368.3 eV foi medido a partir de uma folha padrão de Ag, que foi utilizada para a calibragem de energia do analisador. O pico C 1s a uma energia de ligação de 284.6 eV, característico de carbonos alifáticos, foi utilizado como referência para verificar e corrigir eventuais efeitos de carregamento. Todos os picos foram ajustados com funções mistas de Gaussian-Lorentzian e uma análise de fundo Shirley. Nesta análise foram utilizados os seguintes filmes: **PLA** e **PLA.MeS.10000**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Física “Gleb Wataghin”, da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

4.11.10 Ângulo de Contato da Água dos Filmes de Polietileno de Alta Densidade, Polihidroxibutirato e Ácido Polilático com e sem os SI

Análises de Ângulo de Contato da Água foram realizadas com filmes de PEAD, PHB e PLA; em um equipamento modelo Kruss Goniometer Drop Shape Analyzer DSA100. Gotículas de água deionizada de 1 μ L foram depositadas com uma seringa acionada por um motor, na superfície das amostras poliméricas. O Ângulo de Contato foi determinado a partir de uma linha tangente, apropriadamente posicionada sobre o contorno da gotícula, respeitando o plano de superfície. Os

Ângulos de Contato foram medidos utilizando um dispositivo controlado por um computador e software DSA4. Na análise estatística, os valores reportados são as médias de duas medições realizadas em diferentes áreas de superfície de cada amostra. Os valores de ângulos de contato da água foram calculados utilizando o pacote de software Surftens v. 3.0. Nesta análise foram utilizadas as seguintes amostras: **PEAD, PEAD.CI.0125, PEAD.CI.0250, PEAD.CI.0500, PEAD.MeS.0125, PEAD.MeS.0250, PEAD.MeS.0500, PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250, PHB.MeS.0500, PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250, PLA.MeS.0500**. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Campus do Vale, da UFRGS.

5. RESULTADOS

5.1 Filmes de PEAD com Sais Imidazólicos

5.1.1 Preparação de Filmes de PEAD com Sais Imidazólicos

Os biomateriais de PEAD foram preparados misturados no estado fundido, incorporando diferentes teores dos SI (0,00; 0,125; 0,250; 0,500 %m/m) cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImCl**) e metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImMeS**). Desta forma, obtendo-se filmes de PEAD com SI após o processo de prensagem (Figura 3).



Figura 3. Filmes de PEAD com o SI **C₁₆MImCl**

5.1.2 Ensaio Antibiofilme

O Ensaio Antibiofilme foi realizado para verificar se os biomateriais de PEAD com SI apresentavam efeito antibiofilme em comparação com o **PEAD** (Tabelas 6-7 e Figuras 4-6). Neste ensaio foi verificado que em comparação com o **PEAD** (sem os SI), todos os biomateriais testados (**PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500**) apresentaram atividade antibiofilme frente a isolados clínicos de *C. tropicalis* 72A, *C. parapsilosis* RL11 e RL20; e *C. albicans* CA04. Além disso, os filmes de PEAD com o **C₁₆MImCl** (excluindo o **PEAD.CI.0250**) também mostraram atividade antibiofilme frente a *C. tropicalis* RL17.

Tabela 6. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no **PEAD e PEAD.CI** frente aos isolados de *Candida* spp.

Biomaterial	Levedura	Diluição	Média*	UFC/cm²	log
PEAD	<i>Candida tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	13,75	3,4x10 ⁵	5,53
	<i>C. tropicalis</i> RL17	10 ⁻¹	16,2	4x10 ⁵	5,6
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	10,5	2,6x10 ⁵	5,41
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	4	1x10 ⁵	5
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	9	2,2x10 ⁵	5,35
PEAD.CI.0125	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1	2,5x10 ⁴	4,39
	<i>C. tropicalis</i> RL17	10 ⁻¹	5,25	1,3x10 ⁵	5,11
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	5,5	1,3x10 ⁵	5,13
PEAD.CI.0250	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	2	5x10 ⁴	4,7
	<i>C. tropicalis</i> RL17	10 ⁻¹	11,5	2,8x10 ⁵	5,45
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	1,75	4,3x10 ⁴	4,64
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	1,25	3,1x10 ⁴	4,49
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	6,25	1,5x10 ⁵	5,19
PEAD.CI.0500	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1	2,5x10 ⁴	4,39
	<i>C. tropicalis</i> RL17	10 ⁻¹	1,25	3,1x10 ⁴	4,49
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	3,5	8,7x10 ⁴	4,94

* Média: UFC/mL- Soma das colônias, em quadruplicata, e logo transformadas para log.

Tabela 7. Resultado do Ensaio Antibiofilme realizado no **PEAD** e **PEAD.MeS** frente aos isolados de *Candida* spp.

Biomaterial	Levedura	Diluição	Média*	UFC/cm ²	log
PEAD	<i>Candida tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	16,2	4x10 ⁵	5,6
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	10,5	2,6x10 ⁵	5,41
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	4	1x10 ⁵	5
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	3,25	8,1x10 ⁴	4,9
PEAD.MeS.0125	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	7,25	1,8x10 ⁵	5,25
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	1,5	3,7x10 ⁴	4,57
PEAD.MeS.0250	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	2,5	6,2x10 ⁵	4,79
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	7	1,7x10 ⁵	5,24
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	0,75	1,8x10 ⁴	4,27
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	1,75	4,3x10 ⁴	4,64
PEAD.MeS.0500	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1	2,5x10 ⁴	4,39
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	2,25	5,6x10 ⁴	4,7

* Média: UFC/mL- Soma das colônias, em quadruplicata, e logo transformadas para log.

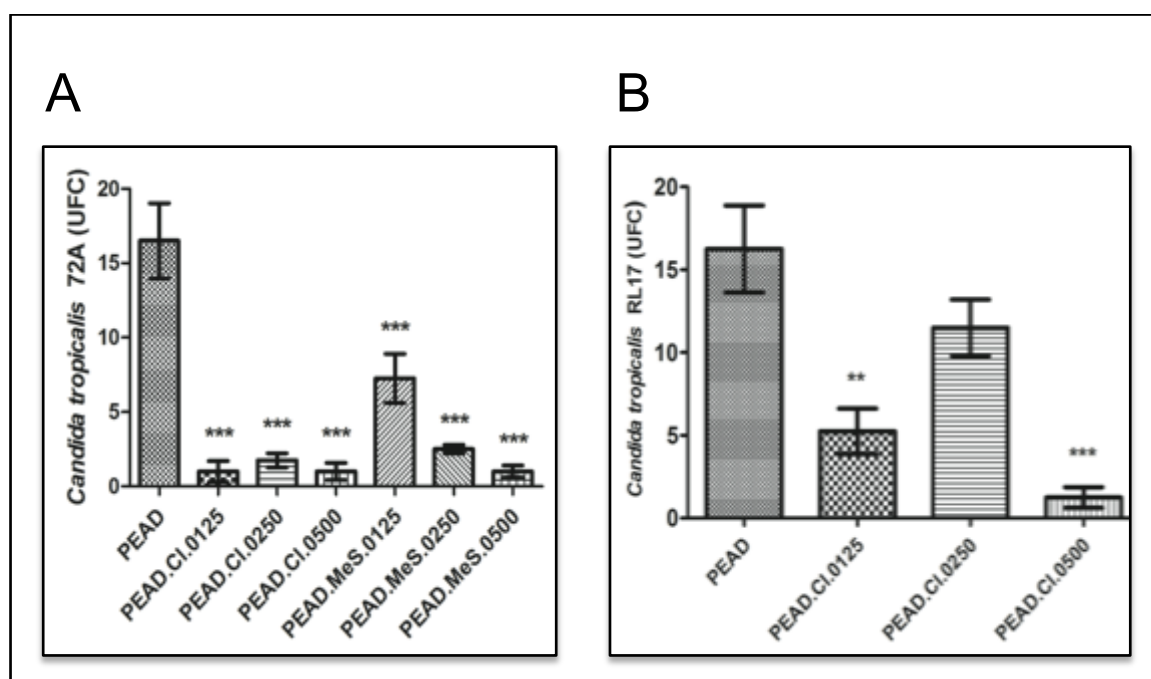


Figura 4. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10⁻¹, dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam

o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250** e **PEAD.CI.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 16 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0003 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** ** $P<0,01$ e **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** $P<0,001$.

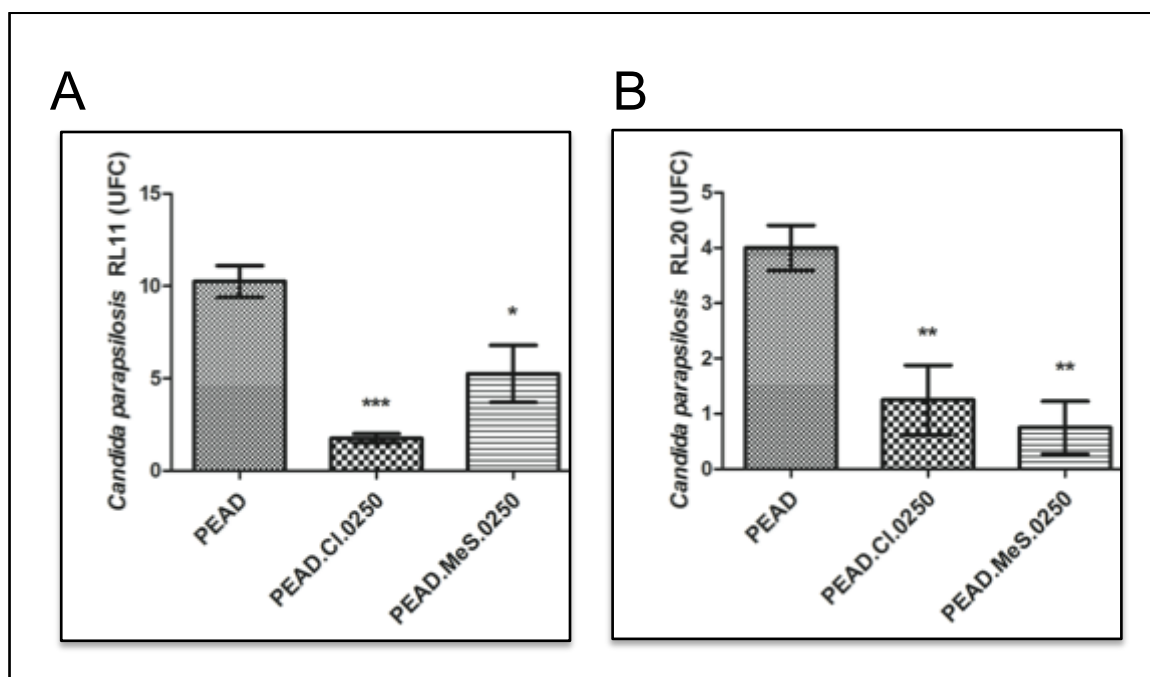


Figura 5. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0250** e **PEAD.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida parapsilosis* RL11. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0008, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0250** * $P<0,05$ **(B)** Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0250** e **PEAD.CI.0250** frente ao isolado de *Candida parapsilosis* RL20. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0032 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0250** ** $P<0,01$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** $P<0,01$.

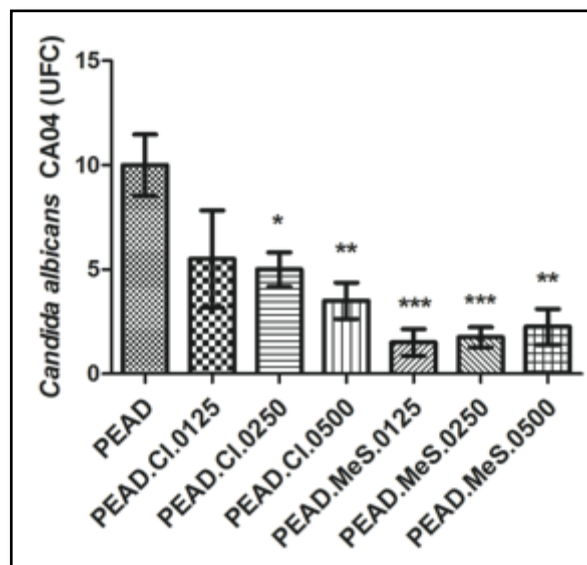


Figura 6. Gráfico de colunas vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida albicans* CA04. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0009, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD** vs **PEAD.CI.0250** * $P < 0,05$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0500** ** $P < 0,01$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PEAD** vs **PEAD.MeS.0500** ** $P < 0,01$.

5.1.3 Ensaio Menor Concentração Antibiofilme

O Ensaio Menor Concentração Antibiofilme foi realizado para verificar a porcentagem de impedimento da formação do biofilme dos filmes de PEAD com o **C₁₆MImCl** (Figura 7: **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250** e **PEAD.CI.0500**) e com o **C₁₆MImMeS** (Figura 8: **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500**), em comparação com o **PEAD** (PEAD sem aditivos); frente a 12 isolados de *C. tropicalis* formadores de biofilmes. Os resultados das análises estatísticas estão apresentados nas Figuras 9-14.

No geral, os biomateriais de PEAD com os SI impediram a formação do biofilme frente aos isolados de *C. tropicalis* testados. Houve uma variação na porcentagem de impedimento da formação do biofilme dependendo do isolado de *C. tropicalis* testado. Os valores de porcentagem de impedimento de formação do biofilme variaram entre 0-75% e 0-64% para os biomateriais com **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, respectivamente.

As melhores porcentagens de impedimento da formação do biofilme foram obtidas utilizando o **PEAD.CI.0125** com 75% de impedimento para a *C.*

tropicalis 17P e 44% para a *C. tropicalis* 102A; utilizando o **PEAD.CI.0250** obteve-se 75% de impedimento para a *C. tropicalis* 17P e 70% para a *C. tropicalis* 17A e com o **PEAD.CI.0500** obteve-se 65% de impedimento para a *C. tropicalis* 17P e 47% para a *C. tropicalis* 17A (Figura 7).

As melhores porcentagens de impedimento da formação do biofilme utilizando o **PEAD.MeS.0125** foram de 54% de impedimento para a *C. tropicalis* ATCC 750 e 41% para a *C. tropicalis* 17P; utilizando o **PEAD.MeS.0250** obteve-se 40% de impedimento para a *C. tropicalis* 94P e 37% para a *C. tropicalis* ATCC 950 e com o **PEAD.MeS.0500** obteve-se 64% de impedimento para a *C. tropicalis* 17P e 46% para a *C. tropicalis* 72P (Figura 8).

Os resultados obtidos com os filmes de PEAD com os diferentes teores de **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, testados com os isolados de *C. tropicalis* mostraram que não existe uma relação direta entre o teor do sal imidazólico utilizado como aditivo no PEAD e a porcentagem de impedimento da formação do biofilme (Figura 7 e 8). No caso das amostras de PEAD com **C₁₆MImMeS**, o **PEAD.MeS.0500** mostrou, em geral, a maior porcentagem de impedimento da formação do biofilme (Figura 8).

Considerando a eficácia dos biomateriais de PEAD em relação com o teor do SI, frente aos isolados de *C. tropicalis*, foi possível verificar que nos teores de 0,125 e 0,250 %m/m o **C₁₆MImCl** foi mais eficaz no impedimento da formação do biofilme quando comparado com o **C₁₆MImMeS**. No teor de 0,500 %m/m o **C₁₆MImMeS** foi mais eficaz.

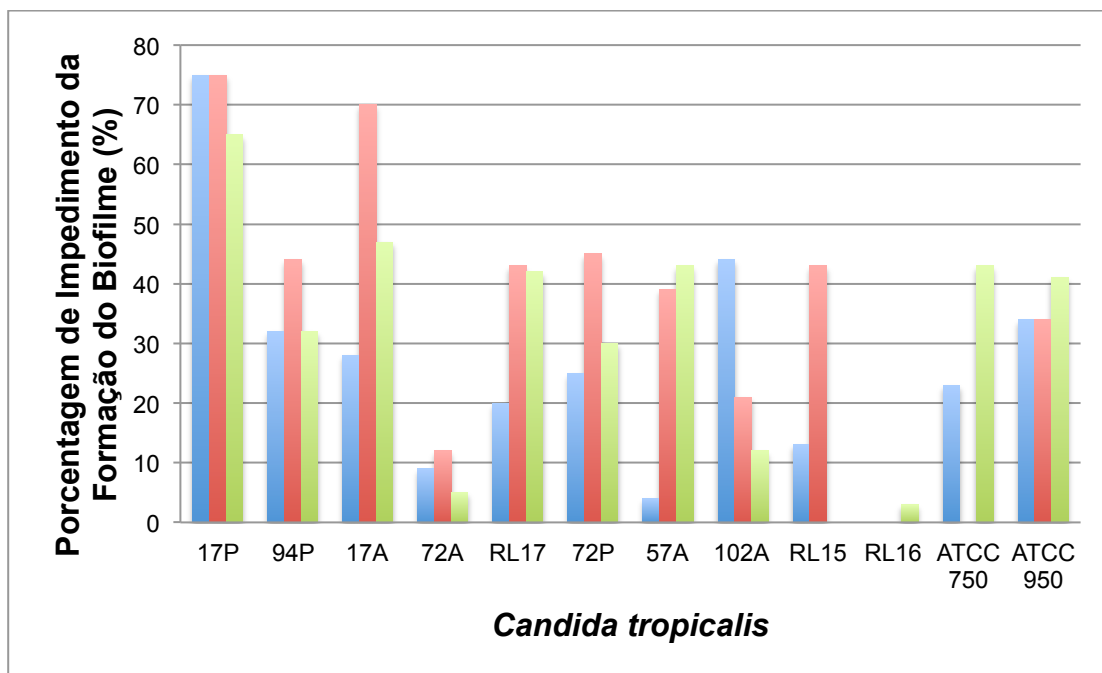


Figura 7. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PEAD.CI.0125** (barras azuis), **PEAD.CI.0250** (barras vermelhas); e **PEAD.CI.0500** (barras verdes).

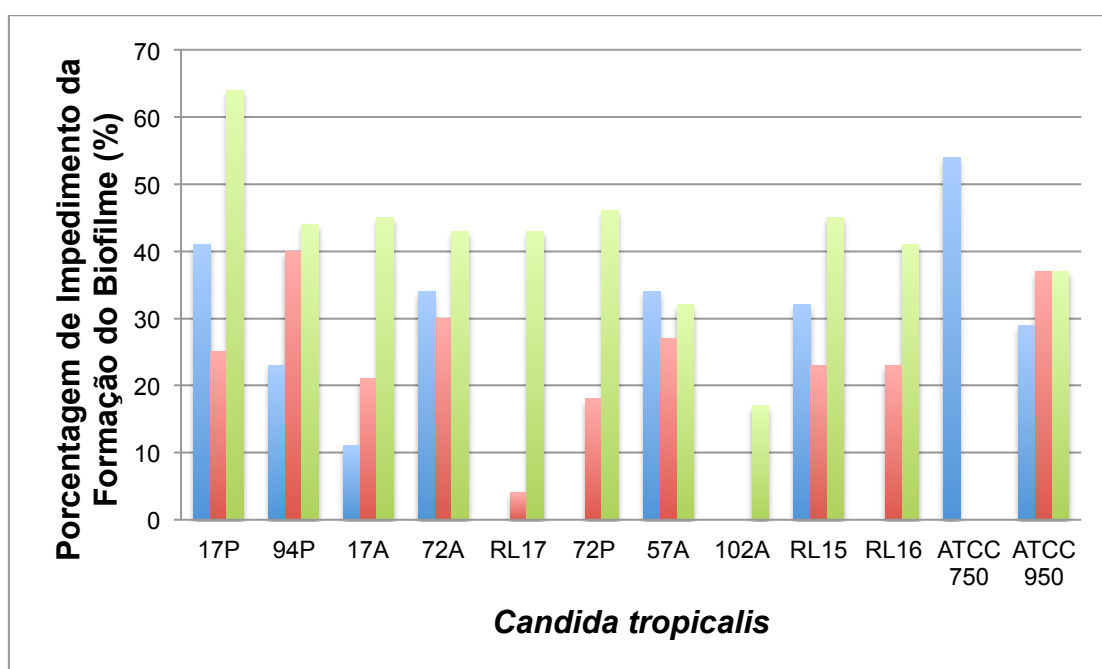


Figura 8. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PEAD.MeS.0125** (barras azuis), **PEAD.MeS.0250** (barras vermelhas); e **PEAD.MeS.0500** (barras verdes).

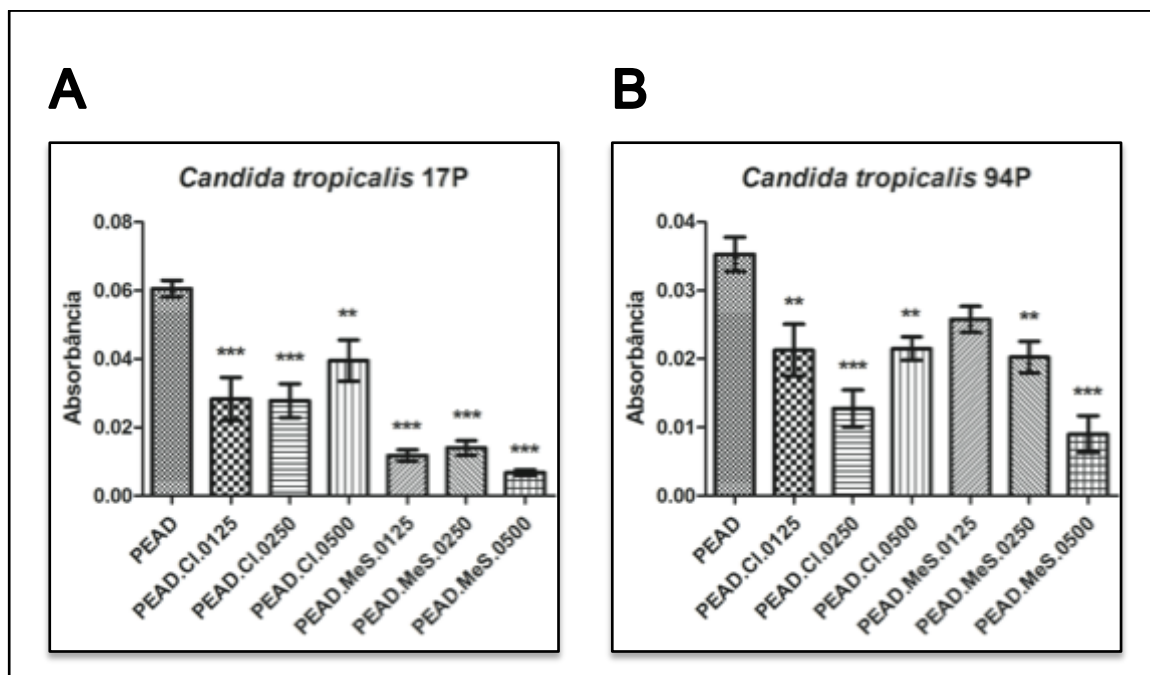


Figura 9. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD** vs **PEAD.CI.0125** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0500** ** $P<0,01$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PEAD** vs **PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 94P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD** vs **PEAD.CI.0125** ** $P<0,01$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0500** ** $P<0,01$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0250** ** $P<0,01$ e **PEAD** vs **PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$.

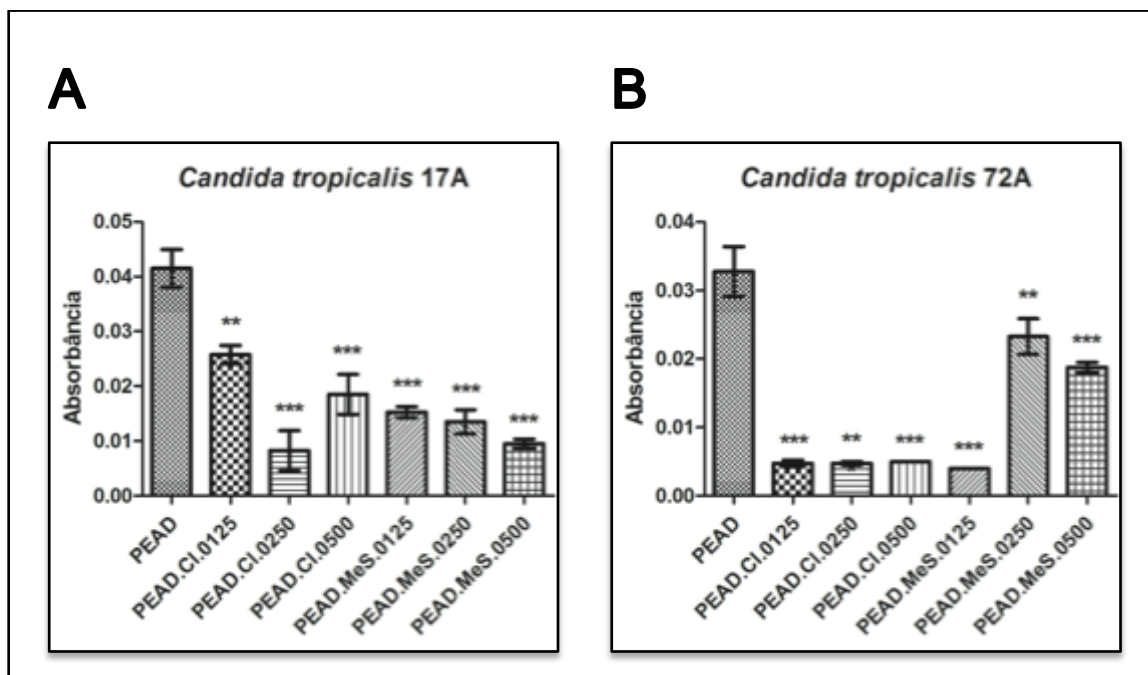


Figura 10. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** ** $P<0,01$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** ** $P<0,01$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** $P<0,01$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$.

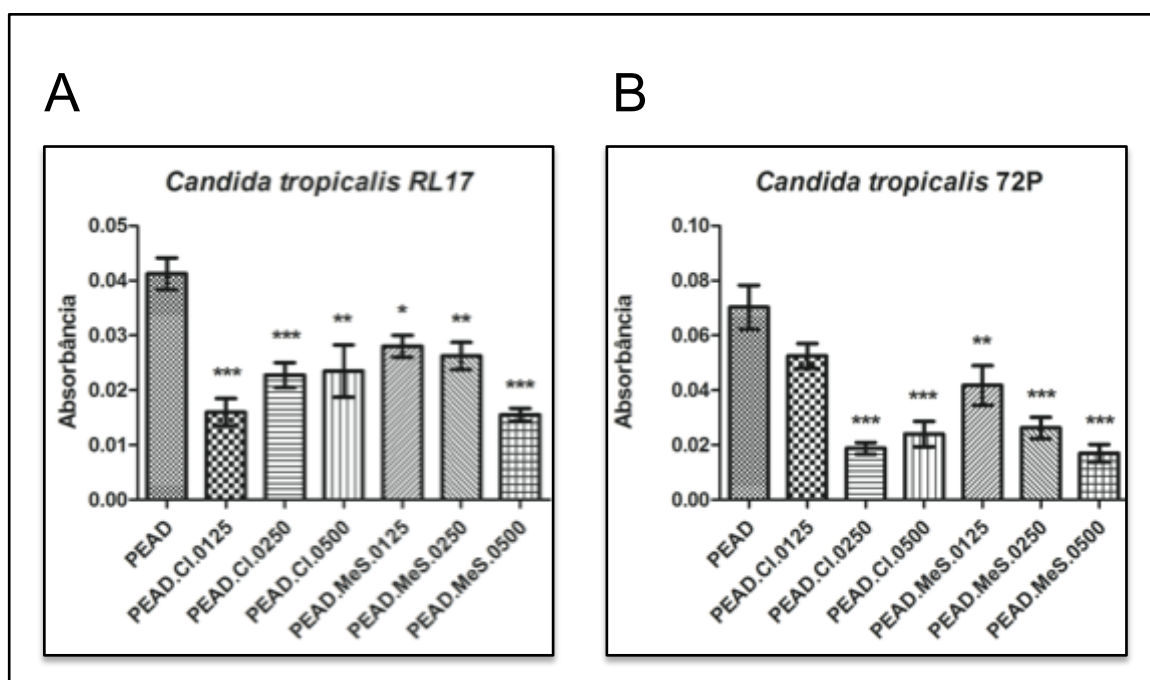


Figura 11. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD** vs **PEAD.CI.0125** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0500** ** $P<0,01$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0125** * $P<0,05$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0250** ** $P<0,01$ e **PEAD** vs **PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD** vs **PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.CI.0500** *** $P<0,001$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0125** ** $P<0,01$, **PEAD** vs **PEAD.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PEAD** vs **PEAD.MeS.0500** *** $P<0,001$.

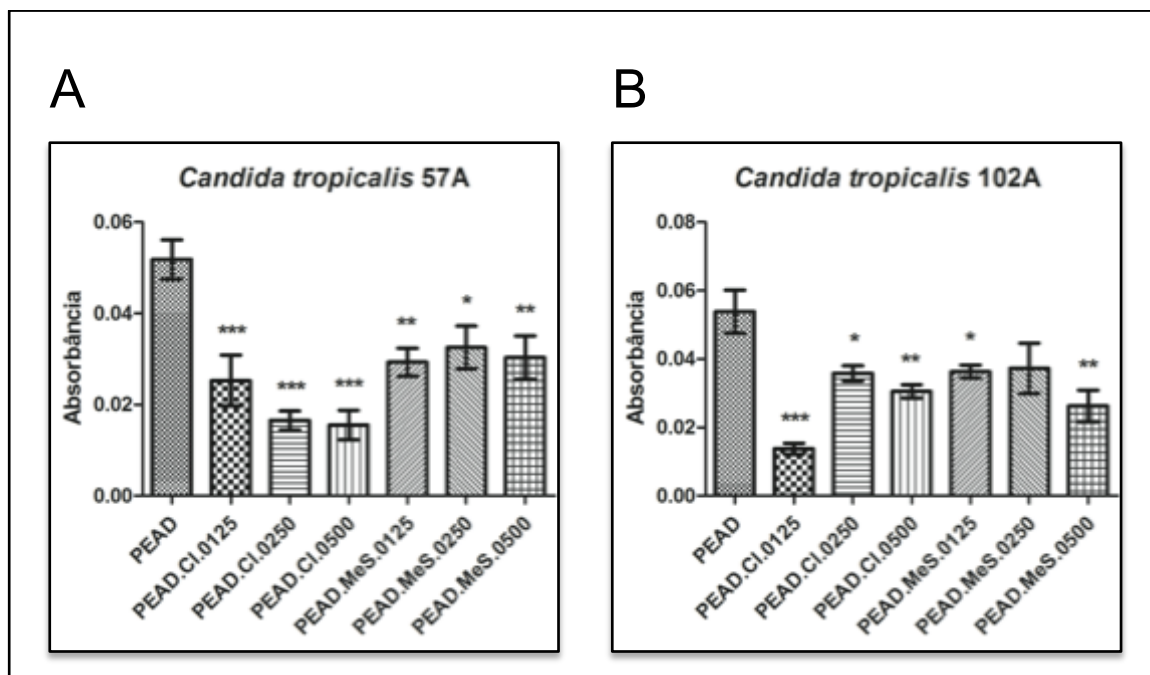


Figura 12. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 57A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** ** $P<0,01$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** * $P<0,05$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** ** $P<0,01$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 102A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** $P<0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** * $P<0,05$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** ** $P<0,01$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** * $P<0,05$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** ** $P<0,01$.

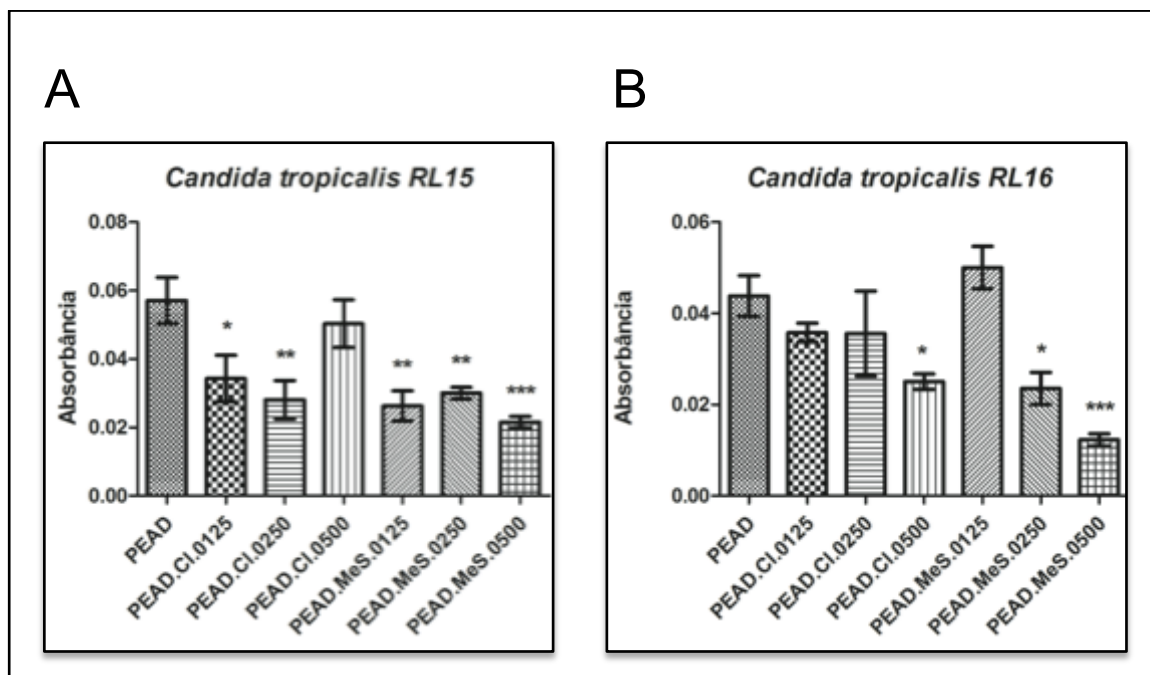


Figura 13. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL15. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0007, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** * $P < 0,05$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** ** $P < 0,01$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** ** $P < 0,01$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** ** $P < 0,01$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** $P < 0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL16. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0002 considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0500** * $P < 0,05$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** * $P < 0,05$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** $P < 0,001$.

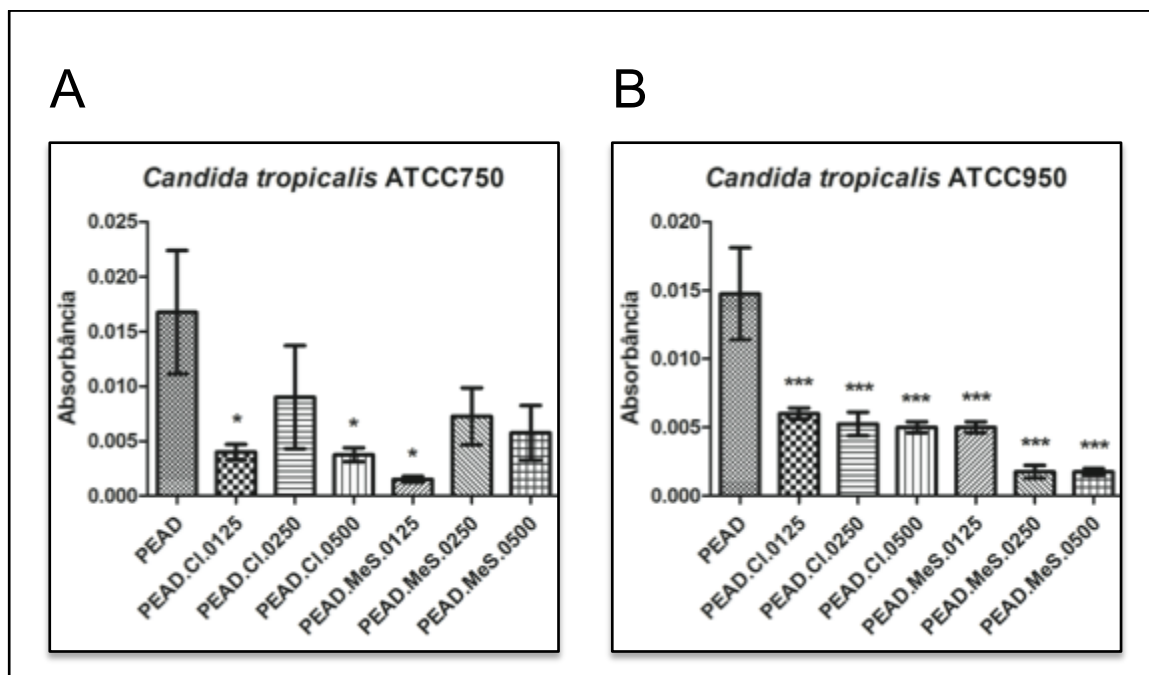


Figura 14. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC750. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi 0,0491, considerado significativo para os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** * $P < 0,05$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** * $P < 0,05$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0125** * $P < 0,05$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PEAD**, **PEAD.CI.0125**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0125**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC950. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PEAD.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PEAD.SI**. **PEAD vs PEAD.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PEAD vs PEAD.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PEAD vs PEAD.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PEAD vs PEAD.MeS.0500** *** $P < 0,001$.

5.1.4 MEV – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de PEAD

Todas as micrografias de MEV das amostras de PEAD estão representadas nas Figuras 15, 73 (Anexo I) e 74 (Anexo I). As micrografias de MEV do **PEAD** (Figuras 15A, 73 (Anexo I) e 74A (Anexo I)), após 72 hs de incubação com o isolado clínico *C. tropicalis* 72A (formador de biofilme), mostram a formação do biofilme com matriz polimérica extracelular aderidos a superfície do filme de **PEAD**. No caso das amostras de **PEAD.CI.0500** (Figuras 15B e 74B (Anexo I)) e

PEAD.MeS.0500 (Figuras 15C e 74C (Anexo I)), houve impedimento da formação do biofilme quando comparado com o **PEAD**, pois não foi observado crescimento fúngico e de biofilme da *C. tropicalis* 72A nas superfícies destes biomateriais, apresentando atividade antibiofilme.

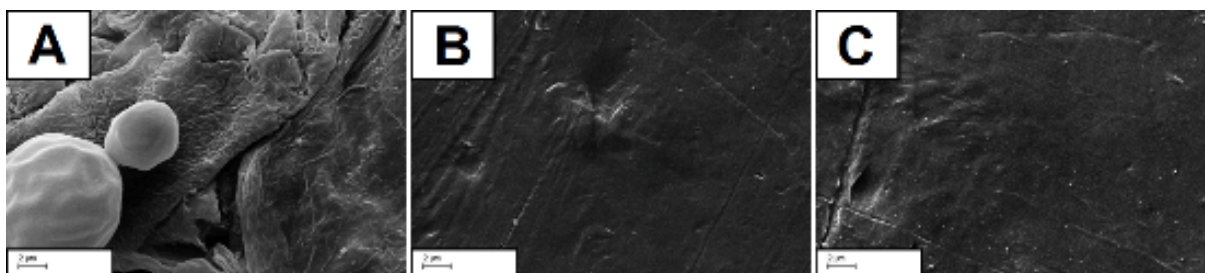


Figura 15. Micrografias de MEV do (A) **PEAD** (biofilme formado), (B) **PEAD.CI.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme) e (C) **PEAD.MeS.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 2 µm.

5.1.5 Citotoxicidade de Sais Imidazólicos

A citotoxicidade dos SI (Figura 2) cloreto de 1-*n*-butil-3-metilimidazólico (**C₄MImCl**) (Figura 16), cloreto de 1-*n*-decil-3-metilimidazólico (**C₁₀MImCl**) (Figura 17), 1,3-di-*n*-decil-2-metilimidazólico ((**C₁₀)₂MImCl**) (Figura 18), **C₁₆MImCl** (Figura 19) e **C₁₆MImMeS** (Figura 20) foi avaliada frente às células de fibroblastos L929 de camundongos. Os SI **C₄MImCl**, **C₁₀MImCl**, (**C₁₀)₂MImCl** foram utilizados como parâmetro de comparação com o **C₁₆MImCl** e o **C₁₆MImMeS**, para avaliar quais SI apresentavam-se mais ou menos tóxicos e em quais concentrações eles poderiam ser utilizados como aditivos. Além de fazer uma relação entre a estrutura dos SI e a citotoxicidade dos mesmos. O **C₄MImCl** (Figura 16) mostrou uma baixa citotoxicidade com o aumento da proliferação de células durante o tempo de cultura, comparado ao comportamento típico de células semeadas em placas de cultura (Controle). Aumentando o comprimento da cadeia *N*-alquil de butil para decil (**C₁₀MImCl**, Figura 17), ocorreu um efeito citotóxico nas células de fibroblasto L929 de camundongos na faixa de concentração de 50-500 µg/mL; enquanto isso, a citotoxicidade do **C₁₀MImCl** estava reduzida quando aplicado em concentrações mais baixas de 1 e 10 µg/mL. Os SI (**C₁₀)₂MImCl**, **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (Figuras 17-20) mostraram um efeito negativo sobre a proliferação celular na maioria das concentrações (10-500 µg/mL) testadas. No entanto, a citotoxicidade destes SI é

baixa na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, embora inferior aos SI com comprimentos de cadeia *N*-alquil mais curtas.

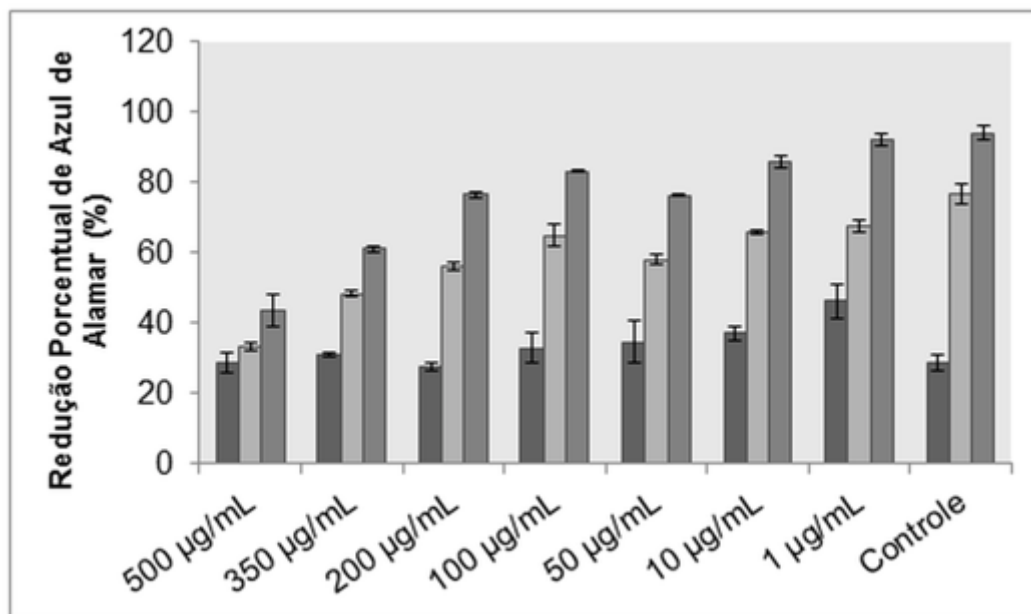


Figura 16. Citotoxicidade do C_4MImCl após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).

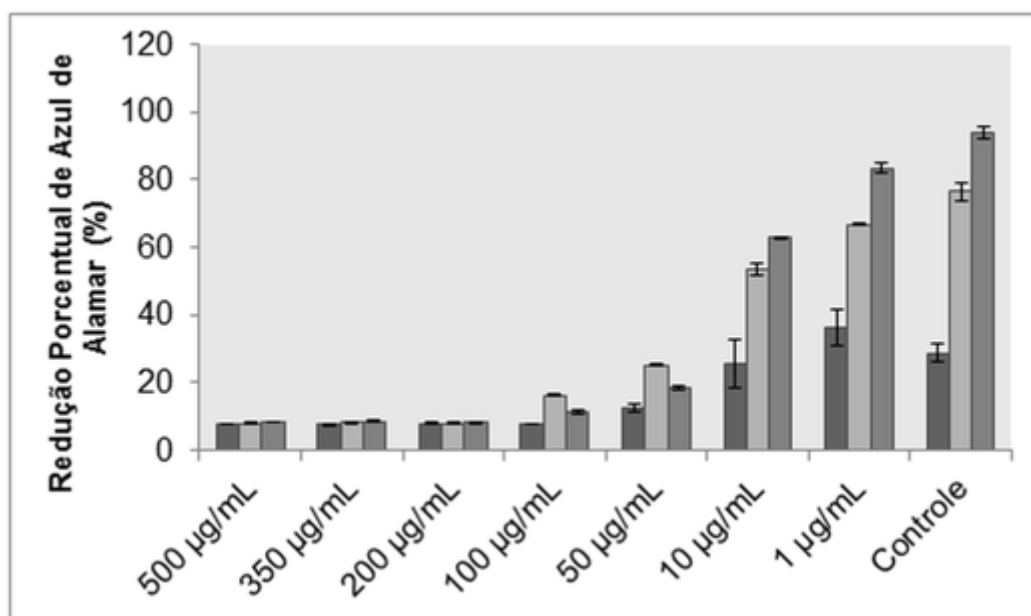


Figura 17. Citotoxicidade do $\text{C}_{10}\text{MImCl}$ após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).

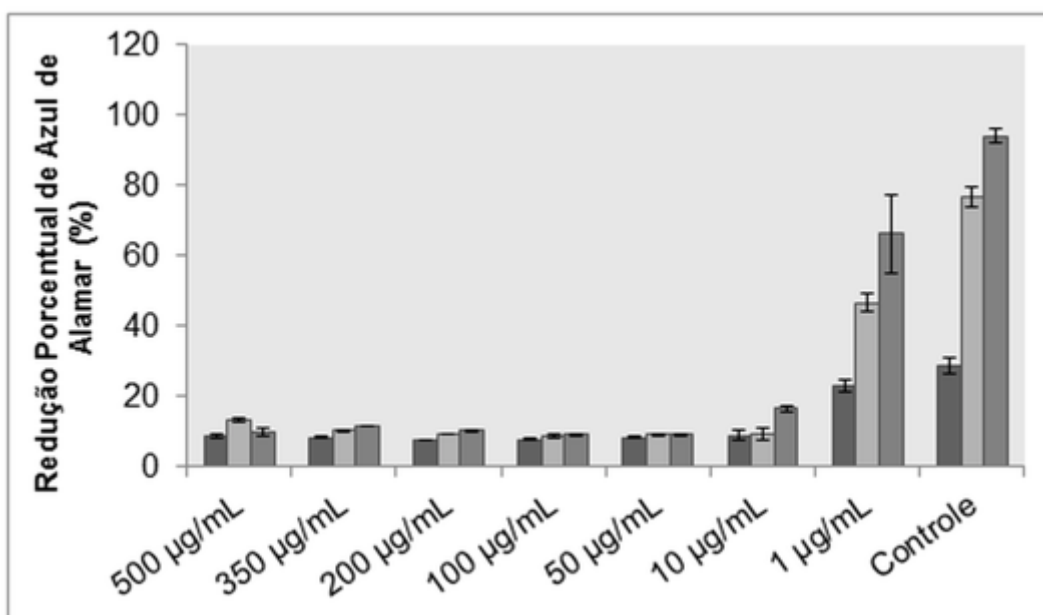


Figura 18. Citotoxicidade do $(C_{10})_2MImCl$ após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).

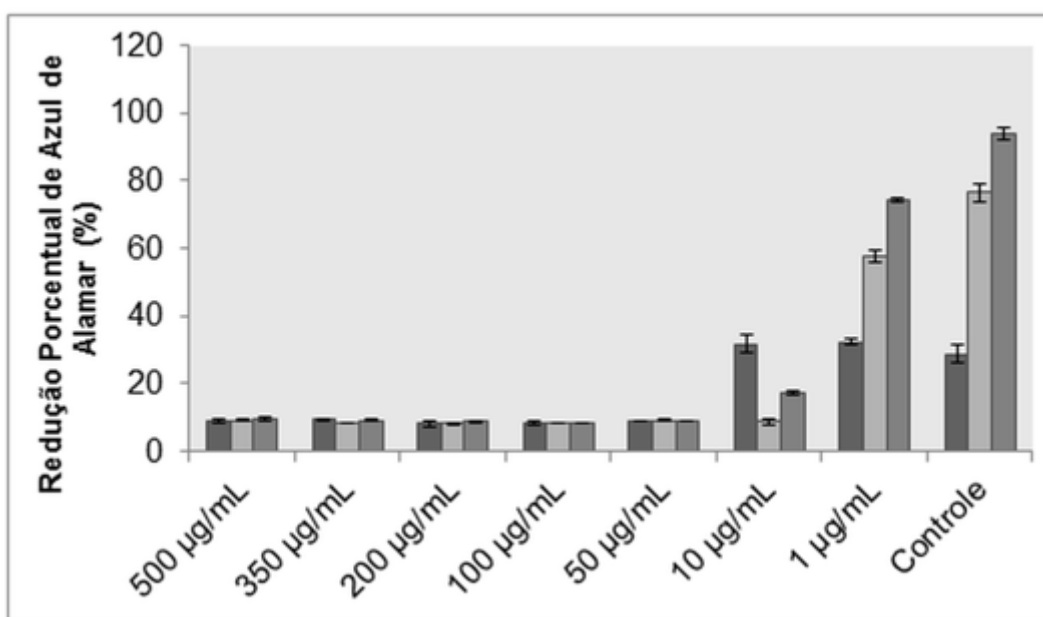


Figura 19. Citotoxicidade do $C_{16}MImCl$ após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).

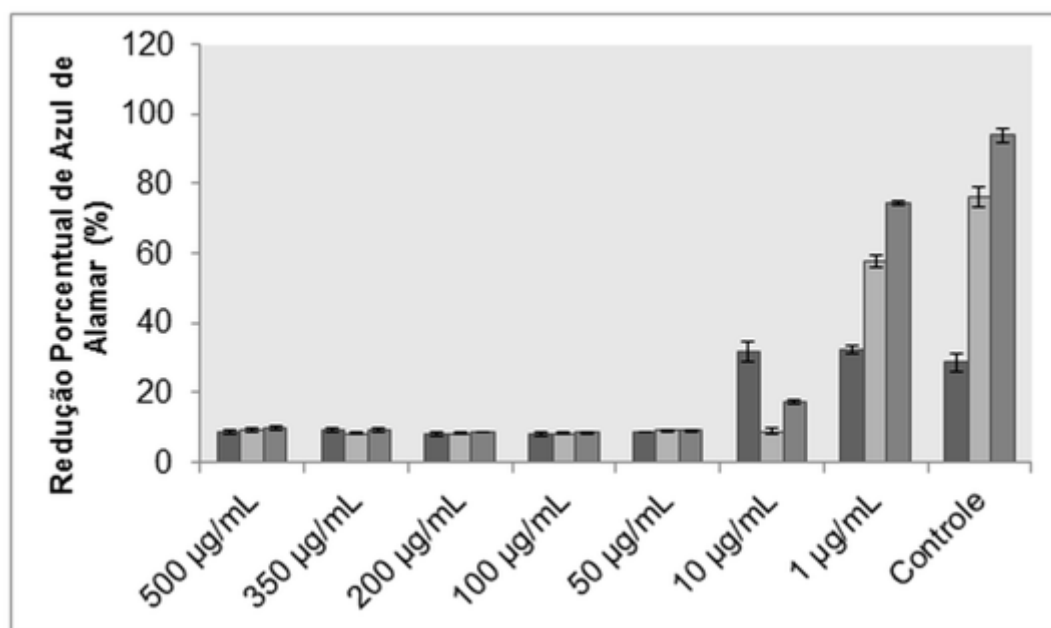


Figura 20. Citotoxicidade do **C₁₆MImMeS** após 24 hs (barras cinzas escuras), 48 hs (barras cinzas claras) e 72 hs (barras cinzas).

5.1.6 Análises de adesão e proliferação em filmes de PEAD com SI

5.1.6.1 Adesão Celular – Análise Morfológica em Microscopia Confocal

As células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) foram utilizadas como um modelo de linhagem celular para os testes *in vitro* de biocompatibilidade dos materiais baseados em PEAD com SI (Raucci et al., 2012). Ambas as análises qualitativa e quantitativa foram realizadas com o objetivo principal, de obter informações sobre o processo de adesão celular (Figuras 21 e 22).

Na análise de adesão celular das células-tronco mesenquimais humanas (CTMh), realizada por microscopia confocal, a Figura 21 apresenta uma mudança na morfologia com o aumento do teor dos SI nos biomateriais de PEAD. As CTMh semeadas sobre o **PEAD** (sem SI) apresentaram uma estrutura fina e alongada típica de células de fibroblastos. Diferentemente, os biomateriais **PEAD.SI** mostraram que existe uma relação direta entre a presença do SI e a morfologia das CTMh, pois dependendo do teor do SI utilizado ocorre uma mudança na morfologia dessas células. Biomateriais baseados em PEAD com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** induziram o crescimento das células-tronco com uma estrutura

poligonal, tipicamente das células de osteoblastos. Este comportamento é mais pronunciado para os biomateriais com maiores teores de SI (Figuras 21C,D,F,G).

Os biomateriais **PEAD**, **PEAD.CI** e **PEAD.MeS** mostraram todos excelentes valores nas análises quantitativas de adesão celular (Figura 22), os quais demonstraram ótimas propriedades de superfície, promovendo a extensão da filopodia do corpo celular e garantindo uma adesão celular estável nas primeiras 48 hs de incubação. Para os biomateriais baseados no **C₁₆MImCl**, a adesão celular aumentou com o aumento do teor do SI, mostrando uma porcentagem de adesão celular mais alta para o **PEAD.CI.0500** em comparação com o **PEAD**, isso demonstra que o **PEAD.CI.0500** é um ótimo biomaterial, sendo um dos mais biocompatíveis com as CTMh. Todas as amostras **PEAD.MeS** apresentaram valores comparáveis com aqueles obtidos com o **PEAD**. Sendo assim, foi possível verificar que o **PEAD**, **PEAD.CI** e **PEAD.MeS** são biocompatíveis com as CTMh.

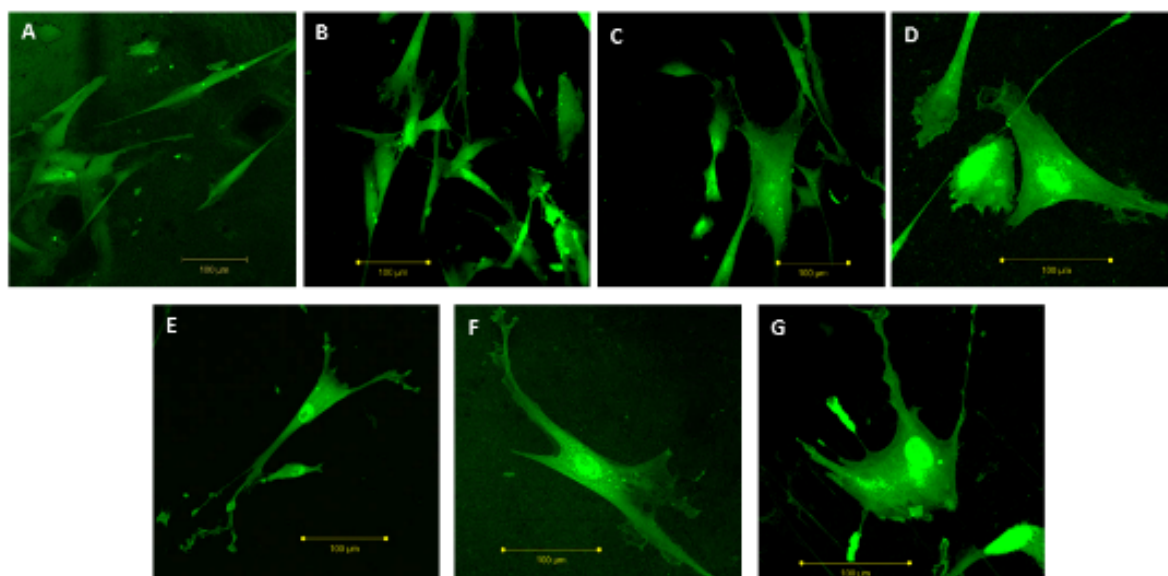


Figura 21. Micrografias de Microscopia Confocal do (A) **PEAD**, (B) **PEAD.CI.0125**, (C) **PEAD.CI.0250**, (D) **PEAD.CI.0500**, (E) **PEAD.MeS.0125**, (F) **PEAD.MeS.0250** e (G) **PEAD.MeS.0500** (barra de escala = 100 µm), após crescimento celular das CTMh nos biomateriais de PEAD com e sem os SI.

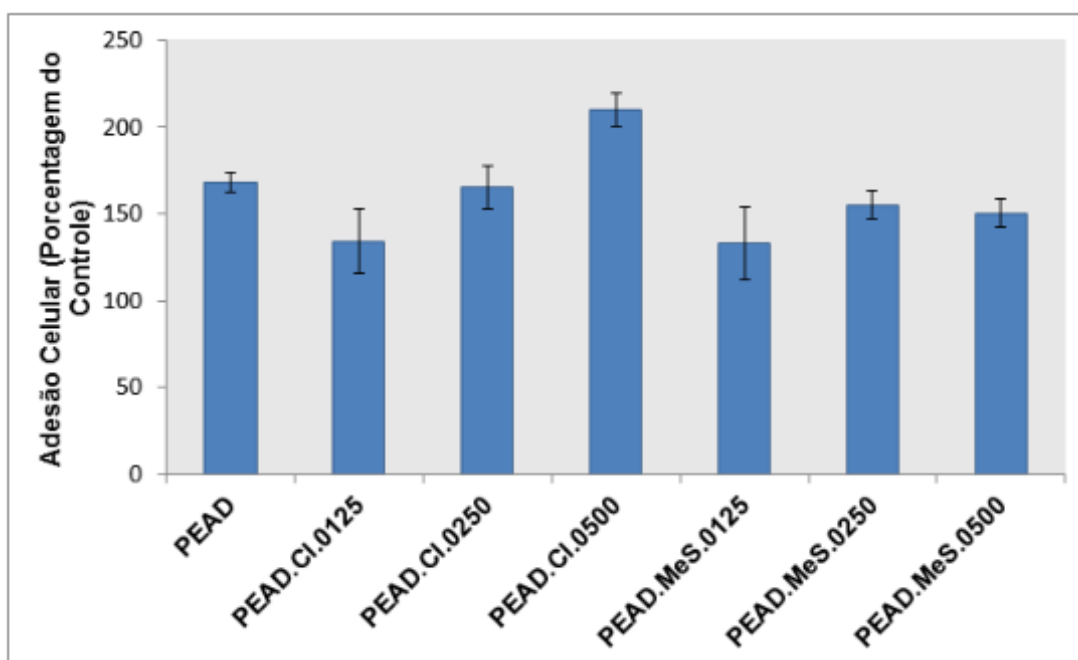


Figura 22. Adesão celular de CTMh, após 48 hs de incubação (Ensaio do Azul de Alamar), sobre os filmes de PEAD. Como controle da viabilidade (100%) das células foi utilizada as CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos.

5.1.6.2 Teste de Viabilidade Celular

A proliferação celular da CTMh foi estudada após longos períodos de exposição (7, 10, 14 e 21 dias) aos biomateriais de PEAD. Os resultados estão representados na Figura 23. No teste de viabilidade celular, em geral, os biomateriais de PEAD sem e com os SI mostraram baixas porcentagens de proliferação celular comparadas com o Controle após 7 dias (Figura 23). Mesmo assim, isso foi compensado com todos os materiais após 21 dias. **PEAD**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500** e **PEAD.MeS.0250** ultrapassaram os valores das porcentagens de proliferação celular do Controle após 10 dias. O melhor resultado de proliferação foi obtido com os biomateriais contendo 0,250 %m/m dos SI.

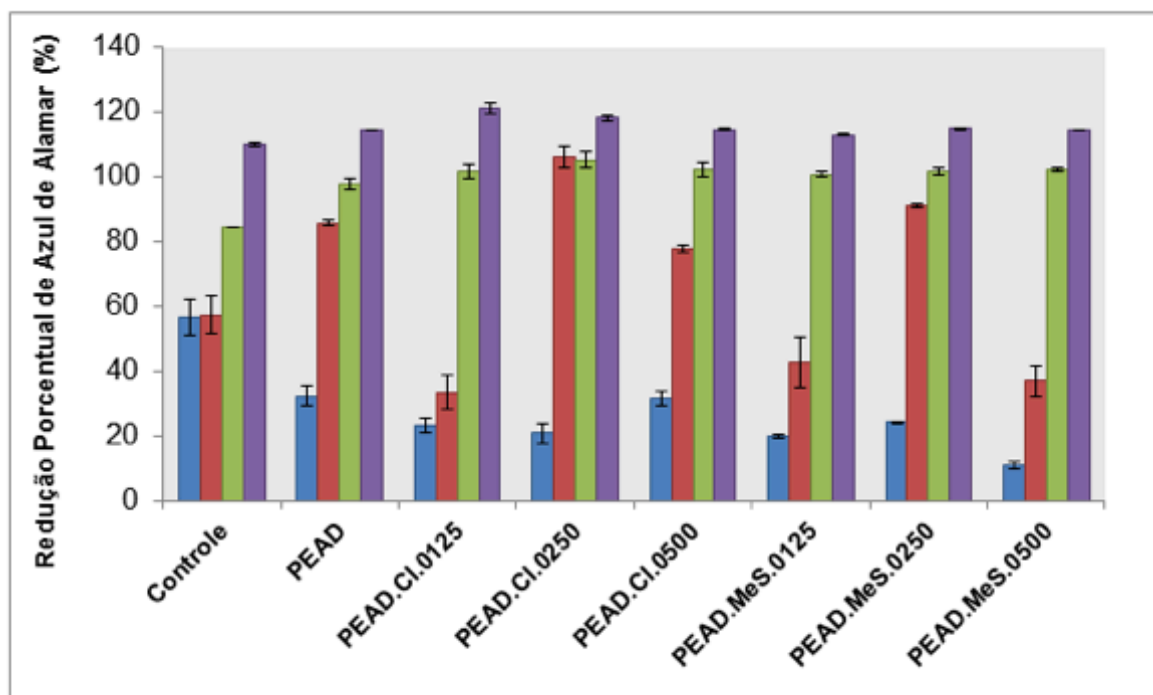


Figura 23. Proliferação celular de CTMh em 7 (barras azuis), 10 (barras vermelhas), 14 (barras verdes) e 21 dias (barras roxas) de tempo de cultivo (Ensaio do Azul de Alamar) sobre os filmes de PEAD.

5.1.7 Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PEAD

Na avaliação histopatológica de pele da orelha suína incubada com os filmes de PEAD (**PEAD**, **PEAD.CI.0250**, **PEAD.CI.0500**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500**) não foram observadas alterações celulares na epiderme (como hiperplasia, espessamento e paraqueratose), quando comparado com a amostra controle com tampão PBS pH 7,0 (Figura 24: 1A e 2A). Desta forma foi verificado que os biomateriais de PEAD não causam lesões microscópicas agudas na pele da orelha suína (Figura 24).

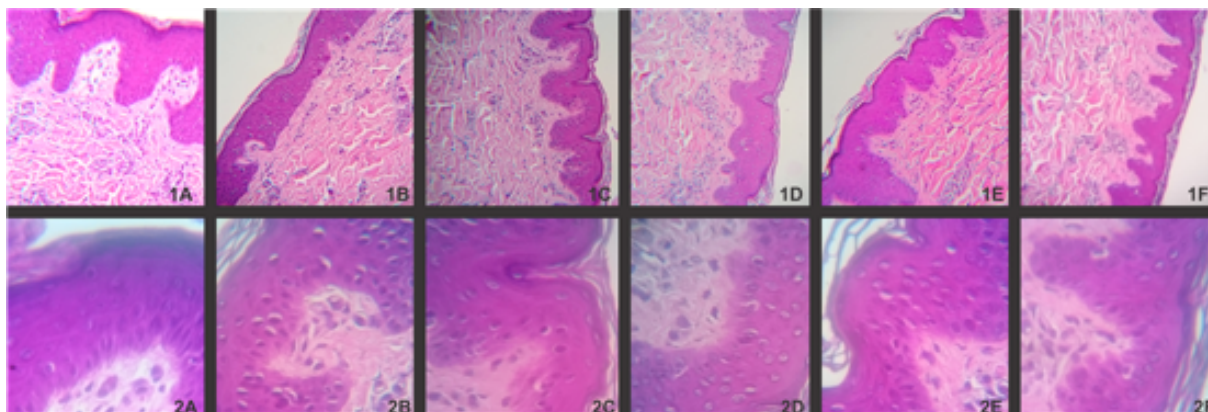


Figura 24. Avaliação histopatológica de pele de orelha de suíno em contato com filmes de PEAD com SI ($C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$) e tratada com solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 (controle negativo em aumentos de 100 e 400 vezes de magnitude): Aumento de 100 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (1A) tampão PBS pH 7,0; (1B) **PEAD**; (1C) **PEAD.CI.0250**; (1D) **PEAD.CI.0500**; (1E) **PEAD.MeS.0250**; e (1F) **PEAD.MeS.0500**. Aumento de 400 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (2A) tampão PBS pH 7,0; (2B) **PEAD**; (2C) **PEAD.CI.0250**; (2D) **PEAD.CI.0500**; (2E) **PEAD.MeS.0250**; e (2F) **PEAD.MeS.0500**.

5.1.8 Técnicas de Caracterização dos Polímeros PEAD

5.1.8.1 MEV – Morfologia da Superfície dos Filmes de PEAD

A morfologia da superfície dos filmes de PEAD foi estudada através de MEV. As micrografias de MEV do **PEAD**, **PEAD.CI.0500** e **PEAD.MeS.0500** mostram que a incorporação dos SI $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$ não resultaram em mudanças expressivas na morfologia da superfície destes biomateriais quando comparados com o PEAD (sem os SI) (Figura 25).

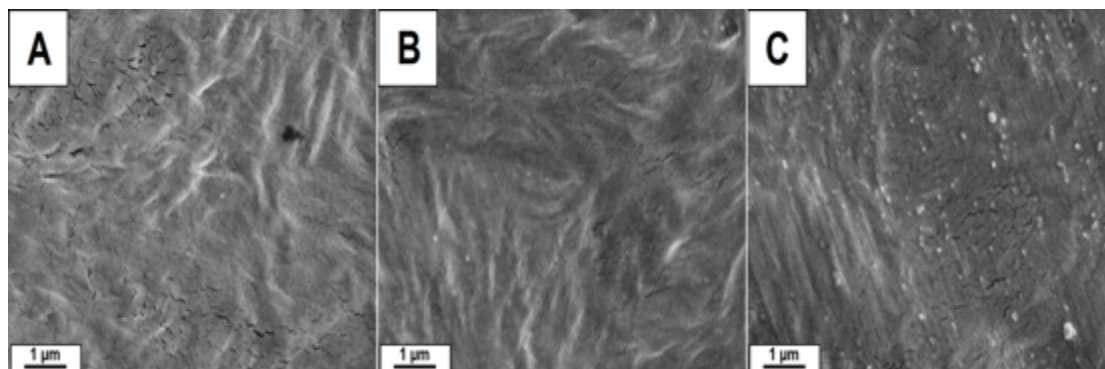


Figura 25. Micrografias de MEV do (A) **PEAD**; (B) **PEAD.CI.0500**; e (C) **PEAD.MeS.0500** (barra de escala = 1 µm).

5.1.8.2 Análises de Difração de raios X

A cristalinidade dos biomateriais de PEAD foi estudada através da análise de DRX. Todas as amostras mostraram os picos de difração em 21,6 e 24,0°, os quais correspondem com os planos (110) e (200), respectivamente (Chouit et al., 2014). Os difratogramas dos biomateriais de PEAD (Figuras 26 e 27) permitem observar que os SI (**C₁₆MImCl** ou **C₁₆MImMeS**) e o teor dos SI (0,125; 0,250 ou 0,500 %m/m) não afetaram o tipo de cristalinidade do PEAD. Porém, a incorporação dos SI resultou em pequenas alterações das razões das áreas dos picos 2 θ 21,6/24,0 (Tabela 8), significando uma leve indução da formação de um dos tipos de cristais.

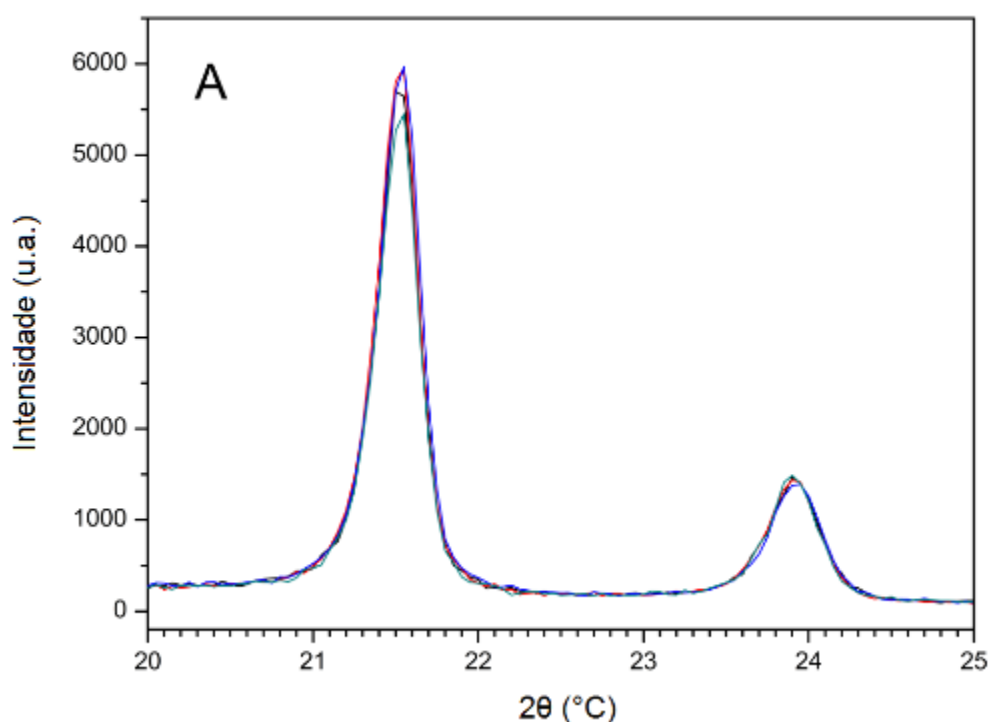


Figura 26. Difratogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2 θ 20-25°: **PEAD** (linha preta); **PEAD.CI.0125** (linha vermelha); **PEAD.CI.0250** (linha azul) e **PEAD.CI.0500** (linha verde).

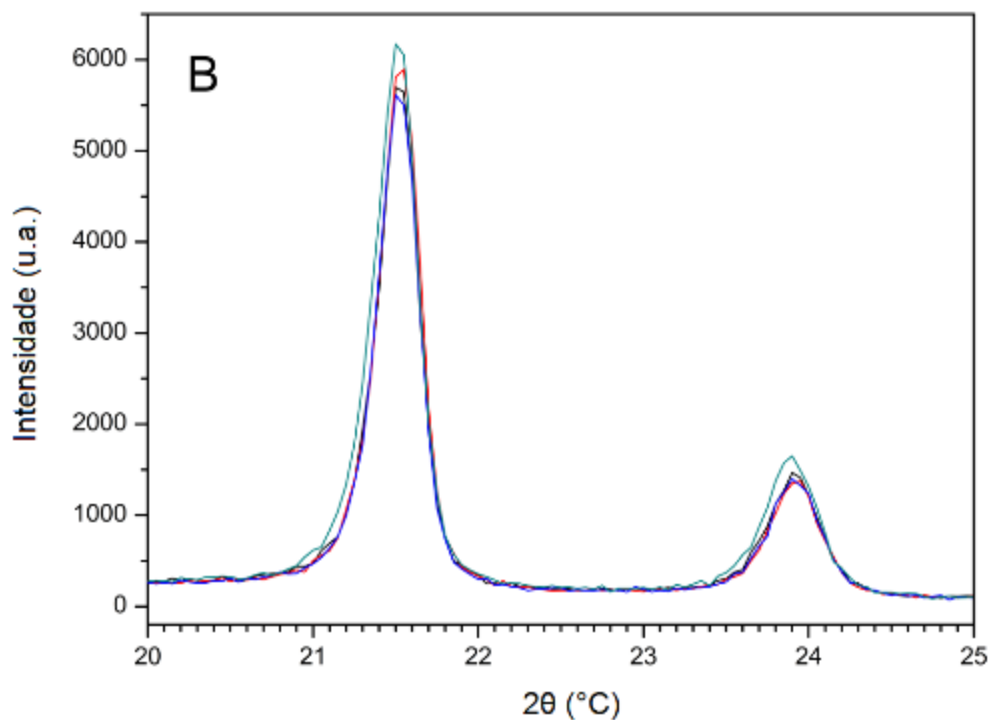


Figura 27. Difratogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 20-25°: PEAD (linha preta); PEAD.MeS.0125 (linha vermelha); PEAD.MeS.0250 (linha azul) e PEAD.MeS.0500 (linha verde).

Tabela 8. Razão das áreas dos picos 2θ em 21,6 e 24,0°.

Biomaterial	Área do pico 2θ 21,6°	Área do pico 2θ 24,0°	Razão das áreas dos picos 2θ 21,6°/24,0°
PEAD	5688	1443	3,94
PEAD.CI.0125	5917	1436	4,12
PEAD.CI.0250	5950	1388	4,29
PEAD.CI.0500	5434	1481	3,67
PEAD.MeS.0125	5873	1369	4,29
PEAD.MeS.0250	5603	1376	4,07
PEAD.MeS.0500	6161	1638	3,76

5.1.8.3 Propriedades térmicas dos filmes de PEAD (Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Análises Termogravimétricas)

As análises de DSC e ATG foram utilizadas para verificar as propriedades térmicas dos biomateriais de PEAD com SI. Os resultados referentes ao ponto de fusão, temperatura de cristalização, entalpia de fusão, entalpia de cristalização, cristalinidade, degradação térmica e massa residual estão resumidos na Tabela 9. As curvas de DSC e ATG estão representadas na Figura 90 do Anexo III e na Figura 94 do Anexo IV, respectivamente.

Em geral, a influência da incorporação dos SI nos teores de 0,125; 0,250 e 0,500 %m/m nas propriedades térmicas dos biomateriais **PEAD.SI** foram sutis. O ponto de fusão (**PEAD**: 132,3 °C) e a temperatura de cristalização (**PEAD**: 116,8 °C) permaneceram com diferenças dentro de 1 °C (T_f : 131,5-132,3 °C; T_c : 116,8-117,8 °C) dos valores originais do **PEAD**. Ambas a cristalinidade e a resistência à degradação térmica não seguiram uma tendência e os valores obtidos não variaram de forma expressiva quando comparado aos valores originais do **PEAD**.

Tabela 9. Propriedades térmicas dos filmes de PEAD, determinadas por DSC e ATG.

<i>Amostra</i>	T_f [°C] ^a	T_c [°C] ^b	ΔH_f [J/g] ^c	ΔH_c [J/g] ^d	X_c [%] ^e	$T_{5\%}$ [°C] ^f	$T_{10\%}$ [°C] ^g	$T_{50\%}$ [°C] ^h	<i>Resíduo</i> [%] ⁱ
PEAD	132,3	116,8	209,8	221,4	71,6	429,6	443,5	483,3	0,1
PEAD.CI.0125	131,6	117,5	212,9	216,0	72,7	416,7	441,6	482,5	0,2
PEAD.MeS.0125	132,0	117,2	212,8	207,9	72,7	431,0	445,1	483,0	0
PEAD.CI.0250	131,7	117,6	205,7	223,9	70,4	400,8	429,3	473,1	0,7
PEAD.MeS.0250	131,6	117,4	207,2	211,1	70,9	415,4	434,6	474,1	0
PEAD.CI.0500	131,5	117,8	220,3	231,6	75,6	414,8	441,9	480,4	0,4
PEAD.MeS.0500	131,8	117,3	206,1	210,1	70,7	412,2	432,6	481,4	0,7

^a Temperatura de fusão determinada através de DSC. ^b Temperatura de cristalização determinada através de DSC. ^c Entalpia de fusão determinada através de DSC. ^d Entalpia de cristalização determinada através de DSC. ^e Cristalinidade determinada através de DSC, utilizando a Equação 1. ΔH_f^0 é a entalpia de fusão de PEAD 100% cristalino, sendo 293 J/g (Mignoni et al., 2011). ^f Temperatura de decomposição de 5 %m/m como determinada através de ATG. ^g Temperatura de decomposição de 10 %m/m como determinada através de ATG. ^h Temperatura de decomposição de 50 %m/m como determinada através de ATG. ⁱ Peso residual a 550 °C como determinado através de ATG.

5.1.8.4 Análises Dinâmico-Mecânicas

Os resultados das análises de DMA estão representados de forma resumida na Tabela 10 e a Figura 97 do Anexo V representa as curvas de módulo

de armazenamento, módulo de perda e rigidez. A maioria dos biomateriais **PEAD.SI** mostraram módulo de armazenamento parecido com o **PEAD**, com exceção do **PEAD.CI.0500**, o qual mostrou valores inferiores. Para o módulo de perda, os filmes de PEAD contendo SI mostraram valores inferiores, embora não exista uma relação clara com o aumento do teor dos SI. Como observado no módulo de armazenamento, o **PEAD.CI.0500** mostrou também o módulo de perda com valores mais baixos. Isto também é refletido na menor rigidez do **PEAD.CI.0500**. Mais uma vez, não foi observada uma tendência clara para a rigidez com o aumento do teor do SI, porém, os biomateriais **PEAD.CI.0250**, **PEAD.MeS.0250** e **PEAD.MeS.0500** neste caso demonstraram melhores desempenhos comparado com o **PEAD**. Considerando todos estes resultados, foi possível verificar que o balanço das propriedades dinâmico-mecânicas depende do SI e do seu teor apresentando, em geral, melhores resultados para os filmes com **C₁₆MImMeS**.

Tabela 10. Propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes de PEAD.

<i>Amostra</i>	G'40 [GPa] ^a	G'40 [GPa] ^b	G''40 [GPa] ^c	G''40 [GPa] ^d	S40 [kN/m] ^e	S40 [kN/m] ^f	S90 [kN/m] ^g
PEAD	3,33	1,48	0,07	0,17	315,45	140,50	26,71
PEAD.CI.0125	3,14	1,44	0,05	0,16	271,63	124,96	22,05
PEAD.MeS.0125	3,17	1,40	0,06	0,16	349,31	154,66	28,11
PEAD.CI.0250	3,28	1,52	0,07	0,16	346,19	160,34	29,83
PEAD.MeS.0250	3,09	1,38	0,05	0,15	288,79	129,50	23,64
PEAD.CI.0500	2,44	1,12	0,04	0,12	230,62	106,03	19,45
PEAD.MeS.0500	3,18	1,45	0,05	0,16	416,42	190,24	32,03

^a Módulo de armazenamento a -40 °C. ^b Módulo de armazenamento a 40 °C. ^c Módulo de perda a -40 °C. ^d Módulo de perda a 40 °C. ^e Rigidez a -40 °C. ^f Rigidez a 40 °C. ^g Rigidez a 90 °C.

5.1.8.5 Ângulo de Contato da Água

As medidas de ângulo de contato da água foram realizadas para entender o efeito dos SI na molhabilidade da superfície dos filmes de PEAD. A Figura 28 mostra os ângulos de contatos determinados para os filmes de PEAD contendo 0-0,5 %m/m do **C₁₆MImCI** ou do **C₁₆MImMeS**. Embora o **PEAD.CI.0250** tenha mostrado um valor maior de ângulo de contato da água do que o **PEAD**, os outros teores de 0,125 e 0,500 %m/m do **C₁₆MImCI** mostraram somente pequenas variações nos valores quando comparado com o filme sem o SI. Em contraste, os

filmes de PEAD com o **C₁₆MImMeS** mostraram uma aumentada hidrofiliicidade com o aumento dos teores do SI.

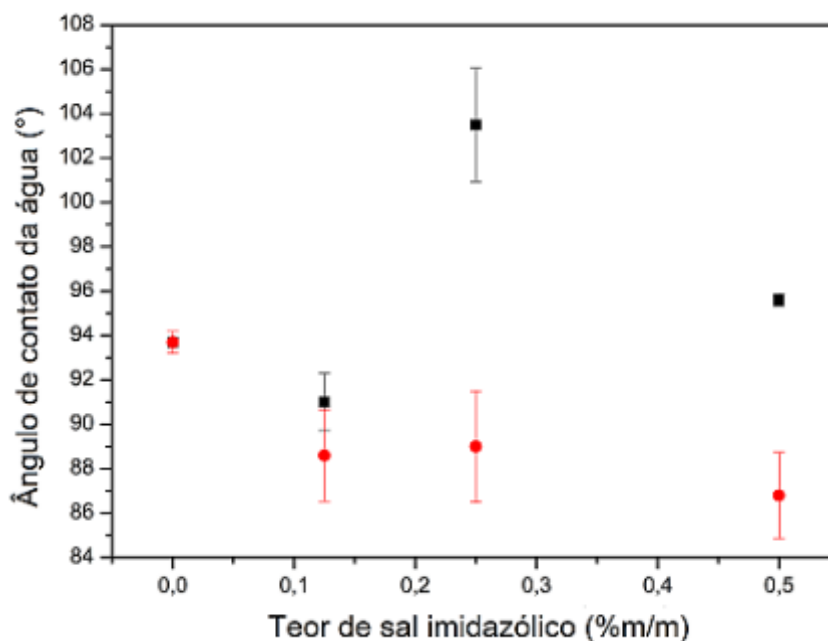


Figura 28. Ângulos de contato da água para filmes de PEAD: **PEAD.CI** (quadro preto) e **PEAD.MeS** (círculo vermelho).

5.2 Filmes de PHB com Sais Imidazólicos

5.2.1 Preparação de filmes de PHB com Sais Imidazólicos

Os biomateriais de PHB foram preparados misturados no estado fundido em Câmara de Misturas, incorporando diferentes teores dos SI (0,000; 0,125; 0,250; 0,500 %m/m) cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImCl**) e metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImMeS**). Desta forma, obtendo-se filmes de PHB com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, com uma espessura de 0,5 mm após o processo de prensagem utilizando a prensa hidráulica Carver Monarch 3710.

5.2.2 Ensaio Antibiofilme

O Ensaio Antibiofilme foi realizado para verificar se os biomateriais de PHB com SI apresentavam atividade antibiofilme em comparação com o **PHB** (Tabelas 11-12 e Figuras 29-30). Neste ensaio foi verificado que em comparação com o **PHB** (sem os SI), todos os biomateriais testados (**PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500**)

apresentaram atividade antibiofilme frente a isolados clínicos formadores de biofilme de *C. tropicalis* 72A, *C. parapsilosis* RL11 e RL20 e *C. albicans* CA04.

Tabela 11. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no **PHB e PHB.CI** frente aos isolados de *Candida* spp.

Biomaterial	Levedura	Diluição	Média*	UFC/cm²	log
PHB	<i>Candida tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	10,75	2,6x10 ⁵	5,42
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	4	1x10 ⁵	5
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	8,75	2,1x10 ⁵	5,33
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	7,25	1,8x10 ⁵	5,25
PHB.CI.0125	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1,25	3,1x10 ⁴	4,49
PHB.CI.0250	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0	0	0
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	0,75	1,8x10 ⁴	4,27
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	3,25	8,1x10 ⁴	4,9
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	0	0	0
PHB.CI.0500	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0,75	1,8x10 ⁴	4,27

* Média: UFC/mL- Soma das colônias, em quadruplicata, e logo transformadas para log.

Tabela 12. Resultado do Ensaio Antibiofilme realizado no **PHB e PHB.MeS** frente aos isolados de *Candida* spp.

Biomaterial	Levedura	Diluição	Média*	UFC/cm ²	log
PHB	<i>Candida tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	10,75	2,6x10 ⁵	5,42
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	4	1x10 ⁵	5
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	8,75	2,1x10 ⁵	5,33
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	7,25	1,8x10 ⁵	5,25
PHB.MeS.0125	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0	0	0
PHB.MeS.0250	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0	0	0
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	2	5x10 ⁴	4,69
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	1,5	3,7x10 ⁴	4,57
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	2	5x10 ⁴	4,69
PHB.MeS.0500	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1	2,5x10 ⁴	4,39

* Média: UFC/mL- Soma das colônias, em quadruplicata, e logo transformadas para log.

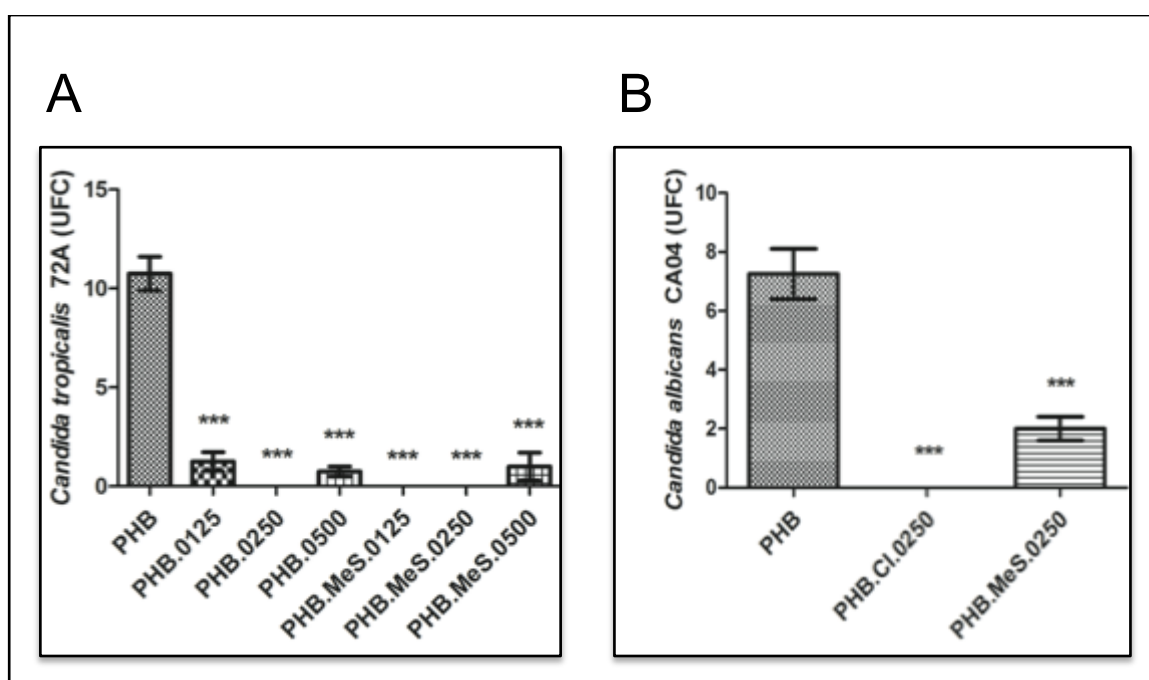


Figura 29. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10⁻¹, dos biomateriais de **PHB, PHB.CI.0125, PHB.CI.0250, PHB.CI.0500, PHB.MeS.0125, PHB.MeS.0250 e PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi <0,0001, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125 *** P<0,05, PHB vs PHB.CI.0250 *** P<0,05, PHB vs PHB.CI.0500 *** P<0,05, PHB vs**

PHB.MeS.0125 *** $P < 0,05$, **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *** $P < 0,05$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0500** *** $P < 0,05$. **(B)** Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0250** e **PHB.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida albicans* CA04. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0250** *** $P < 0,05$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *** $P < 0,05$.

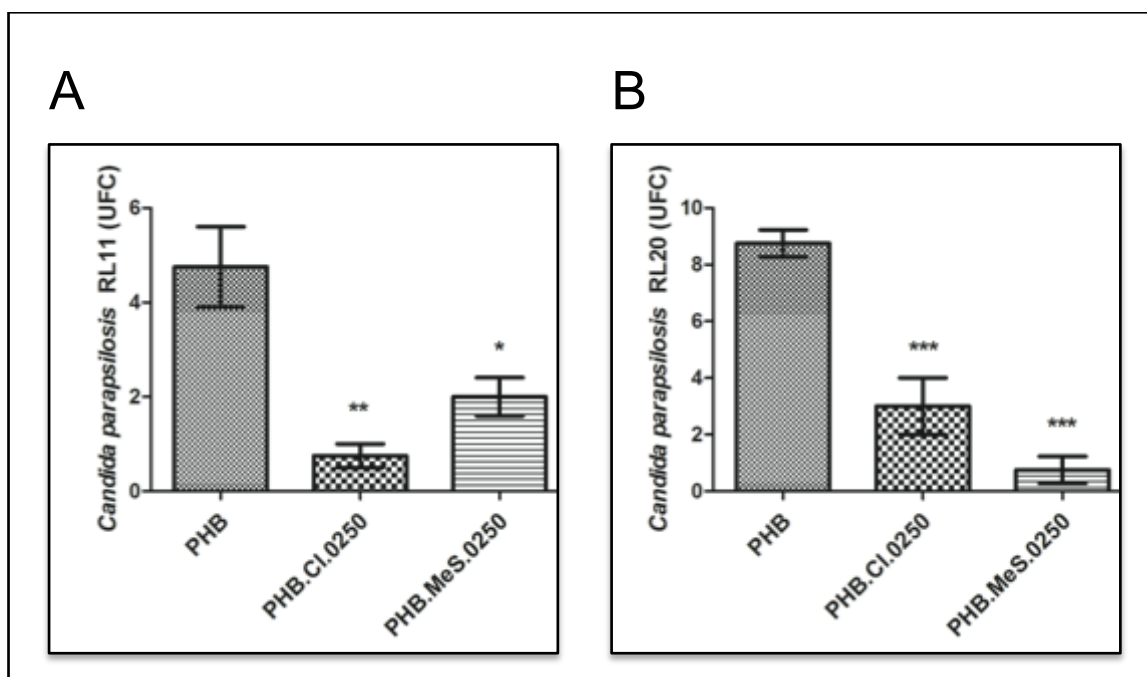


Figura 30. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0250** e **PHB.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida parapsilosis* RL11. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi 0,0022, considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0250** ** $P < 0,05$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *.

(B) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0250** e **PHB.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida parapsilosis* RL20. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0250** *** $P < 0,05$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *** $P < 0,05$.

5.2.3 Ensaio Menor Concentração Antibiofilme (MCA)

O Ensaio Menor Concentração Antibiofilme foi realizado para verificar a porcentagem de impedimento da formação do biofilme dos filmes de PHB com **C₁₆MImCl** (Figura 31: **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250** e **PHB.CI.0500**) e com **C₁₆MImMeS** (Figura 32: **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500**), em comparação com o **PHB** (sem os SI); frente a 12 isolados de *C. tropicalis*

formadores de biofilmes. Os resultados das análises estatísticas estão apresentados nas Figuras 33-38.

No geral, os biomateriais de PHB com os SI impediram a formação do biofilme frente aos isolados de *C. tropicalis* testados. Houve uma variação na porcentagem de impedimento da formação do biofilme dependendo do isolado de *C. tropicalis* testado. Os valores de porcentagem de impedimento de formação do biofilme variaram entre 17-90% e 0-100% para os biomateriais com **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, respectivamente.

As melhores porcentagens de impedimento da formação do biofilme foram obtidas utilizando o **PHB.CI.0125** com 75% de impedimento para a *C. tropicalis* RL15 e 74% para a *C. tropicalis* 17A; com o **PHB.CI.0250** obteve-se 90% de impedimento para a *C. tropicalis* 72A e 83% para a *C. tropicalis* 94P e com **PHB.CI.0500** obteve-se 88% de impedimento para a *C. tropicalis* 94P e 87% para a *C. tropicalis* RL15 (Figura 31).

As melhores porcentagens de impedimento da formação do biofilme utilizando o **PHB.MeS.0125** foram de 71% para a *C. tropicalis* 17P e 69% para a *C. tropicalis* 94P; com o **PHB.MeS.0250** obteve-se 90% de impedimento para a *C. tropicalis* 17P e 87% para a *C. tropicalis* 94P e com o **PHB.MeS.0500** obteve-se 100% de impedimento para a *C. tropicalis* 17A e 97% de impedimento para a *C. tropicalis* 17P (Figura 32).

Em geral, foi verificado que com o aumento do teor dos SI (**C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**) no PHB, ocorreu um aumento na porcentagem de impedimento da formação do biofilme (Figura 31 e 32). Considerando a eficácia dos biomateriais de PHB em relação com o teor do SI, frente aos isolados de *C. tropicalis*, foi possível verificar que o teor de 0,125 %m/m o **C₁₆MImCl** foi mais eficaz no impedimento da formação do biofilme quando comparado com o **C₁₆MImMeS**. Nos teores de 0,250 e 0,500 %m/m o **C₁₆MImMeS** foi mais eficaz.

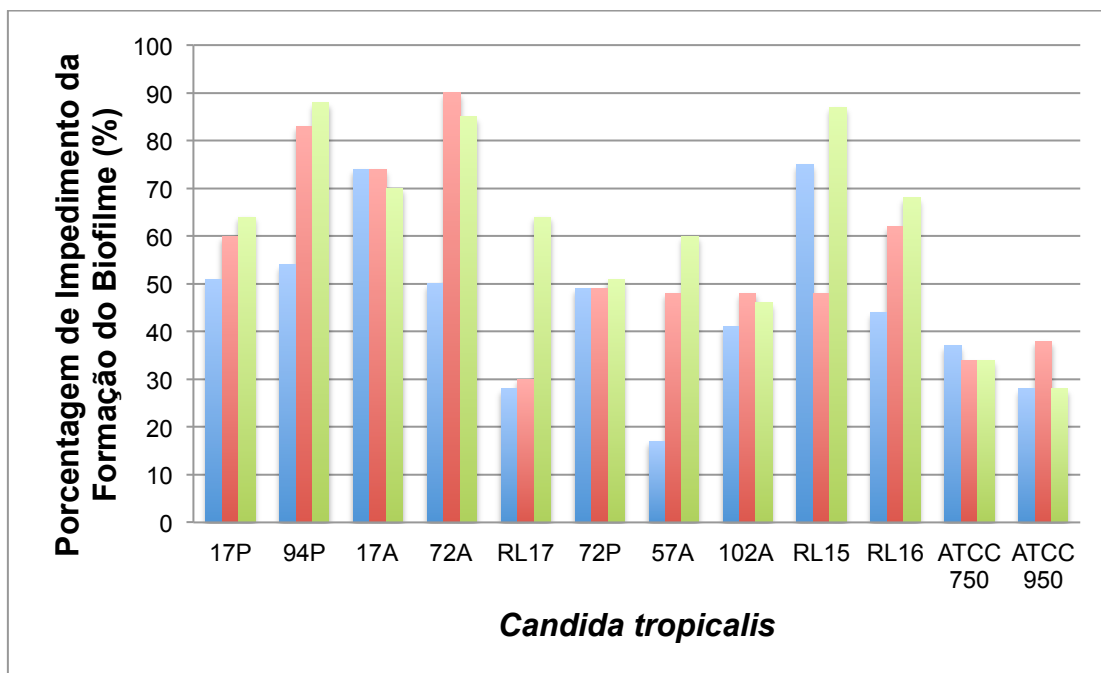


Figura 31. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PHB.CI.0125** (barras azuis), **PHB.CI.0250** (barras vermelhas); e **PHB.CI.0500** (barras verdes).

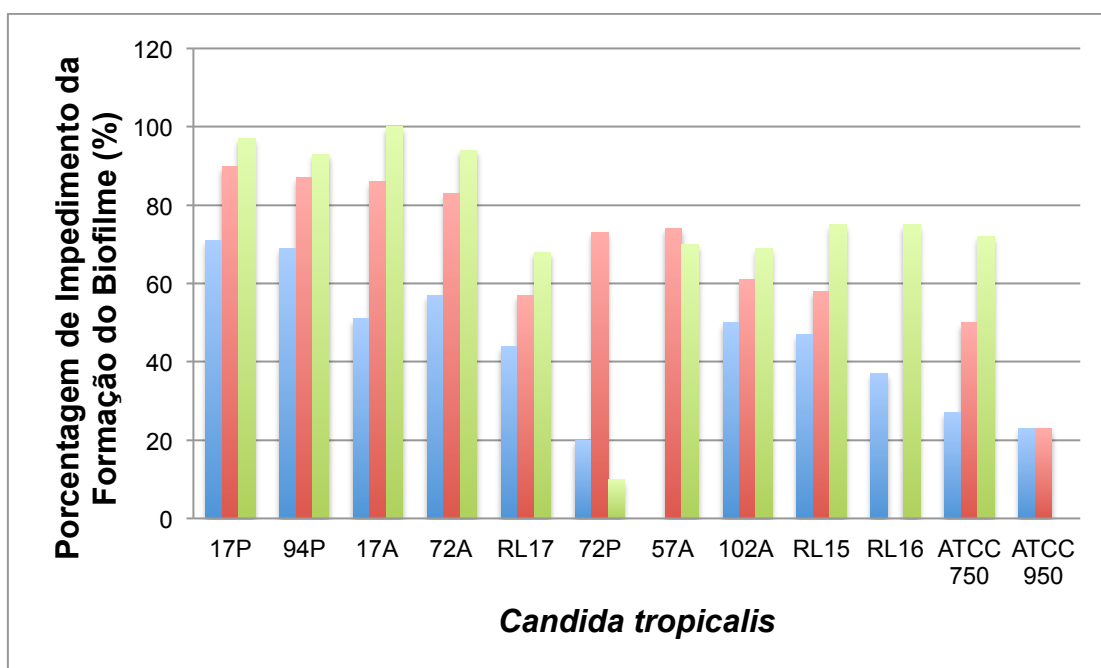


Figura 32. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PHB.MeS.0125** (barras azuis), **PHB.MeS.0250** (barras vermelhas); e **PHB.MeS.0500** (barras verdes).

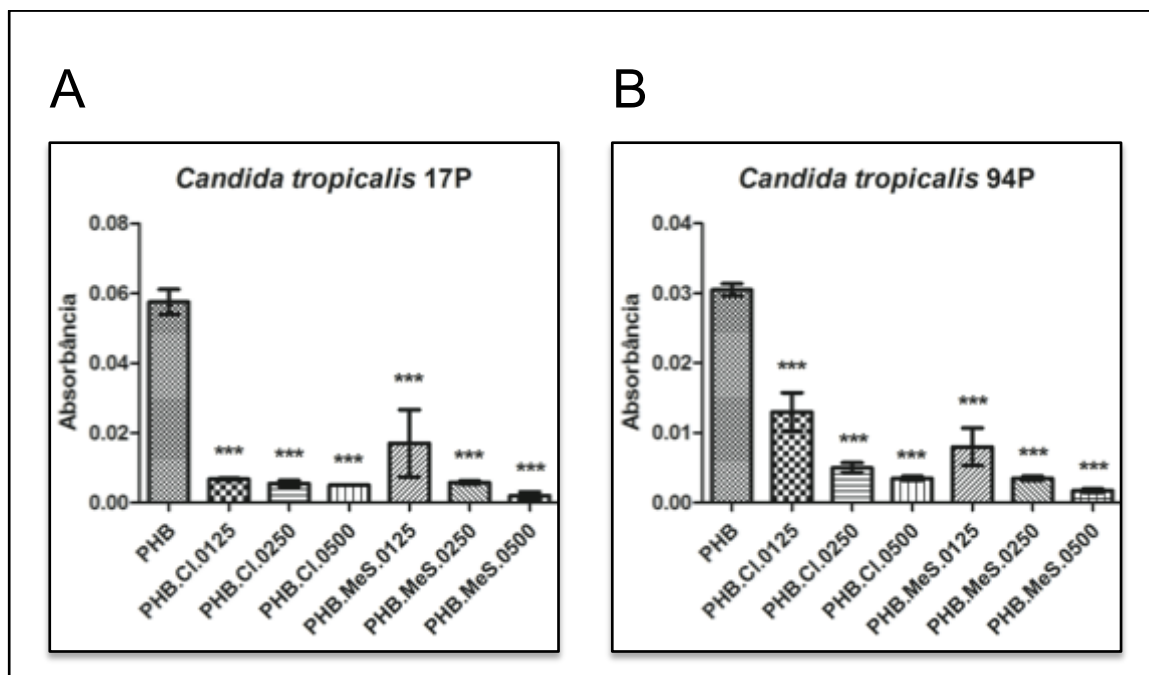


Figura 33. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 94P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$.

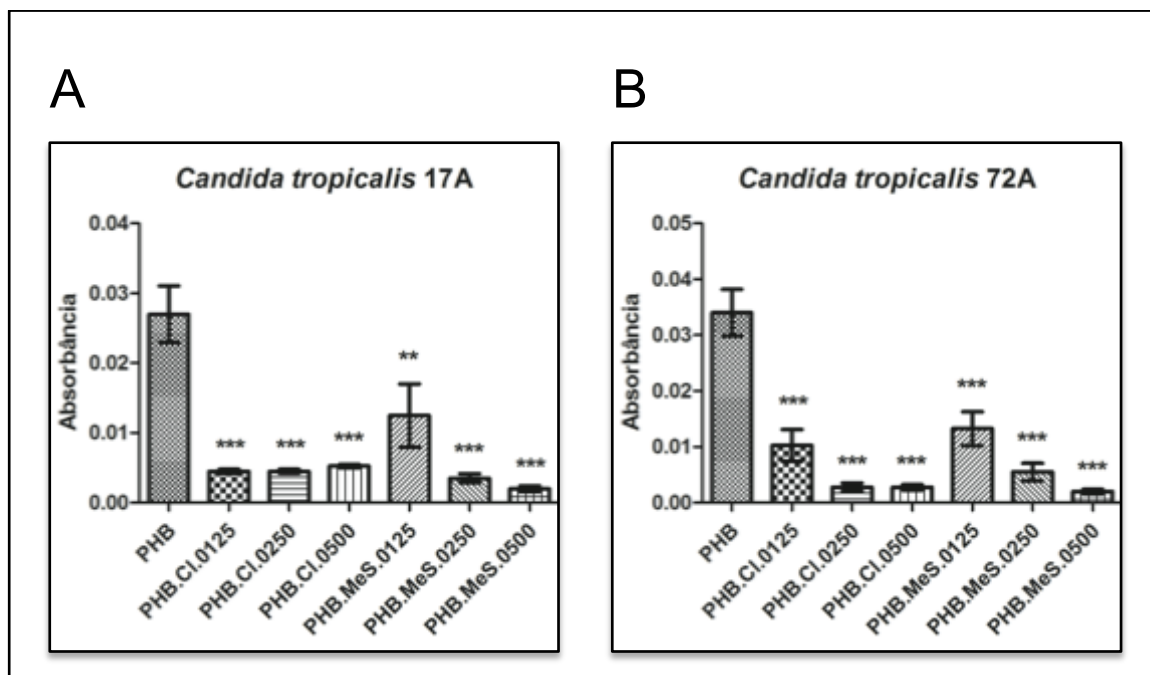


Figura 34. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** ** $P<0,01$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$.

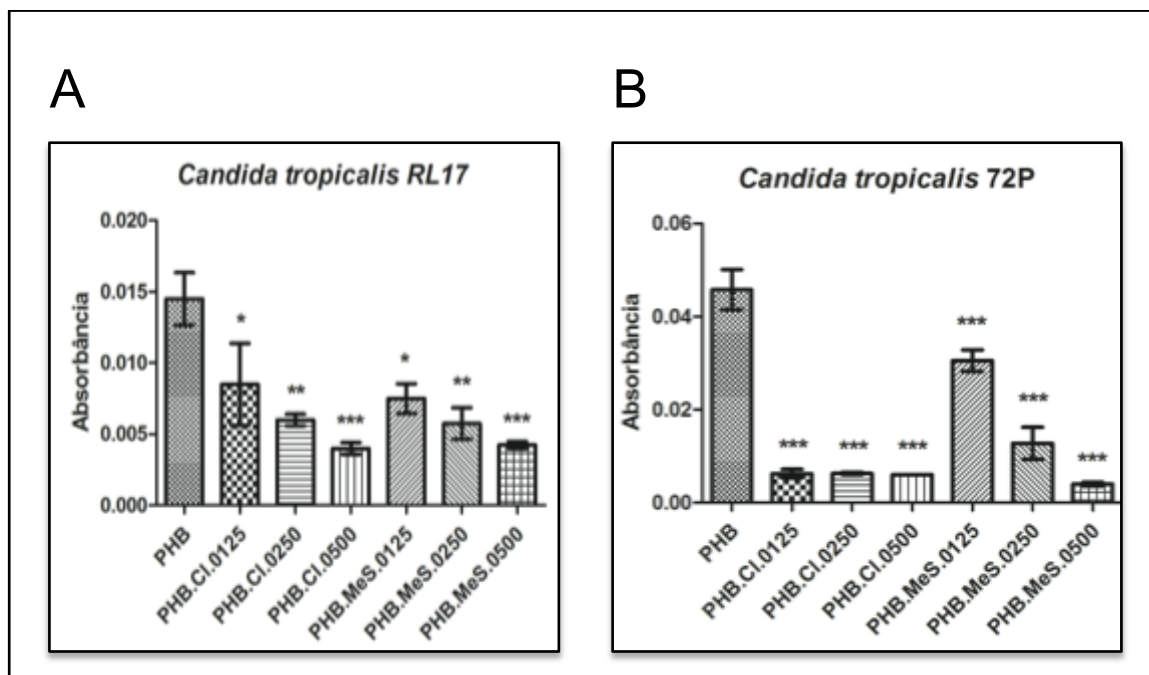


Figura 35. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi 0,0007, considerado significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** * $P < 0,05$, **PHB vs PHB.CI.0250** ** $P < 0,01$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** * $P < 0,05$, **PHB vs PHB.MeS.0250** ** $P < 0,01$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$.

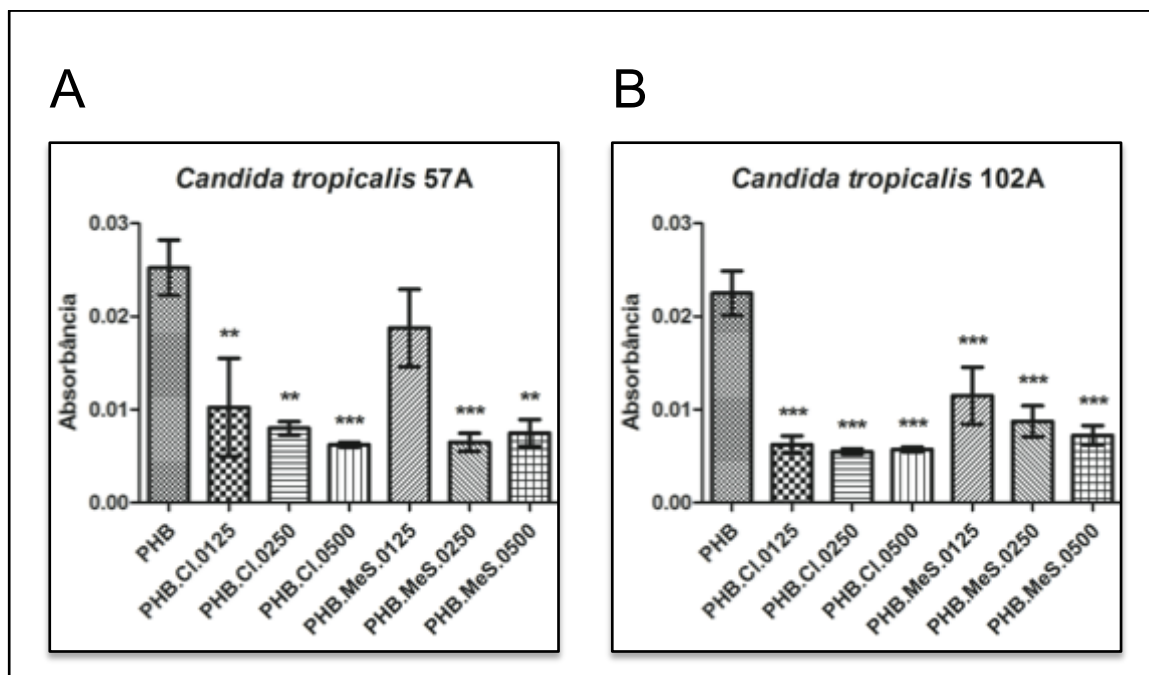


Figura 36. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 57A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi 0,0005 considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0125** ** $P < 0,01$, **PHB** vs **PHB.CI.0250** ** $P < 0,01$, **PHB** vs **PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0500** ** $P < 0,01$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 102A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB** vs **PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB** vs **PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB** vs **PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$.

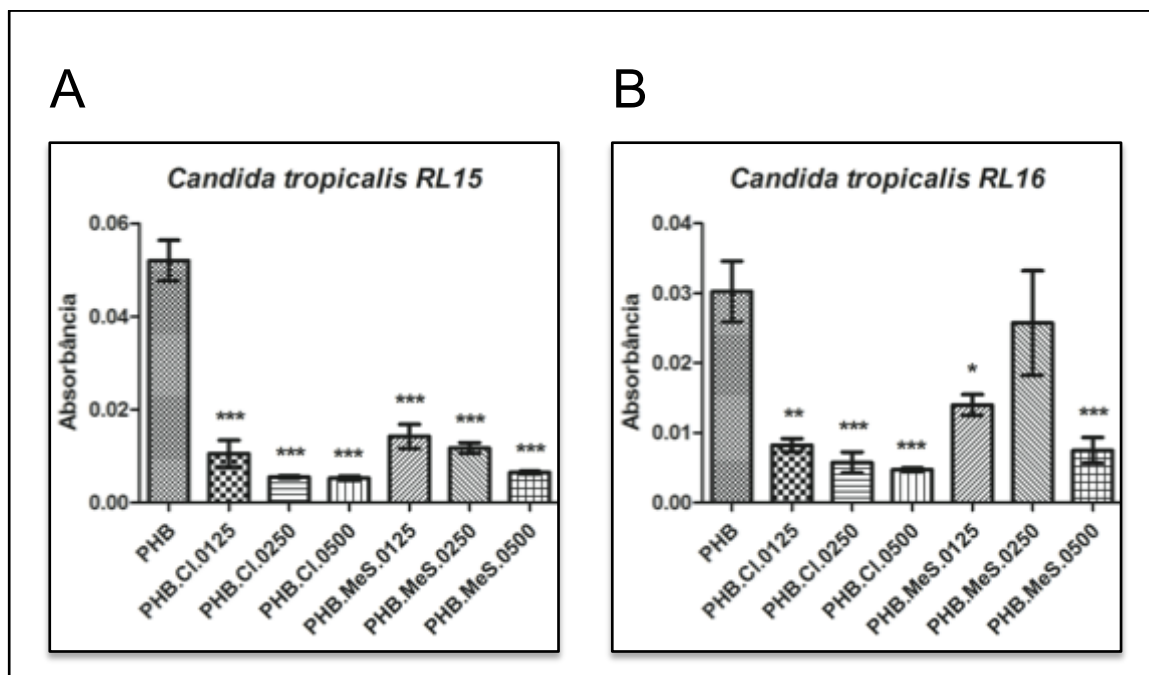


Figura 37. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL15. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0125** *** $P<0,001$, **PHB** vs **PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB** vs **PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB** vs **PHB.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PHB** vs **PHB.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL16. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB** vs **PHB.CI.0125** ** $P<0,01$, **PHB** vs **PHB.CI.0250** *** $P<0,001$, **PHB** vs **PHB.CI.0500** *** $P<0,001$, **PHB** vs **PHB.MeS.0125** * $P<0,05$ e **PHB** vs **PHB.MeS.0500** *** $P<0,001$.

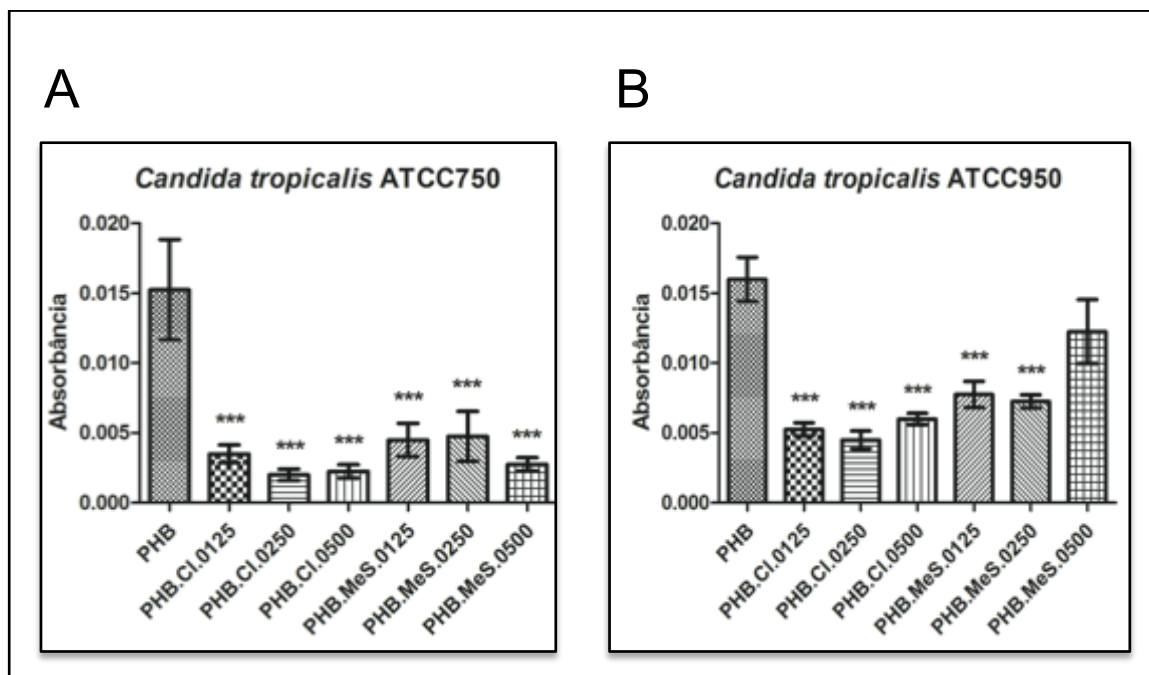


Figura 38. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC750. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi 0,0001, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0500** *** $P < 0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PHB**, **PHB.CI.0125**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0125**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC950. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PHB.SI**. O valor de P foi $< 0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PHB.SI**. **PHB vs PHB.CI.0125** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0250** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.CI.0500** *** $P < 0,001$, **PHB vs PHB.MeS.0125** *** $P < 0,001$ e **PHB vs PHB.MeS.0250** *** $P < 0,001$.

5.2.4 MEV – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de PHB

As amostras de **PHB**, **PHB.CI.0500** e **PHB.MeS.0500** foram submetidas às condições de crescimento de biofilme fúngico com o isolado clínico *C. tropicalis* 72A. As amostras de **PHB.CI.0500** e **PHB.MeS.0500** foram escolhidas para serem utilizadas nas análises de MEV, por impedirem mais a formação do biofilme quando comparado com as amostras de **PHB.SI** com menores concentrações dos SI. Após

72 hs, as amostras foram analisadas por MEV para visualizar se ocorreu o impedimento da formação do biofilme nos filmes de PHB.

As micrografias de MEV do **PHB** (Figuras 39A, 75 (Anexo I) e 76A (Anexo I)), após 72 hs de incubação com o isolado clínico *C. tropicalis* 72A, mostram a formação do biofilme com matriz polimérica extracelular aderidos à superfície do filme de **PHB**. No caso das amostras de **PHB.CI.0500** (Figuras 39B e 76B (Anexo I)) e **PHB.MeS.0500** (Figuras 39C e 76C (Anexo I)), as micrografias mostraram que houve impedimento da formação do biofilme da *C. tropicalis* 72A quando comparado com o **PHB**, porém observa-se, a presença de algumas células leveduriformes nas superfícies destes biomateriais.

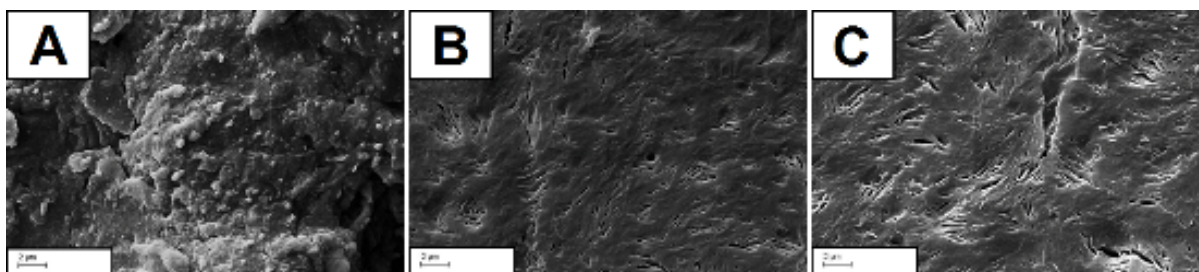


Figura 39. Micrografias de MEV do (A) **PHB** (biofilme formado), (B) **PHB.CI.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme) e (C) **PHB.MeS.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 2 µm.

5.2.5 Análises Biológicas de filmes de PHB com SI

5.2.5.1 Adesão Celular – Análise Morfológica

As células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) foram utilizadas como um modelo de linhagem celular para os testes *in vitro* de biocompatibilidade dos materiais baseados em PHB com SI (Raucci et al., 2012). Ambas as análises qualitativa e quantitativa foram realizadas com o objetivo principal de obter informações sobre o processo de adesão celular (Figuras 40 e 41).

Na análise de adesão celular das células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) realizada por microscopia confocal foi verificada uma mudança na morfologia quando aplicado o **PHB.CI.0250** (Figura 40). As CTMh semeadas sobre o **PHB** (sem SI) apresentaram uma estrutura fina e alongada típica de células de fibroblastos. Enquanto isso, o biomaterial **PHB.CI.0250** mostrou células que aparecem pequenas e crescem de forma aleatória sobre a superfície do biomaterial.

Esta observação foi suportada pela análise quantitativa, onde a adesão celular é reportada como porcentagem do Controle (Figura 41). A incorporação do SI na matriz do PHB provocou uma pequena diminuição na adesão das CTMh.

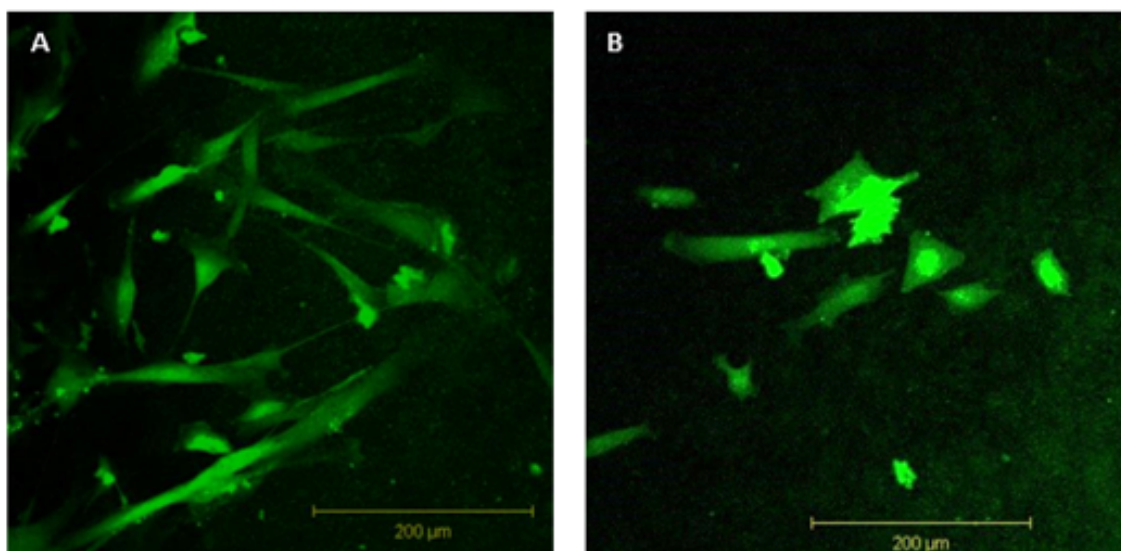


Figura 40. Micrografias de Microscopia Confocal do (A) PHB e (B) PHB.CI.0250 (barra de escala = 200 µm), após crescimento celular.

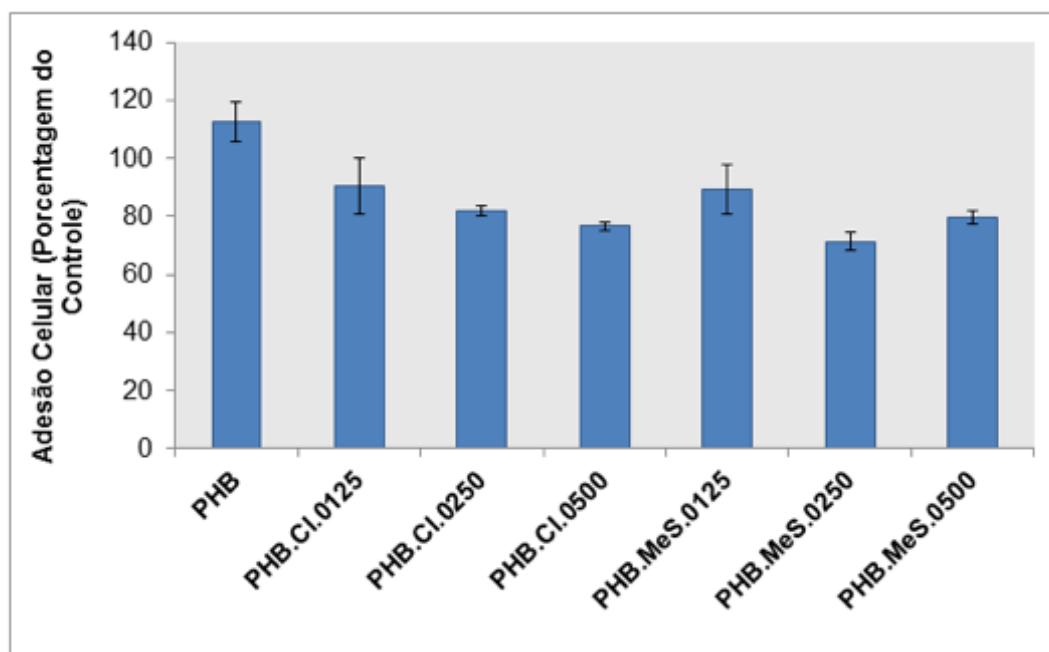


Figura 41. Adesão celular de CTMh, após 48 hs de incubação (Ensaio do Azul de Alamar), sobre os filmes de PHB. Como controle da viabilidade (100%) das células foi utilizada as CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos.

5.2.5.2 Teste de Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular forneceu informações sobre a proliferação celular das CTMh após 7, 10, 14 e 21 dias de incubação (Figura 42). No teste de viabilidade celular foi verificado que a incorporação dos SI causou uma menor proliferação celular na superfície dos biomateriais (Figura 42), sendo a consequência da menor adesão celular nos primeiros 2 dias (Figura 41). Mesmo assim, a proliferação das células CTMh foi compensada com o passar do tempo, mostrando somente pequenas diferenças nos valores de proliferação celular após 21 dias nos biomateriais de **PHB.SI** em comparação com o **PHB**.

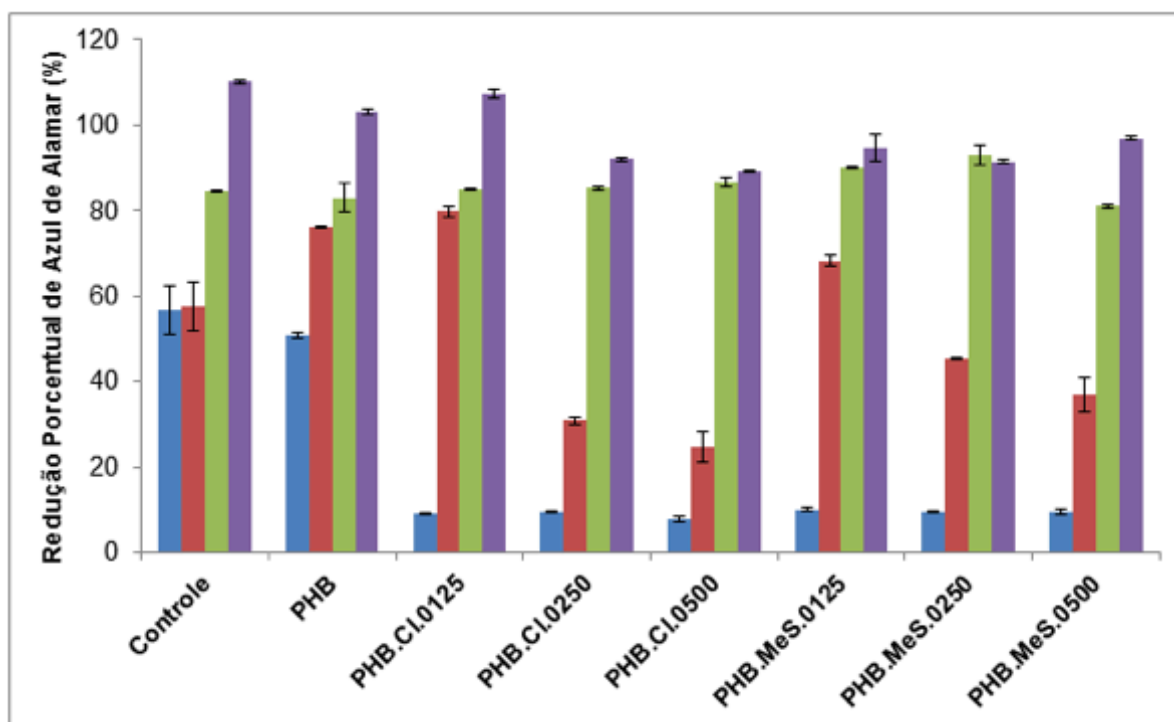


Figura 42. Proliferação celular de CTMh em 7 (barras azuis), 10 (barras vermelhas), 14 (barras verdes) e 21 dias (barras roxas) de tempo de cultivo (Ensaio do Azul de Alamar) sobre os filmes de PHB.

5.2.6 Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PHB

Na avaliação histopatológica de pele da orelha suína incubada com os filmes de PHB (**PHB**, **PHB.CI.0250**, **PHB.CI.0500**, **PHB.MeS.0250** e **PHB.MeS.0500**) não foram observadas alterações celulares na epiderme (como hiperplasia, espessamento e paraqueratose), quando comparado com a amostra controle com tampão PBS pH 7,0 (Figura 43: 1A e 2A), mostrando desta forma que

os biomateriais de PHB não causam lesões microscópicas agudas na pele da orelha suína (Figura 43).

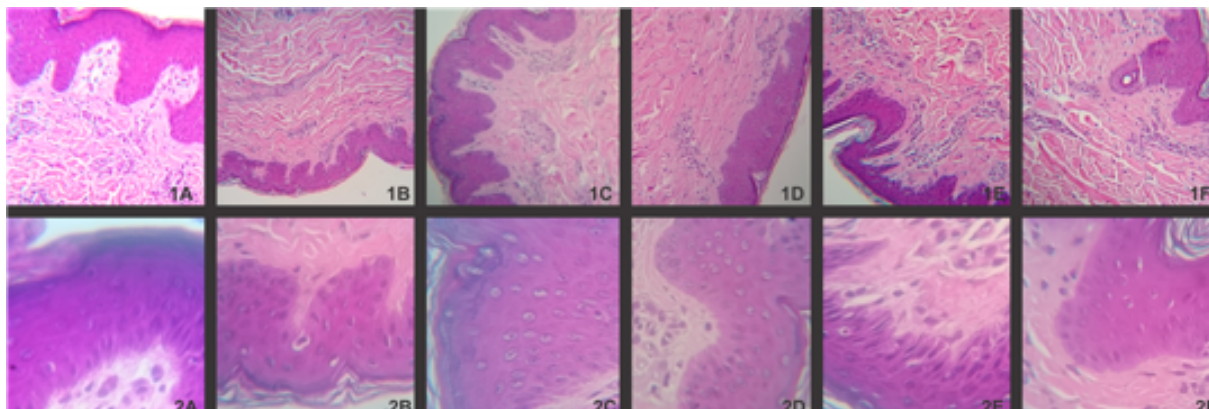


Figura 43. Avaliação histopatológica de pele de orelha de suíno em contato com filmes de PHB com SI ($C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$) e tratada com solução tampão PBS pH 7,0 (controle negativo em aumentos de 100 e 400 vezes de magnitude): Aumento de 100 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (1A) tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0; (1B) **PHB**; (1C) **PHB.CI.0250**; (1D) **PHB.CI.0500**; (1E) **PHB.MeS.0250**; e (1F) **PHB.MeS.0500**. Aumento de 400 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (2A) tampão PBS pH 7,0; (2B) **PHB**; (2C) **PHB.CI.0250**; (2D) **PHB.CI.0500**; (2E) **PHB.MeS.0250**; e (2F) **PHB.MeS.0500**.

5.2.7 Técnicas de Caracterização dos Polímeros PHB

5.2.7.1 MEV – Morfologia da Superfície dos Filmes de PHB

As micrografias de MEV dos filmes do **PHB** (sem os SI), **PHB.CI.0500** e **PHB.MeS.0500** são apresentadas na Figura 44. A incorporação dos SI $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$ não resultou em mudanças expressivas na morfologia da superfície destes biomateriais.

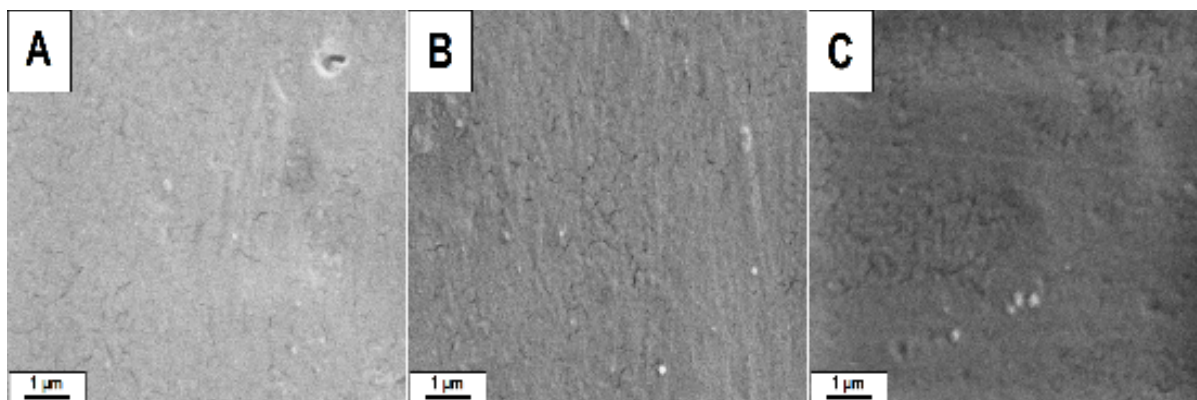


Figura 44. Micrografias de MEV do (A) **PHB**; (B) **PHB.CI.0500**; e (C) **PHB.MeS.0500** (barra de escala = 1 μm).

5.2.7.2 Microscopia de Força Atômica

A morfologia da superfície do **PHB** (sem os SI) foi investigada por MFA. O resultado está apresentado na Figura 45, inclusive o valor da rugosidade. O **PHB** mostrou uma superfície relativamente irregular com rugosidade de 21,9 nm. Isto está de acordo com a morfologia observada na micrografia de MEV da Figura 44A.

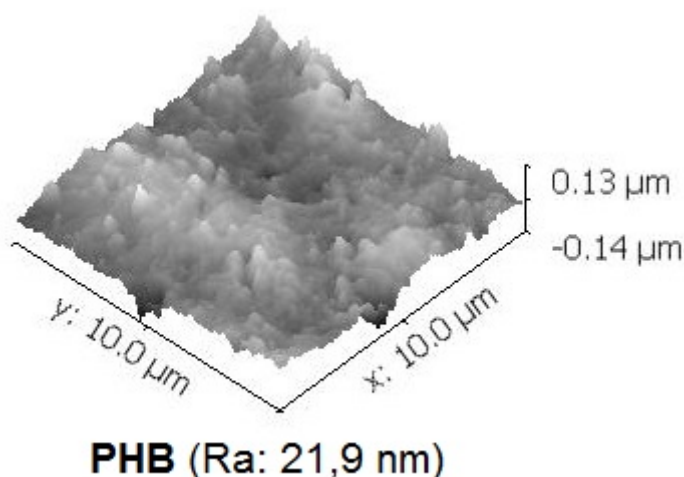


Figura 45. Imagem de MFA do **PHB** (Ra = Rugosidade média aritmética em nm).

5.2.7.3 Análises de Difração de raios X

A cristalinidade dos biomateriais de PHB foi estudada através da análise de DRX. Os difratogramas dos biomateriais com o **C₁₆MImCl** e o **C₁₆MImMeS** estão representados nas Figuras 46 e 47, respectivamente. Independente do SI ou do teor do SI (0,125; 0,250 ou 0,500 %m/m) no PHB, o tipo de cristalinidade não foi afetado nestes biomateriais, mostrando em todos os casos os planos cristalinos típicos do polímero de PHB (Medvecky, 2012).

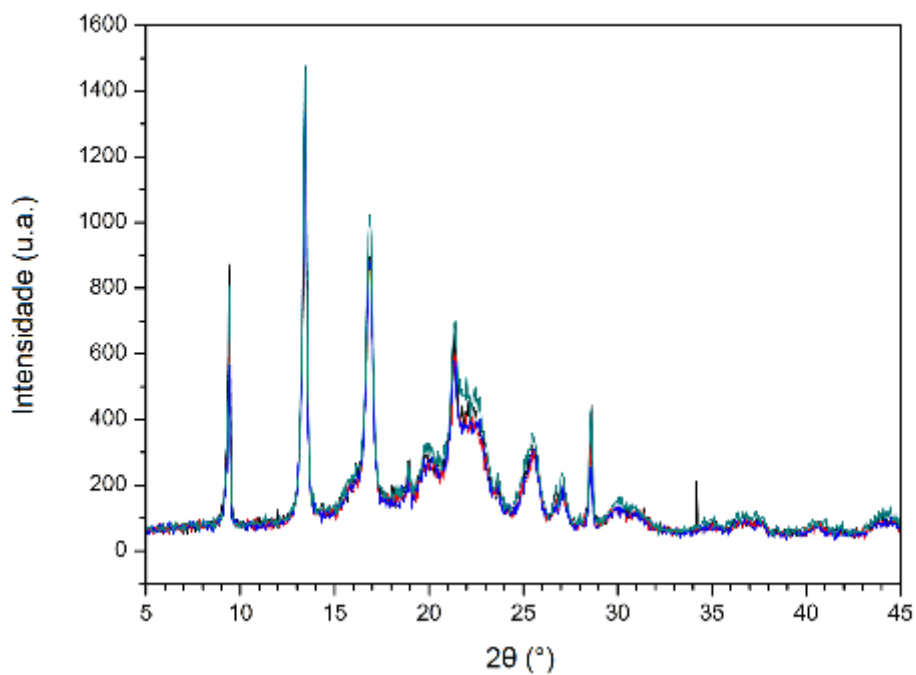


Figura 46. Difratogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 5-45°: **PHB** (linha preta); **PHB.CI.0125** (linha vermelha); **PHB.CI.0250** (linha azul) e **PHB.CI.0500** (linha verde).

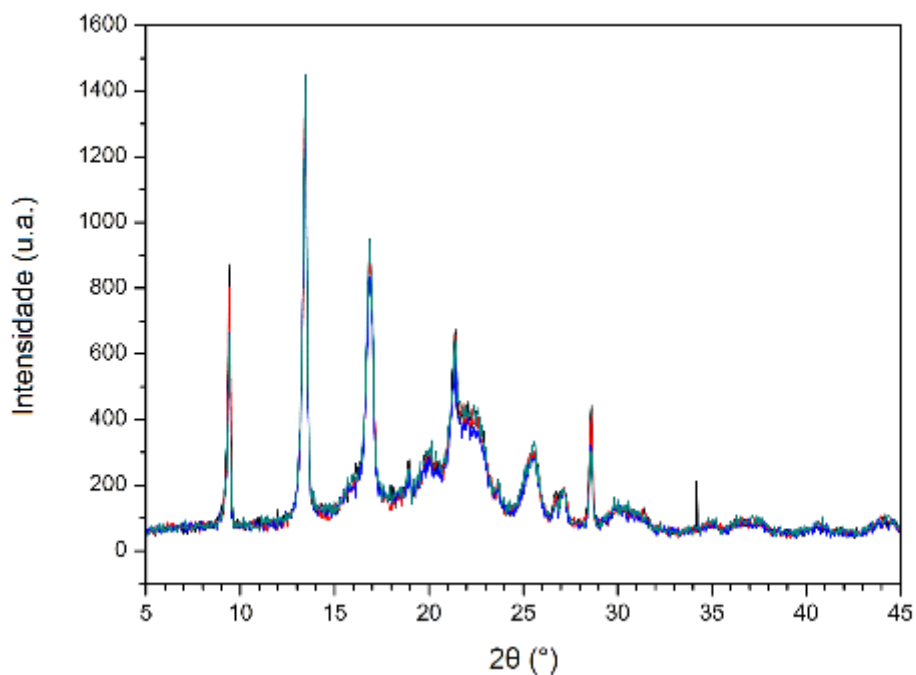


Figura 47. Difratogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 5-45°: **PHB** (linha preta); **PHB.MeS.0125** (linha vermelha); **PHB.MeS.0250** (linha azul) e **PHB.MeS.0500** (linha verde).

5.2.7.4 Propriedades térmicas dos filmes de PHB (Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Análises Termogravimétricas)

As análises de DSC e ATG foram utilizadas para verificar as propriedades térmicas dos biomateriais de PHB com SI. Os resultados referentes ao ponto de fusão, temperatura de cristalização, entalpia de fusão, entalpia de cristalização, cristalinidade, degradação térmica e massa residual estão resumidos na Tabela 13. As curvas de DSC e ATG estão representadas na Figura 91 do Anexo III e na Figura 94 do Anexo IV, respectivamente.

Em geral, as propriedades térmicas dos biomateriais de PHB com SI tiveram alterações sutis, não sofrendo influência pronunciada da incorporação dos SI nos teores de 0,125; 0,250 e 0,500 %m/m. O ponto de fusão (**PHB**: 156,7 e 166,9 °C) e a temperatura de cristalização (**PHB**: 110,2 °C) permaneceram com diferenças de 1,7 °C (T_{m1} : 156,7-157,8 °C; T_{m2} : 166,9-167,8 °C; T_c : 108,5-110,9 °C) dos valores originais do **PHB**. Com exceção do **PHB.MeS.0250**, o qual mostrou uma diminuição na cristalinidade de 10%, os valores de cristalinidade não seguiram uma tendência e não variaram muito em comparação com o valor do **PHB**. Também a resistência do PHB à degradação térmica não foi afetada pela incorporação dos SI, mostrando em geral uma resistência de alguns graus inferiores ao valor do **PHB**, sendo que isto não limitaria a aplicabilidade do PHB.

Tabela 13. Propriedades térmicas dos filmes de PHB.

<i>Amostra</i>	T_{f1} [°C] ^a	T_{f2} [°C] ^b	T_c [°C] ^c	ΔH_f [J/g] ^d	ΔH_c [J/g] ^e	X_c [%] ^f	$T_{5\%}$ [°C] ^g	$T_{10\%}$ [°C] ^h	$T_{50\%}$ [°C] ⁱ	<i>Resíduo</i> [%] ^j
PHB	156,7	166,9	110,2	55,6	74,0	38,1	230,1	275,3	307,8	0,8
PHB.CI.0125	156,7	166,9	109,5	55,5	70,8	38,1	236,2	275,2	301,7	1,6
PHB.MeS.0125	157,0	167,3	108,5	52,8	68,2	36,2	228,2	269,5	298,9	1,7
PHB.CI.0250	156,9	166,9	110,8	56,8	73,6	39,0	231,1	275,2	303,9	2,6
PHB.MeS.0250	157,8	167,8	109,4	41,0	65,8	28,1	228,6	269,7	299,1	0,8
PHB.CI.0500	157,2	167,0	110,9	53,3	74,2	36,7	231,8	271,1	298,0	2,0
PHB.MeS.0500	156,9	166,9	110,5	53,5	76,7	36,8	235,1	271,4	297,4	1,0

^a Primeira temperatura de fusão determinada através de DSC. ^b Segunda temperatura de fusão determinada através de DSC. ^c Temperatura de cristalização determinada através de DSC. ^d Entalpia de fusão determinada através de DSC. ^e Entalpia de cristalização determinada através de DSC. ^f Cristalinidade determinada através de DSC, utilizando a Equação 1. ΔH_f^0 é a entalpia de fusão de PHB 100% cristalino, sendo 146 J/g (Barham et al., 1984). ^g Temperatura de decomposição de 5 %m/m como determinada através de ATG. ^h Temperatura de decomposição de 10 %m/m como determinada através de ATG. ⁱ Temperatura de decomposição de 50 %m/m como determinada através de ATG. ^j Peso residual a 550 °C como determinado através de ATG.

5.2.7.5 Análises Dinâmico-Mecânicas

A Tabela 14 resume os valores e a Figura 98 do Anexo V representa as curvas de módulo de armazenamento, módulo de perda, transição vítrea e rigidez obtidos pela análise de ADM dos filmes de PHB com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**. Todos os biomateriais de PHB com SI apresentaram módulo de armazenamento inferior quando comparado com o **PHB**. Incorporando o mesmo teor dos SI, os biomateriais de **PHB.Cl** mostraram melhor desempenho do que os de **PHB.MeS**. Ambos os módulos de armazenamento e de perda não seguiram mudanças sistemáticas com o aumento do teor dos SI. Em contraste com os módulos de armazenamento, alguns dos biomateriais de **PHB.SI** demonstraram melhores módulos de perda do que o **PHB**. Também neste caso, os biomateriais de **PHB.Cl** tiveram melhor desempenho do que os de **PHB.MeS** e o melhor módulo de perda foi alcançado com o **PHB.Cl.0500**. A rigidez foi inferior para a maioria dos biomateriais de **PHB.SI**, com exceção do **PHB.Cl.0500**, o qual mostrou um aumento significativo em comparação com o **PHB**.

Tabela 14. Propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes de PHB.

<i>Amostra</i>	<i>G' -25</i> [GPa] ^a	<i>G' 0</i> [GPa] ^b	<i>G'' -25</i> [GPa] ^c	<i>G'' 0</i> [GPa] ^d	<i>T_v</i> [°C] ^e	<i>S -25</i> [kN/m] ^f	<i>S 0</i> [kN/m] ^g	<i>S 90</i> [kN/m] ^h
PHB	3,16	2,37	0,17	0,15	0,06	301,06	223,69	56,01
PHB.Cl.0125	2,70	2,13	0,25	0,20	0,54	221,58	175,38	43,94
PHB.MeS.0125	2,24	1,90	0,17	0,16	8,18	203,13	172,27	42,35
PHB.Cl.0250	2,73	2,06	0,14	0,14	9,43	178,46	134,86	29,56
PHB.MeS.0250	2,00	1,59	0,14	0,13	5,80	109,09	87,01	23,09
PHB.Cl.0500	2,50	1,99	0,28	0,27	8,20	414,98	330,63	97,00
PHB.MeS.0500	2,37	1,87	0,26	0,22	0,67	231,53	182,89	50,51

^a Módulo de armazenamento a -25 °C. ^b Módulo de armazenamento a 0 °C. ^c Módulo de perda a -25 °C. ^d Módulo de perda a 0 °C. ^e Temperatura de transição vítrea determinada através de ADM. ^f Rigidez a -25 °C. ^g Rigidez a 0 °C. ^h Rigidez a 90 °C.

5.2.7.6 Ângulo de Contato da Água

As medidas de ângulo de contato da água foram realizadas para entender o efeito dos SI na molhabilidade da superfície dos filmes de PHB. As análises de ângulo de contato foram determinadas para os filmes de PHB contendo 0-0,5 %m/m do **C₁₆MImCl** ou do **C₁₆MImMeS** (Figura 48). Não foi observada nenhuma tendência

na medida do ângulo de contato da água com os teores de SI testados. Além disso, o teor de 0,250 %m/m dos SI não afetaram a hidrofilicidade/hidrofobicidade dos filmes de PHB. Interessante foi verificar que os teores de 0,125 e 0,500 %m/m do **C₁₆MImCl** tornaram os filmes de PHB mais hidrofóbicos e o **C₁₆MImMeS** tornou os filmes de PHB mais hidrofílicos. Embora estes SI tenham causado um efeito oposto na hidrofilicidade/hidrofobicidade, isto ocorreu na mesma extensão para os teores dos SI definidos.

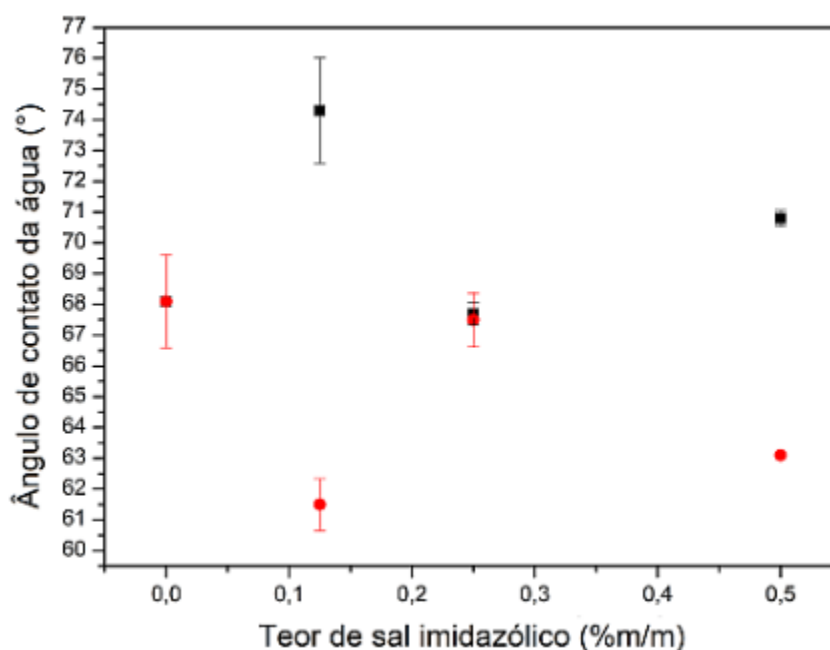


Figura 48. Ângulos de contato de água para filmes de PHB: **PHB.Cl** (quadro preto) e **PHB.MeS** (círculo vermelho).

5.3 Filmes de PLA com Sais Imidazólicos

5.3.1 Preparação de filmes de PLA com Sais Imidazólicos

Os filmes de PLA foram preparados por evaporação de clorofórmio (Método de Solvent Casting), incorporando diferentes teores dos SI (0,000; 0,125; 0,250; 0,500; 2,000; 5,000 e 10,000 %m/m) cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImCl**) e metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (**C₁₆MImMeS**). Desta forma, obtendo-se filmes de PLA com SI.

5.3.2 Ensaio Antibiofilme

O Ensaio Antibiofilme foi realizado para verificar se os biomateriais de PLA com SI apresentavam efeito antibiofilme em comparação com o **PLA** (Tabelas

15-16 e Figuras 49-50). Neste ensaio foi verificado que em comparação com o **PLA** (sem os SI), todos os biomateriais testados (**PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500**) apresentaram atividade antibiofilme, frente a isolados clínicos formadores de biofilme de *C. tropicalis* 72A, *C. parapsilosis* RL11 e RL20 e *C. albicans* CA04.

Tabela 15. Resultados dos Ensaio Antibiofilme realizados no **PLA e PLA.CI** frente aos isolados de *Candida* spp.

Biomaterial	Levedura	Diluição	Média*	UFC/cm²	log
PLA	<i>Candida tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	20,25	5,0x10 ⁵	5,70
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	17,25	4,3x10 ⁵	5,63
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	11	2,7x10 ⁵	5,43
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	19,75	4,9x10 ⁵	5,69
PLA.CI.0125	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0	0	0
PLA.CI.0250	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0,5	1,25x10 ⁴	4,09
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	7,75	1,9x10 ⁵	5,28
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	0,25	6,25x10 ³	3,79
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	0,75	1,8x10 ⁴	4,27
PLA.CI.0500	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1	2,5x10 ⁴	4,3

* Média: UFC/mL- Soma das colônias, em quadruplicata, e logo transformadas para log.

Tabela 16. Resultado do Ensaio Antibiofilme realizado no **PLA e PLA.MeS** frente aos isolados de *Candida* spp.

Biomaterial	Levedura	Diluição	Média*	UFC/cm ²	log
PLA	<i>Candida tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	20,25	5,0x10 ⁵	5,70
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	17,25	4,3x10 ⁵	5,63
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	11	2,7x10 ⁵	5,43
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	19,75	4,9x10 ⁵	5,69
PLA.MeS.0125	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0,5	1,25x10 ⁴	4,09
PLA.MeS.0250	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	1,75	4,3x10 ⁴	4,64
	<i>C. parapsilosis</i> RL11	10 ⁻¹	1,25	3,1x10 ⁴	4,49
	<i>C. parapsilosis</i> RL20	10 ⁻¹	0,25	6,25x10 ³	3,79
	<i>C. albicans</i> CA04	10 ⁻¹	4,25	1,0x10 ⁵	5,02
PLA.MeS.0500	<i>C. tropicalis</i> 72A	10 ⁻¹	0,25	1,25x10 ⁴	4,09

* Média: UFC/mL- Soma das colônias, em quadruplicata, e logo transformadas para log.

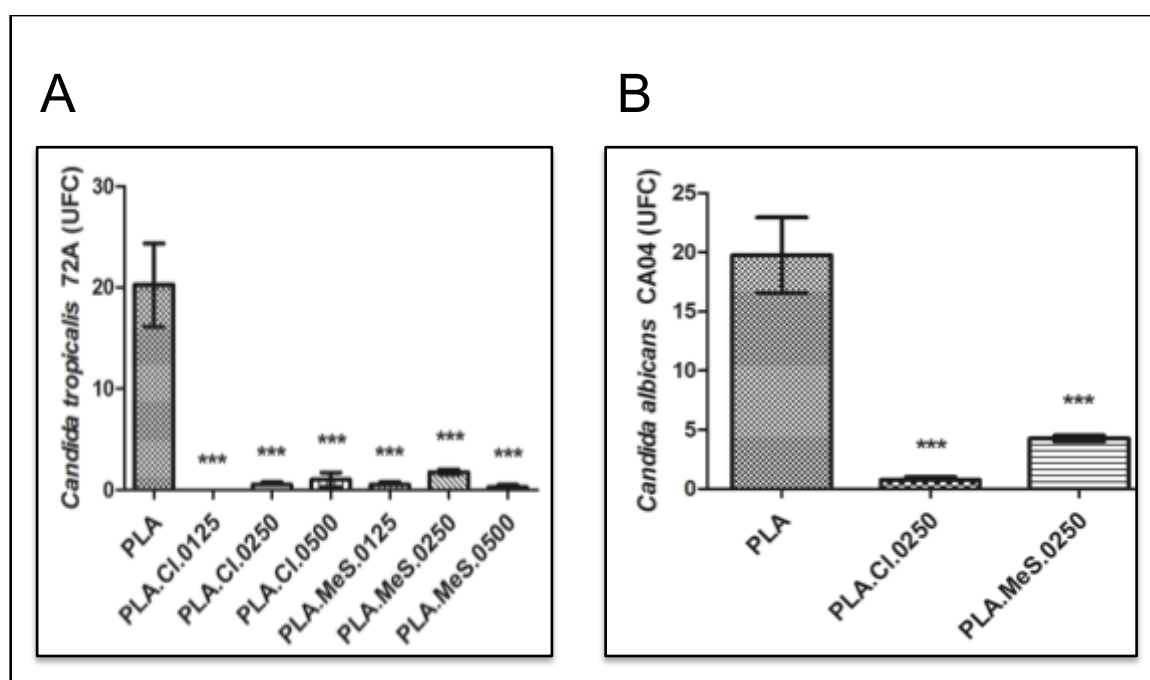


Figura 49. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10⁻¹, dos biomateriais de **PLA, PLA.CI.0125, PLA.CI.0250, PLA.CI.0500, PLA.MeS.0125, PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio ± desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi <0,0001, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** P<0,05,

PLA vs PLA.CI.0250 *** $P < 0,05$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P < 0,05$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P < 0,05$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,05$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P < 0,05$. **(B)** Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0250** e **PLA.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida albicans* CA04. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi 0,0001 considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,05$ e **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,05$.

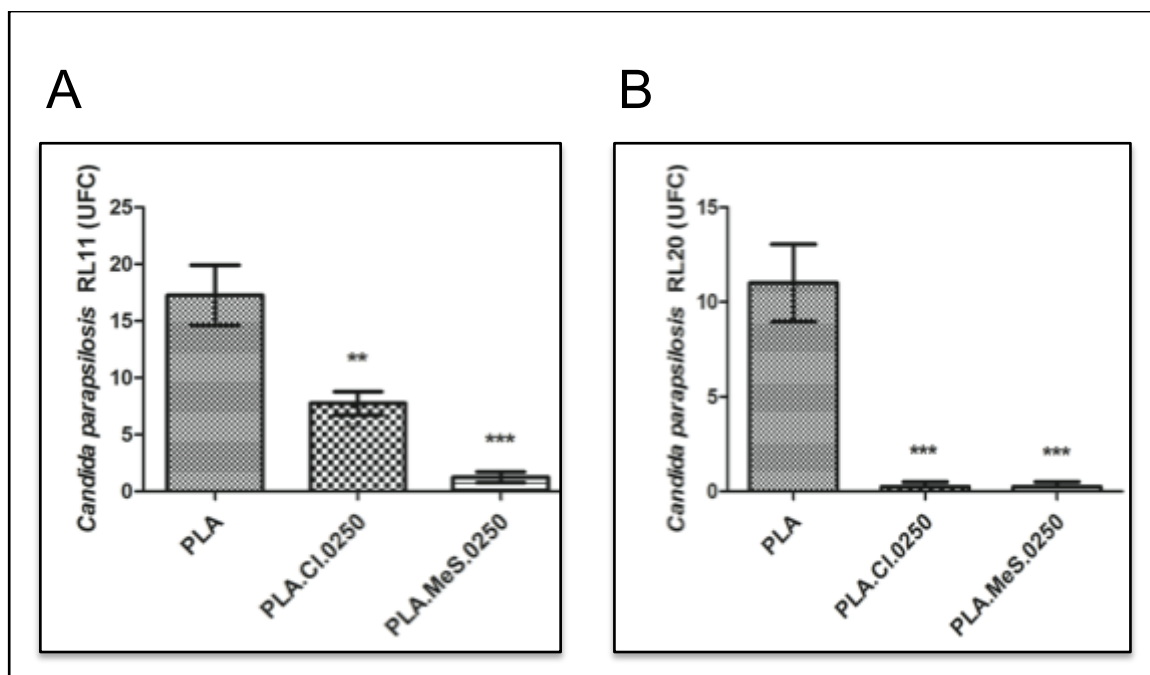


Figura 50. (A) Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0250** e **PLA.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida parapsilosis* RL11. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi 0,0003 considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0250** ** $P < 0,05$ e **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,05$. **(B)** Gráfico de coluna vertical da atividade antibiofilme obtida pelo Ensaio Antibiofilme na diluição 10^{-1} , dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0250** e **PLA.MeS.0250** frente ao isolado de *Candida parapsilosis* RL20. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 12 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi 0,0002 considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P < 0,05$ e **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P < 0,05$.

5.3.3 Ensaio Menor Concentração Antibiofilme

O Ensaio Menor Concentração Antibiofilme foi realizado para verificar a porcentagem de impedimento da formação do biofilme dos filmes de PLA com **C₁₆MImCl** (Figura 51: **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250** e **PLA.CI.0500**) e com **C₁₆MImMeS** (Figura 52: **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500**), em

comparação com o **PLA** (PLA sem aditivos); frente a 12 isolados de *C. tropicalis*. Os resultados das análises estatísticas estão apresentados nas Figuras 53-58.

No geral, os biomateriais de PLA com os SI impediram a formação do biofilme frente aos isolados de *C. tropicalis* testados. Houve uma variação na porcentagem de impedimento da formação do biofilme dependendo do isolado de *C. tropicalis* testado. Os valores de porcentagem de impedimento de formação do biofilme variaram entre 32-92% e 0-94% para os biomateriais com **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, respectivamente.

As melhores porcentagens de impedimento da formação do biofilme foram obtidas utilizando o **PLA.CI.0125** com 86% de impedimento para a *C. tropicalis* 72P e 81% para a *C. tropicalis* RL17; com o **PLA.CI.0250** obteve-se 89% de impedimento para a *C. tropicalis* 72P e 87% para a *C. tropicalis* RL17 e RL15 e com **PLA.CI.0500** obteve-se 92% de impedimento para a *C. tropicalis* 72P e 87% para a *C. tropicalis* RL17 (Figura 51).

As melhores porcentagens de impedimento da formação do biofilme utilizando o **PLA.MeS.0125** foram de 77% para a *C. tropicalis* RL17 e 72% para a *C. tropicalis* 17A; com o **PLA.MeS.0250** obteve-se 85% de impedimento para a *C. tropicalis* 17A e 81% para a *C. tropicalis* RL16 e com o **PLA.MeS.0500** obteve-se 94% de impedimento para a *C. tropicalis* 72P e 92% para a *C. tropicalis* 17A (Figura 52).

Com o aumento do teor dos SI (**C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**) no PLA, foi possível verificar que ocorreu um aumento na porcentagem de impedimento da formação do biofilme (Figura 51 e 52). Considerando a eficácia dos biomateriais de PLA em relação com o teor do SI frente aos isolados de *C. tropicalis*, foi possível verificar que no teor de 0,125 %m/m o **C₁₆MImCl** foi mais eficaz no impedimento da formação do biofilme quando comparado com o **C₁₆MImMeS**. Nos teores de 0,250 e 0,500 %m/m o **C₁₆MImMeS** foi mais eficaz.

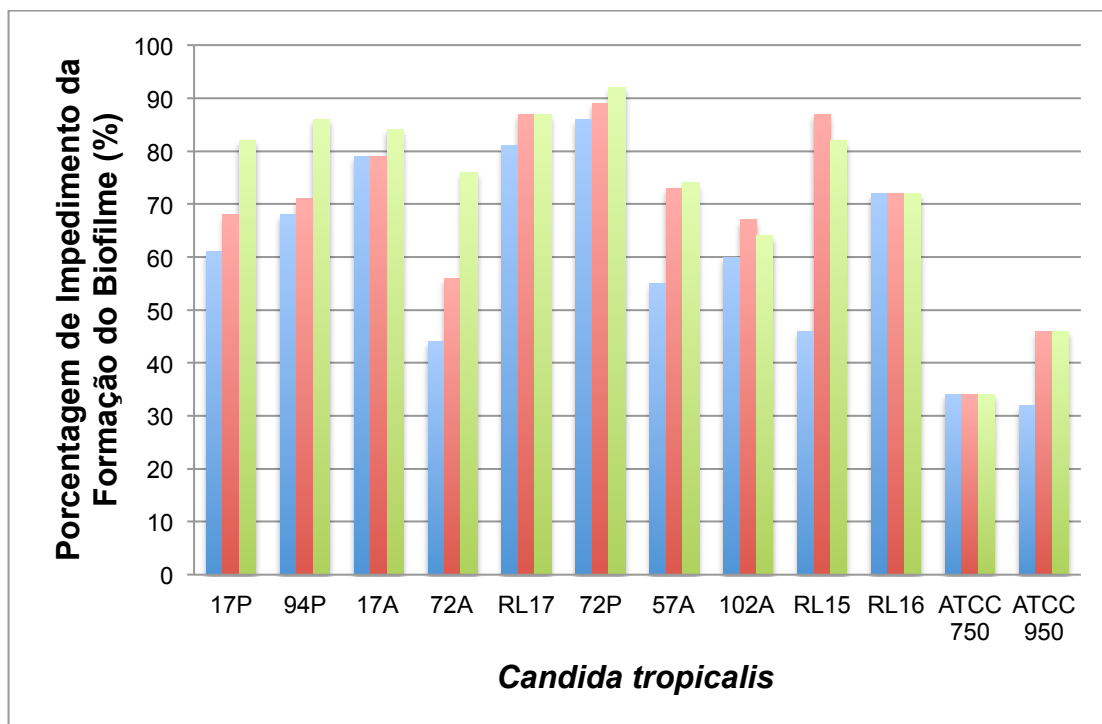


Figura 51. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PLA.CI.0125** (barras azuis); **PLA.CI.0250** (barras vermelhas); e **PLA.CI.0500** (barras verdes).

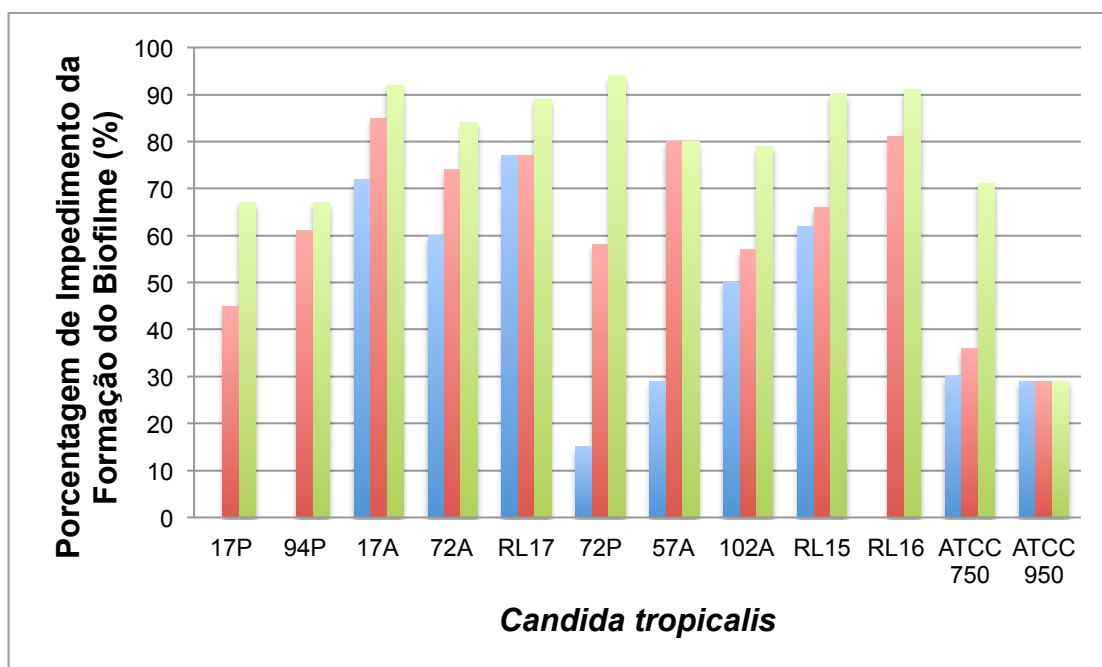


Figura 52. Ensaio *in vitro* Menor Concentração Antibiofilme (Placas de 96 poços): Porcentagem de impedimento da formação do biofilme para **PLA.MeS.0125** (barras azuis); **PLA.MeS.0250** (barras vermelhas); e **PLA.MeS.0500** (barras verdes).

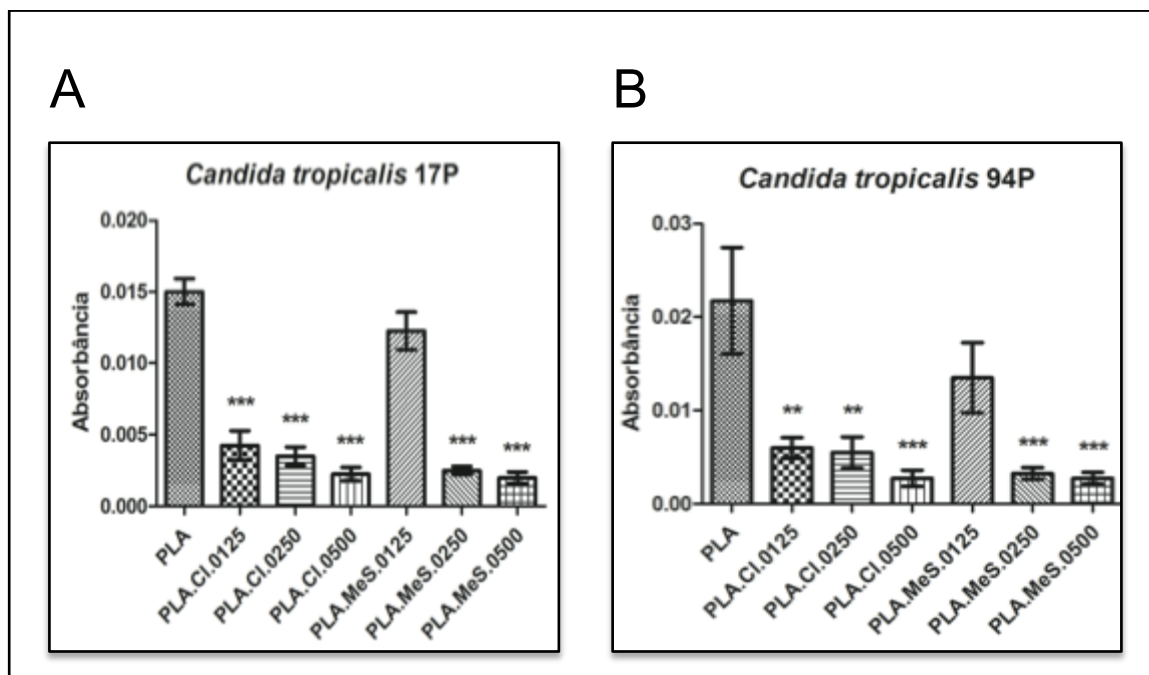


Figura 53. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 94P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi 0,0004 considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** ** $P<0,01$, **PLA vs PLA.CI.0250** ** $P<0,01$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$.

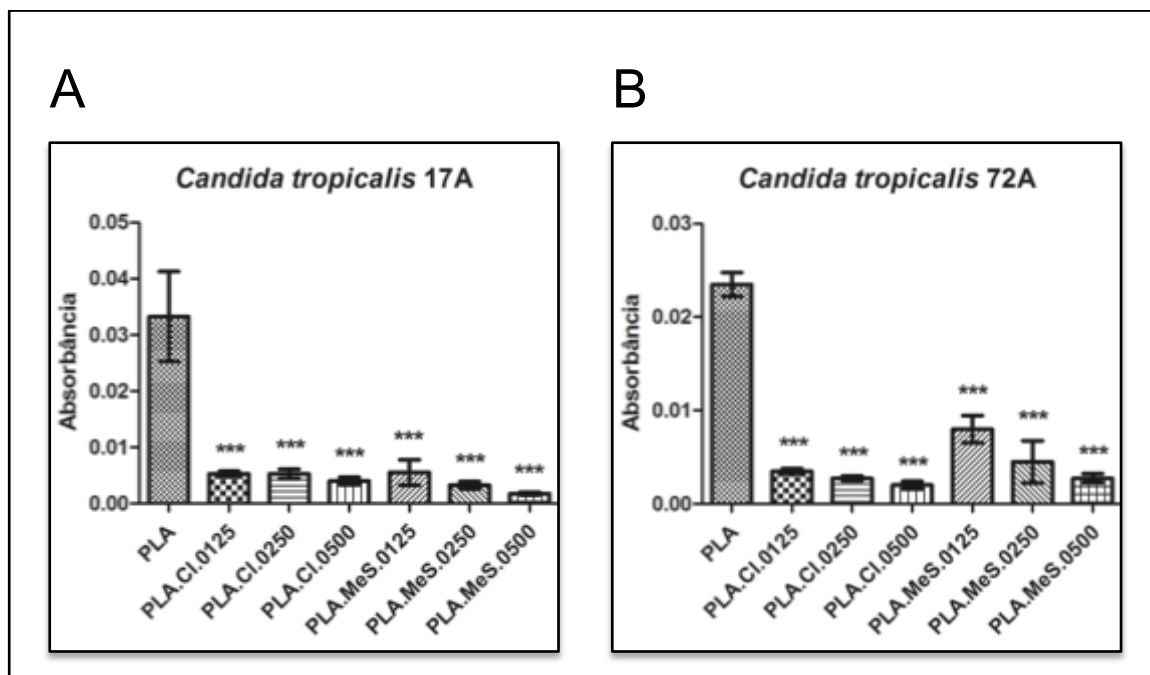


Figura 54. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 17A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$.

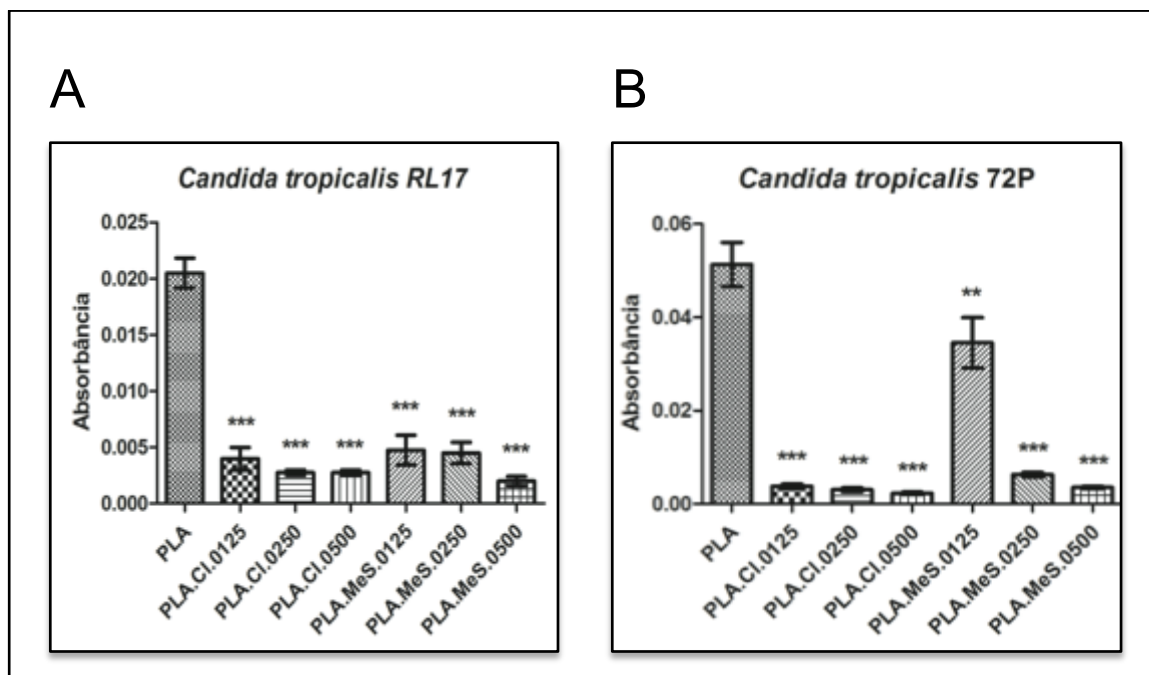


Figura 55. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL17. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 72P. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** ** $P<0,01$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$.

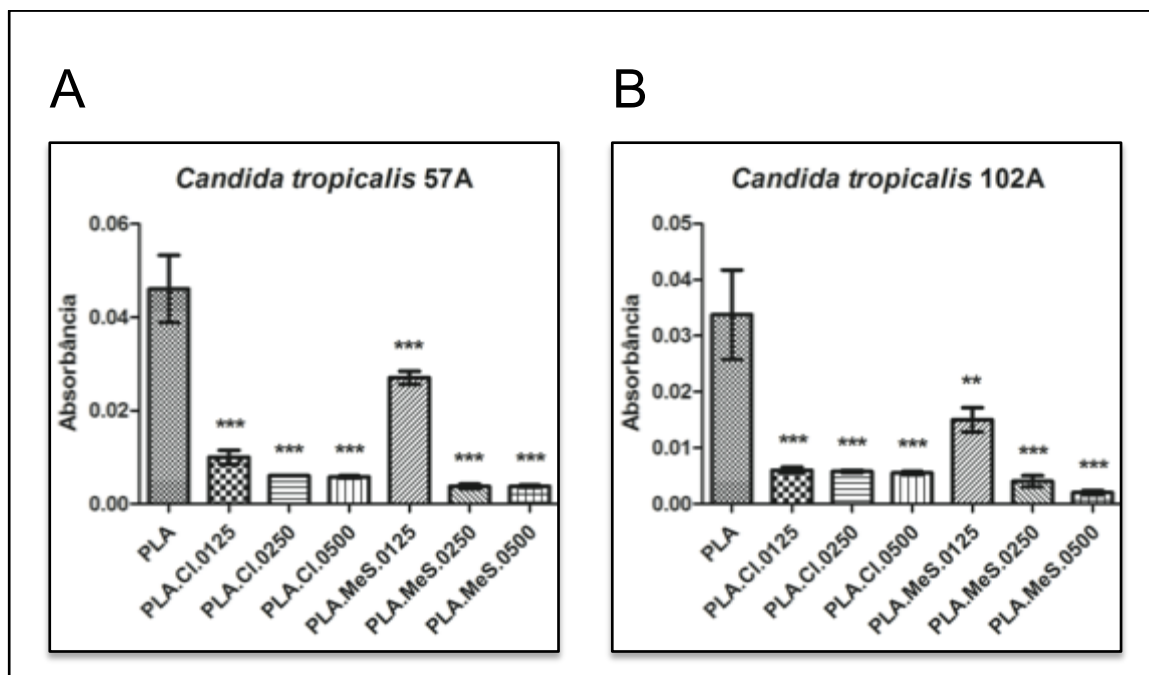


Figura 56. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 57A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* 102A. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** ** $P<0,01$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$.

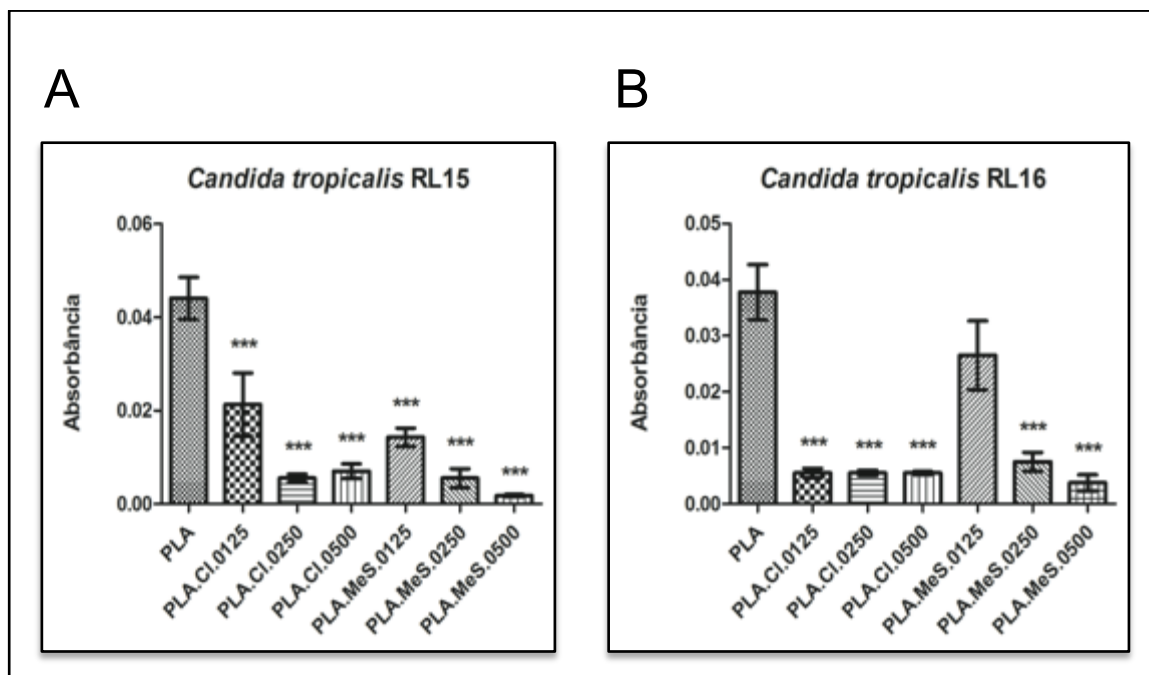


Figura 57. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL15. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* RL16. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado significativo para os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$.

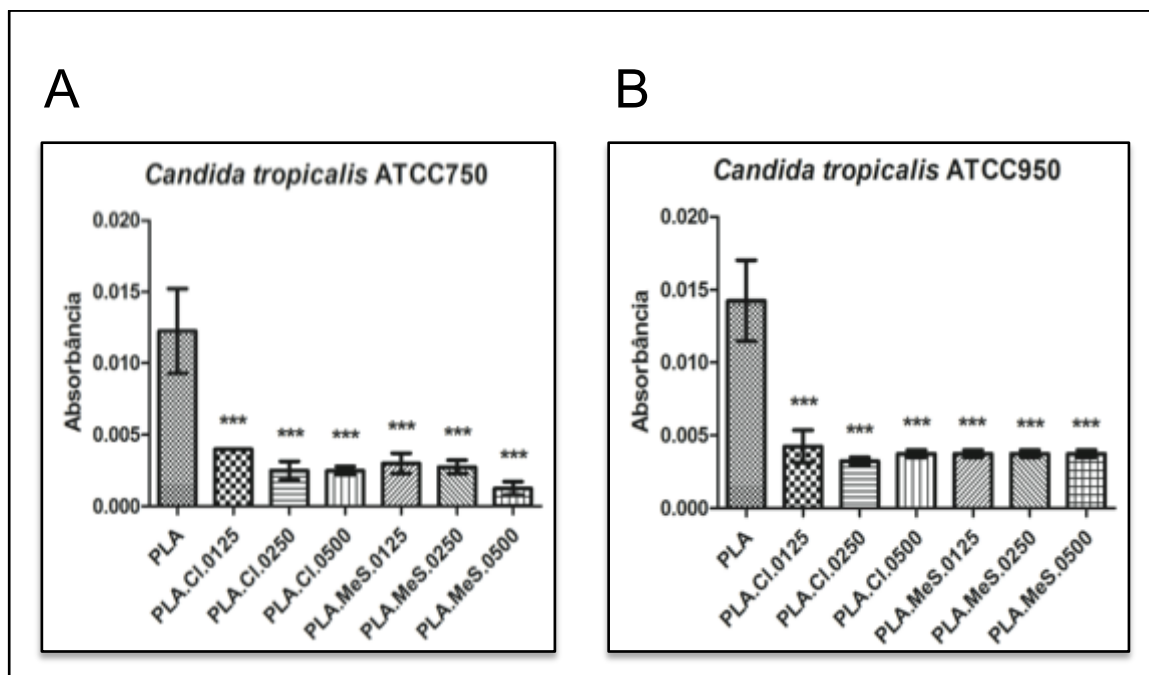


Figura 58. (A) Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC750. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$, considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$. **(B)** Gráfico de coluna vertical do Ensaio MCA, representando o impedimento da formação do biofilme obtido pelo valor de absorbância dos biomateriais de **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0125**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500** frente ao isolado de *Candida tropicalis* ATCC950. Os dados representam o valor médio \pm desvio padrão da média de 28 amostras de **PLA.SI**. O valor de P foi $<0,0001$ considerado muito significativo para todos os biomateriais de **PLA.SI**. **PLA vs PLA.CI.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0250** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.CI.0500** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0125** *** $P<0,001$, **PLA vs PLA.MeS.0250** *** $P<0,001$ e **PLA vs PLA.MeS.0500** *** $P<0,001$.

5.3.4 MEV – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de PLA

As amostras de **PLA**, **PLA.CI.0500** e **PLA.MeS.0500** foram submetidas às condições de crescimento de biofilme fúngico com o isolado clínico *C. tropicalis* 72A. Após 72 hs, as amostras foram analisadas por MEV para visualizar se ocorreu o impedimento da formação do biofilme nos filmes de PLA. As micrografias de MEV estão representadas nas Figuras 59, 77 (Anexo I) e 78 (Anexo I).

As micrografias de MEV do **PLA** (Figuras 59A, 77 (Anexo I) e 78A (Anexo I)), após 72 hs de incubação com o isolado clínico *C. tropicalis* 72A, mostram a formação do biofilme com matriz polimérica extracelular aderido a superfície do filme de **PLA**. No caso das amostras de **PLA.CI.0500** (Figuras 59B e 78B (Anexo I)) e **PLA.MeS.0500** (Figuras 59C e 78C (Anexo I)), houve impedimento da formação do biofilme quando comparado com o **PLA**, pois não foi observado proliferação fúngica e a formação do biofilme da *C. tropicalis* 72A nas superfícies destes biomateriais. Sendo assim, foi possível verificar que a incorporação dos SI no PLA impede a formação do biofilme, apresentando atividade antibiofilme.

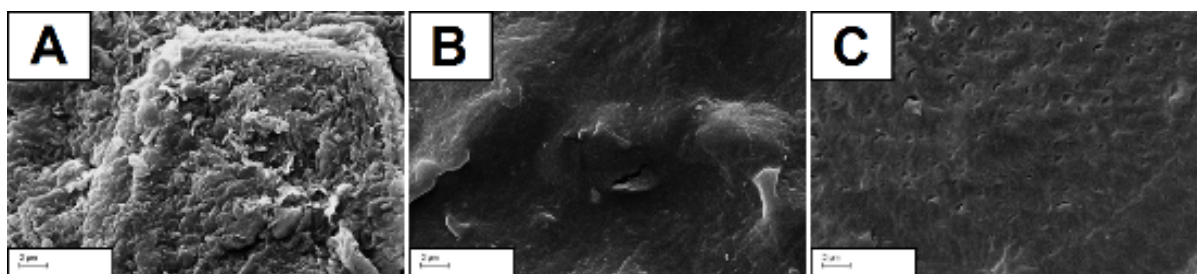


Figura 59. Micrografias de MEV do (A) **PLA** (biofilme formado), (B) **PLA.CI.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme) e (C) **PLA.MeS.0500** (sem crescimento fúngico e de biofilme); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 2 µm.

5.3.5 Análises Biológicas de filmes de PLA com SI

5.3.5.1 Adesão Celular – Análise Morfológica

As células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) foram utilizadas como um modelo de linhagem celular para os testes *in vitro* de biocompatibilidade dos materiais baseados em PLA com SI (Raucci et al., 2012). Ambas as análises qualitativa e quantitativa foram realizadas com o objetivo principal, de obter informações sobre o processo de adesão celular (Figuras 60 e 61).

O efeito da adesão e morfologia das células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) nas superfícies dos biomateriais à base de PLA com diferentes teores dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** (0,000, 0,125, 0,250 e 0,500 %m/m) foi investigado para verificar o comportamento das células CTMh sobre estes biomateriais. A adesão celular foi o primeiro parâmetro a ser considerado quando se avaliou a biocompatibilidade dos biomateriais com CTMh (A Figura 60 mostra a morfologia das células após 48 hs de tempo de cultura). Estas imagens de

microscopia confocal mostram uma boa compatibilidade celular das CTMh com o **PLA** (PLA sem SI). Com a amostra de **PLA** observou-se uma morfologia lisa, alongada e com a presença de filopódios sobre a superfície do biomaterial. As amostras de PLA com os SI também demonstraram uma boa fixação e propagação das CTMh. A incorporação do **C₁₆MImCl** na matriz do PLA induziu nas CTMh a formação de estruturas celulares mais largas comparadas com o **C₁₆MImMeS**, que mostrou estruturas celulares menores e alongadas. As análises quantitativas, com tempo de incubação de 48 hs (Ensaio do Azul de Alamar, Figura 61) demonstraram adesões celulares ligeiramente mais baixas para os biomateriais **PLA.CI** (com todos os teores do SI) em comparação com **PLA**. A porcentagem de adesão celular do **PLA.MeS.0125** ficou no mesmo nível do que o observado para os biomateriais **PLA.CI**. Embora o **PLA.MeS.0250** e o **PLA** tenham mostrado um desempenho semelhante na adesão celular, o melhor resultado obtido foi com o biomaterial **PLA.MeS.0500**.

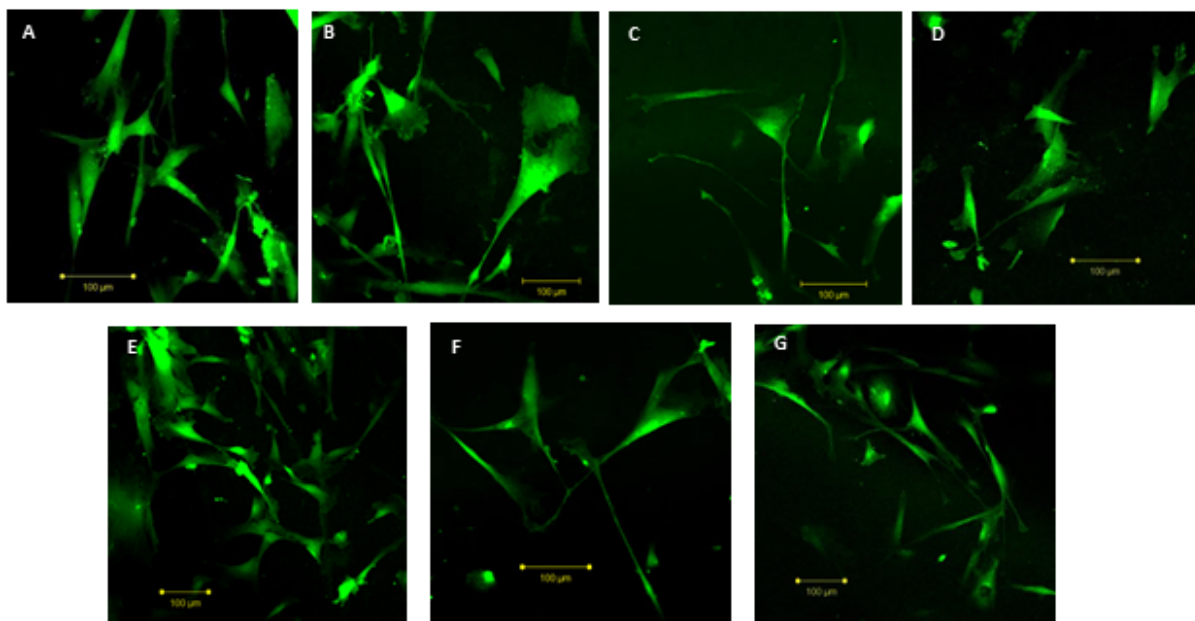


Figura 60. Micrografias de Microscopia Confocal do (A) **PLA**; (B) **PLA.CI.0125**; (C) **PLA.CI.0250**; (D) **PLA.CI.0500**; (E) **PLA.MeS.0125**; (F) **PLA.MeS.0250**; e (G) **PLA.MeS.0500** (barra de escala = 100 µm), após crescimento celular.

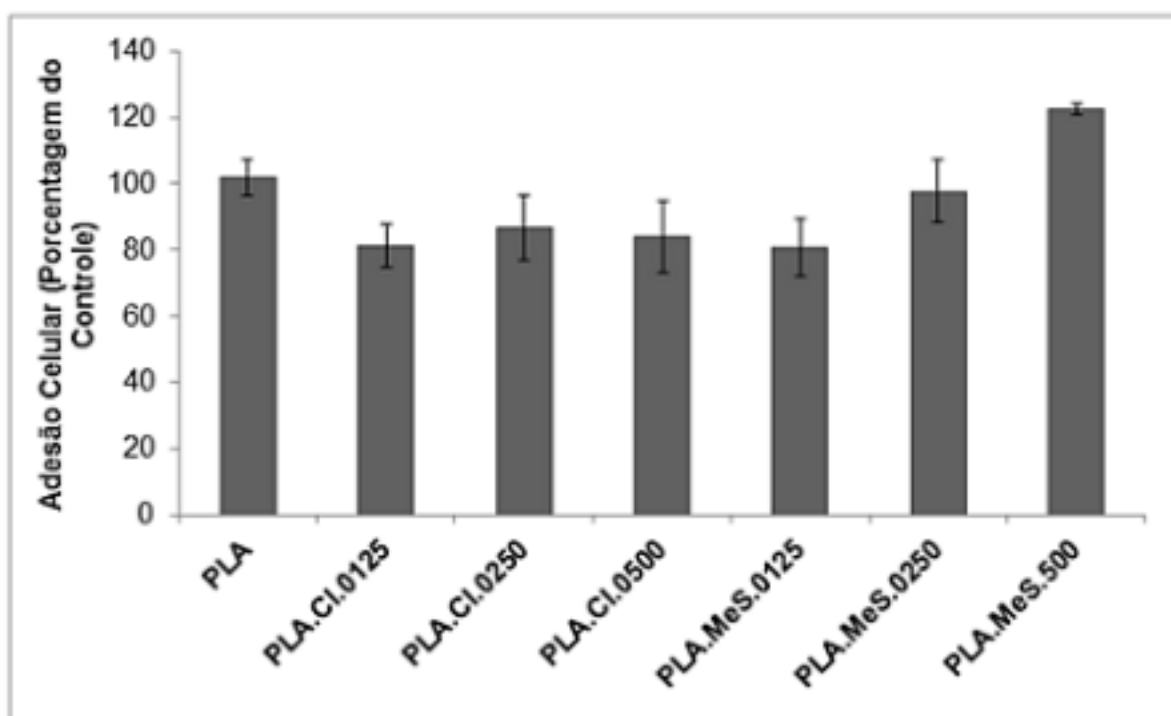


Figura 61. Adesão celular de CTMh, após 48 hs de incubação (Ensaio do Azul de Alamar), sobre os filmes de PLA. Como controle da viabilidade (100%) celular foram utilizadas as CTMh semeadas na placa de cultura de tecidos.

5.3.5.2 Teste de Viabilidade Celular

A proliferação celular da CTMh foi estudada após longos períodos de exposição (7, 14 e 21 dias) aos biomateriais de PLA. Os resultados estão representados na Figura 62. Todos os biomateriais à base de PLA testados apresentaram uma proliferação celular que aumentou com o tempo. Sendo que após 21 dias, a proliferação celular de todos os biomateriais estava no mesmo nível da amostra controle. O **PLA**, **PLA.CI.0125**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500** e **PLA.MeS.0125** apresentaram percentuais de proliferação celular comparáveis após 7 dias, no entanto, estes valores eram muito menores comparados com os valores da amostra controle. Curiosamente, a incorporação de maiores teores do **C₁₆MImMeS** resultou em forte melhoria nas proliferações das CTMh após 7 dias. O **PLA.MeS.0250** mostrou, inicialmente, uma proliferação celular mais elevada comparado com a amostra controle.

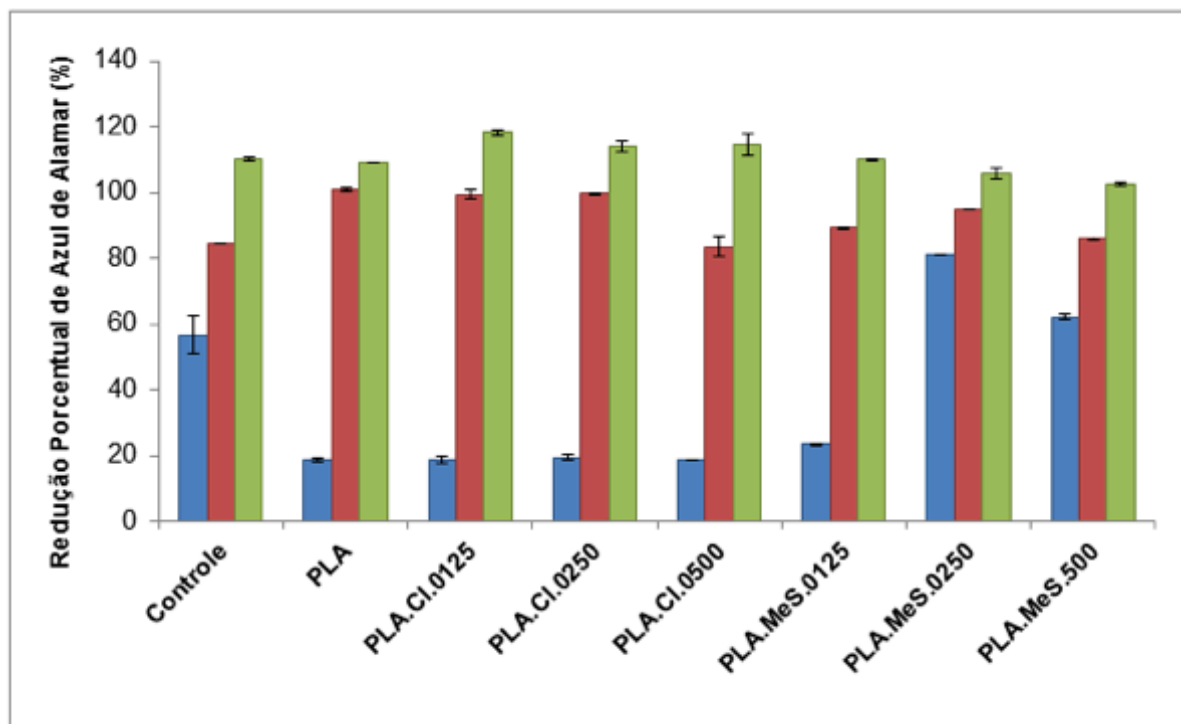


Figura 62. Proliferação celular de CTMh em 7 (barras azuis), 14 (barras vermelhas) e 21 dias (barras verdes) de tempo de cultivo (Ensaio do Azul de Alamar) sobre os filmes de PLA.

5.3.6 Avaliação Histopatológica de Pele de Orelha de Suíno tratada com os Filmes de PLA

Na avaliação histopatológica de pele da orelha suína incubada com os filmes de PLA (**PLA**, **PLA.CI.0250**, **PLA.CI.0500**, **PLA.MeS.0250** e **PLA.MeS.0500**) não foram observadas alterações celulares na epiderme (como hiperplasia, espessamento e paraqueratose), quando comparado com a amostra controle com tampão PBS pH 7,0 (Figura 63: 1A e 2A) desta forma, mostrando que os biomateriais de PLA não causam lesões microscópicas agudas na pele da orelha suína (Figura 63).

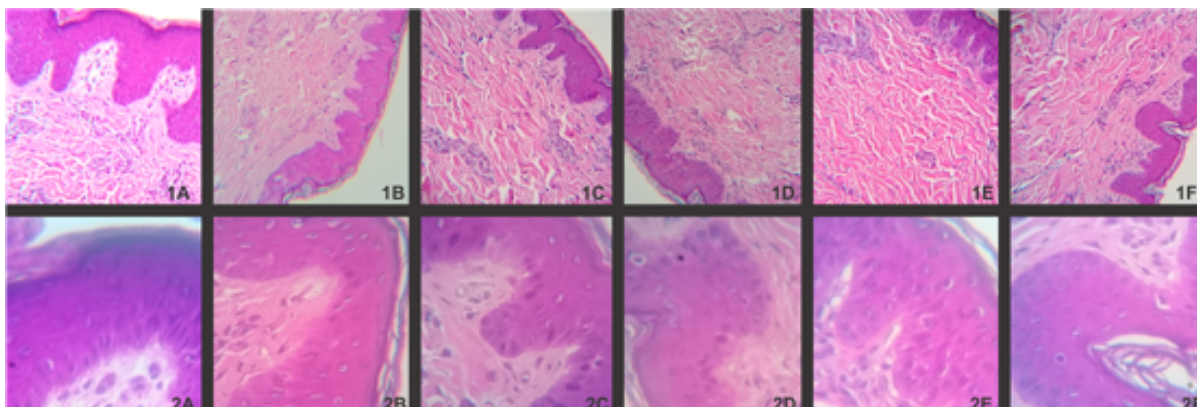


Figura 63. Avaliação histopatológica de pele de orelha de suíno em contato com filmes de PLA com SI (**C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**) e tratada com solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 (controle negativo em aumentos de 100 e 400 vezes de magnitude): Aumento de 100 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (1A) tampão PBS pH 7,0; (1B) **PLA**; (1C) **PLA.CI.0250**; (1D) **PLA.CI.0500**; (1E) **PLA.MeS.0250**; e (1F) **PLA.MeS.0500**. Aumento de 400 vezes de magnitude de células epiteliais de orelha de suínos tratadas com (2A) tampão PBS pH 7,0; (2B) **PLA**; (2C) **PLA.CI.0250**; (2D) **PLA.CI.0500**; (2E) **PLA.MeS.0250**; e (2F) **PLA.MeS.0500**.

5.3.7 Técnicas de Caracterização dos Polímeros PLA

5.3.7.1 MEV – Morfologia da Superfície dos Filmes de PLA

A morfologia da superfície dos filmes de PLA foi estudada através de MEV. As micrografias das amostras de PLA sem e com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** são apresentadas nas Figuras 64 e 65, respectivamente. Algumas ampliações das micrografias das amostras com o **C₁₆MImCl** e o **C₁₆MImMeS** estão apresentadas nas Figuras 79-83 (Anexo II) e 84-89 (Anexo II), respectivamente.

Nas Figuras 64A-B, as micrografias do **PLA** (sem os SI) apresentam uma superfície porosa e com baixa rugosidade. Na superfície do **PLA.CI.0125**, foi verificada a presença de várias esferas (mudança na morfologia do biomaterial) (Figura 64C), porém, no filme de **PLA.CI.0250** não foi observado a presença destas esferas na superfície (Figura 64D). Aumentando o teor do **C₁₆MImCl** para 0,50 %m/m foi possível verificar que esta concentração do SI induziu a presença de grande quantidade de esferas superficiais de diferentes tamanhos modificando a morfologia da superfície destes biomateriais de forma significativa, quando comparado com o PLA (sem os SI) (Figuras 64E-F, 79 e 80 (Anexo II)). O tamanho médio das esferas foi fortemente reduzido quando aumentado o teor do **C₁₆MImCl** para 2,00 %m/m (Figuras 64G-H e 81 (Anexo II)). Quando o teor do **C₁₆MImCl** foi

aumentado para 5,00 %m/m ocorreu a indução de orientação direcional (presença de linhas na superfície), juntamente com a presença de pequenas esferas (Figuras 64I-J e 82 (Anexo II)). Com o teor mais alto do SI de 10,0 %m/m a presença de esferas não foi mais observada, porém, a orientação direcional foi mais expressiva (Figura 64K-L e 80 (Anexo II)).

Em comparação com o SI **C₁₆MImCl**, o **C₁₆MImMeS** promoveu as mesmas mudanças morfológicas na superfície do biomaterial. Porém, utilizando menores teores do **C₁₆MImMeS** ocorreram mudanças mais pronunciadas (Figura 65). Neste caso, a presença da morfologia esférica foi mais expressiva, utilizando o teor de 0,250 %m/m do **C₁₆MImMeS** (Figuras 65D-E, 84 e 85 (Anexo II)), a qual foi mantida com o teor de 0,500 %m/m (Figuras 65F-G, 86 e 87 (Anexo II)). Como observado anteriormente com o **C₁₆MImCl**, utilizando maiores teores do **C₁₆MImMeS** ocorre a redução do tamanho médio das esferas na superfície do PLA (Figuras 65H-I, 88 e 89 (Anexo II)) e há indução da orientação direcional (Figuras 65J-K).

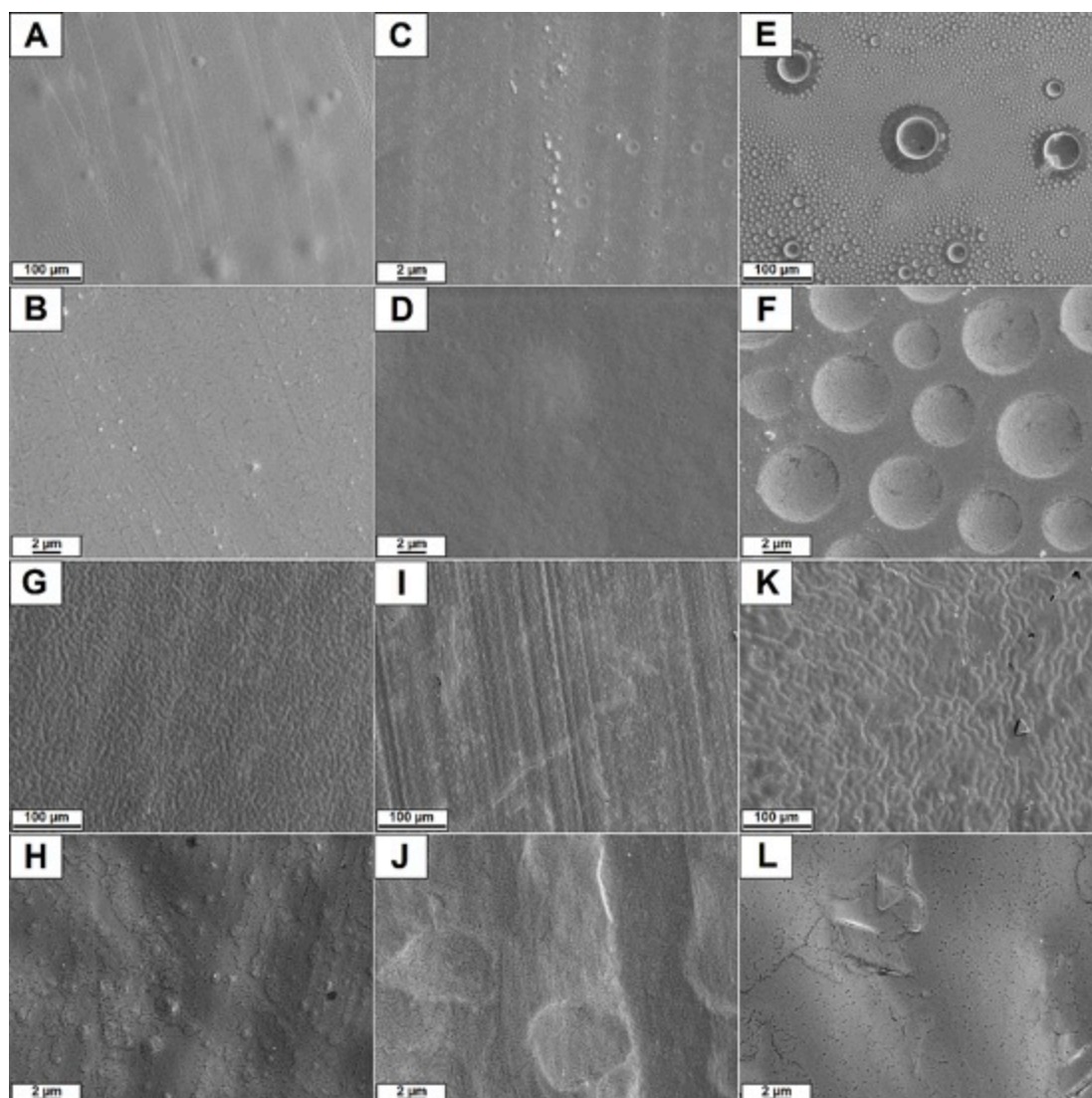


Figura 64. Micrografias de MEV do (A) **PLA** (barra de escala = 100 μm); (B) **PLA** (barra de escala = 2 μm); (C) **PLA.CI.0125** (barra de escala = 2 μm); (D) **PLA.CI.0250** (barra de escala = 2 μm); (E) **PLA.CI.0500** (barra de escala = 100 μm); (F) **PLA.CI.0500** (barra de escala = 2 μm); (G) **PLA.CI.2000** (barra de escala = 100 μm); (H) **PLA.CI.2000** (barra de escala = 2 μm); (I) **PLA.CI.5000** (barra de escala = 100 μm); (J) **PLA.CI.5000** (barra de escala = 2 μm); (K) **PLA.CI.10000** (barra de escala = 100 μm); (L) **PLA.CI.10000** (barra de escala = 2 μm).

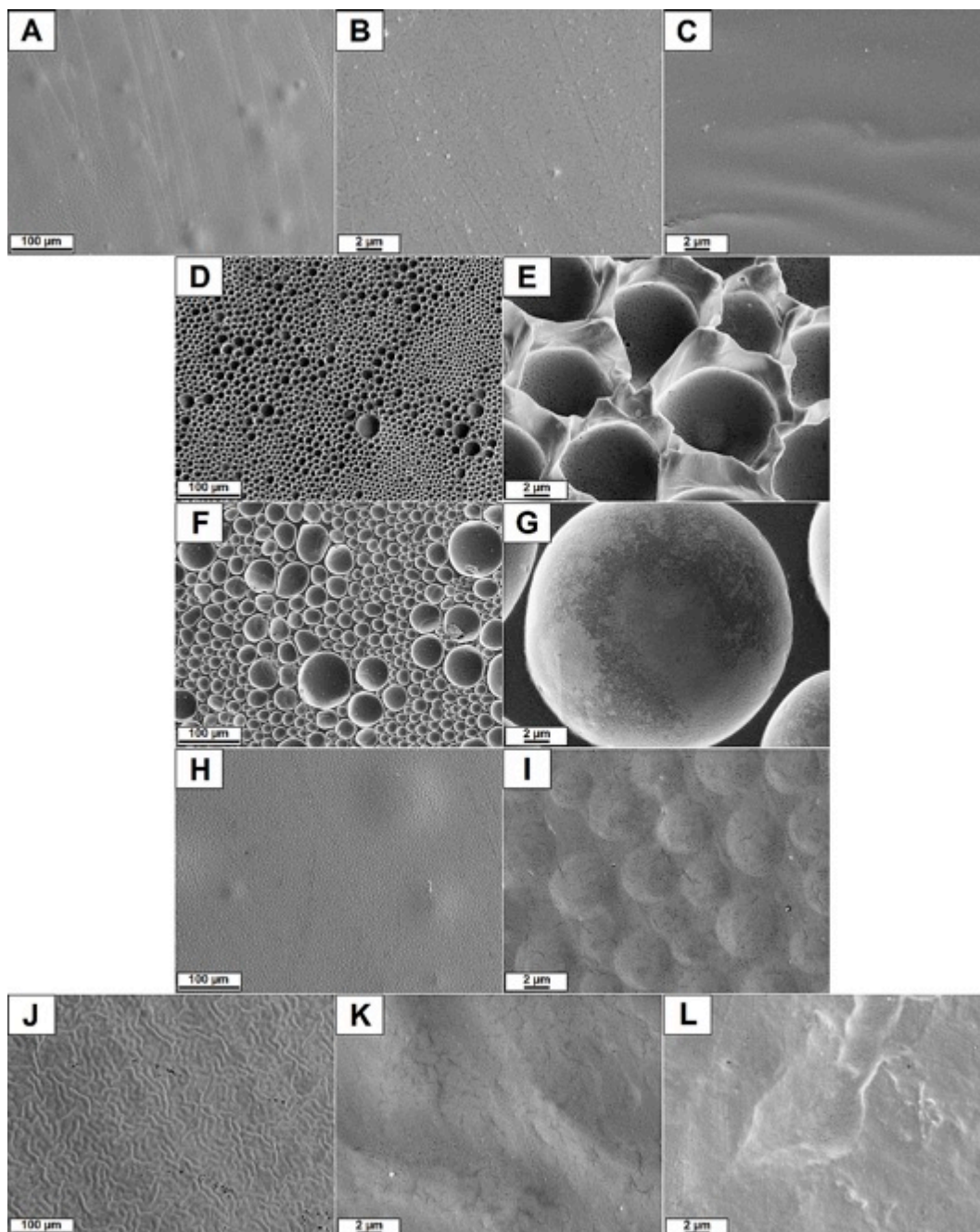


Figura 65. Micrografias de MEV do (A) **PLA** (barra de escala = 100 μm); (B) **PLA** (barra de escala = 2 μm); (C) **PLA.MeS.0125** (barra de escala = 2 μm); (D) **PLA.MeS.0250** (barra de escala = 100 μm); (E) **PLA.MeS.0250** (barra de escala = 2 μm); (F) **PLA.MeS.0500** (barra de escala = 100 μm); (G) **PLA.MeS.0500** (barra de escala = 2 μm); (H) **PLA.MeS.2000** (barra de escala = 100 μm); (I) **PLA.MeS.2000** (barra de escala = 2 μm); (J) **PLA.MeS.5000** (barra de escala = 100 μm); (K) **PLA.MeS.5000** (barra de escala = 2 μm); (L) **PLA.MeS.10000** (barra de escala = 2 μm).

5.3.7.2 Microscopia de Força Atômica

A morfologia da superfície foi investigada por MFA e as imagens estão representadas nas Figuras 66 e 67. O **PLA** mostrou uma superfície relativamente

lisa, com baixa rugosidade de 7,65 nm. A rugosidade da superfície aumentou com o teor do **C₁₆MImCl**, considerando tanto o **PLA.CI.0125**, quanto o **PLA.CI.0500**.

A caracterização da superfície das amostras **PLA.MeS** também mostraram um aumento da rugosidade de 16,2, 24,2 e 56,9 nm para o **PLA.MeS.0250**, **PLA.MeS.0500** e o **PLA.MeS.2000**, respectivamente. Em comparação com as amostras **PLA.CI**, os valores de rugosidade foram menores. Um aumento adicional do teor de **C₁₆MImMeS** levou a uma diminuição drástica na rugosidade.

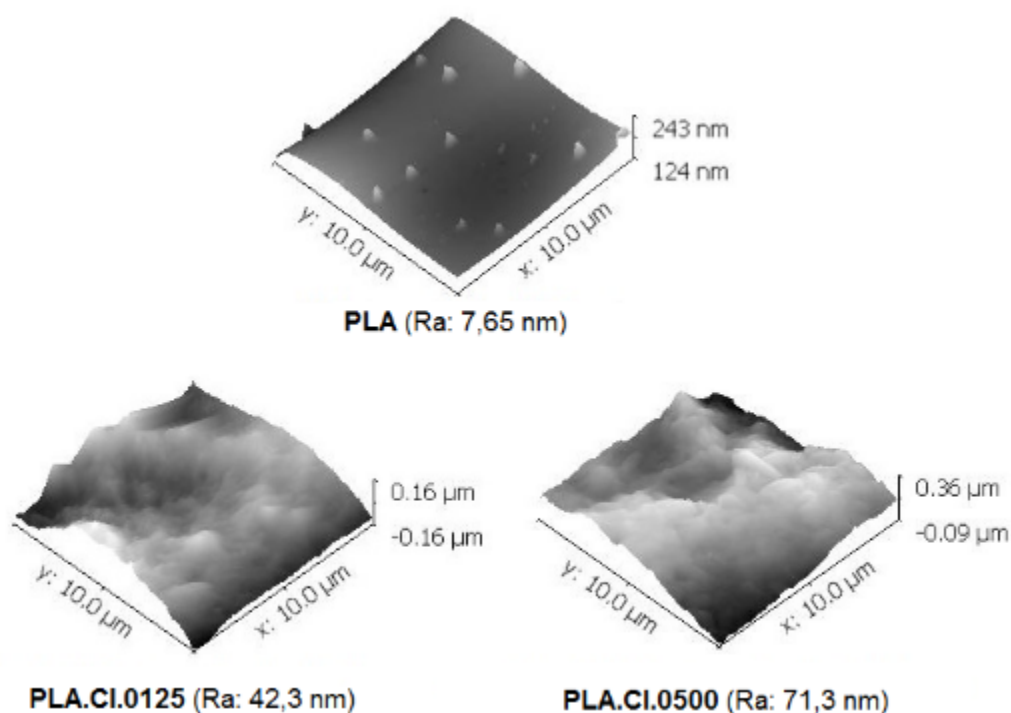


Figura 66. Imagens de MFA do **PLA**, **PLA.CI.0125** e **PLA.CI.0500** (Ra = Rugosidade média aritmética).

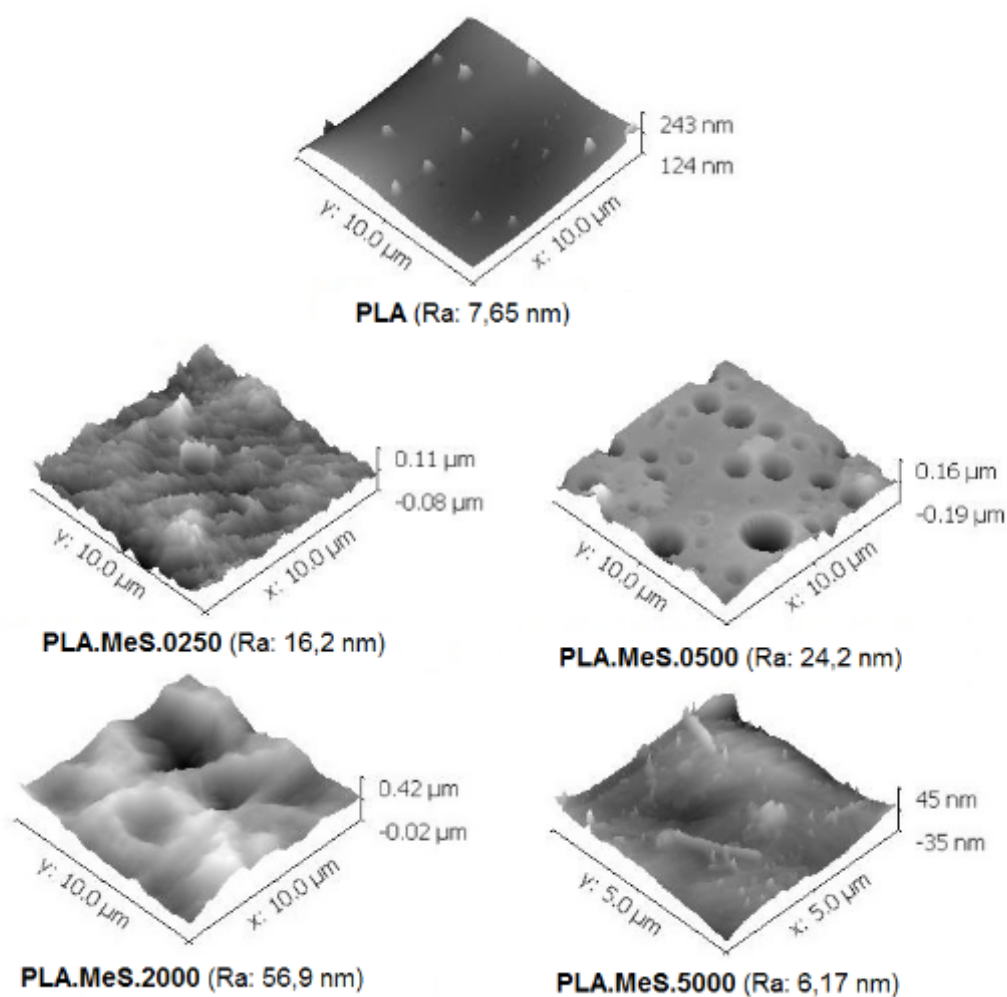


Figura 67. Imagens de MFA do **PLA**, **PLA.MeS.0250**, **PLA.MeS.0500**, **PLA.MeS.2000** e **PLA.MeS.5000** (Ra = Rugosidade média aritmética).

5.3.7.3 Análises de Difração de raios X

As análises de DRX foram realizadas com os biomateriais de PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** a fim de verificar a cristalinidade dos mesmos. Os difratogramas dos biomateriais **PLA.Cl** e **PLA.MeS** estão representados nas Figuras 68 e 69, respectivamente. Embora todas estas amostras tenham mostrado um halo típico de PLA amorfo, a incorporação de teores crescentes do **C₁₆MImCl** influenciou significativamente a cristalinidade. O **PLA** mostrou quatro difrações distintas correspondentes aos planos (010) α , (110/200) α , (203) β e (015) α (Shameli et al., 2010). A presença do **C₁₆MImCl** reduziu as intensidades destes picos de difração. Altos teores do **C₁₆MImCl** (**PLA.Cl.5000** e **PLA.Cl.10000**) promoveram a indução de diferentes tipos de planos de difração em 13,1, 16,4, 19,7, 21,2 e 23,0°.

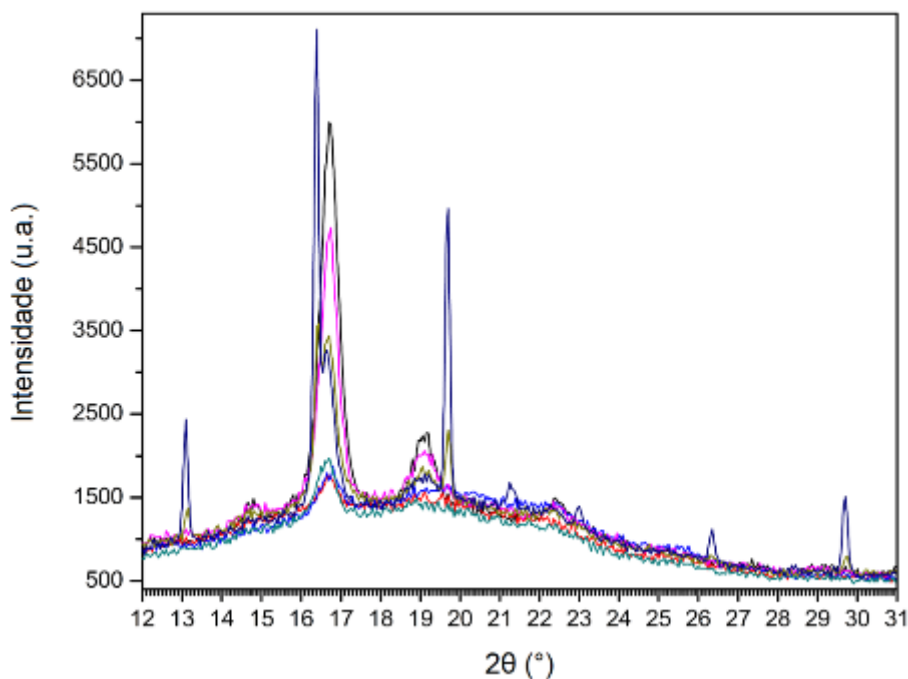


Figura 68. Difratogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 12-31°: **PLA** (linha preta); **PLA.CI.0125** (linha vermelha); **PLA.CI.0250** (linha azul); **PLA.CI.0500** (linha verde); **PLA.CI.2000** (linha rosa); **PLA.CI.5000** (linha amarela escura); e **PLA.CI.10000** (linha azul marinho).

Os biomateriais com **C₁₆MImMeS** seguiram uma mesma tendência, reduzindo as intensidades dos picos característicos do PLA (Figura 69). Como também foi observado para o **PLA.CI.5000** e o **PLA.CI.10000**, novas difrações foram detectadas para o **PLA.MeS.10000** em 6,5, 7,3, 9,7, 13,0, 16,1 e 22,8°.

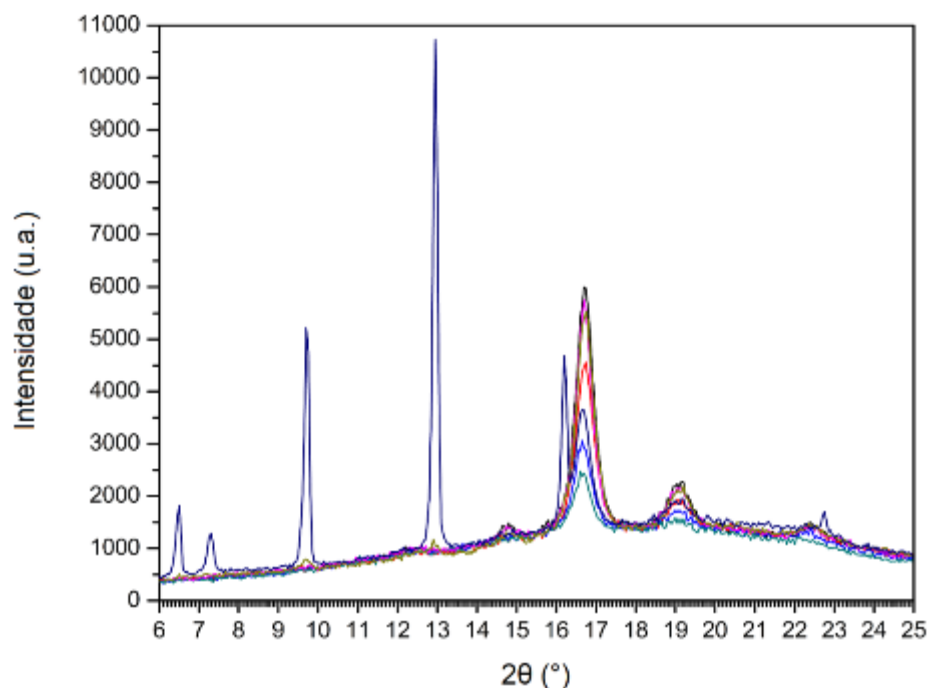


Figura 69. Difratogramas de DRX (u.a. = unidades arbitrárias) na faixa de 2θ 6-25°: **PLA** (linha preta); **PLA.MeS.0125** (linha vermelha); **PLA.MeS.0250** (linha azul); **PLA.MeS.0500** (linha verde); **PLA.MeS.2000** (linha rosa); **PLA.MeS.5000** (linha amarela escura); e **PLA.MeS.10000** (linha azul marinho).

5.3.7.4 Cromatografia de Permeação em Gel

As análises de GPC (Tabela 17) foram realizadas com os filmes de PLA com os SI para avaliar o efeito do procedimento de Solvent Casting e a incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** na massa molar do polímero. A massa molar média em massa do **PLA** de 67.638 g/mol indica que o método de Solvent Casting causou uma redução no peso molecular do PLA. O mais importante neste estudo foi verificar que a adição dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** não influenciou nas massas molares do PLA de forma significativa, não ocasionando a fragmentação da cadeia do polímero.

Tabela 17. As massas molares médias em massa (M_w), o número médio massas molares (M_n) e os índices de polidispersão (PDI) dos filmes de PLA.

Amostra	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	PDI (M_w/M_n)
PLA	67.650	38.900	1,7
PLA.CI.0125	64.100	33.800	1,9
PLA.CI.10000	77.200	40.100	1,9
PLA.MeS.0250	68.950	38.100	1,8
PLA.MeS.10000	69.250	38.300	1,8

5.3.7.5 Propriedades térmicas dos filmes de PLA (Análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Análises Termogravimétricas)

DSC e ATG foram utilizadas para estudar as propriedades térmicas dos biomateriais de PLA com SI. Os resultados referentes ao ponto de fusão, a temperatura de cristalização, entalpia de fusão, entalpia de cristalização, cristalinidade, degradação térmica e peso residual estão resumidos na Tabela 18. As curvas de DSC e ATG estão representadas na Figura 92 do Anexo III e nas Figuras 95 e 96 do Anexo IV, respectivamente.

As temperaturas de fusão e de cristalização não foram afetadas significativamente nos filmes de **PLA.MeS**. Ocorreu apenas uma ligeira diminuição da temperatura de cristalização com a incorporação dos teores de 5,00 e 10,0%*m/m* do **C₁₆MImMeS**. Foi observada uma nova transição de temperatura à ~40 °C para a amostra **PLA.MeS.10000**. No caso dos filmes de **PLA.CI**, baixos teores do **C₁₆MImCI** reduziram ambas as temperaturas de fusão e de cristalização. A amostra de **PLA.CI.5000** mostrou claramente transições bimodais de fusão, sem a presença de uma transição de cristalização. Finalmente, o teor de 10,0%*m/m* do **C₁₆MImCI** resultou na ausência das transições de fusão e cristalização.

Ambos os SI modificaram o perfil de degradação térmica dos filmes de PLA. Alguns teores baixos do **C₁₆MImCI** aumentaram a temperatura de degradação ($T_{50\%}$), contudo a estabilidade térmica das amostras de PLA com altos teores deste SI reduziu de forma gradativa e foi inferior comparada às do **PLA**. Nenhum dos filmes de **PLA.MeS** apresentou uma temperatura de degradação inferior as do **PLA**.

Tabela 18. Propriedades térmicas dos filmes de PLA.

<i>Amostra</i>	T_f [°C] ^a	T_c [°C] ^b	ΔH_f [J/g] ^c	ΔH_c [J/g] ^d	X_c [%] ^e	$T_{5\%}$ [°C] ^f	$T_{10\%}$ [°C] ^g	$T_{50\%}$ [°C] ^h	<i>Resíduo</i> [%] ⁱ
PLA	174,6	103,9	65,2	19,2	69,6	193,4	271,0	321,2	0
PLA.CI.0125	173,8	103,9	58,6	30,4	62,6	122,5	281,0	328,1	0,6
PLA.MeS.0125	173,5	104,3	52,6	28,8	56,2	230,5	296,5	332,4	0
PLA.CI.0250	172,3	103,8	51,7	32,7	55,3	140,7	265,1	317,1	2,7
PLA.MeS.0250	174,4	103,3	66,2	24,5	70,8	195,7	294,3	341,0	1,1
PLA.CI.0500	171,0	102,1	56,6	28,5	60,7	125,0	277,3	327,8	0
PLA.MeS.0500	173,9	101,9	70,2	26,0	75,3	266,7	298,6	336,9	0,7
PLA.CI.2000	163,9	103,0	49,7	11,3	54,1	197,3	238,6	303,0	0
PLA.MeS.2000	172,9	100,0	62,4	25,1	67,9	214,8	290,7	342,9	0
PLA.CI.5000	152,4	-	29,0	-	32,6	125,1	226,2	289,5	0
PLA.MeS.5000	172,9	99,5	59,3	24,5	66,6	199,1	280,5	338,0	1,9
PLA.CI.10000	142,3	-	2,1	-	2,5	134,0	216,1	253,2	2,9
PLA.MeS.10000	173,2	99,6	64,5	19,1	76,5	194,2	289,9	330,5	1,0

^a Temperatura de fusão determinada através de DSC. ^b Temperatura de cristalização determinada através de DSC. ^c Entalpia de fusão determinada através de DSC. ^d Entalpia de cristalização determinada através de DSC. ^e Cristalinidade determinada através de DSC, utilizando a Equação 1. ΔH_f^0 é a entalpia de fusão de PEAD 100% cristalino, sendo 93,7 J/g (Zhai et al., 2009). ^f Temperatura de decomposição de 5 %m/m como determinada através de ATG. ^g Temperatura de decomposição de 10 %m/m como determinada através de ATG. ^h Temperatura de decomposição de 50 %m/m como determinada através de ATG. ⁱ Peso residual a 550 °C como determinado através de ATG.

5.3.7.6 Análises Dinâmico-Mecânicas (ADM)

A Tabela 19 resume os valores e a Figura 99 do Anexo V representam as curvas de módulo de armazenamento, módulo de perda, rigidez e temperatura de transição vítrea obtidos pela análise de ADM. As amostras de **PLA.CI.5000** e **PLA.MeS.5000** mostraram aumentos nos módulos de armazenamento. Em geral os valores de módulo de armazenamento foram maiores para os biomateriais de **PLA.MeS**; a mesma tendência foi observada para o módulo de perda e a rigidez. A temperatura de transição vítrea não sofreu grandes alterações.

Tabela 19. Propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes de PLA.

<i>Amostra</i>	G'30 [GPa] ^a	G'55 [GPa] ^b	G''30 [GPa] ^c	G''55 [GPa] ^d	S30 [kN/m] ^e	S55 [kN/m] ^f	S85 [kN/m] ^g	T_v [°C] ^h
PLA	1,64	0,34	0,17	0,057	68,8	14,4	9,17	55,7
PLA.CI.2000	1,43	0,37	0,09	0,074	53,6	13,7	7,60	56,5
PLA.MeS.2000	1,52	0,42	0,12	0,076	58,1	16,2	4,13	55,9
PLA.CI.5000	1,93	0,37	0,11	0,069	68,6	13,3	6,98	56,6
PLA.MeS.5000	2,23	0,43	0,13	0,080	66,0	12,8	3,94	54,7
PLA.MeS.10000	1,32	0,34	0,16	0,064	60,8	15,8	7,05	55,8

^a Módulo de armazenamento a 30 °C. ^b Módulo de armazenamento a 55 °C. ^c Módulo de perda a 30 °C. ^d Módulo de perda a 55 °C. ^e Rigidez a 30 °C. ^f Rigidez a 55 °C. ^g Rigidez a 85 °C. ^h Temperatura de transição vítrea determinada através de ADM.

5.3.7.7 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X

As análises de EFEX foram realizadas para verificar a presença do SI **C₁₆MImMeS** na superfície da amostra **PLA.MeS.10000**. Os resultados das análises de EFEX (Figura 70) para o **PLA** mostram os ambientes químicos esperados para os átomos de carbono e oxigênio (Cossement et al., 2006). A região C 1s foi deconvoluída em três componentes químicos: EL = 284,6 eV (identificação 1); EL = 286,6 eV (identificação 2) e EL = 288,8 eV (identificação 3). A região O 1s mostra os dois componentes esperados indicados como *a* e *b*. O filme preparado com 10% m/m do **C₁₆MImMeS** evidencia os mesmos componentes em ambas as regiões de EFEX para C 1s e O 1s. As intensidades relativas da região C 1s foram alteradas devido a presença do SI, o qual contribui com um expressivo teor de carbono alifático (componente 1 a 284,6 eV). A análise de EFEX do **PLA.MeS.10000** também detectou os picos S 2p (dubleto de 2p_{1/2} e 2p_{3/2}) e o pico N 1s, corroborando que de fato o **C₁₆MImMeS** está presente na superfície do polímero.

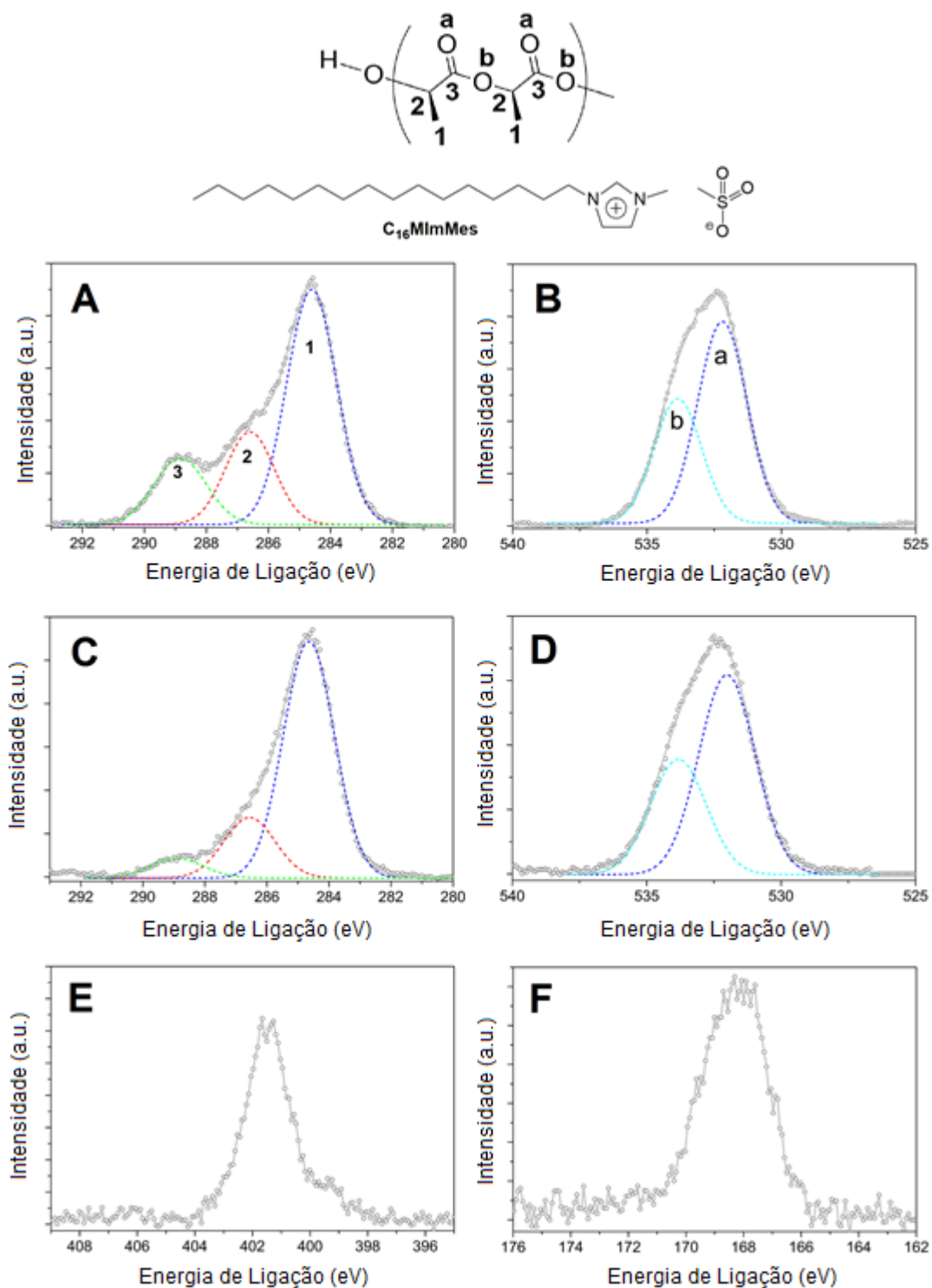


Figura 70. Identificações atômicas para PLA e C₁₆MImMes usadas nas análises de EFEX. EFEX do **PLA**: regiões de (A) C 1s e (B) O 1s. EFEX do **PLA.MeS.10000**: regiões de (C) C 1s, (D) O 1s, (E) N 1s e (F) S 2p.

5.3.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de raios X por Dispersão em Energia

A análise de MEV/EDS foi realizada para obter informações mais detalhadas sobre a distribuição dos SI na superfície do PLA, estudando ambos **PLA.CI.10000** e **PLA.MeS.10000**. Os resultados estão representados na Figura 71. Como a matriz de PLA somente contém átomos de carbono e oxigênio, a detecção dos átomos de oxigênio foi utilizada como referência. O íon cloreto característico do **C₁₆MImCl** indica que o SI estava localizado na superfície, mostrando duas regiões de concentrações distintas do **C₁₆MImCl**, dispersado em ambas as regiões de forma homogênea. No caso do **PLA.MeS.10000**, uma distribuição similar foi observada.

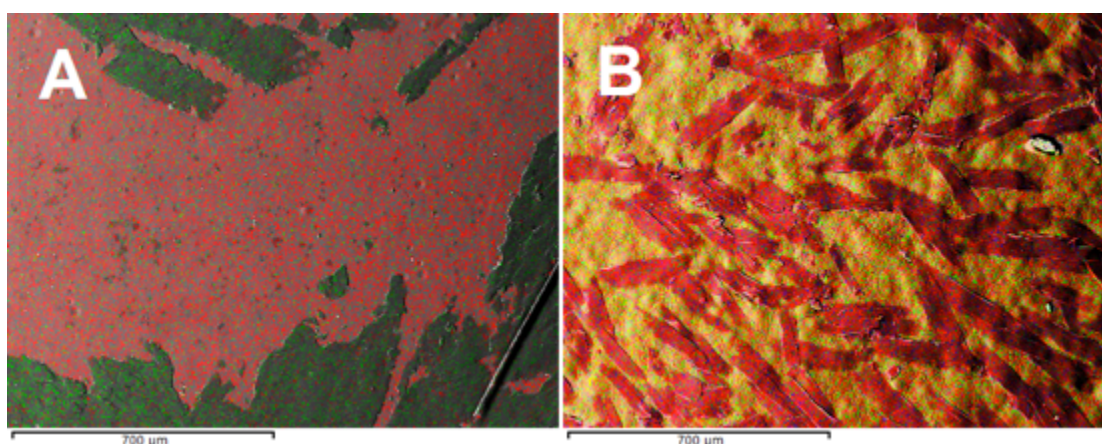


Figura 71. Análise de superfície através de MEV/EDS do (A) **PLA.CI.10000** –Átomo de oxigênio = vermelho – Átomo de cloro = verde; e do (B) **PLA.MeS.10000** – Átomo de oxigênio = amarelo – Átomo de enxofre = vermelho.

5.3.7.9 Ângulo de Contato da Água

Análises do ângulo de contato da água foram realizadas para entender o efeito do SI na molhabilidade da superfície dos filmes de PLA. A Figura 72 mostra o ângulo de contato determinado para os filmes de PLA contendo 0-0,5 %m/m de **C₁₆MImCl** ou **C₁₆MImMeS**. Com o aumento do teor do SI ocorre redução dos ângulos de contato da água, o qual corresponde a um aumento na molhabilidade da superfície dos filmes de PLA. O umedecimento total (ângulo de contato ~ 0°) foi observado nos filmes com teor igual ou maior de 2,0 %m/m do SI.

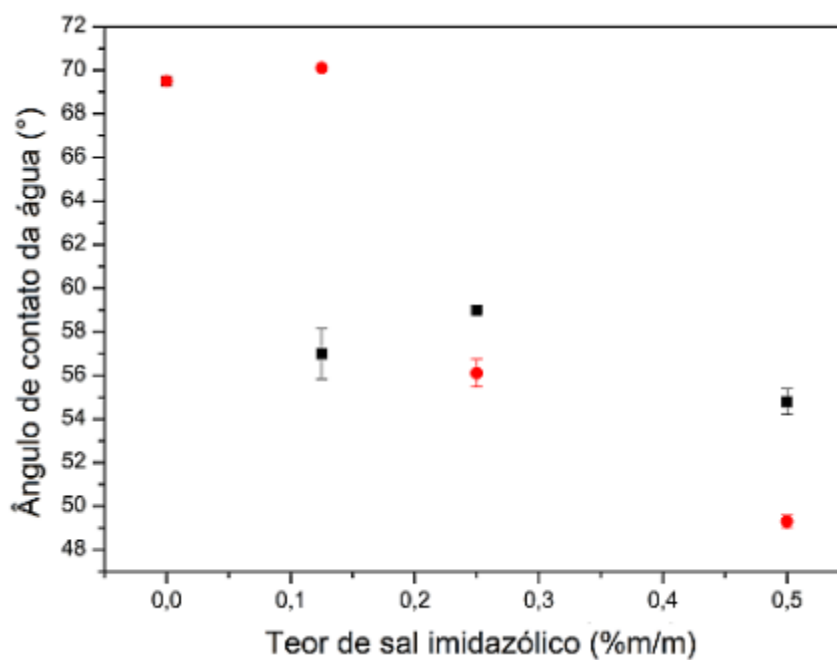


Figura 72. Ângulos de contato de água relacionado ao teor do SI: **PLA.CI** (quadrado preto) e **PLA.MeS** (círculo vermelho).

6. DISCUSSÃO

6.1 Preparação dos Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI

Para um material polimérico ser caracterizado como um biomaterial ideal ele deve apresentar principalmente as seguintes propriedades: biocompatibilidade, ser antimicrobiano ou antibiofilme, biofuncionalidade e ter boas propriedades físicas, químicas e mecânicas (Pendleton & Gilmore, 2015).

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um dispositivo médico ter um desempenho satisfatório, quando em contato com o organismo vivo, com resposta apropriada do tecido hospedeiro, numa dada aplicação. Ou seja, o termo biocompatibilidade envolve dois fenômenos associados: o dispositivo médico não pode ser afetado pelo meio fisiológico e o organismo (órgãos e tecidos locais ou distantes) não podem sofrer danos pela presença desse biomaterial. Para um biomaterial ser antimicrobiano ele deve matar (microbicida) ou inibir o desenvolvimento (microbiostático) de micro-organismos, como bactérias, fungos e vírus. E, um biomaterial antibiofilme é quando o material (por ex. polímero) com uma substância inserida têm a capacidade de atuar contra o biofilme fúngico. A biofuncionalidade descreve o comportamento do dispositivo médico no organismo. Biofuncionalidade é o conjunto de propriedades que dá a um determinado dispositivo a capacidade de desempenhar uma função desejada, pelo tempo necessário, que pode ser longo, em caso de implante permanente, ou curto, no caso de implante temporário. Ela está relacionada com as propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas que permitem ao dispositivo médico o desempenho satisfatório de sua função (Pendleton & Gilmore, 2015). Devido a isso, neste estudo foram avaliadas todas as propriedades do PEAD, PHB e PLA com a finalidade de obter-se um biomaterial que possa ser utilizado comercialmente.

Atualmente, na literatura não existem relatos da preparação de biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI como aditivos, apresentando propriedades antibiofilme, antimicrobiana, entre outras. A preparação de biomateriais com propriedades avançadas como antibiofilme foi exclusivamente pesquisada com SI poliméricos (ligação covalente entre o polímero e o SI; Liu et al., 2012; Anderson & Long, 2010). Portanto, a incorporação de SI como aditivos em polímeros ainda é uma área de pesquisa incipiente e muito promissora (Pendleton & Gilmore, 2015).

Dentro desse contexto, neste estudo foi estudado pela primeira vez a incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** nos polímeros através dos processos de mistura no estado fundido (PEAD e PHB) e de Solvent Casting (PLA), com o intuito de obter-se biomateriais para serem utilizados na confecção de dispositivos médicos. O processo de mistura no estado fundido proporciona a produção dos biomateriais em grande escala, sendo o principal processo utilizado na indústria de termoplásticos. Neste processo, a adição dos SI é facilmente adaptada nas plantas de produção das indústrias. No caso do processo de Solvent Casting, este método proporciona a produção dos biomateriais em menor escala, objetivando aplicações específicas. Além disso, a incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** como aditivos nos polímeros proporciona a obtenção de propriedades avançadas nos biomateriais de PEAD, PHB e PLA como a atividade antibiofilme.

6.2 Atividade Antibiofilme dos Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI

Atualmente, existem poucos estudos relatando a atividade antibiofilme dos SI. Bergamo et al. (2015) relataram a atividade antibiofilme do **C₁₆MImCl** na superfície de catéteres comerciais frente a *C. tropicalis*. Choi et al. (2011) prepararam biomateriais de poli(vinil cloreto) com atividade antimicrobiana e antibiofilme para um amplo espectro de bactérias resistentes a antibióticos, utilizando dois sais funcionais (docusato de 1-etilpiridínio e docusato de tributil(2-hidroxi)etil)fosfônio), porém, não houve nenhum relato de atividade antibiofilme para leveduras e outras espécies de fungos.

Neste estudo, a incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** nos polímeros de PEAD (Tabelas 6-7 e Figuras 4-5), PHB (Tabelas 11-12 e Figuras 29-30) e PLA (Tabelas 15-16 e Figuras 49-50) proporcionou a obtenção de biomateriais com atividade antibiofilme frente a *Candida* spp., sendo uma inovação nesta área de pesquisa, pois não existem relatos na literatura da preparação destes polímeros com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**. Estes SI já foram estudados anteriormente, apresentando excelente atividade antifúngica para *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Trichosporon asahii*. As CIM destes sais imidazólicos apresentaram valores entre 0,9-250 µg mL⁻¹. Em geral o SI **C₁₆MImCl** apresentou a melhor atividade antifúngica contra todos os isolados testados com a CIM de 0,9 µg mL⁻¹, independente do tipo de isolado. Esse valor é dramaticamente baixo quando

comparado com os valores de CIM de drogas de escolha no tratamento antifúngico como fluconazol e cetoconazol, testados contra os mesmos isolados e com valores de CIM mais altos. Esses resultados são de máxima importância pois todos os isolados testados no ensaio de CIM são fortes formadores de biofilme (Schrekker et al., 2013). Sendo assim, neste trabalho mostra-se a versatilidade destes SI como aditivos nos polímeros de PEAD, PHB e PLA para a obtenção de biomateriais com propriedades avançadas. Como por exemplo, o **PEAD.SI** poderia ser testado como implantes faciais, na tentativa de encontrar um material aloplástico como substituto facial ósseo (Niechajev, 2012).

Na literatura não existem estudos relatando a utilização dos polímeros de PEAD, PHB e PLA com atividade antibiofilme frente a isolados fúngicos, com aplicações em dispositivos médicos. Alguns estudos relatam a utilização de outros materiais com atividade antibiofilme. Recentemente, poliésteres foram testados para verificar se apresentavam atividade antibiofilme, sendo possível verificar que esses materiais inibem os biofilmes de alguns isolados de *Candida albicans* e *C. tropicalis* (Jäger et al., 2015). Raman et al., demonstraram que a colonização de *C. albicans* sobre as superfícies dos segmentos de tubo de catéter pode ser reduzida *in vitro* e *in vivo* (camundongos) por revestimento com camadas múltiplas de polieletrólito que libertam um potente antifúngico o beta-peptídeo. Neste estudo foram utilizados catéteres com revestimentos (filmes) de polieletrólito usando componentes a base de polissacarídeo (ácido hialurônico), quitosana e beta-peptídeo, e revestimentos de polieletrólito, beta-peptídeo, usando componentes à base de polipeptídeos. Os filmes apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e preveniram a formação de biofilmes na superfície destes materiais tanto *in vitro* como *in vivo* (Raman et al., 2016). Devido a isto, a utilização de PEAD, PHB e PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** fornece uma alternativa inovadora para o desenvolvimento de dispositivos médicos, a fim de, prevenir e erradicar a formação de biofilmes fúngicos, um grave problema de saúde pública.

As micrografias de MEV (PEAD: Figuras 15, 73 (Anexo I) e 74 (Anexo I); PHB: Figuras 39, 75 (Anexo I) e 76 (Anexo I); PLA: Figuras 59, 77 (Anexo I) e 78 (Anexo I)), após 72 hs de incubação com o isolado clínico *C. tropicalis* 72A, confirmaram o potencial antibiofilme destes biomateriais, impedindo a adesão e formação do biofilme, qualificando assim os resultados obtidos nos ensaios Antibiofilme e MCA.

No ensaio MCA foi possível verificar que houve uma variação na porcentagem de impedimento da formação do biofilme dependendo do isolado de *C. tropicalis* testado (Dühning et al., 2015). Em relação aos filmes de PEAD com os diferentes teores de **C₁₆MimCl** e **C₁₆MimMeS**, testados frente aos isolados de *C. tropicalis* mostraram que não existe uma relação direta entre o teor do SI e a porcentagem de impedimento da formação do biofilme (Figuras 7-14). No caso dos biomateriais de PHB (Figuras 31-38) e de PLA (Figuras 51-58); foi possível verificar que com o aumento do teor dos SI (**C₁₆MimCl** e **C₁₆MimMeS**) nos polímeros, ocorre um aumento na porcentagem de impedimento da formação do biofilme. Estas variações na relação do teor do SI e da atividade antibiofilme dependem de uma série de fatores, que incluem principalmente a rugosidade, distribuição do SI, morfologia, carga e hidrofiliçidade da superfície dos biomateriais. Como o teor do SI está diretamente envolvido nas propriedades da superfície dos biomateriais, isto poderia influenciar na atividade antibiofilme (Campoccia et al., 2013).

6.3 Citotoxicidade de SI

Os SI **C₄MimCl**, **C₁₀MimCl**, **(C₁₀)₂MimCl**, **C₁₆MimCl** e **C₁₆MimMeS** foram testados para avaliar a citotoxicidade dos mesmos em células de fibroblastos L929 de camundongos (Figuras 16-20), a fim de comparar entre eles a relação estrutura-atividade e verificar se os mesmos poderiam ser utilizados como aditivos em polímeros para o processo de regeneração óssea e outros processos.

O comprimento da cadeia *N*-alquil do cátion imidazólico exerce efeito expressivo na citotoxicidade dos SI, sendo que quanto maior a cadeia maior a citotoxicidade. O SI **C₄MimCl** (Figura 16) é o menos citotóxico, possibilitando a sua aplicação em elevadas concentrações de até 500 µg/mL. O aumento da citotoxicidade dos SI com maiores cadeias *N*-alquil poderia estar relacionado com uma maior compatibilidade destes SI com as membranas celulares e consequente penetração nas células de fibroblastos (Pham et al., 2010).

A biocompatibilidade dos SI **C₁₆MimCl** e **C₁₆MimMeS** na concentração de 1 µg/mL sugere que os mesmos podem ser aplicados em baixas concentrações, sem apresentar citotoxicidade. Schrekker et al. (2013) testaram a citotoxicidade dos SI **C₁₆MimCl** e **C₁₆MimMeS** e verificaram que os mesmos não apresentam citotoxicidade em células de leucócitos humanos, quando aplicados em altas concentrações. Isto pode indicar que nas células de fibroblastos de camundongos

L929, a penetração dos SI na membrana das células é maior quando comparado às células de leucócitos humanos (Pham et al., 2010). Combinando os perfis de citotoxicidade em ambas as células, a aplicação destes SI em biomateriais mostra-se segura.

Em geral, toda a série de SI testados poderia ser utilizada como aditivos nos polímeros, variando a concentração, pois como no caso dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** os mesmos não apresentaram-se tóxicos em células de fibroblastos de camundongos L929 em baixas concentrações, podendo ser aplicados para o processo de regeneração óssea e outras finalidades como biomateriais com atividade antibiofilme.

6.4 Biocompatibilidade dos Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI

Os biomateriais quando implantados no corpo humano devem ser não tóxicos e biocompatíveis, sem causar um grau intolerável de dano no organismo vivo (Williams DF, 2008). A incorporação de aditivos nos polímeros em dispositivos médicos temporários ou permanentes pode ser usada para melhorar a aceitação do material orgânico implantado, minimizando a possibilidade de rejeição, um dos principais problemas enfrentados quando os dispositivos médicos são implantados (Sobczac et al., 2013; Siedenbiedel & Tiller, 2012).

O estudo de biocompatibilidade dos biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI foi realizado com células-tronco mesenquimais humanas (CTMh), incluindo a adesão (PEAD: Figuras 21 e 22; PHB: Figuras 40 e 41; PLA: Figuras 60 e 61) e a proliferação celular (PEAD: Figura 23; PHB: Figura 42; PLA: Figura 62). Os três polímeros sem os SI apresentaram boa biocompatibilidade com as CTMh, considerando ambas as etapas de adesão e de proliferação. Foi possível verificar que as CTMh aderiram-se e proliferaram nos biomateriais de PEAD, PHB e PLA

Os biomateriais de **PEAD.SI** destacaram-se na etapa de adesão celular, pelo elevado nível de células aderidas e pela diferenciação das células CTMh em osteoblastos (Figura 21), processo importante na regeneração óssea. Para ocorrer a osseointegração no processo de regeneração óssea há necessidade da estabilidade primária, a qual depende da forma do implante. Logo após a instalação do implante os mecanismos celulares que culminam com a osseointegração são iniciados. Então a diferenciação das CTMh em osteoblastos é especialmente importante para a

regeneração de matrizes extracelulares mineralizadas em defeitos ósseos (D'Antò et al., 2013; Raucci et al., 2011; Raucci et al., 2014). A incorporação do SI na matriz do PHB provocou uma pequena diminuição na adesão das CTMh. Os biomateriais **PLA.SI** também demonstraram uma boa fixação e propagação das CTMh.

A proliferação celular inicial dos biomateriais de **PEAD.SI**, **PHB.SI** e **PLA.SI** é menor do que o nível da amostra Controle. Isto poderia ser explicado pelas propriedades de superfície dos biomateriais, pois comportamentos celulares como adesão, mudanças morfológicas e proliferação celular são principalmente determinados pela rugosidade, morfologia, carga da superfície, hidrofiliabilidade, entre outras (Campoccia et al., 2013). A proliferação celular nas superfícies dos biomateriais de **PEAD.SI**, **PHB.SI** e **PLA.SI** aumentou com o tempo, chegando no mesmo nível da amostra Controle após 21 dias, confirmando que estes biomateriais são biocompatíveis com as CTMh. A interação das células com as superfícies dos biomateriais é de extrema importância na efetividade de dispositivos médicos, como implantes médicos, podendo definir o seu grau de rejeição. Assim, modificações de superfície podem modular as respostas das células junto aos biomateriais (Campoccia et al., 2013).

A biocompatibilidade dos biomateriais de **PEAD.SI**, **PHB.SI** e **PLA.SI** foi confirmada pela avaliação histopatológica realizada na pele da orelha suína, onde não foram observadas lesões microscópicas agudas (Figuras 24, 43 e 63; Kimura & Doi., 2004). Possibilitando assim possíveis aplicações tópicas destes biomateriais, como por exemplo na engenharia de tecidos, entre outras aplicações. (Park et al., 2013).

6.5 Morfologia e Hidrofiliabilidade da Superfície dos Filmes de PEAD, PHB e PLA

Os filmes de **PEAD.SI** (Figura 25) e **PHB.SI** (Figura 44) não apresentaram mudanças expressivas na morfologia da superfície, quando comparados com o PEAD (sem os SI) e o PHB (sem os SI). O processo de prensagem pode ser o responsável pela ausência de mudanças induzidas pelos SI na morfologia destes biomateriais. Como consequência, as mudanças na atividade antibiofilme e na biocompatibilidade dos biomateriais de **PEAD.SI** e **PHB.SI** não estão relacionadas com as mudanças morfológicas de superfície.

Ambos os filmes de **PLA.CI** (Figuras 64 e 66) e **PLA.MeS** (Figuras 65 e 67) apresentaram mudanças na rugosidade e morfologia da superfície, como a presença de esferas superficiais e orientação direcional. Estas mudanças estão relacionadas com a incorporação dos SI em diferentes teores aos filmes de PLA. Sendo que a adição dos SI **C₁₆MImCI** e **C₁₆MImMeS** não modificaram os valores de massa molar média em massa do PLA de forma significativa. Dessa forma, as mudanças de rugosidade e de morfologia podem ser atribuídas aos SI (Tabela 10).

O controle morfológico com a adição dos SI foi favorecido pelo processo de Solvent Casting, utilizado na preparação destes biomateriais de **PLA.SI**. A dissolução simultânea do SI e do PLA permitiram uma pré-orientação supramolecular devido às interações SI-PLA. Após a evaporação do solvente, esta pré-orientação SI-PLA foi refletida nos biomateriais na forma de esferas superficiais e de orientação direcional (presença de linhas na superfície). Kim et al. (2015) utilizaram com sucesso os SI derivados do cátion **C₄Mim** no processo de Solvent Casting para preparar dispositivos de PLA com morfologia controlada, destacando desta forma o grande potencial dos SI de induzir controle de morfologia em biomateriais de PLA.

As análises de ângulo de contato forneceram importantes informações sobre a hidrofiliabilidade das superfícies dos biomateriais de **PEAD.SI** (Figura 28), **PHB.SI** (Figura 48) e **PLA.SI** (Figura 72) e sobre a orientação preferencial dos SI presentes nas respectivas superfícies. As modificações observadas na molhabilidade das superfícies não estão somente em concordância com a presença dos SI nas superfícies do PEAD, PHB e PLA, mas também sugerem a orientação específica dos SI. A aumentada hidrofobicidade do **PEAD.CI.0250** sugere que a cadeia alifática do **C₁₆MImCI** estava orientada preferencialmente na direção da gota da água. Em contraste, os filmes de PEAD com o **C₁₆MImMeS** mostraram uma aumentada hidrofiliabilidade com o aumento dos teores do SI. Isto sugere que a parte polar (núcleo imidazólico do cátion e o ânion metanossulfonato do SI) estava orientada preferencialmente para a gota da água (Zolghadr et al., 2014).

O **C₁₆MImCI** tornou os filmes de PHB mais hidrofóbicos e o **C₁₆MImMeS** tornou os filmes de PHB mais hidrofílicos. Embora estes SI tenham causado um efeito oposto na hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, isto ocorreu na mesma extensão para os teores dos SI definidos. Isto indica uma orientação distinta destes SI na

superfície do PHB, sendo que o **C₁₆MImCl** está orientado com a parte apolar para a gota da água e o **C₁₆MImMeS** com a parte polar (Zolghadr et al., 2014).

Ambos os SI aumentaram a molhabilidade da superfície dos filmes de PLA. O aumento na hidrofiliabilidade sugere uma orientação preferida do núcleo imidazólico e do ânion polares na direção da gota de água e da cadeia lateral apolar *N-1-n*-hexadecil na matriz do PLA (Zolghadr et al., 2014). Desta forma, o PLA poderia ser usado em várias aplicações médicas em dispositivos médicos, como scaffolds (Belkhir et al., 2015), sistemas de liberação de drogas (Davachi & Kaffashi, 2015), malhas (Davachi & Kaffashi, 2015), microesferas (Davachi & Kaffashi, 2015), microcápsulas, na engenharia de tecidos (Huang et al., 2015; Wang et al., 2015; Salerno et al., 2015), entre outras aplicações.

6.6 Cristalinidade dos Filmes de PEAD, PHB e PLA

Da mesma forma que os SI não modificaram a morfologia da superfície dos biomateriais de **PEAD.SI** e de **PHB.SI**, o tipo de cristalinidade das matrizes do PEAD (Figuras 26 e 27; Chouit et al., 2014) e do PHB (Figuras 46 e 47; Medvecky, 2012) não foram alteradas. Porém, a cristalinidade do PLA foi alterada pela incorporação dos SI (Figuras 68 e 69; Shameli et al., 2010). A presença dos SI reduziu as intensidades dos picos característicos do PLA. Altos teores dos SI promoveram a indução de novos planos de cristalinidade com a formação de cristais diferentes, dependendo do SI aplicado. Alguns dos novos planos de cristalinidade podem estar relacionados com a cristalização dos próprios SI na matriz ou na superfície dos biomateriais de PLA. Ohba et al. (2015) estudaram a nanocristalização de LI imidazólicos em nanotubos de carbono, observando a indução da cristalização quando confinados em nanoespaços.

6.7 Propriedades Térmicas dos Filmes de PEAD, PHB e PLA

Considerando os biomateriais de PEAD (Tabela 9, Figuras 90 (Anexo III) e 94 (Anexo IV)), PHB (Tabela 13, Figuras 91 (Anexo III) e 95 (Anexo IV)) e PLA (Tabela 18, Figura 92 (Anexo III) e Figuras 95 e 96 (Anexo IV)) com teores dos SI de até 0,5 %m/m, não ocorreram mudanças expressivas nas propriedades térmicas, indicando que os SI podem ser utilizados como aditivos para a preparação de biomateriais (PEAD: Pourdanesh et al., 2014; PHB: Chen & Wu, 2005; PLA: Hamad et al., 2015).

As temperaturas de fusão e de cristalização não foram afetadas significativamente nos filmes de **PLA.MeS**, o que parece estar de acordo com a localização preferencial do **C₁₆MImMeS** na superfície do PLA. Ocorreu apenas uma ligeira diminuição da temperatura de cristalização com a incorporação dos teores de 5,00 e 10,0% m/m do **C₁₆MImMeS**, o que pode ser devido aos cristais do SI formados na superfície do polímero. Foi observada uma nova transição de temperatura a ~40 °C para a amostra **PLA.MeS.10000**, o que poderia estar relacionado com a fusão do SI na superfície. Nenhum dos filmes de **PLA.MeS** apresentou uma temperatura de degradação ($T_{50\%}$) inferior as do **PLA**, o que poderia sugerir que o SI na superfície do polímero atuou como uma camada de proteção.

A amostra de **PLA.CI.5000** mostrou claramente transições bimodais de fusão, as quais parecem estar de acordo com a distribuição do SI na matriz do PLA, induzindo uma nova fase cristalina do PLA. Finalmente, o teor de 10,0% m/m do **C₁₆MImCI** resultou na ausência das transições de fusão e cristalização.

6.8 Propriedades Dinâmico-Mecânicas dos Filmes de PEAD, PHB e PLA

As propriedades dinâmico-mecânicas poderão nortear possíveis aplicações dos biomateriais de **PEAD.SI** (Tabela 10 e Figura 97 (Anexo V)), **PHB.SI** (Tabela 14 e Figura 98 (Anexo V)) e **PLA.SI** (Tabela 19 e Figura 99 (Anexo V)), pois é importante que um biomaterial apresente boas propriedades dinâmico-mecânicas para a confecção de dispositivos médicos. Os valores de módulo de armazenamento, módulo de perda e rigidez não seguiram mudanças sistemáticas com o aumento do teor dos SI. Neste contexto, foi possível verificar que o balanço das propriedades dinâmico-mecânicas depende do SI e do seu teor.

6.9 Presença e Distribuição dos SI na Superfície do PLA

Através das análises de EFEX confirmou-se a presença do SI **C₁₆MImMeS** na superfície da amostra do **PLA.MeS.10000** (Figura 70; Naudin et al., 2002). A análise de MEV/EDS foi realizada para obter informações mais detalhadas sobre a distribuição dos SI na superfície do PLA, estudando ambos **PLA.CI.10000** e **PLA.MeS.10000** (Figura 71; Sanes et al., 2006). Para os dois biomateriais foi confirmada a presença dos SI na superfície, tendo duas regiões de concentrações distintas dos SI, dispersados em ambas as regiões de forma homogênea. Isso

poderia ser devido ao alto teor de 10 % m/m dos SI, o qual causou acumulação em regiões definidas. No caso do **PLA.MeS.10000**, a orientação do **C₁₆MImMeS** foi observada nas regiões de maior concentração.

6.10 Comparação entre os Biomateriais de PEAD, PHB e PLA com os SI

Através das análises de MCA (PEAD: Figuras 7 e 8; PHB: Figuras 31 e 32; PLA: Figuras 51 e 52) realizadas com os biomateriais de PEAD, PHB e PLA foi possível verificar que em primeiro lugar o PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** apresentaram melhor impedimento da adesão e formação do biofilme, seguido em segundo lugar pelo **PHB.SI** e por terceiro lugar o **PEAD.SI** (Tabela 20). Mesmo assim, de acordo com as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, todos os biomateriais **PEAD.SI**, **PHB.SI** e **PLA.SI** impedem a formação do biofilme com eficiência. No PEAD, PHB e PLA, comparando a eficácia entre os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** utilizados como aditivos nos polímeros, foi possível verificar que, em geral, os biomateriais com o **C₁₆MImMeS** apresentaram o melhor impedimento da adesão e formação do biofilme frente aos 12 isolados de *C. tropicalis* testados (Tabela 20).

No ensaio de biocompatibilidade realizado com células-tronco mesenquimais humanas (CTMh) foi possível verificar que os três biomateriais de PEAD, PHB e PLA possuem boa adesão celular (Tabela 20; PEAD: Figura 22; PHB: Figura 41; PLA: Figura 61). Porém, comparando estes biomateriais, o **PEAD.SI** apresentou excelentes resultados de adesão celular comparado com o **PLA.SI**, que apresentou melhores resultados do que o **PHB.SI**. Avaliando os biomateriais separadamente em relação aos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** incorporados no PEAD, PHB e PLA, no PEAD o **PEAD.Cl** teve melhores resultados de adesão celular comparado com o **PEAD.MeS**; com o PLA o **PLA.MeS** teve melhores resultados de adesão celular comparado com o **PLA.Cl** e com o PHB ambos **PHB.Cl** e o **PHB.MeS** tiveram os mesmos resultados de adesão celular. Em relação à proliferação celular, no sétimo dia os valores dos três biomateriais **PLA.SI**, **PEAD.SI** e **PHB.SI** foram inferiores quando comparados com o Controle, sendo que, o **PLA.SI** apresentou melhores resultados de proliferação celular do que o **PEAD.SI** e o **PHB.SI** que apresentou os menores resultados (Tabela 20; PEAD: Figura 23; PHB: Figura 42; PLA: Figura 62). Porém, com 21 dias a proliferação celular foi

compensada, e em geral, foi igual para o **PEAD.SI**, **PHB.SI** e **PLA.SI**. Na avaliação histopatológica os três biomateriais de PEAD, PHB e PLA com os SI não mostraram lesões microscópicas agudas (Tabela 20).

Na morfologia de superfície dos biomateriais de **PEAD.SI** (Figura 25), **PHB.SI** (Figura 44) e **PLA.SI** (Figuras 64 e 65), a incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** somente afetou a morfologia dos biomateriais de **PLA.SI**, que apresentaram esferas na superfície. Isso pode estar relacionado ao método de Solvent Casting de preparação dos filmes, esse processo é importante pois mostra que os SI podem induzir mudanças expressivas e significativas na morfologia dos polímeros de **PLA.SI** (Tabela 20). A dissolução do PLA e dos SI em clorofórmio permite uma melhor interação entre a matriz e o SI, causando uma pré-organização em solução. Isto poderia explicar porque somente a cristalinidade do **PLA.SI** foi afetada (Figuras 26, 27, 46, 47, 68 e 69; Tabela 20). Nos biomateriais de **PLA.SI** ocorreu a indução de novos planos de cristalinidade.

Em relação às propriedades térmicas e dinâmico-mecânicas, os valores encontrados poderiam auxiliar na escolha do biomaterial com o melhor balanço destas propriedades, dependendo da aplicação desejada (Tabela 20). Nas propriedades térmicas avaliadas neste estudo (Tabelas 6, 8 e 11), foi possível verificar que a maior temperatura de fusão encontrada foi do biomaterial **PLA.SI**. e a maior temperatura de cristalização encontrada foi do **PEAD.SI**. Não foram detectados valores de transição vítrea para o **PEAD.SI**, sendo que para o **PHB.SI** foram encontrados valores de 0-10 °C e para o PLA.SI foram encontrados valores entre 51-60 °C. A resistência à degradação térmica diminuiu na ordem de **PEAD.SI**> **PLA.SI**> **PHB.SI**. Referente às propriedades dinâmico-mecânicas, incluindo módulo de armazenamento, módulo de perda e rigidez, observam-se valores compatíveis entre os biomateriais de **PEAD.SI** e **PHB.SI**, porém em geral, os valores de desempenho dos biomateriais de **PLA.SI** são inferiores (Tabelas 7, 8 e 12).

Os ângulos de contato para os biomateriais diminuíram na ordem de **PEAD.SI**> **PHB.SI**> **PLA.SI** sendo que esta propriedade reflete a molhabilidade destes biomateriais (Figuras 28, 48 e 72; Tabela 20).

Tabela 20. Comparação das propriedades entre os biomateriais de PEAD, PHB e PLA com SI.

Propriedade	Biomateriais com SI (0,125-0,500 %m/m)		
Impedimento da Formação do Biofilme	PLA.SI > PHB.SI > PEAD.SI (PLA.MeS > PLA.Cl; PHB.MeS > PHB.Cl; PEAD.MeS > PEAD.Cl)		
Biocompatibilidade – Adesão celular	PEAD.SI > PLA.SI > PHB.SI (PEAD.Cl > PEAD.MeS; PLA.MeS > PLA.Cl; PHB.Cl ~ PHB.MeS)		
Biocompatibilidade – Proliferação celular	7 dias: PLA.SI > PEAD.SI > PHB.SI 21 dias: PLA.SI = PEAD.SI = PHB.SI		
Avaliação Histopatológica	PEAD.SI = PHB.SI = PLA.SI		
Morfologia da Superfície	PEAD.SI Sem efeito do SI	PHB.SI Sem efeito do SI	PLA.SI Indução de esferas
Cristalinidade	PEAD.SI Não muda o tipo de cristalinidade	PHB.SI Não muda o tipo de cristalinidade	PLA.SI Indução de novos planos de cristalinidade
Temperatura de fusão	PEAD.SI $T_f = 131,5-132,0\text{ °C}$	PHB.SI $T_{f1} = 156,7-157,8\text{ °C}$ $T_{f2} = 166,9-167,8\text{ °C}$	PLA.SI $T_f = 170,8-175,4\text{ °C}$
Temperatura de cristalização	PEAD.SI $T_c = 117,2-117,8\text{ °C}$	PHB.SI $T_c = 108,5-110,9\text{ °C}$	PLA.SI $T_c = 107,6-115,7\text{ °C}$
Temperatura de Transição Vítre	PEAD.SI Não se aplica	PHB.SI $T_v = 0,54-9,43\text{ °C}$	PLA.SI $T_v = 51,4-60,2\text{ °C}$
Resistência a Degradação Térmica	PEAD.SI $T_{50\%} = 473,1-483,0\text{ °C}$	PHB.SI $T_{50\%} = 297,4-303,9\text{ °C}$	PLA.SI $T_{50\%} = 317,1-341,0\text{ °C}$
Módulo de Armazenamento	PEAD.SI $G'_{40} = 2,44-3,28\text{ GPa}$ $G'_{40} = 1,12-1,52\text{ GPa}$	PHB.SI $G'_{25} = 2,00-2,73\text{ GPa}$ $G'_{0} = 1,59-2,13\text{ GPa}$	PLA.SI $G'_{30} = 0,22-1,97\text{ GPa}$ $G'_{55} = 0,01-0,37\text{ GPa}$
Módulo de Perda	PEAD.SI $G''_{40} = 0,04-0,07\text{ GPa}$ $G''_{40} = 0,12-0,16\text{ GPa}$	PHB.SI $G''_{25} = 0,14-0,28\text{ GPa}$ $G''_{0} = 0,13-0,27\text{ GPa}$	PLA.SI $G''_{30} = 0,05-0,25\text{ GPa}$ $G''_{55} = 0,004-0,063\text{ GPa}$
Rigidez	PEAD.SI $S_{40} = 230,62-416,42\text{ kN/m}$ $S_{40} = 106,03-190,24\text{ kN/m}$ $S_{90} = 19,45-32,03\text{ kN/m}$	PHB.SI $S_{25} = 109,09-414,98\text{ kN/m}$ $S_{0} = 87,01-330,63\text{ kN/m}$ $S_{90} = 23,09-97,00\text{ kN/m}$	PLA.SI $S_{30} = 7,91-62,9\text{ kN/m}$ $S_{55} = 0,37-12,3\text{ kN/m}$ $S_{85} = 0,04-8,77\text{ kN/m}$
Molhabilidade da superfície	PEAD.SI $87,0-103^\circ$	PHB.SI $61,5-74,5^\circ$	PLA.SI $49,0-70,5^\circ$

7. CONCLUSÃO

1) Neste estudo, foi possível concluir que a incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** nos polímeros de PEAD, PHB e PLA, pelo método de estado fundido em Câmara de Misturas (PEAD e PHB) e de Solvent Casting (PLA), proporciona a produção de biomateriais com propriedades avançadas, com atividade antibiofilme frente a espécies de *Candida*, mostrando potencial para serem utilizados na confecção de dispositivos médicos.

2) Os biomateriais de PEAD, PHB e PLA com os SI apresentaram Atividade Antibiofilme frente a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Além disso, estes biomateriais apresentaram alta capacidade de impedimento da formação do biofilme frente a isolados de *C. tropicalis*, avaliados pelo Ensaio MCA. Através das análises de MEV foi possível confirmar que os biomateriais de PEAD, PHB e PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, em geral, impedem a adesão e formação do biofilme.

3) Na análise da citotoxicidade dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** testados em células de fibroblastos L929 de camundongos, foi possível concluir que estes SI não possuem citotoxicidade quando presentes em baixas concentrações ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$). Desta forma, a liberação de baixas quantidades dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** dos polímeros não seria um impedimento para a aplicação em biomateriais. Como a citotoxicidade é menor para os SI com cadeia *N*-alquil mais curta, os SI **C₄MImCl** e **C₁₀MImCl** poderiam ser utilizados como aditivos, podendo ser explorados na preparação de biomateriais.

4) Os biomateriais de PEAD, PHB e PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** mostraram-se biocompatíveis com as células-tronco mesenquimais humanas (CTMh), mostrando resultados satisfatórios nas etapas de adesão e proliferação celular.

5) Na avaliação histopatológica de pele da orelha suína incubadas com os filmes de PEAD, PHB e PLA, não foram observadas lesões microscópicas agudas na pele da orelha suína.

6) A incorporação dos SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** nos polímeros de PEAD e PHB, através do método de mistura no estado fundido, não provocou mudanças expressivas na morfologia da superfície destes biomateriais. No caso dos biomateriais de **PLA.SI**, preparados através do método de Solvent Casting, a

presença dos SI exerceu uma grande influência na morfologia da superfície, induzindo a formação de esferas e a orientação direcional na superfície.

7) Para os biomateriais de **PEAD.SI** e **PHB.SI** não foram observadas grande mudanças na hidrofiliabilidade da superfície, somente no caso dos biomateriais de **PLA.SI** houve um aumento expressivo da hidrofiliabilidade da superfície deste biomateriais.

8) Em geral, a incorporação dos SI nos polímeros de PEAD, PHB e PLA melhorou as propriedades físico-químicas e dinâmico-mecânicas destes biomateriais.

9) Desta forma, conclui-se que os biomateriais com PEAD, PHB e PLA com os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS**, são candidatos promissores para serem aplicados em dispositivos médicos (como próteses, catéteres, implantes, sistemas de liberação de drogas, entre outros) devido as propriedades avançadas apresentadas, como atividade antibiofilme frente a *Candida* spp., impedimento da formação do biofilme de isolados de *Candida tropicalis*, os SI **C₁₆MImCl** e **C₁₆MImMeS** não apresentaram citotoxicidade em células de fibroblastos L929 de camundongos em baixa concentrações, biocompatibilidade com as CTMh, apresentando propriedades físico-químicas e dinâmico-mecânicas interessantes.

8. REFERÊNCIAS

Artigos:

- Anderson EB, Long TE. 2010. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. *Polymer*. 51: 2447-2454.
- Azizi M, Farag N, Khardori N. 2015. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed *in vitro* pharmacokinetic model. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*14(21): 1-9.
- Banat IM, Rienzo MAD, Quinn GA. 2014. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 9915-9929.
- Barham PJ, Keller A, Otun EL, Holmes PA. 1984. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *J Mater Sci*. 19: 2781-2794.
- Belkhir K, Shen H, Chen J, Jegat C, Taha M. 2015. Synthesis of multi-thiol functionalized polylactid acid, polyhydroxybutyrate and polycaprolactone. *Eur Polym J*. 66: 290-300.
- Bergamo VZ, Donato RK, Dalla Lana DF, Donato KJ, Ortega GG, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. *Lett Appl Microbiol*. 60(1): 66-71.
- Bishai M, De S, Adhikari B, Banerjee R. 2014. A Comprehensive study on enhanced characteristics of modified polylactid acid based versatile biopolymer. *Eur Polym J*. 54: 52-61.
- Boiko M E, Sharkov MD, Boiko AM, Konnikov SG, Bobyl AV, Budkina NS. 2015. Investigation of the atomic, crystal, and domain structures of materials based on X-Ray diffraction and absorption data: a review. *Tech Phys*. 60: 1575-1600.
- Borowiecki P, Krawczyk MM, Plenkiewicz J. 2013. Chemoenzymatic synthesis and biological evaluation of enantiomerically enriched 1-(β -hydroxypropyl)imidazolium- and triazolium-based ionic liquids. *Beilstein J Org Chem*. 9: 516-525.
- Braem A, De Cremer K, Delattin N, De Brucker K, Neirinck B, Vandamme K, Martens JA, Michiels J, Vleugels J, Cammue BPA, Thevissen K. 2015. Novel anti-infective implant substrates: controlled release of antibiofilm compounds from mesoporous silica-containing macroporous titanium. *Colloids Surf B*. 126: 481-488.
- Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V. 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *eXPRESS Polym Lett*. v. 8: 791-808.
- Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. 2013. A Review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*. 34: 8533-8554.
- Capelletti RV. 2006. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Carlsson K, Danielsson PE, Lenz R, Liljeborg A, Majlöv L, Aslund N. 1985. Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. *Opt Lett*. 10: 53-55.
- Chandra J., Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2012. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*. 55: 46-57.

- Chen GQ, Wu Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 26: 6565-6578.
- Choi SY, Rodríguez H, Mirjafari A, Gilpin DF, McGrath S, Malcolm KR, Tunney MM, Rogers RD, McNally T. 2011. Dual functional ionic liquids as plasticisers and antimicrobial agents for medical polymers. *Green Chem*. 13: 1527-1535.
- Chouit F, Guellati O, Boukhezar S, Harat A, Guerioune M, Badi N. 2014. Synthesis and characterization of HDPE/N-MWNT nanocomposite films. *Nanoscale Res Lett*. 9(1): 288-293.
- Chyasnavichyus M, Young SL, Tsukruk VV. 2015. Recent advances in micromechanical characterization of polymer, biomaterial, and cell surface with atomic force microscopy. *Jpn J of Appl Phys*. 54: 08LA02-08LA02-13.
- Coad BR, Kidd SE, Ellis DH, Griesser HJ. 2014. Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation. *Biotechnol Adv*. 32: 296-307.
- Cossement D, Gouttebaron R, Cornet V, Viville P, Hecq M, Lazzaroni R. 2006. PLA-PMMA blends: A study by XPS and ToF-SIMS. *Appl Surf Sci*. 252: 6636-6639.
- Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. 2013. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses*. 56: 614-622.
- Coutinho FMB, Mello IL, Maria LCS. 2003. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros*. 13: 1-13.
- Cruz MC, González AV, Novelo BM, Romero E.L, Baca ER, Escorza MAQ, Castro JCV. 2012. The effect of biomaterials and antifungal on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31: 2513-2527.
- Cruz MC, Romero EL, Castro JCV, Baca ER. 2012. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol*. 7: 755-765.
- D'Antò V, Raucci MG, Guarino V, Martina S, Valletta R, Ambrosio L. 2013. Behaviour of human mesenchymal stem cells on chemically synthesized HA-PCL scaffolds for hard tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. DOI: 10.1002/term.1768.
- Davachi SM, Kaffashi B. 2015. Polylactid acid in medicine. *Polym Plast Technol Eng*. 54: 944-967.
- Delcheva I, Ralston J, Beattie DA, Krasowska M. 2015. Static and dynamic wetting behaviour of ionic liquids. *Adv Colloid Interface Sci*. 222: 162-171.
- Dharmaprakash A, Thandavarayan R, Joseph I, Thomas S. 2015. Development of broad-spectrum antibiofilm drugs: strategies and challenges. *Future Microbiol*. 10: 1035-1048.
- Dias AS, Miranda IM, Branco J, Soares MM, Vaz CP, Rodrigues AG. 2015. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*. 6: 1-8.
- Dixon EF, Hall RA. 2015. Noisy neighbourhoods: quorum sensing in fungal-polymicrobial infections. *Cell Microbiol*. 17(10): 1431-1441.
- Donato RK, Migliorini MV, Benvegnú MA, Stracke MP, Gelesky MA, Pavan FA, Schrekker CML, Benvenuto EV, Dupont J, Schrekker HS. 2009. Synthesis of silica xerogels with highly distinct morphologies in the presence of imidazolium ionic liquids. *J Sol-Gel Sci Techn*. 49: 71-77.
- Dühring S, Germerodt S, Skerkak C, Zipfel PF, Dandekar T, Schuster S. 2015. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans*- Understanding and modeling defense and evasion strategies. *Front Microbiol*. 6: 1-18.

- Dupont PC. 2004. Dynamic mechanical analysis in coatings industry. *Prog Org Coat.* 49: 197-208.
- Durbec M, Mayer N, Ciolino DV, Disant F, Gerin FM, Groult EP. 2014. Reconstruction du cartilage nasal par ingénierie tissulaire à base de polyéthylène de haute densité et d'un hydrogel. *Pathol Biol.* 62: 137-145.
- Estivil D, Arias A, Lana AT, Muñoz AJC, Arévalo MP. 2011. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Meth.* 86: 238-242.
- Fang B, Zhou CH, Rao XC. 2010. Synthesis and biological activities of novel amine-derived bis-azoles as potencial antibacterial and antifungal agentes. *Eur J Med Chem.* 45: 4388-4398.
- Fan X., Jiang, Q, Sun Z, Li G, Ren X, Liang J, Huang TS. 2015. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). *Fiber Polym.* 16: 1751-1758.
- Fernandes T, Silva S, Henriques M. 2015. *Candida tropicalis* biofilm's matrix-involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 83: 165-169.
- Fox EP, Bui CK, Nett JE, Hartooni N, Mui MC, Andes DR, Nobile CJ, Johnson AD. 2015. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Mol Microbiol.* 96(6): 1226-1239.
- Fu T, Wang C, Wang X, Li L. 2015. Preparation of biocompatible fluorescent core-shell nanoparticles for cellular imaging. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 485: 49-54.
- Fujarte IS, Romero EL, López GER, Gámez MAM, Gonzalez AV, Cruz MC. 2015. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. *BioMed Res Int.* 2015: 1-15.
- Gredes T, Gedrange T, Hinüber C, Gelinsky M, Keil CK. 2015. Histological and molecular-biological analyses of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) patches for enhancement of bone regeneration. *Ann of Anat.* 199: 36-42.
- Grumezescu V, Socol G, Grumezescu AM, Holban AM, Ficai A, Trusca R, Bleotu C, Balaure PC, Cristescu R, Chifiriuc MC. 2014. Functionalized antibiofilm thin coatings based on PLA-PVA microspheres loaded with usnic acid natural compounds fabricated by MAPLE. *Appl Surf Sci.* 302: 262-267.
- Gupta K, Barua S, Hazarika SN, Manhar AK, Nath D, Karak N, Namsa ND, Mukhopadhyay R, Kalia VC, Mandal M. 2014. Green silver nanoparticles: enhanced antimicrobial and antibiofilm activity with effects on DNA replication and cell cytotoxicity. *RSC Adv.* 4: 52845-52855.
- Hamad K, Kaseem M, Yang HW, Deri F, Ko YG. 2015. Properties and medical applications of polylactid acid: a Review. *eXPRESS Polym Lett.* 9: 435-455.
- Han XH, Wang D, Chen X, Lin H, Qu F. 2014. One-pot synthesis of macroporous bioactive glasses/polylactid acid for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 43: 367-374.
- Hodyna D, Bardeau JF, Metelytsia L, Riabov S, Kobrina L, Laptiy S, Kalashnikova L, Parkhomenko V, Tarasyuk O, Rogalsky S. 2016. Efficient antimicrobial activity and reduced toxicity of 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid/ β -cyclodextrin complex. *Chem Eng J.* 284: 1136-1145.
- Hourston DJ, Song M, Pollock HHM, Reading M. 1997. Modulated differential scanning calorimetry: 6. Thermal characterization of multicomponent polymers and interfaces. *Polym.* 38: 1-7.
- Huang JN, Jing X, Geng LH, Chen BY, Mi HY, Peng XF. 2015. A novel multiple soaking temperature (MST) method to prepare polylactid acid foams with bi-modal

- open-pore structure and their potential in tissue engineering application. *J Supercrit Fluids*. 103: 28-37.
- Hui F, Chouvy CD. 2013. Antimicrobial N-Halamine polymers and coatings: a review of their synthesis, characterization, and applications. *BioMacromolecules*. 14: 585-601.
- Inciani V, Omar A, Porta-Prosperi G, Nadworny P. 2015. Ag₅IO₆: novel antibiofilm activity of a silver compound with application to medical devices. *Int J Antimicrob Agents*. 45: 586-593.
- Izmaylov B, Gioia DD, Markova G, Aloisio I, Colonna M, Vasnev V. 2015. Imidazolium salts grafted on cotton fibres for long-term antimicrobial activity. *React Funct Polym*. 87: 22-28.
- Jäger E, Donato RK, Perchacz M, Jäger A, Surman F, Höcher A, Konefat R, Donato KZ, Venturini CG, Bergamo VZ, Schrekker HS, Fuentefria AM, Raucci MG, Ambrosio L, Stěpánek P. 2015. Biocompatible succinic acid-based polyesters for potential biomedical applications: fungal biofilm inhibition and mesenchymal stem cell growth. *RSC Adv*. 5: 85756-85766.
- Jamshidian M, Tehrany EA, Imran M, Jacquot M, Desobry S. 2010. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 9: 552-571.
- Karahaliloglu Z, Ercan B, Taylor EN, Chung S, Denkbaz EB, Webster TJ. 2015. Antibacterial nanostructured polyhydroxybutyrate membranes for guide bone regeneration. *J Biomed Nanotechnol*. 11: 2253-2263.
- Kim SH, Seo JW, Shin US. 2015. Application of Room-Temperature Ionic Liquids in Preparation of Highly Porous Polymer Membranes and Microspheres. *B Korean Chem Soc*. 36(2): 643-649.
- Kimura T, Doi K. 2004. Clinical and Histopathological Findings in Pustular Psoriaform Dermatitis (Pityriasis Rosea) in Pigs. *J Vet Med Sci*. 66(9): 1147-1150.
- Ko KS, Lee JY, Song JH, Peck KR. 2010. *In vitro* evaluation of antibiotic lock technique for the treatment of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* biofilms. *Infect Dis Microbiol et Parasitol*. 25: 1722-1726.
- Kolecka A, Jr. Chorvát D, Budjádová H. 2015. The impact of growth conditions on biofilm formation and the cell surface hydrophobicity in fluconazole susceptible and tolerant *Candida albicans*. *Folia Microbiol*. 60: 45-51.
- Köse GT, Kenar H, Hasirci N, Hasirci V. 2003. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 24: 1949-1958.
- Kulma A, Telichowska KS, Kostyn K, Szatkowski M, Skala J, Kawa ZD, Preisner M, Zuk M, Szepelik J, Wang YF, Szopa, J. 2015. New flax producing bioplastic fibers for medical purposes. *Ind Crops and Prod*. 68: 80-89.
- Lei C, Zhun H, Li J, Feng X, Chen J. 2015. Preparation and characterization of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate/Silk fibroin nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering. *Polym Eng Sci*. 55: 907-916.
- Liao Z, Guan XZZ, Zhu ZY, Yao XW, Yang Y, Jiang YY, Cao YY. 2015. Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 46: 45-52.
- Li C, Jun X, Jing C. 2015. Applications of scanning electron microscopy in earth sciences. *Sci China Earth Sci*. 58: 1768-1778.
- Lim JS, Kook MS, Jung S, Park HJ, Ohk SH, Oh HK. 2014. Plasma treated high-density polyethylene (HDPE) Medpor implant immobilized with rhBMP-2 for improving the bone regeneration. *J Nanomater*. 1: 1-7.

- Liu L, Huang Y, Riduan SN, Gao S, Yang Y, Fan W. 2012. Main-chain imidazolium oligomer material as a selective biomimetic antimicrobial agent. *Biomaterials*. 33: 8625-8631.
- Liu L, Wu H, Riduan SN, Ying JY, Zhang Y. 2013. Short imidazolium chains effectively clear fungal biofilm in keratitis treatment. *Biomaterials*. 34: 1018-1023.
- Liu R, Chen X, Falk SP, Masters KS, Weisblum B, Gellman S H. 2015. Nylon-3 polymers active against drug-resistant *Candida albicans* biofilms. *J Am Chem Soc*. 137: 2183-2186.
- Liu X, Peng F, Lou G, Wen Z. 2015. Liquid water transport characteristics of porous diffusion media in polymer electrolyte membrane fuel cells: a review. *J Power Sources*. 299: 85-96.
- Lockhart SR. 2014. Current epidemiology of *Candida* infection. *Clin Microbiol Newsletter*. 36: 131-136.
- Malheiros SP, Dos Passos CT, Casarin LS, Serraglio L, Tondo EC. 2010. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surface of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*. 21: 298-301.
- Makarov C, Berdicevsky I, Pasteur AR, Gotman I. 2013. *In vitro* antimicrobial activity of vancomycin-eluting bioresorbable β -TCP-poly(lactic acid) nanocomposite material for load-bearing bone repair. *J Mater Sci Mater Med*. 24: 679-687.
- McCann M, Curran R, Shoshan MB, McKee V, Devereux M, Kevin K, Kellet A. 2013. Synthesis, structure and biological activity of silver(I) complexes of substituted imidazoles. *Polyhedron*. 56: 180-188.
- Medvecký L. 2012. Microstructure and Properties of Polyhydroxybutyrate-Chitosan-Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds. *ScientificWorldJournal*. DOI: 10.1100/2012/537973.
- Mi HY, Salick MR, Jing X, Jacques BR, Crone WC, Peng XF, Turng LS. 2013. Characterization of thermoplastic polyurethane/poly(lactid acid) (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *Mater Sci Eng C*. 33: 4767-4776.
- Mignoni ML, Silva JVM, de Souza MO, Mauler RS, de Souza RF, Gusmão KB. 2011. Polyethylene-montmorillonite nanocomposites obtained by *in situ* polymerization of ethylene with nickel-diimine catalysts. *J Appl Polym Sci*. 122: 2159-2165.
- Morace G, Perdoni F, Borghi E. 2014. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *J Glob Antimicrob Resist*. 2: 254-259.
- Morançais A, Fèvre M, François M, Guel N, Kruch S, Kanouté P, Longuet A. 2015. Residual stress determination in a shot-peened nickel-based single-crystal superalloy using X-Ray diffraction. *J of Appl Crystallogr*. 48: 1761-1776.
- Naudin E, Ho HA, Branchaud S, Breau L, Bélanger D. 2002. Electrochemical Polymerization and Characterization of Poly(3-(4-fluorophenyl)thiophene) in Pure Ionic Liquids. *J Phys Chem B*. 106: 10585-10593.
- Nett, JE, Brooks EG, Olcoz JC, Sanchez H, Zarnowski R, Marchillo K, Andes, DR. 2014. Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. *Infect Immun*. 82: 4931-4940.
- Niechajev I. 2012. Facial reconstruction using porous high-density polyethylene (Medpor): long-term results. *Aesthet Plast Surg*. 36: 917-927.
- Obatomi DK, Brant S, Anthonypillai V, Bach PH. 1998. Toxicity of atractyloside in precision-cut rat and porcine renal and hepatic tissue slices. *Toxicol Appl Pharm*. 148: 35-45.
- Ohba T, Hata K, Chaban VV. 2015. Nanocrystallization of Imidazolium Ionic Liquid in Carbon Nanotubes. *J Phys Chem C*. 119: 28424-28429.

- Oncu S. 2014. Optimal dosage and dwell time of ethanol lock therapy on catheters infected with *Candida* species. *Clin Nutr.* 33: 360-362.
- Pacheco DP, Amaral MH, Reis RL, Marques AP, Correlo VM. 2015. Development of an injectable PHBV microparticles-GG hydrogel hybrid system for regenerative medicine. *Int J Pharm.* 478: 398-408.
- Pannanusorn S, Fernandez V, Römling U. 2013. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses.* 56: 264-272.
- Park J, Friendship RM, Poljak Z, DeLay J, Slavic D, Dewey CE. 2013. An investigation of ear necrosis in pigs. *Can Vet J.* 54(5): 491-495.
- Pathaweisariyakul T, Narkchamnan K, Thitisuk B, Yau W. 2015. Methods of long chain branching detection in PE by triple-detector gel permeation chromatography. *J Appl Polym Sci.* 132: 42222-42231.
- Peelman N, Ragaert P, Ragaert K, Meulenaer B, Devlieghere F, Cardon, L. 2015. Heat resistance of new biobased polymeric materials, focusing on starch, cellulose, PLA and PHA. *J Appl Polym Sci.* 132: 42305-42320.
- Pendleton JN, Gilmore BF. 2015. The antimicrobial potential of ionic liquids: A source of chemical diversity for infection and biofilm control. *Int J Antimicrob Agents.* 46: 131-139.
- Pham TPT, Cho CW, Yun YS. 2010. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res.* 44: 352-372.
- Pourdanesh F, Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Allaveisie, A. 2014. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a new nanocomposite, containing high-density polyethylene, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, and magnesium oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C.* 40: 382-388.
- Qian G, Li Y, Gerson AR. 2015. Applications of surface analytical techniques in earth sciences. *Surf Sci Rep.* 70: 86-133.
- Ramage G, Mowat E, Jones B, William C, Ribot JL. 2009. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 35: 340-355.
- Ramage G, Robertson SN, Williams C. 2014. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 43: 114-120.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Ribot JLL. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell.* 4: 633-638.
- Raman N, Lee MR, Palecek SP, Lynn DM. 2014. Polymer multilayers loaded with antifungal β -peptides kill planktonic *Candida albicans* and reduce formation of fungal biofilms on the surface of flexible catheter tubes. *J Control Release.* 191: 54-62.
- Raman N, Marchillo K, Lee MR, Lopez ADR, Andes DR, Palecek SP, Lynn DM. 2016. Intraluminal release of an antifungal beta-peptide enhances the antifungal and anti-biofilm activities of multilayer-coated catheters in a rat model of venous catheter infection. *ACS Biom Sci & Eng.* 2(1): 112-121.
- Raucci MG, Alvarez-Perez MA, Demitri C, Sannino A, Ambrosio L. 2011. Proliferation and osteoblastic differentiation of hMSCs on cellulose-based hydrogels. *J Appl Biomater Funct Mater.* 10(3): 302-307.
- Raucci MG, Guarino V, Ambrosio L. 2012. Biomimetic strategies for bone repair and regeneration. *3(3):* 688-705.
- Raucci MG, Alvarez-Perez MA, Meikle S, Ambrosio L, Santin M. 2014. Poly(ϵ -lysine) dendrons tethered with phosphoserine increase mesenchymal stem cell differentiation potential of calcium phosphate gels. *Tissue Eng Part A.* 20(3-4): 474-485.

- Reznickova A, Novotna Z, Kolska Z, Kasalkova NS, Rimpelova S, Svorcic V. 2015. Enhanced adherence of mouse fibroblast and vascular cells to plasma modified polyethylene. *Mater Sci Eng C*. 52: 259-266.
- Riduan ST, Zhang Y. 2013. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. *Chem Soc Rev*. 42: 9055-9070.
- Salerno A, Gutiérrez MF, Barrio JSR, Domingo C. 2015. Bio-safe fabrication of PLA scaffolds for bone tissue engineering by combining phase separation, porogen leaching and scCO₂ drying. *J Supercrit Fluids*. 97: 238-246.
- Salwiczek M, Qu Y, Gardiner J, Strugnell RA, Lithgowl T, Mclean KL, Thissen H. 2014. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends Biotechnol*. 32: 82-90.
- Sanes J, Carrión FJ, Bermúdez MD, Martínez-Nicolás G. 2006. Ionic liquids as lubricants of polystyrene and polyamide 6-steel contacts. Preparation and properties of new polymer-ionic liquid dispersions. *Tribol Lett*. 21(2): 121-133.
- Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. 26: 726-737.
- Schrekker HS, Donato RK, Fuentesfria AM, Bergamo V, Oliveira LF, Machado MM. 2013. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. *Med Chem Comm*. 4: 1457-1460.
- Schrekker HS, Silva DO, Gelesky MA, Stracke MP, Schrekker CML, Gonçalves RS, Dupont J. 2008. Preparation, cátion-ânion interactions and physicochemical properties of ether-functionalized imidazolium ionic liquids. *J Braz Chem Soc*. 19: 426-433.
- Seddiki SML, Boucherit ZO, Boucherit K, Kunkel D. 2015. Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida* sp. formation des biofilms et résistance. *J Mycol Méd*. 25: 130-135.
- Shameli K, Ahmad MB, Yunus WMZW, Ibrahim NA, Rahman RA, Jokar M, Darroudi M. 2010. Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity. *Int J Nanomedicine*. 5: 573-579.
- Shenderovich J, Felnn M, Kirmayer D, Quntar AA, Steinberg D, Lavy E, Frien M. 2015. Local sustained-release delivery systems of the antibiofilm agent thiazolidinedione-8 for prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Int J Pharm*. 485: 164-170.
- Siedenbiedel F, Tiller J. 2012. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles. *Polymers*. 4: 46-71.
- Smiglak M, Pringle JM, Lu X, Han L, Zhang S, Gao H Macfarlanef DR Rogers RD. 2014. Ionic liquids for energy, materials, and medicine. *Chem Commun-RSC*. 50: 9228-9250.
- Sobczac M, Debek C, Oledzka E, Kozlowski R. 2013. Polymeric systems of antimicrobial peptides-strategies and potencial applications. *Molecules*. 18: 14122-14137.
- Sousa FDB, Scuracchio CH. The use of atomic force microscopy as an important technique to analyze the dispersion of nanometric fillers and morphology in nanocomposites and polymer blends based on elastomers. *Polímeros*. 24: 661-672.
- Szmereková V, Králik P. 1984. Interactions of polyethylene oxide with surfactants studied by gel permeation chromatography. *J Chromatogr*. 285: 188-193.

- Toulet D, Debarre C, Imbert C. 2012. Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida spp.* biofilms on silicone biomaterials?. *J Antimicrob Chemother.* 67: 430-432.
- Trafny EA, Lewandowski R, Marciniak IZ, Stepinska M. 2013. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworkings fluids. *Word J Microb and Biot.* 29: 1635-1643.
- Villanova JCO, Oréface R L. 2010. Aplicações farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros.* 20: 51-64.
- Walraven CJ, Lee SA. 2013. Antifungal Lock Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 1-8.
- Wang D, Lin H, Jingjie J, Jin Q, Li L, Dong I, Qu F. 2015. Fabrication of long-acting drug release property of hierarchical porous bioglasses/poly(lactic acid) fibre scaffolds for bone tissue engineering. *IET Nanobiotechnol.* 9: 58-65.
- Williams DF. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 29(20): 2941-2953.
- Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. 2014. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida spp.* in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* 43: 78-81.
- Xavier J R, Babusha ST, George J, Ramana KV. 2015. Material properties and antimicrobial activity of polyhydroxybutyrate (PHB) films incorporated with vanillin. *Appl Biochem Biotechnol.* 176: 1498-1510.
- Xu Z, Liu Y, Guo S, Jie S, Li BG. 2016. Novel polyethylene-b-polyurethane-b-polyethylene triblock copolymers: facile synthesis and application. *J Appl Polym Sci.* 133: 42967-42974.
- Zambrano LJM, Escribano P, Bouza E, Guinea J. 2014. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida spp.* isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol.* 304: 1192-1198.
- Zhai W, Ko Y, Zhu W, Wong A, Park CB. 2009. A study of the crystallization, melting and foaming behaviors of poly(lactic acid) in compressed CO₂. *Int J Mol Sci.* 10: 5381-5397.
- Zolghadr AR, Ghatee MH, Zolghadr A. 2014. Adsorption and Orientation of Ionic Liquids and Ionic Surfactants at Heptane/Water Interface. *J Phys Chem C.* 118(34): 19889-19903.

Livros:

- Balaban N. 2008. **Control of biofilm infections by signal manipulation.** Springer Series on Biofilms. 171 p.
- Evans LV. 2005. **Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control.** Harwood Academic Publishers. 471 p.
- Jass J, Surman S, Walker J. 2003. **Medical biofilms: detection, prevention and control.** John Wiley & Sons Ltda. 279 p.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2010. **Microbiologia de Brock.** Artmed 12° Edição. 1160 p.
- Oleskin AV, Shishov VI, Malikina KD. 2010. **Symbiotic biofilms and brain neurochemistry.** Nova Biomedical Books. 57 p.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2012. **Microbiologia.** Artmed 10° Edição. 934 p.

9. ANEXOS

9.1 Anexo I – MEV – Avaliação do Impedimento da Formação do Biofilme em Filmes de PEAD, PHB e PLA

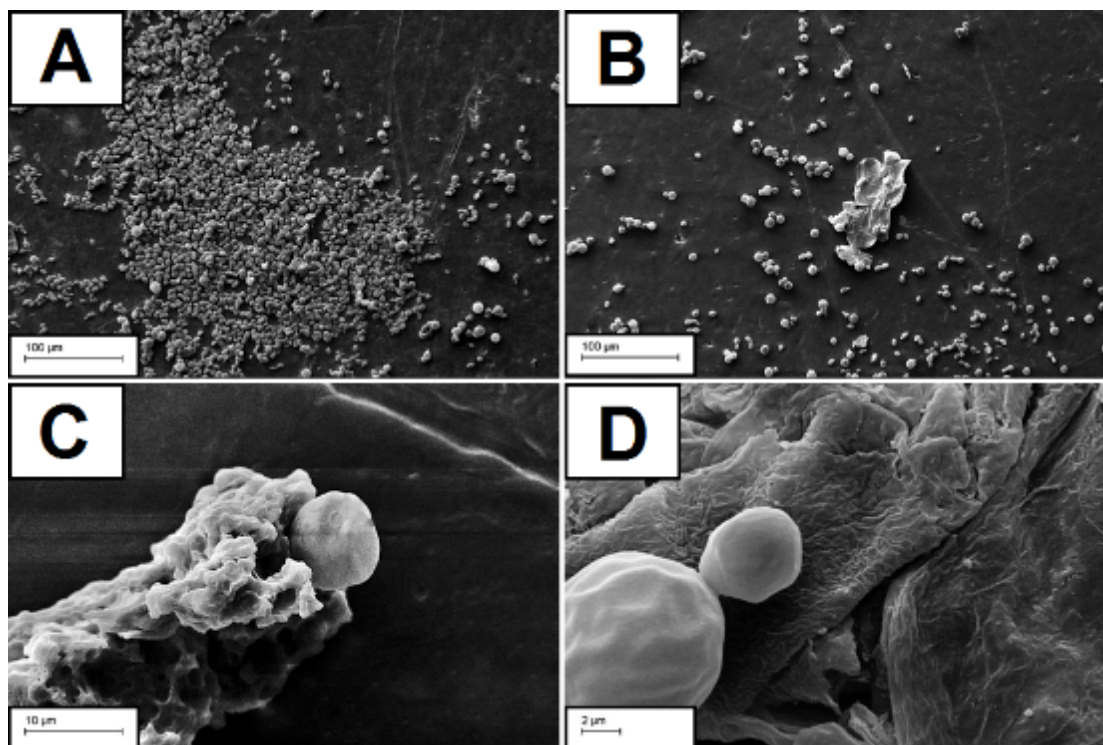


Figura 73. Micrografias de MEV do (A) **PEAD** (células leveduriformes) (barra de escala = 100 µm), (B) **PEAD** (biofilme formado) (barra de escala = 100 µm), (C) **PEAD** (biofilme formado) (barra de escala = 10 µm) e (D) **PEAD** (biofilme formado com matriz polimérica extracelular) (barra de escala = 2 µm); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A.

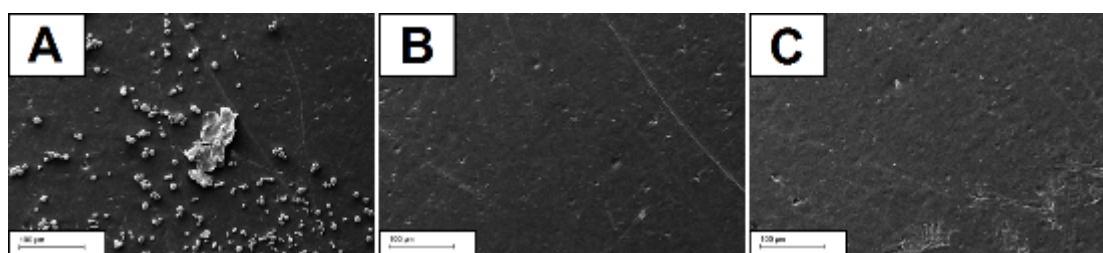


Figura 74. Micrografias de MEV do (A) **PEAD**, (B) **PEAD.CI.0500** e (C) **PEAD.MeS.0500**; após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 100 µm.

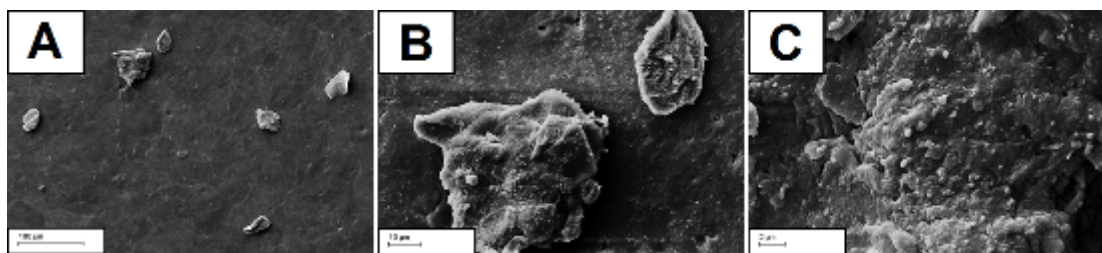


Figura 75. Micrografias de MEV do (A) **PHB** (biofilme formado) (barra de escala = 100 μm), (B) **PHB** (biofilme formado) (barra de escala = 10 μm) e (C) **PHB** (biofilme formado com matriz polimérica extracelular) (barra de escala = 2 μm); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A.

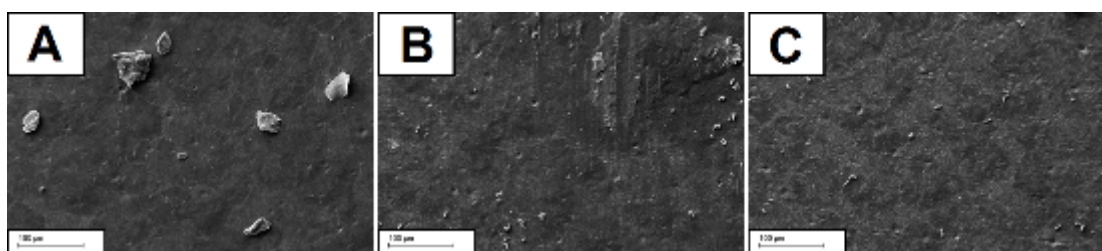


Figura 76. Micrografias de MEV do (A) **PHB**, (B) **PHB.CI.0500** e (C) **PHB.MeS.0500**; após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 100 μm .

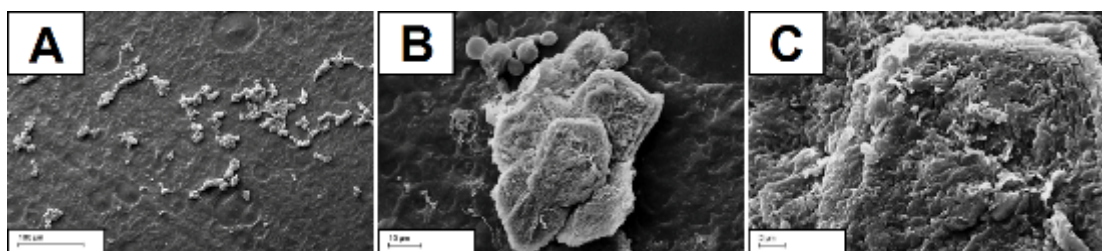


Figura 77. Micrografias de MEV do (A) **PLA** (células leveduriformes) (barra de escala = 100 μm), (B) **PLA** (biofilme formado) (barra de escala = 10 μm) e (C) **PLA** (biofilme formado com matriz polimérica extracelular) (barra de escala = 2 μm); após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A.

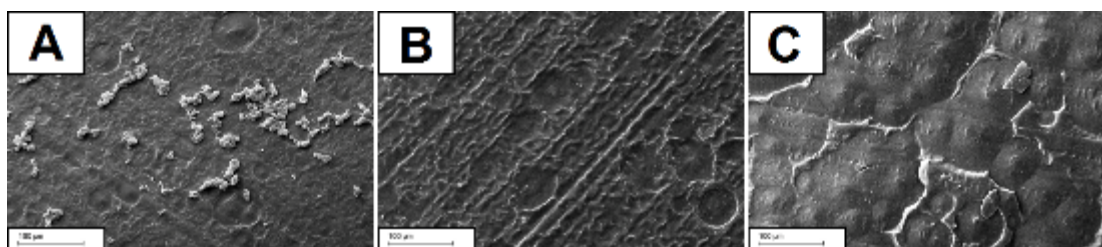


Figura 78. Micrografias de MEV do (A) **PLA**, (B) **PLA.CI.0500** e (C) **PLA.MeS.0500**; após 72 hs de incubação com o isolado clínico formador de biofilme *C. tropicalis* 72A: Barra de escala = 100 μm .

9.2 Anexo II – MEV – Morfologia da Superfície dos Filmes de PLA

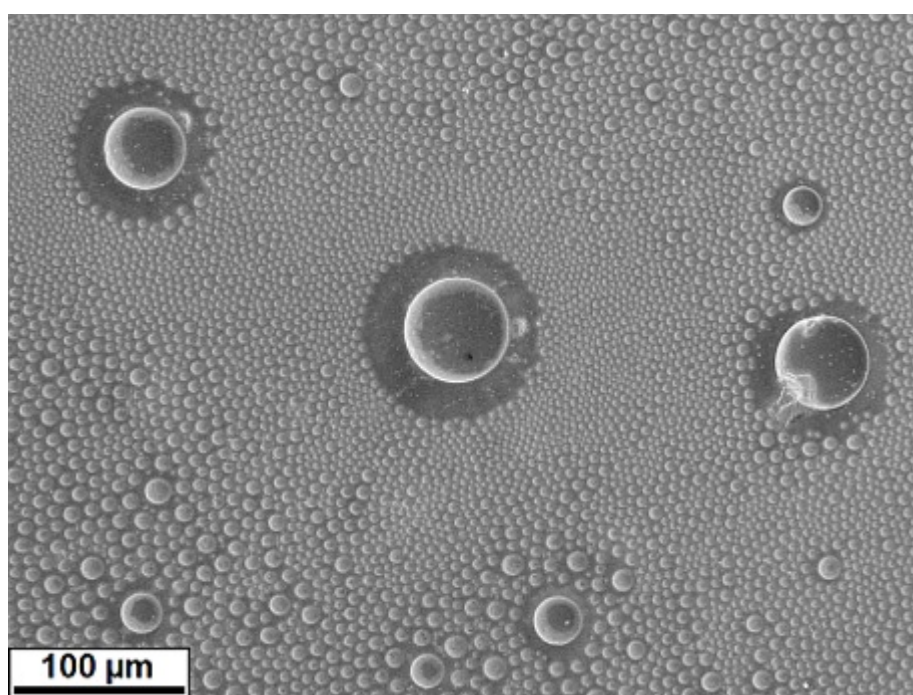


Figura 79. Micrografia de MEV do **PLA.CI.0500** (barra de escala = 100 µm).

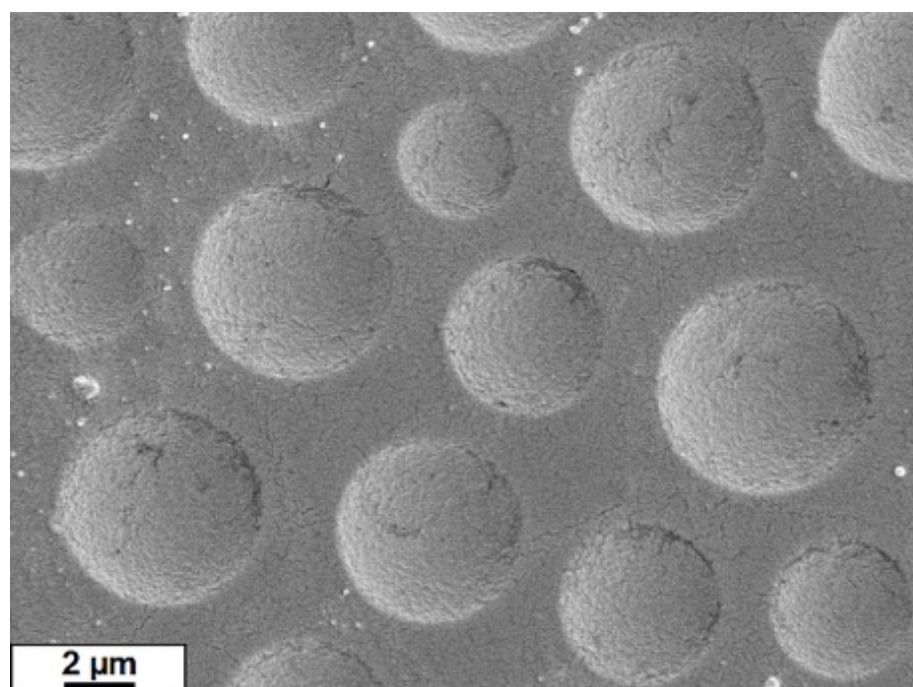


Figura 80. Micrografia de MEV do **PLA.CI.0500** (barra de escala = 2 µm).

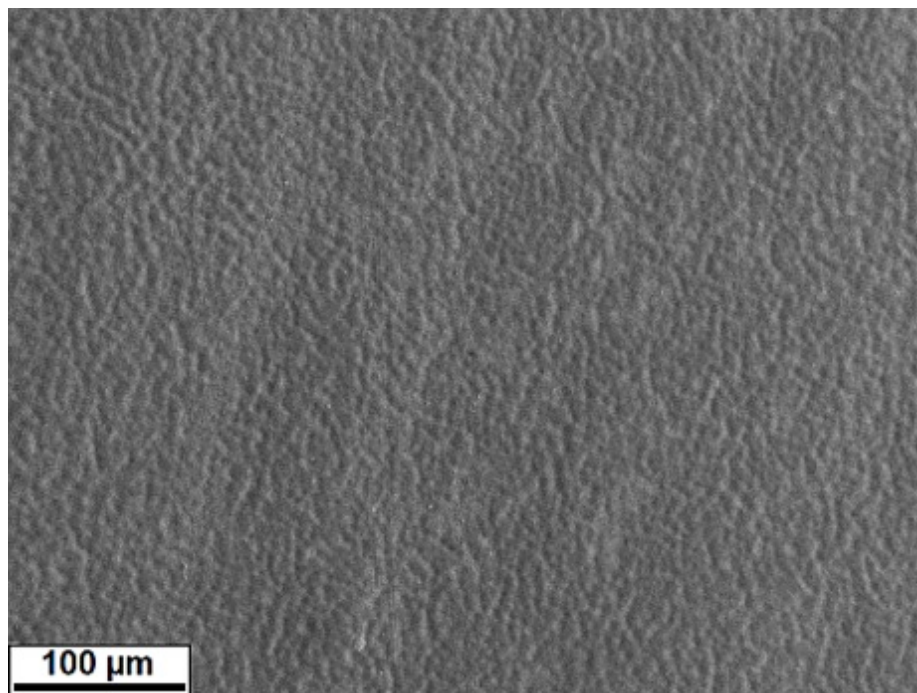


Figura 81. Micrografia de MEV do **PLA.CI.2000** (barra de escala = 100 μm).

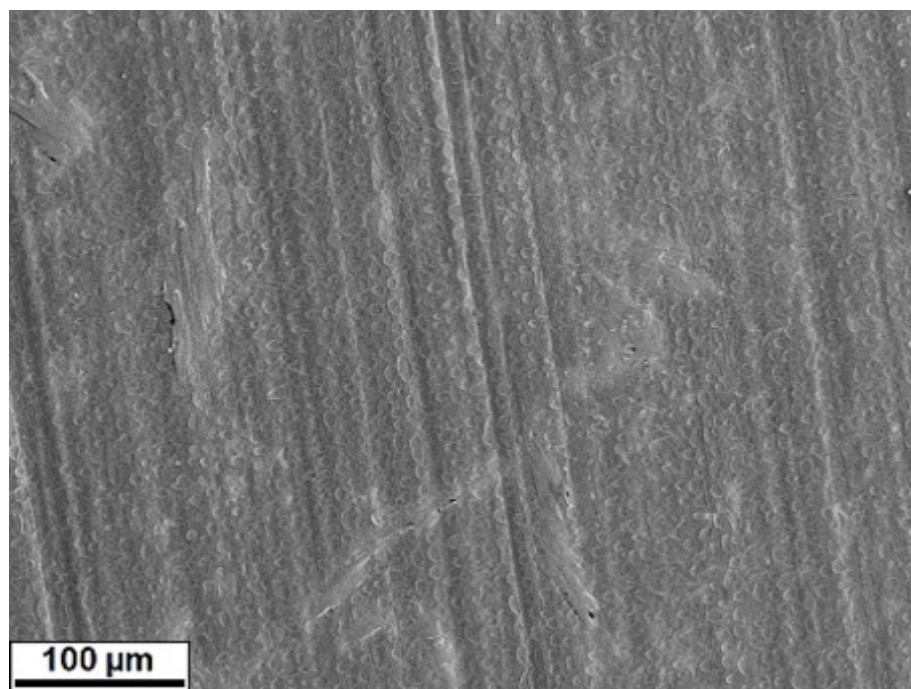


Figura 82. Micrografia de MEV do **PLA.CI.5000** (barra de escala = 100 μm).

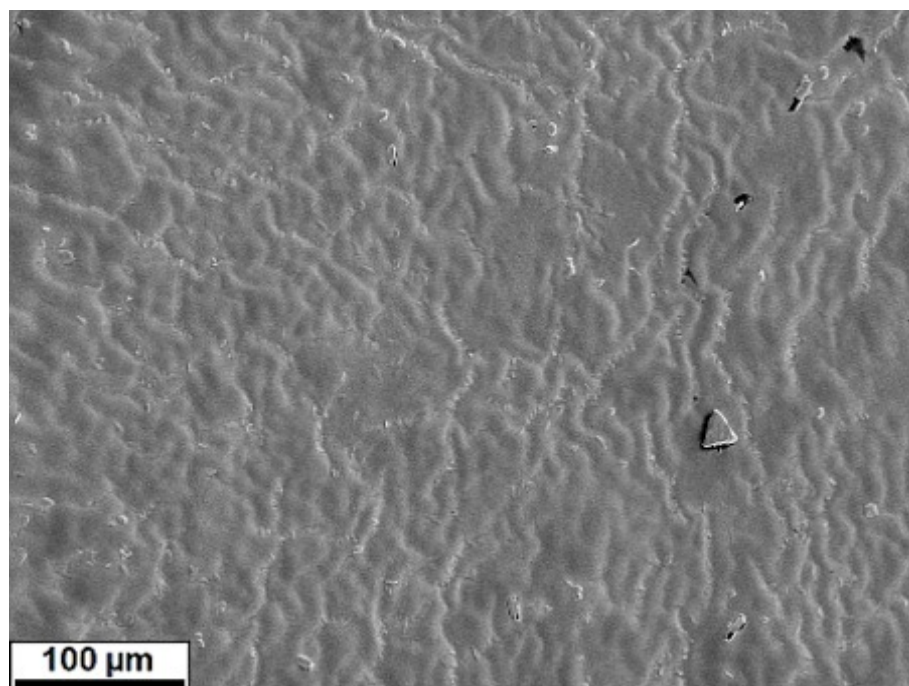


Figura 83. Micrografia de MEV do **PLA.CI.10000** (barra de escala = 100 μm).

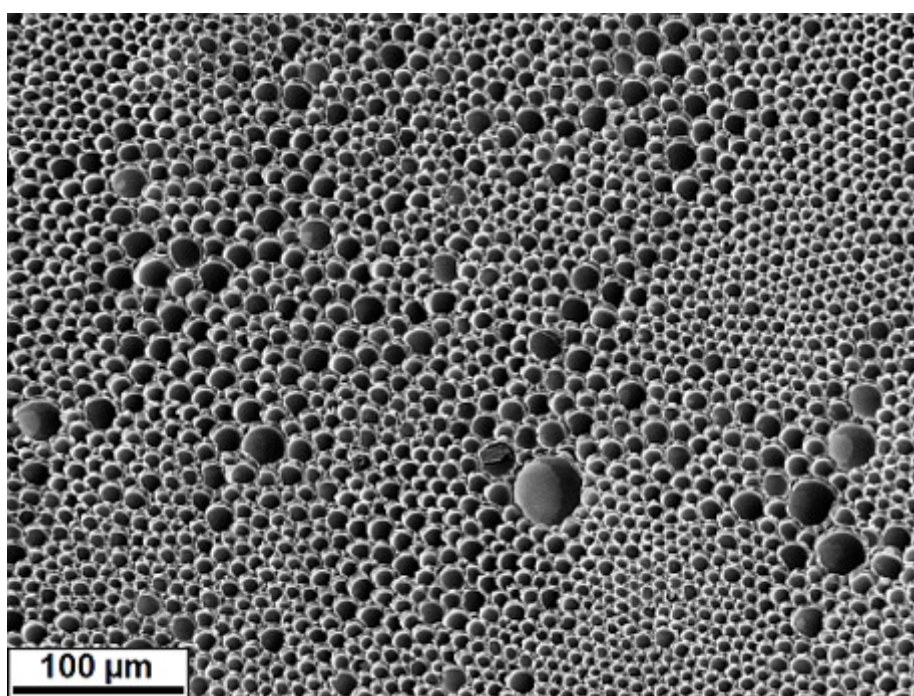


Figura 84. Micrografia de MEV do **PLA.MeS.0250** (barra de escala = 100 μm).

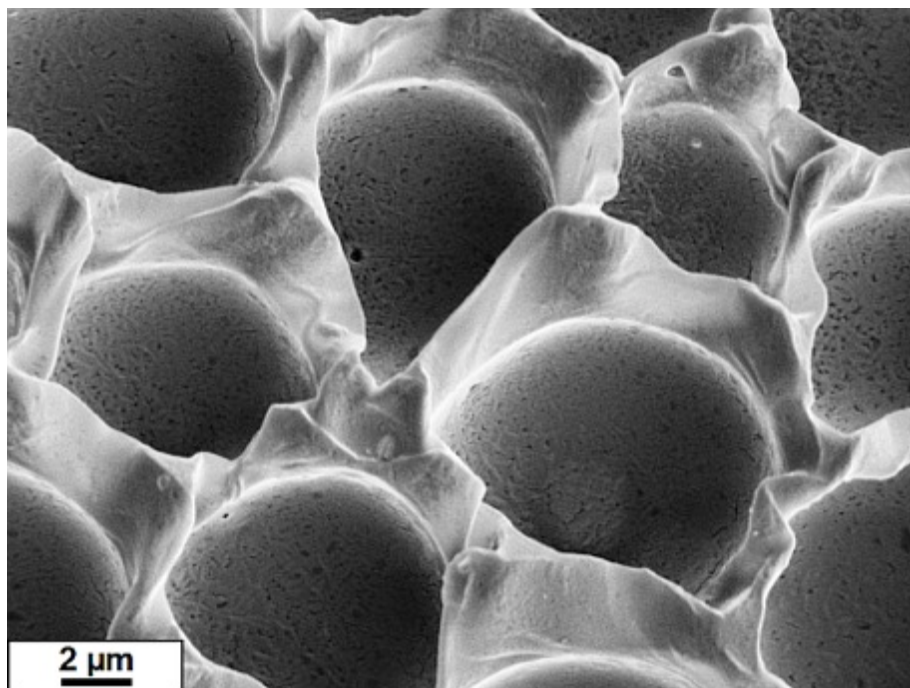


Figura 85. Micrografia de MEV do **PLA.MeS.0250** (barra de escala = 2 µm).

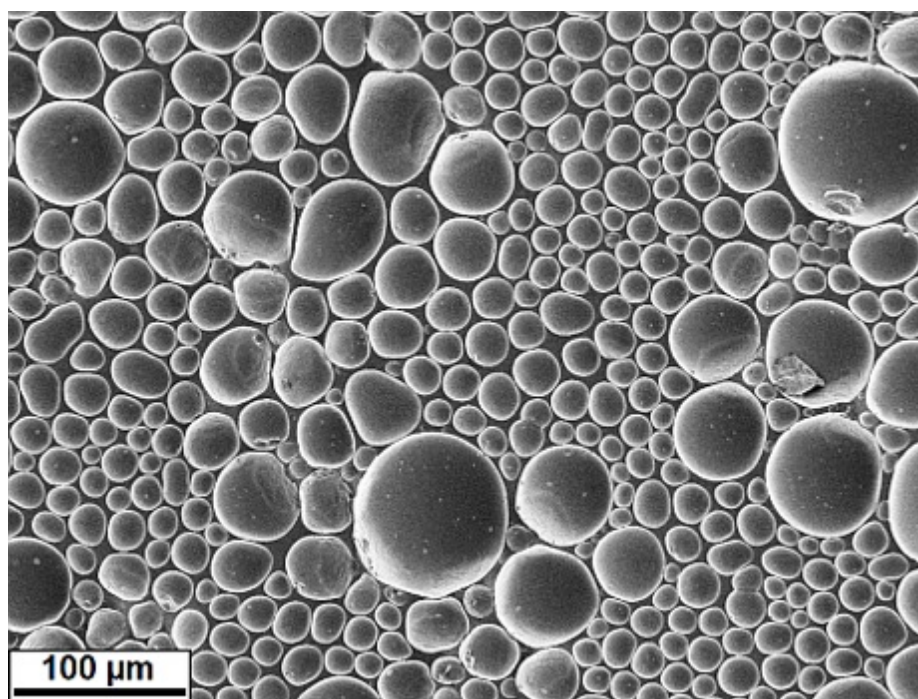


Figura 86. Micrografia de MEV do **PLA.MeS.0500** (barra de escala = 100 µm).

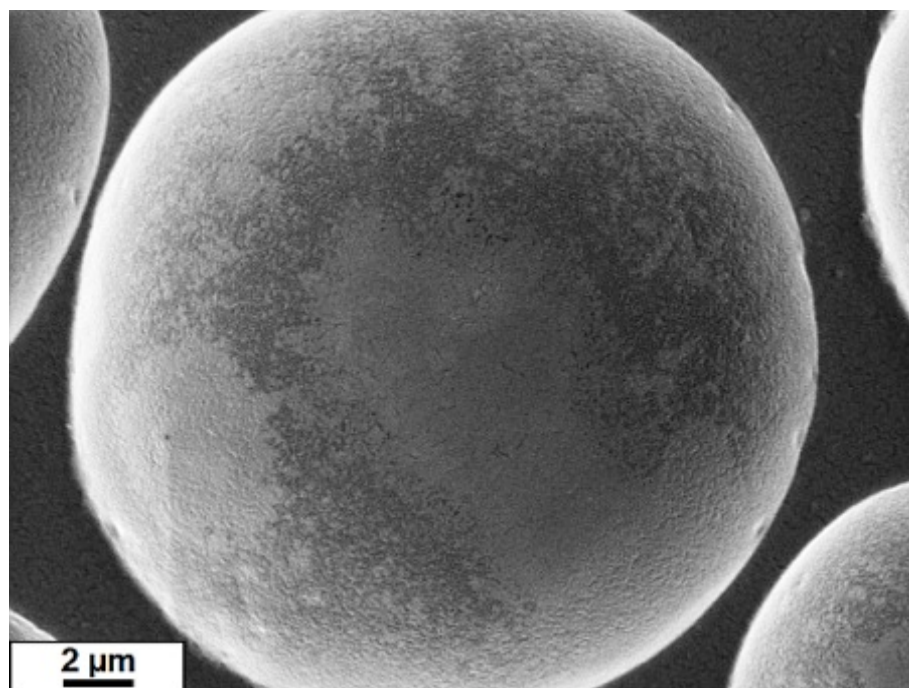


Figura 87. Micrografia de MEV do **PLA.MeS.0250** (barra de escala = 100 µm).

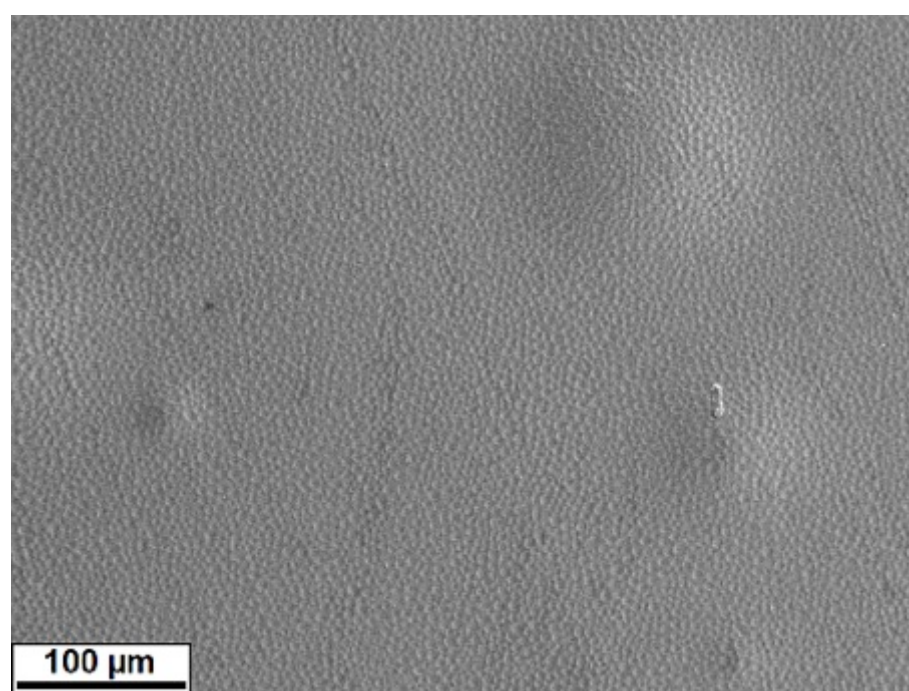


Figura 88. Micrografia de MEV do **PLA.MeS.2000** (barra de escala = 100 µm).

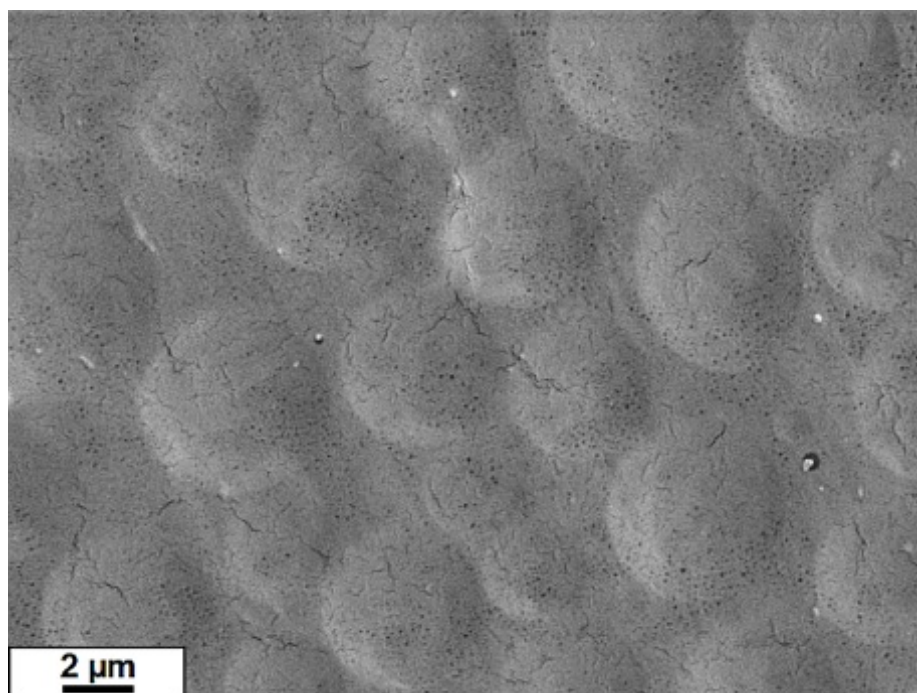


Figura 89. Micrografia de MEV do **PLA.MeS.2000** (barra de escala = 2 μm).

9.3 Anexo III – Curvas de DSC dos Biomateriais

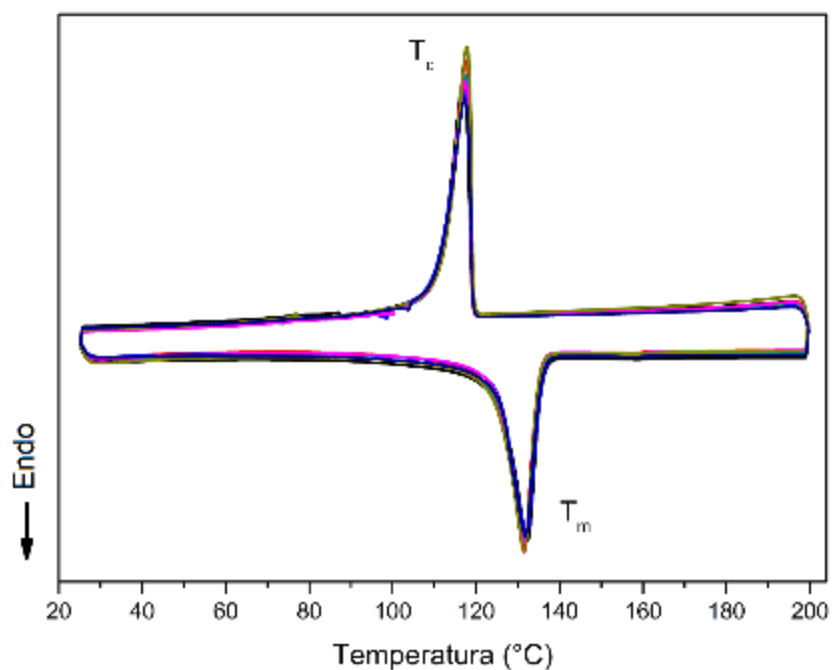


Figura 90. Curvas de DSC: **PEAD** (linha preta), **PEAD.CI.0125** (linha vermelha); **PEAD.MeS.0125** (linha azul); **PEAD.CI.0250** (linha verde); **PEAD.MeS.0250** (linha rosa); **PEAD.CI.0500** (linha amarela escura) e **PEAD.MeS.0500** (linha azul marinho).

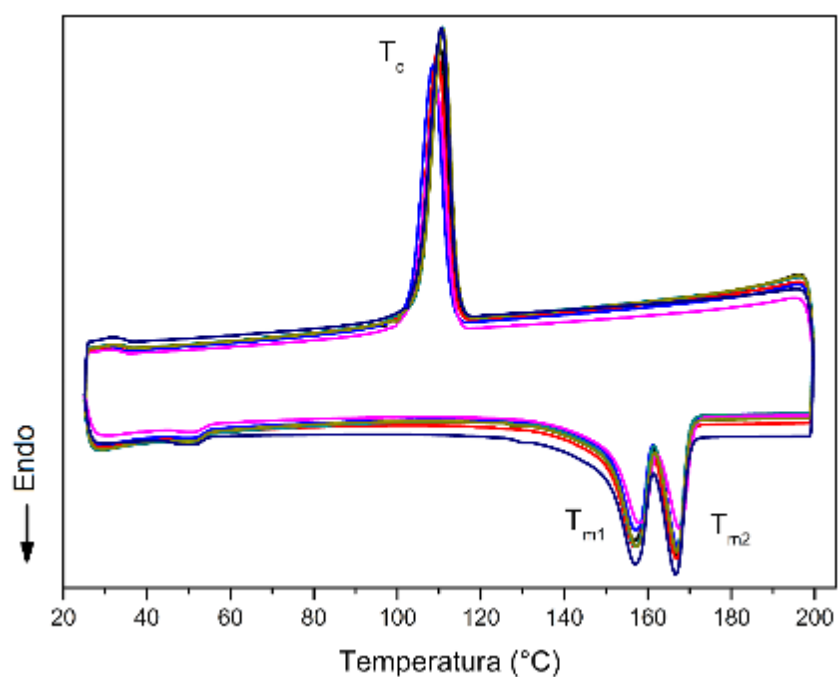
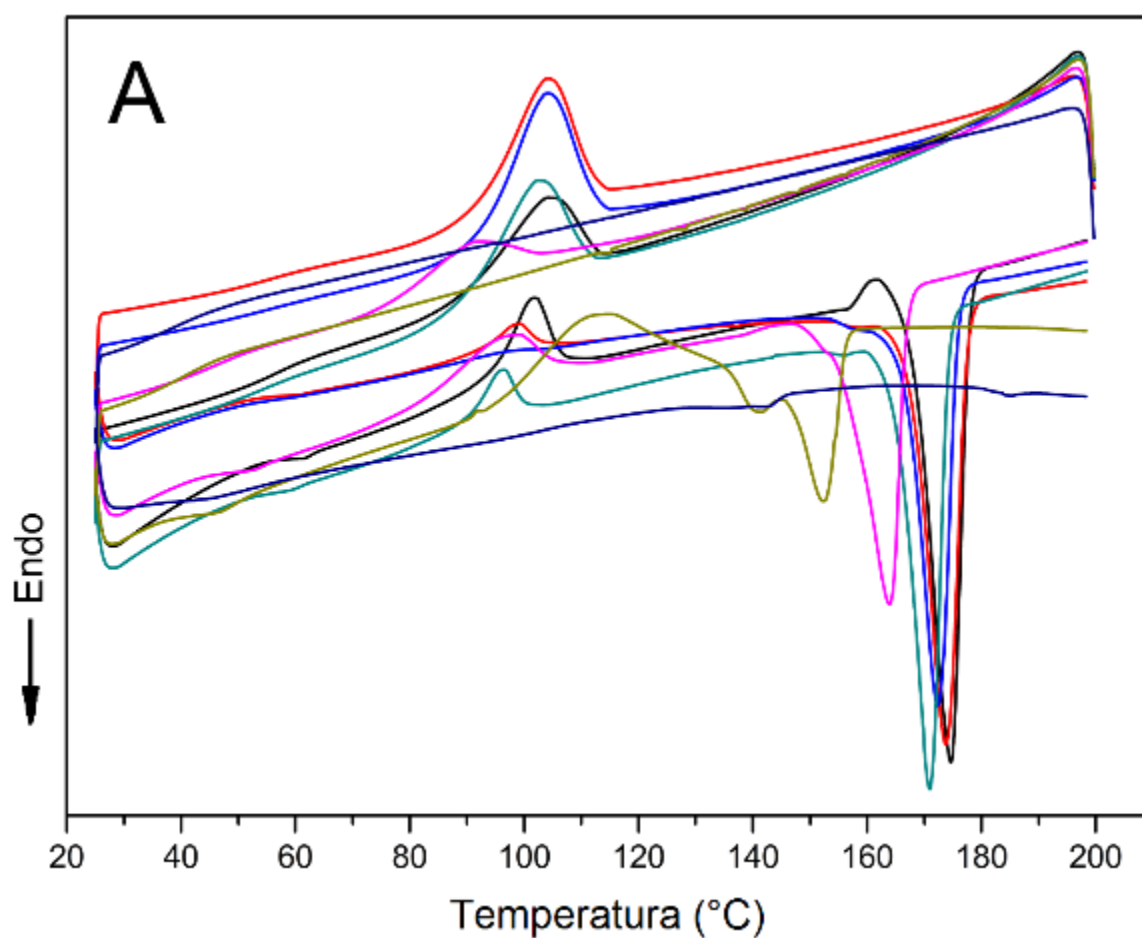


Figura 91. Curvas de DSC: **PHB** (linha preta), **PHB.CI.0125** (linha vermelha); **PHB.MeS.0125** (linha azul); **PHB.CI.0250** (linha verde); **PHB.MeS.0250** (linha rosa); **PHB.CI.0500** (linha amarela escura) e **PHB.MeS.0500** (linha azul marinho).



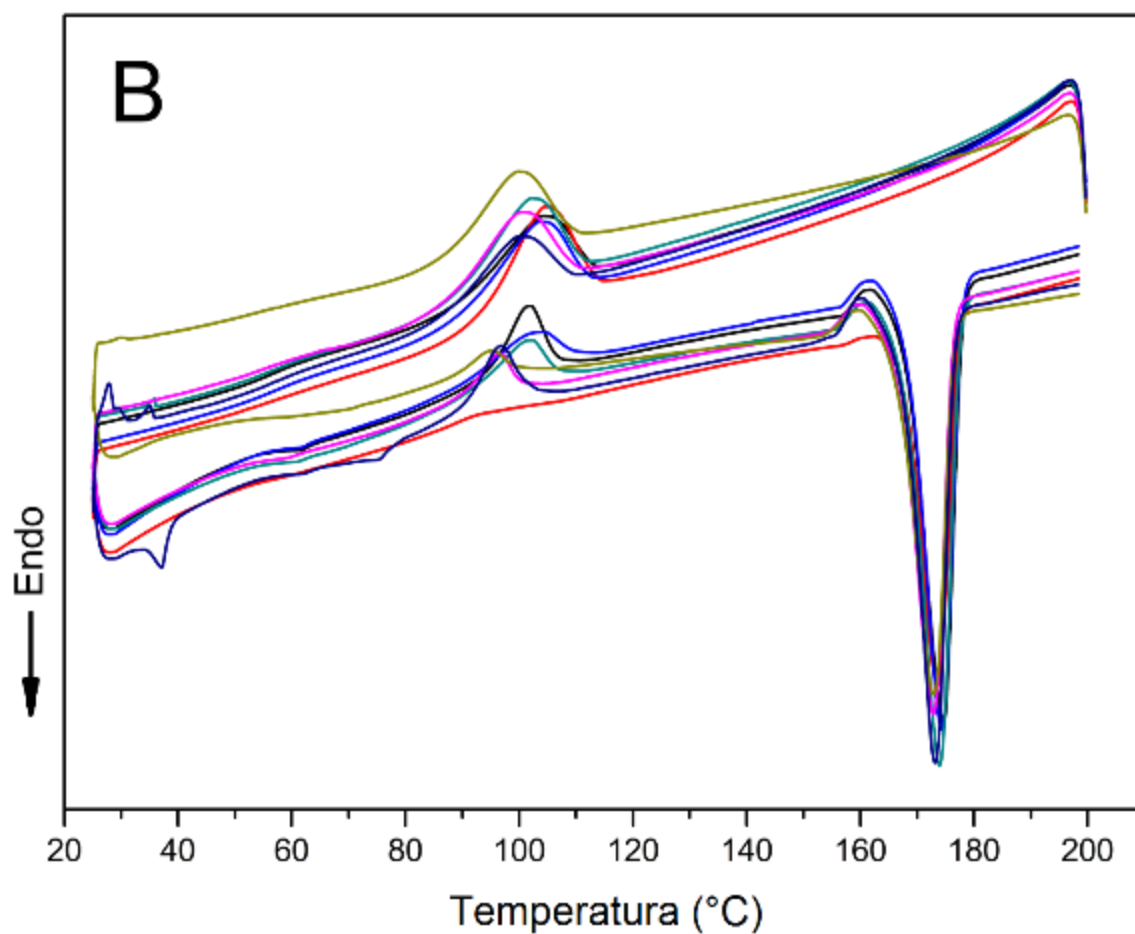


Figura 92. Curvas de DSC das amostras de PLA com (A) $C_{16}MimCl$: PLA (linha preta), PLA.CI.0125 (linha vermelha); PLA.CI.0250 (linha azul); PLA.CI.0500 (linha ciano escuro); PLA.CI.2000 (linha rosa); PLA.CI.5000 (linha amarela escura) e PLA.CI.10000 (linha azul marinho); e (B) com $C_{16}MimMeS$: PLA (linha preta), PLA.MeS.0125 (linha vermelha); PLA.MeS.0250 (linha azul); PLA.MeS.0500 (linha ciano escuro); PLA.MeS.2000 (linha rosa); PLA.MeS.5000 (linha amarela escura) e PLA.MeS.10000 (linha azul marinho).

9.4 Anexo IV – Curvas de ATG dos Biomateriais

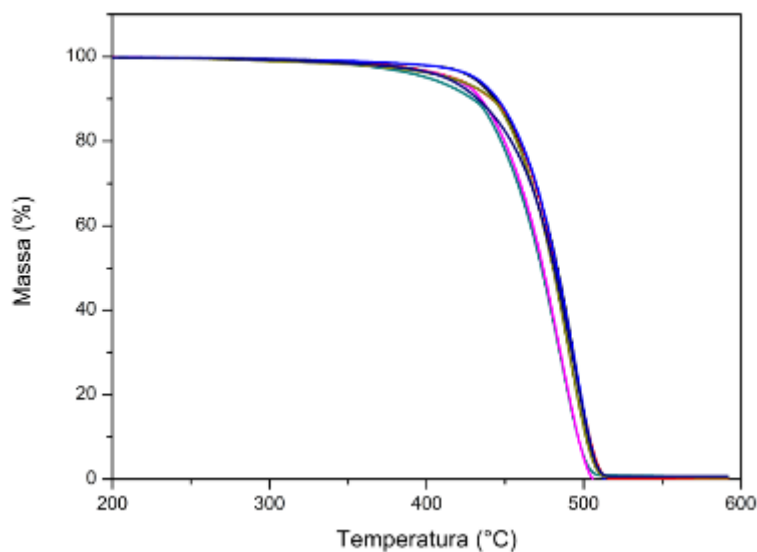


Figura 93. Curvas de ATG: **PEAD** (linha preta), **PEAD.CI.0125** (linha vermelha); **PEAD.MeS.0125** (linha azul); **PEAD.CI.0250** (linha verde); **PEAD.MeS.0250** (linha rosa); **PEAD.CI.0500** (linha amarela escura) e **PEAD.MeS.0500** (linha azul marinho).

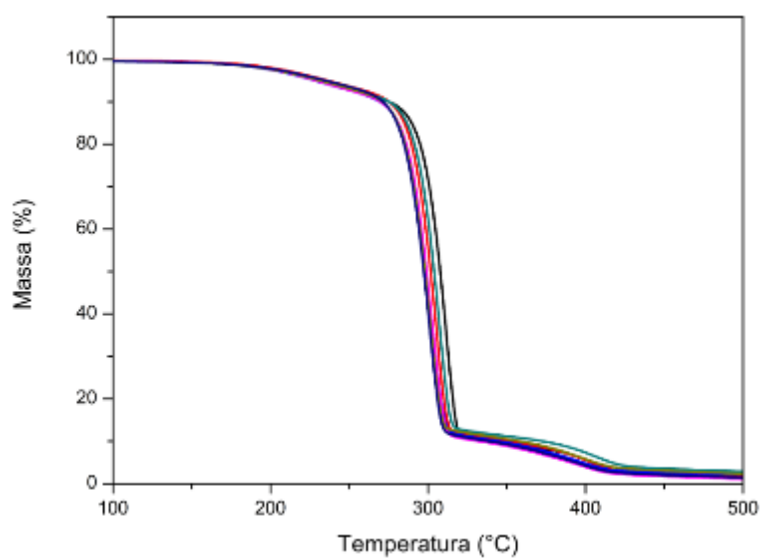


Figura 94. Curvas de ATG: **PHB** (linha preta), **PHB.CI.0125** (linha vermelha); **PHB.MeS.0125** (linha azul); **PHB.CI.0250** (linha verde); **PHB.MeS.0250** (linha rosa); **PHB.CI.0500** (linha amarela escura) e **PHB.MeS.0500** (linha azul marinho).

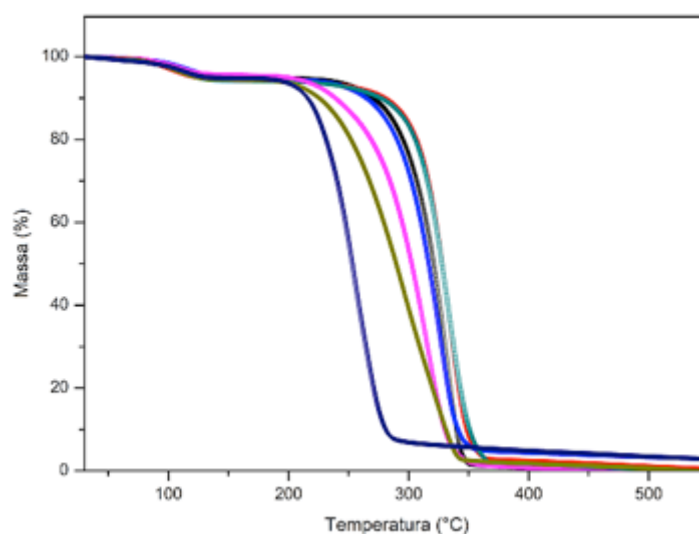


Figura 95. Curvas de ATG das amostras de PLA com $C_{16}MimCl$: **PLA** (linha preta), **PLA.CI.0125** (linha vermelha); **PLA.CI.0250** (linha azul); **PLA.CI.0500** (linha ciano escuro); **PLA.CI.2000** (linha rosa); **PLA.CI.5000** (linha amarela escura) e **PLA.CI.10000** (linha azul marinho).

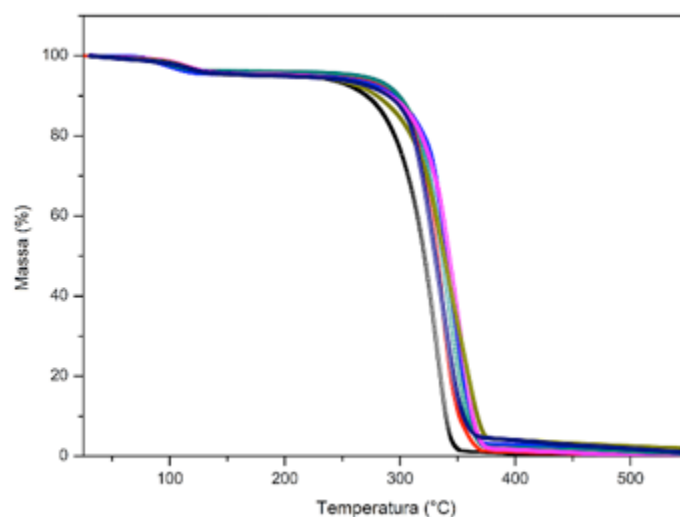


Figura 96. Curvas de ATG das amostras de PLA com $C_{16}MimMeS$: **PLA** (linha preta), **PLA.MeS.0125** (linha vermelha); **PLA.MeS.0250** (linha azul); **PLA.MeS.0500** (linha ciano escuro); **PLA.MeS.2000** (linha rosa); **PLA.MeS.5000** (linha amarela escura) e **PLA.MeS.10000** (linha azul marinho).

9.5 Anexo V – Análises de ADM dos Biomateriais

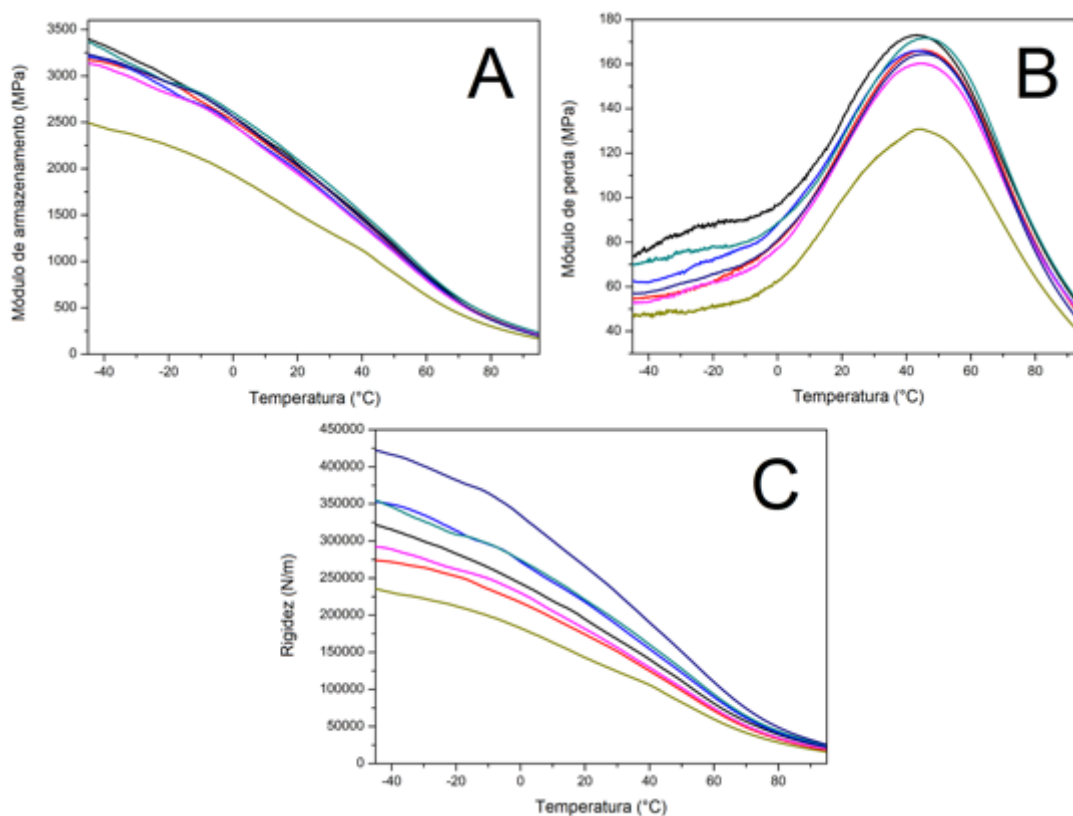


Figura 97. Módulo de armazenamento (A), módulo de perda (B) e rigidez (C): **PEAD** (linha preta); **PEAD.CI.0125** (linha vermelha); **PEAD.MeS.0125** (linha azul); **PEAD.CI.0250** (linha ciano escuro); **PEAD.MeS.0250** (linha rosa); **PEAD.CI.0500** (linha amarelo escuro) e **PEAD.MeS.0500** (linha azul marinho).

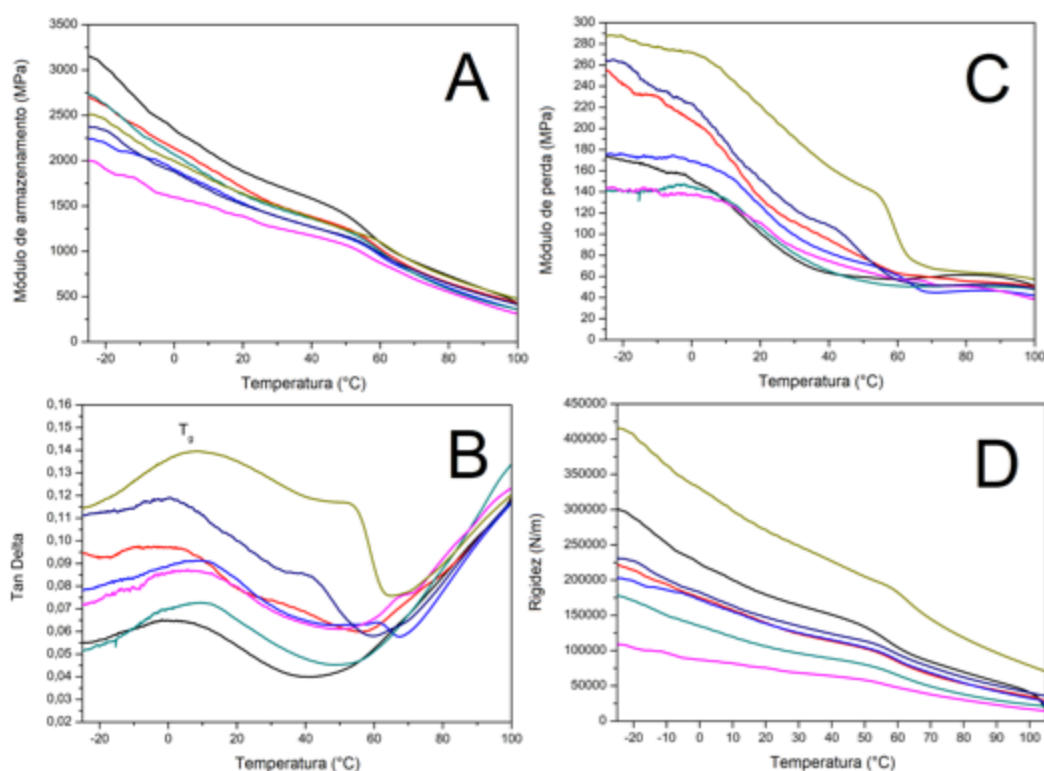


Figura 98. Módulo de armazenamento (A), tan delta (B), módulo de perda (C) e rigidez (D): **PHB** (linha preta); **PHB.CI.0125** (linha vermelha); **PHB.MeS.0125** (linha azul); **PHB.CI.0250** (linha ciano escuro); **PHB.MeS.0250** (linha rosa); **PHB.CI.0500** (linha amarelo escuro) e **PHB.MeS.0500** (linha azul marinho).

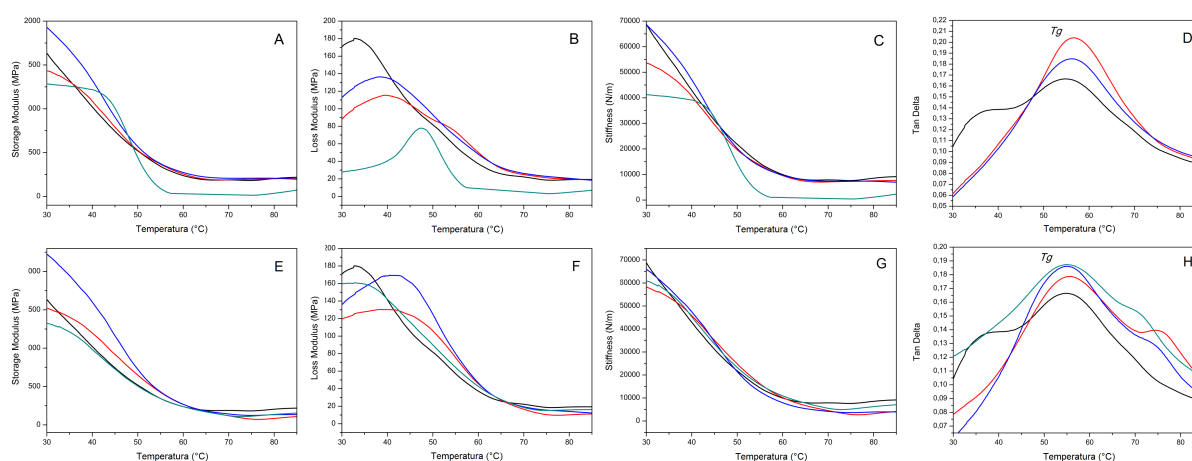


Figura 99. Módulo de armazenamento (A e D), módulo de perda (B e E) e rigidez (C e F): A-C: **PLA** (linha preta); **PLA.CI.2000** (linha vermelha); **PLA.CI.5000** (linha azul) e **PLA.CI.10000** (linha ciano escuro). D-F: **PLA** (linha preta); **PLA.MeS.2000** (linha vermelha); **PLA.MeS.5000** (linha azul) e **PLA.MeS.10000** (linha ciano escuro).