

Universidade Federal de Pelotas

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais



Projeto de Dissertação

Desenvolvimento de nanocompósitos de matriz polimérica biodegradável a base de agar reforçados com *nanofillers* de dióxido de titânio ou hidroxiapatita

Viviane Coelho Duarte

Pelotas, 2013

Desenvolvimento de nanocompósitos de matriz polimérica biodegradável a base de agar reforçados com *nanofillers* de dióxido de titânio ou hidroxiapatita

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Área de Concentração Materiais Nanoestruturados, da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño

Co-Orientador: Prof. Dr. César O. Avellaneda

Pelotas, 2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Neftalí L. Villarreal Carreño (orientador) UFPel – Eng. de Materiais

Prof. Dr. César O. Avellaneda (co-orientador) UFPel - Eng de Materiais

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund, UFPel – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Patrícia Diaz de Oliveira, UFPel – Eng. de Materiais

Suplente:

Prof. Dr. Margarete Osório, UFPel – Eng. de Materiais

Dedico este trabalho....

Para honra e para a glória de Deus, minha fonte de vida e inspiração;

A minha pequena Julia, minha fonte inesgotável de motivação.

Agradecimentos

Nem sei por onde começar, tantas pessoas foram importantes, fundamentais, para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me deu a vida e renovou minhas esperanças quando eu já não mais acreditava que fosse possível recomeçar.

Em segundo lugar, a minha amiga Luciana Azevedo dos Santos, que me incentivou a me inscrever para seleção de mestrado, nunca vou esquecer este “anjo”.

A CAPES, AO CNPq e FINEP pelo aporte financeiro que permitiu que toda a minha pesquisa fosse desenvolvida.

A coordenação do PPGCEM, na figura do professor Dr. Sérgio Cava, por todo o apoio recebido.

Ao meu orientador, professor Dr. Neftalí Carreño, pela confiança depositada, pelo apoio, e por muitas vezes ter me deixado quebrar a cabeça, com certeza isso me fez crescer e entender melhor o sentido da palavra “pesquisa”.

Ao professor Dr. César Avellaneda por me co-orientar, e por ter me adotado na ausência do meu orientador.

A laboratorista da Faculdade de Engenharia de Materiais, Juliana, pelo auxílio com os materiais.

A colega e amiga Ananda Barbosa, pela amizade, colaboração e ajuda, por dividir comigo as dúvidas, as ansiedades, as dificuldades, mas principalmente as conquistas.

Aos meus bolsistas de IC, Gabriele Link e Igor Cherubin, pela ajuda no laboratório e nos ensaios mecânicos.

Meu profundo muito obrigada a Fernanda Nedel, pela ajuda e pela lição de humildade e amizade; e ao professor Flávio Demarco que permitiu os ensaios de citotoxicidade.

Agradeço, também, a Sônia Peralta por sua pronta disponibilidade em nos ajudar nos ensaios microbiológicos, e ao professor Rafael Lund por permitir que os ensaios fossem realizados no laboratório de microbiologia da faculdade de odontologia da UFPel.

A laboratorista da microbiologia, a querida Carmem, que foi uma mãezona durante o período em que estive fazendo os ensaios microbiológicos.

A minha amiga Carol Freitas que levou minhas amostras para o Reino Unido e as enviou gentilmente ao professor Neftalí em Guildford/Suurrey.

A minha família pelo apoio e incentivo, principalmente ao meu pai e a minhas irmãs.

Agradeço a minha pequena Julia, que foi muito paciente e compreensiva todas as vezes que eu deixei de “brincar” para escrever.

A todos os que eu citei o meu sincero muito obrigada e, se eu deixei de citar alguém, por favor, me perdoem, é muito difícil escrever agradecimentos, prefiro fazer isso pessoalmente.

“Esperei com paciência pelo Senhor, e ele se inclinou
para mim e ouviu o meu clamor.”

Salmos 40:1

Resumo

Duarte, Viviane Coelho. **Desenvolvimento de nanocompósitos de matriz polimérica biodegradável a base de agar reforçados com *nanofillers* de dióxido de titânio ou hidroxiapatita.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As tendências mundiais para o avanço científico no desenvolvimento de novos materiais destacam a importância da utilização de fontes renováveis como matéria-prima. No presente trabalho o objetivo foi desenvolver nanocompósitos de matriz biodegradável a base de agar, reforçados com diferentes concentrações de *nanofillers* de TiO_2 e HA, encontrando composições que apresentem propriedades mecânicas e biológicas que possibilitem a aplicação biotecnológica destes materiais. Resinas precursoras previamente sintetizadas a base do cátion Ti foram preparadas por intermédio do método dos precursores poliméricos (baseado na modificação do método *Pechini*). De forma análoga foi obtida a resina precursora de HA, que posteriormente foram depositadas sobre membranas microporosas (diâmetro de poro 0,2 μm), por intermédio de uma técnica de *Spin Coating*. Em seguida o material foi submetido a tratamento térmico por duas horas a 600 °C para o TiO_2 e 800 °C para HA. O material resultante após tratamento térmico teve sua superfície modificada adicionando-se álcool etílico, TEOS e ácido acético, que posteriormente foram evaporados em estufa (processo de silanização). As partículas obtidas foram dispersas num volume de água destilada equivalente para dissolução total do agar, em aparelho de ultrassom, e utilizando concentrações de 0,5 %, 1 % e 2 % de partícula de cada material para obtenção dos diferentes nanocompósitos. Ao material disperso foi adicionado o agar, permanecendo sob agitação e aquecimento até 100 °C, então se acrescentou o sorbitol e glutaraldeído, agentes plastificantes e reticulante, respectivamente. O material resultante foi vertido sobre a placa molde, permanecendo em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente. Os nanocompósitos resultantes, bem como o material polimérico e os *nanofillers* foram caracterizados por MEV e espectroscopia Ramam, as quais confirmam a presença das estruturas formadas pelo TiO_2 e HA na matriz polimérica, bem como suas dimensões nanométricas. Os nanocompósitos, bem como os *nanofillers*, foram submetidos a ensaios de citotoxicidade, onde se constatou que os materiais não promovem a inibição do crescimento celular, não manifestando citotoxicidade quando comparados ao grupo controle composto pelo meio de crescimento celular. A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada através do teste de difusão em agar e difusão ao longo do tempo por 2 e 5 dias, apontando atividade antimicrobiana para o nanocompósito com *nanofillers* de HA. Ensaio mecânicos demonstraram aumento significativo no módulo de elasticidade dos materiais compósitos em relação a matriz controle formada pelo filme de agar. Os dados obtidos nos diferentes ensaios foram submetidos à análise estatística através de two-way ANOVA e teste de Tukey; t test, ANOVA e teste complementar de Student-Newman-Keuls e one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde $p < 0,05$ em todos os casos, respectivamente.

Palavras chave: Nanocompósito. Matriz polimérica biodegradável. agar. *Nanofiller*.

Abstract

Duarte, Viviane Coelho. **Development of biodegradable polymeric matrix nanocomposites agar based reinforced with nanofillers of titanium dioxide or hydroxyapatite.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Global trends to scientific advance in the development of new materials highlight the importance of using renewable raw materials. In this study the objective was to develop a biodegradable matrix nanocomposites agar based reinforced with different concentrations of TiO_2 and HA nanofillers, finding compositions that present mechanical and biological properties that allow the biotechnological application of these materials. Resins precursors previously synthesized with Ti cation were prepared through the polymeric precursor method (based on the modification of the Pechini method). Analogously resin precursor was obtained HA were subsequently deposited onto microporous membranes (pore diameter $0.2\ \mu\text{m}$) by means of a spin coating technique. Then, the material was subjected to heat treatment for two hours at $600\ ^\circ\text{C}$ to TiO_2 and $800\ ^\circ\text{C}$ to HA. The resulting material after heat treatment had its surface modified by adding ethyl alcohol, tetraethoxysilane and acetic acid, which were subsequently evaporated in the oven (silanization process). The particles obtained were dispersed in an equal volume of distilled water to complete dissolution of the agar in ultrasound device and using concentrations of % 0.5, 1 and 2 of each material particle for obtaining the various nanocomposites. Dispersed material was added to the agar, remaining under stirring and heating to $100\ ^\circ\text{C}$. Then it was added the sorbitol and glutaraldehyde crosslinking agents and plasticizers, respectively. The resulting material was poured onto the mold plate, remaining at room temperature until complete evaporation of the solvent. The resulting nanocomposites, as well as the polymeric material and the nanofillers were characterized by SEM and Ramam spectroscopy, which confirm the presence of the structures formed by the HA and TiO_2 in the polymer matrix, as well as their nanometric dimensions. The nanocomposites as well as the nanofillers were tested for cytotoxicity, which demonstrated that the materials do not promote cell growth inhibition, not manifesting cytotoxicity when compared with a control group by means of cell growth. The antimicrobial activity of the films was evaluated by the agar diffusion test and diffusion over time for 2 and 5 days, pointing to the antimicrobial activity of HA nanocomposites with nanofillers. Mechanical testing demonstrated a significant increase in the modulus of elasticity of the composite material over the array control film formed by the agar. The data obtained in different experiments were statistically analyzed by two-way ANOVA and Tukey test, t test, ANOVA and supplementary Student-Newman-Keuls test and one-way ANOVA followed by Tukey test, where $p < 0.05$ in all cases, respectively.

Keywords: Nanocomposite. Biodegradable polymeric matrix. Agar. Nanofiller.

Lista de figuras

Figura 1 - Reações químicas envolvidas na obtenção do precursor polimérico – Método <i>Pechini</i>	26
Figura 2 - Esquema do processo aplicado na síntese dos <i>nanofillers</i> (cerâmicas porosas).	43
Figura 3 - Demonstração esquemática do processo de impregnação do substrato poroso utilizando a técnica de <i>Spin coating</i> .	47
Figura 4 - Demonstração esquemática do crescimento das estruturas porosas sobre o substrato durante tratamento térmico.	48
Figura 5 - Esquema do processo aplicado na síntese do polímero a base de agar.	48
Figura 6 - Filme à base de agar após evaporação do solvente.	50
Figura 7 - Esquema do processo aplicado na síntese dos nanocompósitos de matriz polimérica a base de Agar.	51
Figura 8 - Corpo de prova conforme estabelecido nas normas ASTM D 638 e ISO 527-1.	56
Figura 9 - Corte do corpo de prova em molde confeccionado de acordo com as normas ASTM D 638 e ISO 527-1 e ensaio de tração.	57
Figura 10 - Esquema do método experimental para avaliação da atividade antibacteriana pelo teste de difusão em agar.	61
Figura 11 - Demonstração esquemática da disposição dos corpos de prova no teste de difusão em ágar, onde o polímero de ágar foi considerado como controle.	61
Figura 12 - Micrografias por SEM de <i>nanofillers</i> (a) dióxido de titânio e (b) HA.	67
Figura 13 - Micrografias por SEM do polímero a base de ágar e dos nanocompósitos com 2%, 1% e 0,5 de <i>nanofillers</i> de TiO ₂ e HA, respectivamente.	68
Figura 14 - Espetros Raman dos nanofillers de TiO ₂ e HA, respectivamente.	69
Figura 15 - Análise estatística dos diferentes grupos de materiais, revisada a igualdade de variância e a distribuição normal, sendo os dados transformados em log ₁₀ . Valores identificados por letras minúsculas semelhantes não foram significativamente diferentes (p> 0,05).	71
Figura 16 - Amostras dos nanocompósitos de TiO ₂ e HA submetidos ao teste de difusão em ágar.	74
Figura 17 - Placas de diluição seriada, após incubação durante 24 h a 37 °C para a contagem de colônias bacterianas.	76

Figura 18 - Comparação entre os dois grupos após 48 h de exposição (n = 9) pela média da contagem de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p> 0,05). 76

Figura 19 - Comparação entre os dois grupos após a exposição a 120 h (n = 9) pela média da contagem de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p> 0,05). 77

Figura 20 - Análise comparativa do grupo HA após a exposição ao longo do tempo de 48 e 120 horas (n = 9) pelas médias da contagem de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p> 0,05). 77

Figura 21 - Análise comparativa do grupo TiO₂ após a exposição ao longo do tempo de 48 e 120 horas (n = 9) pelas médias das contagens de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p> 0,05). 78

Figura 22 - Efeito de partículas de TiO₂ e HA na inibição da linhagem celular NIH/3T3 exposto a 24 e 48 h. Os dados estão expressos como médias ± SEM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre o tipo de partículas e letras minúsculas indicam diferenças significativas no período de tempo testado. Teste de Tukey (p <0,05). 79

Figura 23 - Efeito de nanocompósitos de TiO₂ e HA na inibição da linhagem celular NIH/3T3 após a exposição do material a meio de crescimento de células durante 24 h e 72 h. Os dados estão expressos como médias ± SEM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre o tipo de partículas e letras minúsculas indicam diferenças significativas nas concentrações utilizadas. Teste de Tukey (p <0,05). 81

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Reagentes utilizados na obtenção da resina de hidroxiapatita.....	44
Tabela 2 - Reagentes utilizados na obtenção da resina de dióxido de titânio.	46
Tabela 3 - Reagentes utilizados na obtenção do polímero a base de agar.....	49
Tabela 4 - Reagentes utilizados na obtenção do nanocompósito a base de agar.	52
Tabela 5 - Ensaio de tração em polímero a base de ágar e compósitos a base de ágar com 0,5%, 1% e 2% de nanofillers de TiO_2 e HA – Valores médios absolutos.....	72

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ácido desoxirribonucleico - DNA

Ácido ribonucleico – RNA

Centímetros - cm

Dióxido de carbono - CO₂

Dióxido de titânio - TiO₂

Eletro volt - eV

Etilenoglicol – EG

Gramas - g

Graus Célsius - °C

Hidroxiapatita - [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] - HA

Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco - DMEM

Metano - CH₄

Metro – m

Microlitro - µL

Micrometro - µm

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV (SEM)

Mililitro – mL

Milímetro - mm

Minuto - min

Nanômetro - nm

Newton - N

Ortosilicato de tetraetila - TEOS

Óxido de alumínio - Al₂O₃

Óxido de cobre II - CuO

Óxido de ferro III- Fe₂O₃

Óxido de silício - SiO₂

Óxido de zinco – ZnO

Pico ampere - pA

Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) - PLGA

Poli (cloreto de vinila) – PVC

Poli (tereftalato de etileno) - PET

Poliestireno – PS

Polietileno – PE

Polipropileno – PP

Radiação Ultra Violeta - UV

Rotações por Minuto - rpm

Soro Fetal Bovino - FBS

Tonelada – t

Trypticase Soy Agar – TSA

Trypticase Soy Broth - TSB

Water-Soluble tetrazolium salt - WST1

Sumário

1 Introdução	15
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 Revisão de Literatura	20
3.1 Nanotecnologia	20
3.1.2 Métodos de Síntese de Materiais Nanoparticulados	24
3.1.3 Precursor Polimérico - Método <i>Pechini</i>	24
3.1.4 Dióxido de Titânio – TiO_2	26
3.1.5 Hidroxiapatita - $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$	29
3.2.2 Método da Réplica	32
3.3 Materiais Compósitos	33
3.3.1 Compósitos de Matriz Polimérica	34
3.4 Biopolímeros	37
3.4.1 Agar.....	39
4 Material e Métodos.....	43
4.1 Síntese dos Nanofillers - Cerâmicas Porosas	43
4.1.1 Obtenção das Resinas Precursoras	43
4.1.2 Impregnação do Substrato Poroso	46
4.1.3 Tratamento Térmico	47
4.2. Síntese do Polímero a Base de agar.....	48
4.3 Síntese dos Nanocompósitos de Matriz Polimérica a Base de agar	50
4.4. Técnicas de Caracterização	53
4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	53
4.4.2 Espectroscopia Raman	54

4.4.3 Resistência Mecânica.....	54
4.4.4 Atividade Antimicrobiana	57
4.4.5 Citotoxicidade do Material.....	63
4.4.6 Análise dos Dados	64
5 Resultados e Discussão	66
5.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura	66
5.3 Resistência Mecânica	69
5.4 Atividade Antimicrobiana.....	72
5.4.1 Eficiência da esterilização do material.....	72
5.4.2 Teste de Difusão em Agar.....	73
5.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos polímeros ao longo do tempo por contagem microbiana	74
5.5 Citotoxicidade do Material.....	78
5.5.1 Citotoxicidade dos Nanofillers.....	78
5.5.2 Determinação da citotoxicidade dos filmes	80
6 Conclusões.....	82
7 Fontes de Financiamento	83
8 Cronograma de execução	84
9 Referências Bibliográficas	85

1 Introdução

A poluição ambiental causada pelos polímeros sintéticos assumiu proporções gigantescas, com isso, tentativas para resolver estes problemas têm sido feitas, o que inclui a biodegradabilidade em polímeros por meio de pequenas modificações de suas estruturas (CHANDRA; RUSTIGI, 1998). Uma das alternativas destas modificações pode ser a incorporação de óxidos. Estudos sugerem a degradação do polietileno de alta densidade com a incorporação de aditivos prodegradantes que levam a fragmentação e perda de propriedades mecânicas em níveis satisfatórios (DALMOLIN; OJEDA; CAMARGO, 2006).

Entretanto, sabe-se que os polímeros sintéticos são muito resistentes a degradação natural, daí seu acúmulo cada vez mais crescente no meio ambiente (FU, 2001). Além disso, sabe-se que muitos materiais plásticos necessitam de mais de 100 anos para degradação total, tendo em vista a sua alta massa molar média, maior estabilidade e hidrofobicidade, que dificultam a ação dos microrganismos e de enzimas (PETERLIN, 1975; LEPOITTEVIN et al., 2001).

Em geral, polímeros sintéticos produzidos a partir de produtos petroquímicos têm baixas taxas de reciclagem, do total de plásticos produzidos no Brasil, somente são reciclados 15%. Esses materiais plásticos derivados do petróleo também não são facilmente degradados no ambiente (AMBIENTE BRASIL, 2012).

A preocupação com o meio ambiente e a eminência da extinção das reservas de petróleo, alavancaram nas últimas décadas o interesse pelo estudo de polímeros biodegradáveis, os quais podem ser usados como recursos renováveis, se adequando a sistemas sustentáveis e desta forma, reduzindo o volume de resíduos poliméricos sintéticos (YU; DEAN; LI, 2006).

Por outro lado, com o avanço no desenvolvimento dos nanomateriais, nanocompósitos de matriz polimérica vêm sendo estudados para que se encontrem alternativas que melhorem as propriedades dos materiais tradicionais. Além disso, as tendências mundiais para o avanço científico no desenvolvimento de novos materiais destacam a importância da utilização de fontes renováveis como matéria-prima.

A formação de nanocompósitos visa a mudança nas propriedades dando origem a novos materiais e conseqüentemente novas aplicações. Os

nanocompósitos são obtidos pela incorporação de nanocargas (*nanofillers*), tais como argila, sílica, nanotubos de carbono, entre outras, de dimensões nanométricas na matriz polimérica. Uma das vantagens dos nanocompósitos poliméricos em relação aos compósitos convencionais é que os nanocompósitos podem apresentar propriedades mecânicas e térmicas similares ou superiores aos compósitos convencionais, utilizando-se uma quantidade muito pequena de carga (*nanofiller* ou nanopartícula).

Com a evolução da tecnologia nos processos de fabricação de novos materiais houve o surgimento de diferentes tipos de nanocargas empregadas na área de polímeros. Estas proporcionam características únicas à matriz em função de seu grau de dispersão, orientação na matriz, adesão interfacial matriz-reforço, entre outras (TZONG-MING; CHENG-YANG, 2006).

Conforme a aplicação pretendida, podem ser usados diversos tipos de cargas que diferem entre si, por exemplo, nas características morfológicas ou em propriedades tais como a resistência térmica, ou reatividade química. Entre as cargas mais comuns em nanocompósitos de matriz polimérica, encontram-se os carbonatos, os sulfatos, os alumino-silicatos e os óxidos metálicos (ORIAKHI, 2000).

Um dos compostos mais utilizados na odontologia é o dióxido de titânio (TiO_2) (AKIBA et al., 2005; SHIBATA et al., 2007). Também no âmbito da aplicação biológica, o material é utilizado como camada antioxidante e biocompatível em implantes ósseos de titânio metálico (FILIP et al., 2001). O TiO_2 libera radicais livres quando ativado por luz ultravioleta, decompondo material orgânico e bactérias presentes em sua superfície. É um material inorgânico, de custo baixo, não tóxico, que apresenta estabilidade física e química (GÁLVEZ et al., 2001).

A hidroxiapatita é uma das biocerâmicas mais freqüentemente utilizadas para reconstrução óssea e dentária (RODRIGUES et al., 2003). Tem excelente compatibilidade com tecido ósseo e alta osteocondutividade (SUCHANEK; YOSHIMURA, 1998). É considerada um material bioativo que permite a osseointegração, pois forma um elo químico direto com o osso subjacente sem a formação de tecido fibroso (TEIXEIRA; VIDAL; SANTOS, 2000).

Recentemente, com relação às aplicações ambientais, sólidos inorgânicos combinados com polímeros biodegradáveis têm sido utilizados como agentes reforçadores. Estudos demonstraram que a adição de nanopartículas de óxido de

titânio em uma matriz polimérica exibe uma melhora significativa na estabilidade dimensional e térmica, especialmente quando são adicionados tamanhos menores de partículas. (ZAN et al., 2006; YANG et al., 2007; LAACHACHI et al., 2008).

Como se pode constatar, as aplicações da hidroxiapatita e do TiO_2 não se restringem somente a uma determinada área científica. Esses materiais têm grande potencialidade tecnológica e por isso sua obtenção, com qualidade aprimorada e baixo custo, bem como sua incorporação em outros materiais se faz tão necessária e é abordada em diversos estudos científicos.

Estes compósitos representam não só uma alternativa criativa para se pesquisar novos materiais, como também permitem o desenvolvimento de aplicações industriais inovadoras. As aplicações potenciais para esses materiais híbridos orgânico-inorgânico, ou seja, para nanocompósitos combinando *nanofillres* e polímeros incluem: membranas inteligentes, dispositivos fotovoltaicos, células combustíveis, fotocatalise, biosensores, dispositivos microeletrônicos inteligentes, microóptica, novos cosméticos, liberação controlada de fármacos, liberação controlada de moléculas ativas, etc.

Estes materiais, denominados nanocompósitos “*verdes*”, são uma alternativa atrativa para substituir derivados de petróleo na produção de plásticos (Ray; BOUSMINA, 2005). Esta é uma área que se encontra em crescente desenvolvimento e que busca melhorar cada vez mais os métodos de síntese para se obter nanocompósitos com uma distribuição uniforme das cargas inorgânicas na matriz polimérica e uma boa adesão na interface dos dois componentes.

Embora nanocompósitos, com partículas bem dispersas em diversas matrizes poliméricas tenham sido produzidos com graus variáveis de sucesso, as aplicações desses materiais ainda precisam ser melhor exploradas e algumas das questões fundamentais que envolvem a tecnologia dos nanocompósitos ainda precisam ser respondidas, a fim de que as propriedades e o comportamento desses materiais possam ser melhores controlados (MITTAL, 2009).

Na próxima sessão são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho. A seguir, é apresentada a revisão de literatura que deu embasamento teórico para o desenvolvimento desse trabalho, dividida em: Nanotecnologia, Cerâmicas Porosas, Materiais Compósitos e Biopolímeros. Na sequência, são detalhados os materiais e os métodos utilizados na obtenção e na

caracterização dos *nanofillers*, do polímero a base de Agar e dos nanocompósitos de matriz polimérica. Na sessão seguinte, são apresentados os resultados obtidos e, posteriormente, a conclusão do trabalho.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanocompósitos de matriz polimérica biodegradável a base de Agar reforçados com diferentes concentrações de *nanofillers* de dióxido de titânio ou hidroxiapatita, encontrando composições que apresentem propriedades mecânicas e biológicas que possibilitem a aplicação biotecnológica destes materiais.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Obter os *nanofillers* de dióxido de titânio e hidroxiapatita pela adaptação dos métodos da réplica e *template*, o filme polimérico a base de Agar e os nanocompósitos de matriz polimérica a base de Agar incorporando diferentes concentrações dos *nanofillers* em sua matriz;
- b) Caracterizar os *nanofillers* obtidos, o filme polimérico a base de Agar e os nanocompósitos através de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia Raman;
- c) Analisar a resistência mecânica do filme polimérico a base de Agar, bem como dos nanocompósitos desenvolvidos;
- d) Analisar a citotoxicidade dos *nanofillers*, do polímero e dos nanocompósitos;
- e) Realizar ensaios microbiológicos com o material polimérico e com os nanocompósitos.

3 Revisão de Literatura

3.1 Nanotecnologia

Apesar da nanotecnologia estar presente na natureza há milhares de anos, foi na década de 1950 que o físico americano Richard Feynman, em conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, sugeriu a construção e a manipulação, átomo a átomo, de objetos em escala nanométrica. Intitulada “Há mais espaços lá embaixo”, a conferência de Feynman representou uma nova concepção em nanociência e nanotecnologia. Somente mais tarde, na década de 80, com a descoberta dos fulerenos, por Kroto e, posteriormente, a síntese dos nanotubos de carbono por Iijima, os temas em nanociência e nanotecnologia, antes vistos como ficção, passaram a ser tratados com maior seriedade (KROTO et al., 1985; IIJIMA, 1991).

A nanociência e a nanotecnologia referem-se ao estudo e às aplicações tecnológicas dos materiais que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros. A alteração das propriedades de um material ao atingir a escala nanométrica se deve à combinação de dois fatores: i) as pequenas dimensões fazem os efeitos quânticos se manifestarem de maneira forte e, ii) os efeitos de superfície tornam-se pronunciados pelo aumento da razão entre área/volume (MELO; PIMENTA, 2004).

Por definição, os materiais nanoestruturados apresentam, pelo menos, uma de suas dimensões em tamanho nanométrico, ou seja, em escala 1/1.000.000.000, ou um bilionésimo do metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica (GALEMBECK; RIPPEL, 2006).

Devido ao aumento da razão entre a área e o volume do nanomaterial, os efeitos de superfície se tornam mais importantes conferindo a esses materiais características específicas para determinadas aplicações; por exemplo, um material

magnético tal como o ferro pode não se comportar como um ímã ao ser preparado sob a forma de nanopartículas, com tamanho da ordem de 10 nm. Por outro lado, as nanopartículas esféricas de sílica presentes em um material, apesar de incolores, ao assumirem arranjos cristalinos bem empacotados podem difratar a luz visível tornando-se um material colorido (TANSIL; GAO, 2006; TOMA, 2009).

Neste sentido, enquanto a nanociência busca entender a razão para essa sutil mudança de comportamento dos materiais, a nanotecnologia busca se aproveitar destas novas propriedades que surgem na escala nanométrica para desenvolver produtos e dispositivos para diferentes tipos de aplicações tecnológicas (MELO; PIMENTA, 2004).

Assim, a grande motivação para o desenvolvimento de objetos e dispositivos nanométricos reside no fato de que novas e intrigantes propriedades físicas e químicas - ausentes para o mesmo material quando de tamanho microscópico ou macroscópico - são observadas nessa nova escala (MELO; PIMENTA, 2004).

A nanotecnologia consiste essencialmente na habilidade de se trabalhar em nível atômico, molecular e macromolecular a fim de criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades e aplicações fundamentalmente novas. Os blocos de construção são os átomos e moléculas, ou um conjunto deles tais como nanopartículas, nanocamadas, nanofios ou nanotubos.

A funcionalidade, uma das características mais importantes dos nanomateriais que permite sua extensa faixa de aplicações, é a sua capacidade de executar funções específicas. O termo funcionalização, comum em nanotecnologia, refere-se à execução de algumas funções químicas ou biológicas, através da projeção e manipulação desses materiais, de forma controlada e pré-determinada (TOMA, 2009). A funcionalização de nanopartículas de ouro com biopolímeros, por exemplo, é empregada na construção de biossensores para a detecção de ácidos nucleicos e proteínas (DANIEL; ASTRUC, 2004).

Os materiais funcionalizados como os nanocristais, as nanopartículas, os nanofios, as nanofitas, os nanotubos e os nanocompósitos possuem potencial de aplicação em catálise, na síntese de colóides, em processos fotoquímicos, no desenvolvimento de sensores e dispositivos eletrônicos, em aplicações médicas, na obtenção de novos fármacos e no controle ambiental (TANSIL; GAO, 2006).

Do ponto de vista tecnológico, os nanomateriais podem ser preparados segundo uma abordagem *bottom-up* (“de baixo para cima”), construindo os materiais a partir de átomos ou moléculas individuais ou através do procedimento *top-down* (“de cima para baixo”), por meio da ruptura de uma porção maior do material em nanopartículas, fazendo-se uso das técnicas de litografia (MIZUTA; ODA, 2008).

Na abordagem *top-down* um material nanométrico pode ser obtido a partir da técnica de evaporação-condensação do material de interesse sobre uma superfície por várias etapas de corrosão química seletiva. Um exemplo é a evaporação de ouro e paládio sobre mica (RAABE et al., 2007).

No procedimento *bottom-up*, os átomos podem ser depositados sobre uma superfície regular e se auto-agruparem sobre a superfície, formando estruturas nanométricas com tamanho e características bem definidos.

O controle rigoroso de variáveis, tais como do meio reacional, temperatura de calcinação e a dispersão das espécies químicas de interesse, é considerado crítico, especialmente quando se considera o controle do tamanho de partícula (CORDENTE et al., 2001).

Os métodos mais empregados na preparação de nanopartículas metálicas são o processo sol-gel, o método de deposição-precipitação, o método de co-precipitação, o método de impregnação e o método de deposição química a vapor. O método sol-gel é baseado na hidrólise e condensação de precursores moleculares, tais como alcóxidos e íons hidroxilatos metálicos em solução aquosa. Esse processo constitui um importante meio de preparação de materiais baseados em óxidos nanoestruturados, cerâmicas nanoporosas e materiais híbridos (BOYD et al., 2005).

Dessa forma, são obtidas nanopartículas com tamanho e dispersão adequados em função das diferentes estruturas, funcionalidade e reatividade do precursor utilizado (AKOLEKAR et al., 2005).

3.1.1 Nanopartículas

Uma análise mais detalhada revela que tanto os diferentes metais quanto as cerâmicas são constituídos por um ajuntamento estrutural específico de grãos de tamanhos microscópicos e nanoscópicos. As propriedades mecânicas desses materiais são fortemente dependentes do tamanho e da disposição espacial desses grãos; como regra geral, quanto menor o tamanho dos grãos, maior pode ser a dureza do material correspondente (MELO; PIMENTA, 2004).

O desenho e a síntese de materiais nanoestruturados, com propriedades funcionais moduladas, passam pelo controle de três parâmetros: tamanho, morfologia e estruturação (SHRIVASTAVA, 2002; BURDA et al., 2005; ALAYOGLU et al., 2008).

O parâmetro tamanho das nanopartículas acarreta em elevada razão área/volume e efeitos de confinamento quântico devido à restrição de movimento dos elétrons condicionado pelo confinamento espacial. Com relação à área superficial, quando uma partícula diminui em tamanho, uma maior porção de seus átomos é encontrada na superfície. Desta forma, nanopartículas apresentam uma razão de aspecto muito maior se comparado ao sólido estendido, podendo alterar as propriedades que dependem da superfície (TRINDADE; O'BRIEN; PICKETT, 2001).

O processo de obtenção de nanomateriais consta na literatura desde 1857, quando Faraday relatou a síntese do ouro coloidal. A partir desta época, e até os dias atuais, vários métodos de preparação de nanopartículas metálicas empregadas, como catalisadores, vêm sendo desenvolvidos (KECSKES et al., 2007). Em geral, eles são métodos químicos, em especial, aqueles baseados em fenômenos de auto-montagem e auto-organização, e consideram aspectos como a qualidade, a rapidez e o custo da preparação.

O controle rigoroso de variáveis, tais como pH do meio reacional, temperatura de calcinação e a dispersão das espécies químicas de interesse, é considerado crítico, especialmente quando se considera o controle do tamanho de partícula (CORDEnte et al., 2001).

Portanto, esforços têm sido despendidos no intuito de se desenvolver métodos de síntese que possibilitem a obtenção de nanopartículas na fase cristalina desejada, com tamanho e morfologia controlados. Os principais métodos

encontrados na literatura são: sol-gel, método hidrotermal, método *Pechini* e reação de combustão (PECHINI, 1967; YANG et al., 2006; COSTA et al., 2006; FREITAS, 2008; HUSSAIN et al., 2010).

3.1.2 Métodos de Síntese de Materiais Nanoparticulados

Nas últimas décadas, a procura por um melhor desempenho em materiais com propriedades especiais, como por exemplo, materiais magnéticos e luminescentes, têm favorecido a utilização de métodos que possibilitem a formação de materiais nanoparticulados, tais como, microemulsão água em óleo (CHRISTY; VESTA; ZHANG, 2004), microondas (BENSEBAA et al., 2004), moagem mecânica (DING et al., 2000), micela reversa (PILENE, 1998), sonoquímico (HAMDAOUI et al., 2003), combustão (JIU et al., 2002), hidrólise forçada (HANH et al., 2003), coprecipitação (KIM, Y.; KIM, D.; LEE, 2003), síntese hidrotérmica (COTE et al., 2003), método complexiométrico (THANG; RIJNDERS; BLANK, 2005), pirólise (LIU et al., 2005), método *Pechini* (HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ, 2002), sol-gel (MOLCHAN et al., 2002), entre outros. Estes métodos possibilitam maior controle de alguns parâmetros, como cristalinidade, morfologia, tamanho e forma dos cristais, uniformidade granulométrica, graus de aglomeração e porosidade, etc., que podem influenciar muito as propriedades físicas e químicas das partículas.

3.1.3 Precursor Polimérico - Método *Pechini*

Também conhecido como método do precursor polimérico, o método *Pechini* permite obter grande quantidade de óxidos metálicos na forma de pó com controle estequiométrico, permitindo que o produto sintetizado apresente uma ótima reprodutibilidade. Esta técnica também tem sido bastante utilizada devido ao seu baixo custo e versatilidade. Dentre as vantagens deste método está a possibilidade de preparar composições complexas (óxidos mistos), com boa homogeneidade, em temperatura relativamente baixa, através da mistura dos reagentes em nível molecular em solução (SERRA; CICILLINI; ISHIKI, 2000; ZOU; GE; SHEN, 2003).

Dos diversos métodos de síntese química existentes, o *Pechini* se destaca, por ser uma síntese que possibilita utilizar diferentes temperaturas, diferentes proporções de ácido cítrico e cátions metálicos, permitir um controle na estequiometria, morfologia das partículas e/ou aglomerados, produtos monofásico e nanométricos (PECHINI, 1967).

É um método de polimerização de orgânicos “in situ”, que nada mais é que um processo combinado de formação de complexo-metal (organo-metálico) e polimerização de orgânicos. A idéia básica do método é reduzir as individualidades dos diferentes íons metálicos, que podem ser obtidos cercando o complexo-metal, que é estável, com o crescimento de redes poliméricas. A imobilização do complexo-metal em tal rede rígida de polímero orgânico pode reduzir a segregação do metal particular, desta maneira assegurando a homogeneidade composicional (PECHINI, 1967).

Basicamente, o método consiste na formação de uma resina polimérica obtida pela reação entre um ácido α -hidroxicarboxílico, sendo o ácido cítrico o mais utilizado, com diversos precursores catiônicos para formar um complexo (Fig. 1). Na presença de um ácido polihidroxílico (etilenoglicol - EG), os quelatos reagem para formar ésteres orgânicos e água como produtos (LABERTY-ROBERT et al., 2001; KODAIRA; BRITO; FELINTO, 2003). Quando a mistura é aquecida, ocorre a poliesterificação, conduzindo a uma solução homogênea, onde os íons metálicos estão uniformemente distribuídos na matriz orgânica. A solução é aquecida para a eliminação do excesso de solvente, formando uma resina sólida intermediária. O óxido de estequiometria desejada é obtido após secagem e calcinação da resina sólida em temperaturas relativamente baixas.

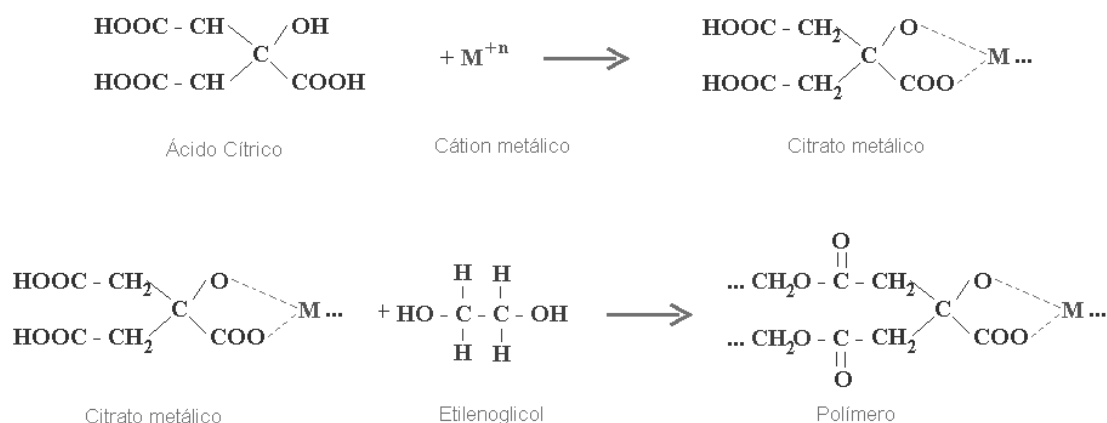


Figura 1 - Reações químicas envolvidas na obtenção do precursor polimérico – Método *Pechini*

Desde a década de 1970 algumas modificações vêm sendo incorporadas ao método proposto por *Pechini*, como a variação na proporção dos materiais orgânicos utilizados na síntese (ácido cítrico : etilenoglicol), na relação entre os componentes orgânicos e os cátions envolvidos na síntese (CHO; JOHNSON; CONDRETE SR, 1990) e no pH inicial da solução (TAI; LESSING, 1992).

3.1.4 Dióxido de Titânio – TiO₂

Entre os óxidos semicondutores, o TiO₂ é o mais amplamente estudado devido principalmente à sua não toxicidade, fotoestabilidade, estabilidade química em uma ampla faixa de pH e a sua viabilidade de custo. Somam-se ainda propriedades especiais, como alta constante dielétrica, excelente transmitância ótica, alto índice de refração e energia de banda proibida de 3,2 eV, permitindo absorção de radiação até 385nm. Tais propriedades tornam o TiO₂ adequado para as mais diversas aplicações óticas, elétricas e eletroquímicas, destacando seu emprego como capacitor dielétrico (DING; LIU, 1998), em células solares (DIAMANT et al., 2004), sensoriamento de gases e umidade (SCHEIBAUM et al., 1991) e aplicação em um grande número de processos catalíticos (NOGUEIRA; JARDIM, 1998).

Dentre as diversas aplicações relacionadas ao semicondutor TiO_2 , tem-se a fotocatalise heterogênea, a qual tem se mostrado como uma boa opção para descontaminação de águas residuárias, dependendo de características como tipo de poluente, carga orgânica e sua concentração (GÁLVEZ et al., 2001). Além da possibilidade de fotodegradação de moléculas persistentes no ambiente, como por exemplo, os organoclorados, o que chama atenção na fotocatalise heterogênea é o fato da mesma ser considerada uma tecnologia solar (emergente) e, portanto, uma tecnologia ambientalmente sustentável (economia de energia), pelo fato de se poder utilizar a luz solar como fonte de fótons para ativar o catalisador (ROBERT; MALATO, 2002). Muitos trabalhos têm demonstrado ser possível a completa degradação de contaminantes orgânicos como fenol, hidrocarbonetos clorados, clorofenóis, inseticidas, corantes e outros na presença de TiO_2 iluminado com luz solar (MATTHEWS, 1991).

Como visto anteriormente, a maioria das aplicações do TiO_2 envolve reações assistidas por luz solar, a qual é capaz de promover a criação de par elétron-buraco que são separados e transportados para a superfície, onde participam de reações de transferência de carga. Este processo é limitado pela recombinação dos portadores de carga em sítios na superfície ou no *bulk* da nanopartícula. Diminuindo os centros de recombinação a eficiência do processo aumenta e, conseqüentemente, a degradação de espécies do ambiente. Aplicações como estas vão desde a descontaminação da água de poluentes orgânicos à esterilização de utensílios hospitalares como agente anti-bactericida (MANESS; SMOLINSKI; JACOBY, 1999; MILLS et al., 2003) e na terapia fotodinâmica, na qual pela aplicação de dióxido de titânio em tumores sob exposição de luz ultravioleta é possível controlar alguns tipos de câncer (SAKAI et al., 1995). Também no âmbito da aplicação biológica o material é utilizado como camada antioxidante e biocompatível em implantes ósseos de titânio metálico (FILIP et al., 2001). Entre outras aplicações do TiO_2 podemos encontrar aplicações como aditivos na indústria de alimentos (FROST; DIJKSTERHUIS; MARTENS, 2001), em produtos cosméticos e farmacêuticos, com destaque para a aplicação em cremes solares para a absorção dos raios UV (SALVADOR et al., 2000) e em tintas e papéis, que utilizam o TiO_2 como pigmento branco usando o seu alto índice de refração.

As propriedades elétricas e óticas do TiO_2 podem mudar dependendo das condições atmosféricas do ambiente. Desta forma, este material, como também outros metalóxidos, tais como ZnO , CuO , dentre outros, estão sendo empregados como sensores de gás. O dióxido de titânio tem sido pesquisado como sensor de oxigênio, hidrogênio, monóxido de carbono e metano (SCHIERBAUM et al., 1991). O gás interage com defeitos na superfície do material alterando a condução elétrica do mesmo.

O semicondutor TiO_2 pode se apresentar em diversas estruturas cristalinas, sendo que as mais conhecidas são: anatásio, rutilo e bruquita. As fases anatásio e bruquita são metaestáveis, e podem se converter em rutilo, a forma termodinamicamente mais estável a altas temperaturas (SHIN et al., 2005; YU et al., 2005). Entretanto, as formas cristalinas anatase e rutilo são as mais estudadas e utilizadas nas inúmeras aplicações desse semicondutor.

A transição de anatase para rutilo é irreversível pois trata-se da transição de uma fase termodinamicamente metaestável para uma fase estável. Esta transição de fase ocorre pelos mecanismos de nucleação e crescimento. Em estruturas nanocristalinas a transição de anatase para rutilo é favorecida pela energia de superfície que favorece a nucleação e crescimento, diminuindo a temperatura de transição de anatase para rutilo (DIEBOLD, 2002; ALMEIDA et al., 2003; REICHEL, 2005).

Entretanto, trabalhando com diferentes técnicas de deposição de filmes de TiO_2 , Zhang (1998, p. 2073-2076) chamou a atenção para uma relação entre o tamanho das partículas (formadas durante o processo de formação do filme) e a fase de TiO_2 formada. Em seu trabalho, observou que partículas pequenas da ordem de 14nm aproximadamente formam preferencialmente estrutura anatase, enquanto que em partículas maiores do que 14nm a fase rutilo tende a predominar (ZHANG; BANFIELD, 1998). Estes resultados podem ser compreendidos levando em consideração princípios termodinâmicos, onde ocorre a contribuição da energia superficial na energia total de formação da estrutura cristalográfica. Resultados apontam que a fase anatase tem menor energia superficial de formação do que a fase rutilo, pois estruturas com partículas pequenas apresentam uma maior concentração da fase anatase em relação à rutilo, com isso, a contribuição da

energia superficial ao total de energia de formação seria maior, tornando a fase anatase mais estável do que a rutilo (DIEBOLD, 2002; ZHANG; BANFIELD, 1998).

3.1.5 Hidroxiapatita - $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$

A hidroxiapatita é uma das biocerâmicas mais frequentemente utilizadas para reconstrução óssea e dentária (RODRIGUES *et al.*, 2003). Tem excelente compatibilidade com tecido ósseo e alta osteocondutividade (SUCHANEK *et al.*, 1998). É considerada um material bioativo que permite a osseointegração, pois forma um elo químico direto com o osso subjacente sem a formação de tecido fibroso (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso, representando de 30 a 70 % da massa dos ossos e dentes. A HA sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção (EANES, 1980). Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (MAVROPOULOS, 1999).

Dois tipos de HA devem ser considerados: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos. A HA precipitada por via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferentemente da HA sintetizada a altas temperaturas (FULMER; MARTIN; BROW, 1992).

Os cristalinos de HA no corpo humano são tão pequenos que são considerados materiais nanoestruturados (RAJABI-ZAMANI *et al.*, 2008). As primeiras pesquisas feitas com a HA estavam focadas principalmente no controle da estequiometria da HA sintética produzida (GOPI *et al.*, 2008).

Alguns experimentos de proliferação celular têm demonstrado que nanopartículas esféricas de HA são mais biocompatíveis do que a hidroxiapatita

disponível comercialmente, e que usualmente apresenta uma forma irregular (FU et al., 2008).

Como um biomaterial, materiais nanocristalizados têm-se provado de grande eficácia do ponto de vista biológico (LI; CHEANG; KHOR, 2004). Stupp e Ciegler (1992) mencionam que é esperado que a HA nanométrica tenha uma melhor bioatividade do que a HA em sua forma padrão.

Considerando revestimentos de HA, estes apresentam uma ausência de resistência mecânica e durabilidade para seu uso em aplicações em locais de elevada solicitação mecânica. Assim, o uso de partículas nanométricas pode minimizar este problema, devido às propriedades mecânicas superiores (XU et al., 2004).

Comparada com as cerâmicas convencionais, as características da HA de fase nano, como tamanho do grão, tamanho do poro e molhabilidade, podem controlar a interação com proteínas (adsorção, configuração e bioatividade), além de modular uma adesão aperfeiçoada de osteoblastos e funcionalidade em longo prazo. Estas funções aperfeiçoadas dos osteoblastos são proliferação, síntese de fosfatase alcalina e deposição mineral de cálcio (FERRAZ; MONTEIRO; MANUEL, 2004).

A hidroxiapatita é amplamente usada na medicina e na odontologia para a reparação de perdas de tecidos ósseos devido à sua alta biocompatibilidade com estes tecidos, entretanto, suas aplicações não se restringem a estas duas áreas.

Dentre suas aplicações, na linha de controle ambiental, a HA vem sendo estudada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos clorados poluentes provenientes da indústria metalúrgica e da incineração do lixo industrial. É um catalisador efetivo para desidratação e desidrogenação de álcoois primários para aldeídos e cetonas, a altas temperaturas (PARRIS; ARMOR. 1991).

Ainda na área ambiental, a HA apresenta uma alta capacidade em remover metais pesados, não só de águas e solos contaminados, como também de dejetos industriais (MA; TRAINA; LOGAN, 1995).

3.2 Cerâmicas Porosas

Materiais cerâmicos apresentam propriedades e características que os capacitam a serem utilizados em aplicações nas quais outras classes de materiais (metais e polímeros) não podem ser utilizadas ou apresentam, de um modo geral, um desempenho abaixo do necessário. Dentre estas propriedades podemos citar a elevada resistência mecânica, alta dureza, resistência ao desgaste, baixo coeficiente de expansão térmica e de condutividade térmica, resistência à oxidação e à corrosão e elevada refratariedade. Apesar da maioria destas aplicações tecnológicas envolverem cerâmicas densas, há um crescente número de aplicações para as quais se utilizam cerâmicas porosas (SHEPPARD, 1992; NETTLESHIP, 1996; RICE, 1998; GUZMAN, 2003; KELLY, 2006; STUDART et al., 2006; COLOMBO, 2006).

Cerâmicas porosas são materiais frágeis de elevada porosidade que apresentam estrutura celular com poros fechados, abertos ou interconectados (ZESCHKY et al., 2003). O crescente interesse nessa classe de materiais tem sido associado principalmente a suas propriedades específicas, como baixa densidade, baixa condutividade térmica e/ou alta permeabilidade. Estas propriedades fazem das cerâmicas porosas, materiais viáveis para diversas aplicações tecnológicas (SAGGIO-WOYANKY; SCOTT; MINNEAR, 1992; SEPULVEDA, 1997; MONTANARO et al., 1998).

As aplicações mais conhecidas para as cerâmicas porosas são: isolantes térmicos, catalisadores e suportes de catalisadores, filtros e membranas para filtração e separação de partículas, gases e líquidos (incluindo metais fundidos), queimadores de gases e difusores. Porém, o campo de aplicação de cerâmicas porosas experimenta uma recente e contínua expansão para novos setores estratégicos, como o de biomateriais, farmacêutico, alimentício, aeroespacial, petroquímico e de engenharia ambiental. (SHEPPARD, 1992; NETTLESHIP, 1996; RICE, 1998; GUZMAN, 2003; KELLY, 2006; STUDART et al., 2006; COLOMBO, 2006).

3.2.1 Métodos de Produção de Cerâmicas Porosas

Cerâmicas porosas podem ser obtidas por diferentes métodos, os quais interferem significativamente nas características e propriedades dos produtos obtidos, sendo que alguns destes são adaptações de métodos clássicos de conformação de materiais cerâmicos densos (SHEPPARD, 1992; NETTLESHIP, 1996; RICE, 1998; GUZMAN, 2003; KELLY, 2006; STUDART et al., 2006; COLOMBO, 2006). A escolha do método mais adequado está diretamente relacionada às características de estrutura dos poros que se deseja.

3.2.2 Método da Réplica

O método da réplica é baseado na impregnação de substratos de estruturas celulares com uma suspensão cerâmica ou solução precursora cerâmica, de maneira a produzir uma estrutura porosa similar à do substrato. Muitas estruturas celulares sintéticas e naturais podem ser usadas como substratos, sendo que o exemplo mais comum é o de espumas poliméricas. As cerâmicas obtidas pelo método da réplica podem apresentar porosidade entre 40 % e 95 %, com uma estrutura reticulada e altamente interconectada, com o tamanho médio de poros variando de 200 μm a 3 mm (RICHARDSON; PENG; REMUE, 2000; ZHU; JIANG; TAN, 2001; ZHU et al., 2001; PU et al., 2004; STUDART et al., 2006; RAMBO; SIEBER; GENOVA, 2008; RAMBO et al., 2008).

A otimização das etapas do processo (escolha do substrato, preparação da suspensão cerâmica, impregnação, secagem e tratamento térmico) permite o desenvolvimento de materiais com características desejáveis para aplicações específicas (STUDART et al., 2006).

A técnica tornou-se popular para produzir cerâmicas macroporosas e hoje é largamente utilizada na indústria de preparação de filtros cerâmicos para filtração de metal fundido. Este sucesso é atribuído principalmente à simplicidade e flexibilidade do método (STUDART et al., 2006).

Um dos problemas que pode ocorrer com a utilização desse método é o surgimento de trincas nos filamentos durante a pirólise da matéria orgânica, o que

pode comprometer as propriedades cerâmicas do material. Visando evitar esse problema foram propostas algumas soluções, como melhorar a molhabilidade da suspensão no substrato a ser impregnado, fazer mais de uma impregnação para o preenchimento das trincas dos filamentos, adição de fibras na suspensão cerâmica, desgaseificação da mesma, etc. (RICHARDSON; PENG; REMUE, 2000; ZHU; JIANG; TAN, 2001; ZHU et al., 2001; PU et al., 2004; STUDART et al., 2006; RAMBO; SIEBER; GENOVA, 2008; RAMBO et al., 2008).

Quando se utiliza como base uma estrutura natural, as propriedades mecânicas são comumente melhores, pois a estrutura mantém a sua forma original e é transformada por meio de processos físico-químicos em um material cerâmico, gerando uma estrutura sem falhas e sem vazios dentro dos filetes (STUDART et al., 2006; RAMBO et al., 2008).

3.2.3 Método *Template*

O método “*template*”, comumente usado para obtenção de nanopartículas, consiste na síntese química ou eletroquímica de estruturas de um material desejado diretamente nos poros de uma membrana de ultra-filtração (“*template*”) (MENON; MARTIN, 1995). Estas membranas são confeccionadas a partir de polímeros com alta densidade, tais como policarbonato, poliéster, dentre outros.

Dentre os métodos existentes para confecção de nanopartículas, destacam-se aqueles baseados na utilização de membranas de ultra-filtração, caracterizadas por apresentarem nanoporos cilíndricos de diâmetro uniforme, a serem usadas como hospedeiras para infiltração e preenchimento de seus canais (MENON; MARTIN, 1995; BROW; FOX; NATAN, 1996; UGO et al., 1996).

3.3 Materiais Compósitos

A grande maioria dos materiais compósitos é composta por apenas duas fases; uma é chamada de matriz, que é contínua e envolve a outra fase, chamada

frequentemente de fase dispersa. As propriedades dos compósitos são uma função das propriedades das fases constituintes, das suas quantidades relativas e da geometria da fase dispersa. Nesse contexto, por “geometria da fase dispersa”, subentende-se a forma das partículas, seu tamanho, sua distribuição e sua orientação (BENTHIEN, 2012).

Os nanocompósitos podem ser definidos por materiais que contêm um ou mais componentes nanoestruturados dispersos em um polímero, vidro ou suporte cerâmico (ZIOLO et al., 1992; CHANÉAC; TRONC; JOLIVET, 1996; CHAKRABARTI et al., 2003). Estes sistemas exibem propriedades funcionais únicas com uma grande variedade de aplicações tecnológicas. Tal como acontece nos compósitos tradicionais, um dos componentes serve de matriz, na qual as nanopartículas do segundo material encontram-se dispersas. Os componentes de um nanocompósito podem ser de natureza inorgânica/inorgânica; orgânica/inorgânica e orgânica/orgânica.

3.3.1 Compósitos de Matriz Polimérica

Sistemas poliméricos são amplamente utilizados nos setores aeroespacial, automotivo, de artigos esportivos e ortopédicos em virtude de sua processabilidade e leveza. Os polímeros, entretanto, geralmente exibem propriedades mecânicas pouco atrativas, como baixo módulo de elasticidade e resistência mecânica reduzida, quando comparados aos metais e cerâmicas. Uma das formas de melhorar as propriedades dos sistemas poliméricos é a incorporação de partículas de alta rigidez. A introdução de partículas com dimensões micrométricas à resina tem sido uma prática utilizada pela indústria dos polímeros, há décadas. Para impactar as propriedades mecânicas, térmicas e elétricas do material, a fração volumétrica de reforço requerida é elevada, cerca de 40 a 60 % em peso. Entretanto, isso pode afetar negativamente algumas das propriedades da matriz polimérica, como a processabilidade e densidade (YASMIN; DANIEL, 2004; JORDAN et al., 2005). Recentemente, as pesquisas em nanomateriais tornaram possível o processamento de materiais compósitos, de alto desempenho, e com reduzida

concentração de reforço, geralmente inferiores a 5 % (TIDJANI; WILKIE, 2001). São os chamados "nanocompósitos poliméricos".

Nanocompósitos poliméricos são materiais nos quais partículas, com pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, encontram-se dispersas em uma matriz polimérica termofixa, termoplástica ou elastomérica (VELMURUGAN; MOHAN, 2009). A interação entre as cadeias poliméricas e as nanopartículas confere aos nanocompósitos propriedades superiores às aquelas apresentadas pelos polímeros convencionais. A combinação da matriz polimérica com reforços inorgânicos com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica pode não só melhorar as propriedades mecânicas do material, tais como rigidez, resistência mecânica, resistência ao impacto e tenacidade, mantendo a processabilidade e baixa densidade da resina, como também permitir uma combinação de propriedades adicionais, como redução do coeficiente de expansão térmica, melhoria da condutividade elétrica e redução da permeabilidade a gases. Este fenômeno em que há combinação de propriedades é denominado multifuncionalidade (KOO, 2006).

Conforme a aplicação pretendida, podem ser usados diversos tipos de cargas que diferem entre si, por exemplo, nas propriedades morfológicas ou em propriedades como a resistência térmica ou reatividade química. Entre as cargas mais comuns em nanocompósitos de matriz polimérica, encontram-se os carbonatos, os sulfatos, os alumino-silicatos e os óxidos metálicos (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , ZnO) (ORIAKHI, 2000). Alguns dos exemplos mais citados na literatura são nanopartículas de TiO_2 na preparação de compósitos com aplicação na indústria de revestimentos e tintas (SEYMOUR, 1990; WALT; FLEMING; MANDAL, 2001; SERTCHOOK; AVNIR, 2003), e nanopartículas de SiO_2 , que podem conferir maior resistência mecânica ou características retardadoras de chama aos nanocompósitos (OU; YANG; YU, 1998; GILMAN et al., 2000; HSIUE; LIU; LIAO, 2001).

As partículas tendo dimensões nanométricas apresentam uma área de superfície elevada, promovendo uma melhor dispersão na matriz polimérica e conseqüentemente uma melhoria nas propriedades físicas do compósito, que dependem da homogeneidade do material. Para obtenção do compósito com uma distribuição uniforme e boa adesão na interface entre os componentes, usualmente utiliza-se um dos seguintes métodos (ESTEVES; BARROS-TIMONS; TRINDADE, 2004):

- Polimerização “in situ”: as nanocargas são adicionadas ao monômero líquido e posteriormente inicia-se a polimerização através do uso do calor, iniciador ou catalisador.
- Intercalação em solução: um solvente é utilizado para promover a dispersão das cargas e solubilização do polímero, posteriormente este solvente é evaporado e o nanocompósito é formado.
- Intercalação no estado fundido: Consiste em misturar polímero e nanocarga numa temperatura superior ao ponto de fusão do polímero.

A afinidade química reduzida entre as cargas inorgânicas (natureza hidrofílica) e o polímero (predominantemente hidrofóbico) é um aspecto importante a se considerar na preparação de nanocompósitos. A compatibilidade das cargas com a matriz polimérica pode ser melhorada através da modificação química superficial das partículas dos componentes. Para o efeito, é normalmente utilizado um agente de derivatização, que promove a compatibilização química entre os componentes por intermédio de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas ou por ligações covalentes na interface inorgânica/orgânica (PHILIPSE; VRIJ, 1989; NASSAR; MESSADDEQ; RIBEIRO, 2002; BOURGEAT-LAMI, 2002).

Pesquisas realizadas nos últimos 10 anos demonstraram que nanocompósitos deste tipo, contendo apenas uma pequena quantidade de silicato inorgânico (2% em volume), duplicaram o módulo elástico e a força, sem sacrificar sua resistência ao impacto. A incorporação de nanopartículas de silicatos lamelares em matrizes poliméricas cria uma forma de labirinto dentro da estrutura, que retarda fisicamente a passagem de moléculas de gás (FISHER, 2003, p. 763).

As excelentes propriedades de barreira contra gás e transmissão de vapor destes nanocompósitos resultam em aplicações principalmente nas indústrias alimentícias, no empacotamento de comida e bebida (YANO; USUKI; OKADA, 1997).

Recentemente, com relação às aplicações ambientais, sólidos inorgânicos combinados com polímeros biodegradáveis têm sido utilizados como agentes reforçadores. Estes materiais, denominados nanocompósitos “verdes”, são uma alternativa atrativa para substituir derivados de petróleo na produção de plásticos (RAY; BOUSMINA, 2005). Esta é uma área que se encontra em crescente desenvolvimento e que busca melhorar cada vez mais os métodos de síntese para

se obter nanocompósitos com uma distribuição uniforme das cargas inorgânicas na matriz polimérica e uma boa adesão na interface dos dois componentes.

3.4 Biopolímeros

Até pouco tempo atrás era importante descobrir materiais cada vez mais duráveis para utilização diária no mercado e dentre estes estavam os plásticos, com grande variedade de aplicações, devido a suas propriedades, versatilidade de uso e preço (HUANG, 1995). Como o uso dos plásticos vem aumentando muito no mundo todo (mais de 100 milhões de t/ano de plásticos produzidos) (REDDY et al., 2003), é grande a quantidade de resíduos plásticos descartados no meio ambiente, isto é, 20 % do volume total (HUANG; EDELMAN, 1995; AGNELLI, 1996). Os plásticos sintéticos, materiais formados de macromoléculas, denominados polímeros (do grego: poli=muitos, meros=partes, unidades), são muito resistentes à degradação natural, quando descartados no meio ambiente, isto é, em aterros ou lixões municipais, daí seu acúmulo cada vez mais crescente (KIRBAS, 1999; TORIKAI; HASEGAWA, 1999).

Os plásticos mais utilizados na vida diária, desde 1940, têm sido polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poli(tereftalato de etileno) (PET) e poli(cloreto de vinila) (PVC) que, apesar do avanço no processamento e fabricação, geram dois grandes problemas: o uso de fonte não-renovável (como o petróleo) para obtenção de sua matéria-prima e a grande quantidade de resíduos gerada para descarte (AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, 1998).

As tendências mundiais para o avanço científico no desenvolvimento de novos materiais destacam a importância da utilização de fontes renováveis, como matéria-prima, além dos resíduos industriais e agro-industriais nos processos de produção. A utilização de resíduos minimiza os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo. A utilização de fontes renováveis é de grande interesse, principalmente aquelas obtidas de plantas de rápido crescimento (MUNRO et al., 1998).

Filmes e recobrimentos comestíveis e/ou biodegradáveis podem ser formados a partir de polímeros naturais, de origem animal ou vegetal, como

polissacarídeos, lipídios e proteínas, sendo perfeitamente biodegradáveis, ou seja, seguros ao meio ambiente (YANG; PAULSON, 2000).

Nos últimos anos tem se dado especial atenção a obtenção de materiais poliméricos derivados de polissacarídeos e proteínas, não somente visando suas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica, como também, para a indústria eletrônica. Estão sendo estudadas as alterações das propriedades físicas e químicas dos polímeros naturais e melhoria das suas características funcionais, seja por processos físicos, como a plastificação ou por meio de reações químicas, tais como, esterificação, enxertia e reações de reticulação (DRAGUNSKI; PAWLICKA, 2002). O objetivo é encontrar composições que permitam a confecção de membranas com boas propriedades ópticas, mecânicas, bem como à adesão às superfícies de vidro e metal. Além das modificações por reações químicas também têm sido feitas pesquisas sobre o preparo de blendas à base de polissacarídeos, tais como celulose e seus derivados (REGIANI, 2000; DANCZUK; FUENTES; RETUERT; GONZÁLEZ, 2007; VIEIRA; AVELLANEDA; PAWLICKA, 2007; PAWLICKA et al., 2008;), quitosana (DANCZUK, 2007; FUENTES; RETUERT; GONZÁLEZ, 2007; PAWLICKA et al., 2008), amido (DRAGUNSKI; PAWLICKA, 2002) ou gelatina (VIEIRA; AVELLANEDA; PAWLICKA, 2007; VIEIRA; AVELLANEDA; PAWLICKA, 2008; VIEIRA; PAWLICKA, 2010).

O processo de produção dos biofilmes a partir de uma solução filme-formadora envolve uma primeira etapa de solubilização da macromolécula em um solvente (água, etanol, solução de ácido acético, etc.) ao qual podem ser incorporados diversos aditivos (plastificantes, agentes reticulantes, etc.); na segunda etapa, a solução formadora do filme é vertida sobre um suporte e, usualmente, submetida à secagem até uma condição que permita um fácil desprendimento do molde (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995).

A degradação desses polímeros resulta primariamente da ação de microrganismos, tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, gerando CO₂, CH₄, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela “American Standard for Testing and Methods” (ASTM-D-833) (RAGHAVAN, 1995; LEE; CHOI, 1998).

A biodegradabilidade do polímero não depende apenas de sua origem mas, principalmente, de sua estrutura química, como a presença de heteroátomos

susceptíveis a quebra hidrolítica, a cristalinidade do polímero e sua massa molar, sendo mais facilmente degradados os polímeros hidrofílicos, amorfos e de menor massa molar (VERT et al., 1992; MULLER; KLEEBERG; DECKWER, 2001; LENZ; MARCHESSAULT, 2005; JIANG; WOLCOTT; ZHANG, 2006).

As vantagens dos filmes biodegradáveis podem ser justificadas com base na funcionalidade das mesmas: controle da migração de água; permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono e migração lipídica em um sistema alimentício multifásico (KESTER; FENNEMA, 1986). Além disso, filmes biodegradáveis oferecem uma possível alternativa aos materiais tradicionais quando a reciclagem não é possível ou é economicamente inviável ou quando o impacto ambiental deve ser minimizado (BASTIOLI, 2001).

3.4.1 Agar

O agar é um hidrocolóide extraído de algas marinhas, que é amplamente utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica. Entre as suas propriedades destacam-se o seu alto poder geleificante em baixas concentrações, baixa viscosidade em solução, alta transparência, é um gel termo-reversível com temperaturas de fusão/geleificação bem definidas.

Em seu estado natural ocorre como carboidrato da parede celular de algas agarófitas, existindo na forma de sais de cálcio ou uma mistura de sais de cálcio e magnésio. É um complexo arranjo de polissacarídeos composto por duas frações principais: a agarose, um polímero neutro, que é a fração geleificante, e a agaropectina, um polímero com carga sulfatada (BASTIOLE, 2000).

Em água fria, o agar é insolúvel, porém se expande consideravelmente absorvendo água numa quantidade que pode atingir até vinte vezes o seu próprio peso. Em água quente, porém, a dissolução é rápida formando um gel firme.

Existem vários biopolímeros extraídos de algas marinhas que são cada vez mais aplicados à biotecnologia. Dentre eles o agar, é o mais utilizado (MURANO et al., 1990). Apesar de suas inúmeras aplicações, são poucos os estudos relacionados à sua utilização para a preparação de filmes (SOUSA, 2008).

3.4.2 Plastificante e Agente Reticulante

A formação de filmes depende da solubilização da macromolécula no solvente (água, etanol, ácido acético, outros), da adição de plastificante e/ou adição de agente reticulante ou outro aditivo que se deseja, para a obtenção de um gel. Esse gel envolve ligações inter e intramoleculares cruzadas entre cadeias de polímeros, formando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (KESTER; FENNEMA, 1986).

O gel submetido à posterior secagem para a formação de um filme biodegradável apresenta uma coesividade que esta diretamente ligada à estrutura do polímero, processo e parâmetros de fabricação (temperatura, tipo de solvente utilizado, técnica de aplicação e evaporação, entre outros), e da presença de agentes plastificantes (GUILBERT, 1986). Com a secagem do gel, o filme está formado e sua flexibilidade será tanto maior ou menor em função da interação entre as cadeias do polímero. Filmes mais rígidos são aqueles que apresentam mais fortes interações e, como consequência disso, são menos permeáveis a gases, vapor de água e líquidos (KESTER; FENNEMA, 1986). Para atenuar a alta rigidez é necessário adicionar ao filme um plastificante, a fim de torná-lo mais manuseável, menos quebradiço e mais flexível.

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade que quando adicionados a outro material provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos mesmos (McHUGH; KROCHTA, 1994). Além disso, em sua maioria apresentam caráter hidrofílico, e por serem normalmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas devido à sua habilidade de reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre elas, diminuindo as forças de atração intermoleculares, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997).

A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes depende da compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizados, isto é, deve ser miscível no polímero e no solvente, de forma a evitar a separação prematura no decorrer do processo de secagem, causando uma diminuição na flexibilidade do filme. A concentração de plastificante usado na elaboração de filmes geralmente

varia de 10 a 60g/100g de matéria seca de polímero, dependendo da flexibilidade desejável no filme (GUILBERT, 1986).

Um problema encontrado em polímeros naturais é que eles frequentemente levam muito tempo para degradar. Isto pode ser resolvido adicionando-se grupos polares às cadeias que, por serem mais lábeis, podem diminuir o tempo de degradação. Por exemplo, para melhorar as propriedades funcionais de polímero a base de gelatina, por exemplo, agentes de reticulação como formaldeído, glutaraldeído ou glioxal são utilizados (CARVALHO; GROSSO, 2004; BERGO; SOBRAL, 2007).

O glutaraldeído é uma molécula bifuncional que interage muito fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura e com menor intensidade com o grupo tiol. Inicialmente, o glutaraldeído foi muito utilizado como fixador na histoquímica e na microscopia eletrônica, só depois ele foi utilizado como reagente bifuncional no estudo estrutural de proteínas simples e macromoléculas agregantes (HADJU; FRIEDRICH, 1975).

O glutaraldeído age normalmente como um agente formador de ligações cruzadas (*crosslinking*). A interação ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos aminas livres dos compostos (HADJU; FRIEDRICH, 1975). Acredita-se que nessa interação seja muito provável que haja envolvimento de formação de duplas ligações etilênicas conjugadas, fato que ganha muito apoio pela estabilidade dessa interação, irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura (MONSAN; PUZO; MAZARGUIL, 1975; NAVARRO; MONSAN, 1976; KENNEDY, 1987).

O glutaraldeído é uma substância hidrofílica, passível de biodegradação rápida, não bioacumulativa e com limitada persistência no ar, solo e água, razão pela qual apresenta baixo potencial de risco ao compartimento terrestre e aquático. Tem potente ação biocida, bactericida, fungicida, virucida e esporicida. Sua atividade é devida à alquilação de grupos sulfidril, hidroxila, carbonila e amino dos microorganismos alterando os ácidos nucleicos (RNA e DNA) e síntese de proteínas (RESOLUÇÃO SS – 27, de 28 de fevereiro de 2007, SP).

Sua aplicação se estende a áreas que incluem técnicas de imobilização de enzimas (CHIBATA, 1978) e a estabilização de matrizes colagênicas para vários tipos de aplicações, tais como a confecção de válvulas cardíacas (IONESCU et al.,

1974) ou géis de colágeno injetáveis (ROSENBLATT; DEVEREUX; WALLACE, 1994). Entretanto sua utilização tem sido associada a processos de calcificação e citotoxicidade (MCPHERSON; SAWAMURA; ARMSTRONG, 1986).

O glutaraldeído, utilizado na odontologia desde 1972, é um agente fixador e bactericida eficaz na terapia pulpar de dentes decíduos, que oferece as características positivas do formocresol sem induzir efeitos colaterais indesejáveis, além de não ocorrer penetrabilidade nos tecidos minerais do dente. Por causa da sua estrutura química, esse fármaco apresenta uma difusão lenta e limitada no local de contato, fixando proteínas encontradas na superfície do remanescente pulpar. Essa propriedade provoca reações inflamatórias moderadas e, conseqüentemente, menor índice de necrose (Pereira Junior e Avelar, 1996).

Entretanto, pesquisas mais conclusivas a respeito do suposto efeito mutagênico e carcinogênico do glutaraldeído são necessárias. Enquanto, alguns pesquisadores em estudo realizado em *hamsters* demonstram que, topicamente, sobre a mucosa bucal, o formocresol e o glutaraldeído, nas concentrações utilizadas clinicamente, apenas induziram alterações morfológicas típicas de displasia epitelial. outros pesquisadores afirmam que tanto o formocresol como o glutaraldeído foram considerados citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos em laboratório e animais de experimentação, e mutações foram observadas em células linfoblastóides humanas (SALLES et al., 1994; SCAVUZZI et al., 1998).

4 Material e Métodos

4.1 Síntese dos *Nanofillers* - Cerâmicas Porosas

A fig. 2 ilustra esquematicamente o processo de síntese das resinas precursoras e, obtenção dos *nanofillers*.

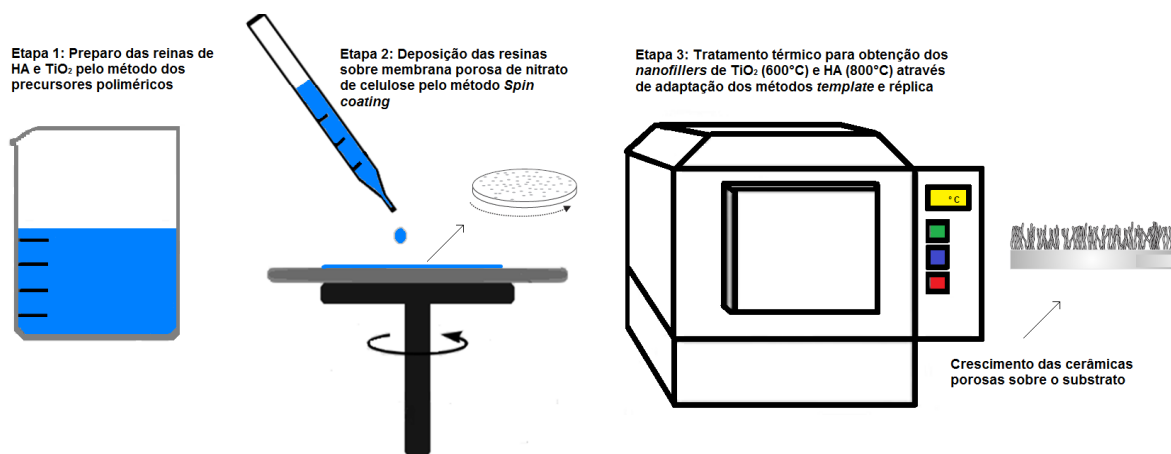


Figura 2 - Esquema do processo aplicado na síntese dos *nanofillers* (cerâmicas porosas).

4.1.1 Obtenção das Resinas Precursoras

Preparo da Resina de Hidroxiapatita Pelo Método dos Precursores Poliméricos (*Pechini*)

A síntese da resina de hidroxiapatita foi feita a partir do método *Pechini*, que corresponde, como visto anteriormente na revisão bibliográfica, ao método dos precursores poliméricos. Este método foi selecionado por permitir a variação na proporção dos componentes utilizados na síntese e por possibilitar o controle na

estequiometria e morfologia das partículas, utilizando temperaturas relativamente baixas.

Inicialmente foi feita a estequiometria da quantidade de ácido cítrico utilizado, levando em conta a razão molar de quatro moles de ácido cítrico para um mole do metal (razão 4:1). Posteriormente, foram pesados os reagentes para a formação da solução.

Os reagentes utilizados na síntese da resina de hidroxiapatita, bem como suas fórmulas moleculares, fabricante, pureza e quantidades utilizadas estão descritas na Tab. 1.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na obtenção da resina de hidroxiapatita.

Reagente	Fórmula molecular	Fabricante	Pureza	Quantidade utilizada
Nitrato de cálcio	$[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Synth	99%	11,8075g
Fosfato de amônio bibásico	$[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$	Synth	99%	3,9618g
Ácido cítrico anidro	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Synth	99,50	61,4835g
Etilenoglicol	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$	Synth	99,69	36,75mL

Preparo da solução de ácido cítrico:

Em um bequer de 250 mL, contendo 80 mL de água destilada, verteu-se 61,4835 g de ácido cítrico. A solução formada foi homogeneizada em agitador magnético durante 15 minutos com aquecimento a 80 °C.

Preparo da hidroxiapatita em solução:

Adicionou-se 11,8075 g de nitrato de cálcio e 3,9618 g de fosfato de amônio bifásico em um béquer de 100 mL contendo 20 mL de água destilada. A solução formada foi homogeneizada em agitador magnético durante 15 minutos com aquecimento a 80 °C.

Preparo da solução de hidroxiapatita com ácido cítrico:

As soluções formadas anteriormente foram misturadas, formando uma única solução a qual foram adicionados 36,75 mL de etilenoglicol, obedecendo a relação de 60 % de ácido cítrico: para 40 % de etilenoglicol.

Preparo da Resina de Dióxido de Titânio Pelo Método dos Precursores Poliméricos (*Pechini*)

A síntese da resina do TiO_2 foi feita a partir do método *Pechini*, que corresponde, como visto na revisão bibliográfica, ao método dos precursores poliméricos. Na verdade, o método dos precursores poliméricos nada mais é do que um aperfeiçoamento do método *Pechini*. A grande diferença está no controle mais rigoroso das etapas de síntese dos compostos de interesse (ZAMPIERI, 2009).

Inicialmente foi feita a estequiometria da quantidade de ácido cítrico utilizado, levando em conta a razão molar de três moles de ácido cítrico para um mole do metal (razão 3:1). Posteriormente, foram pesados os reagentes para a formação da resina.

Os reagentes utilizados na síntese da resina de TiO_2 , bem como suas fórmulas moleculares, fabricante, pureza e quantidades utilizadas estão descritas na Tab. 2.

Tabela 2 - Reagentes utilizados na obtenção da resina de dióxido de titânio.

Reagente	Fórmula molecular	Fabricante	Pureza (%)	Quantidade utilizada
Isopropóxido de titânio	$\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$	Acrôs	98%	10mL
Ácido cítrico anidro	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Synth	99,50	19,3g
Etilenoglicol	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$	Synth	99,69	11,6mL

A resina de TiO_2 foi obtida com a adição do ácido cítrico ao isopropóxido de titânio, na proporção 3:1, sendo acrescentada água destilada a essa mistura para que ocorresse a dissolução dos reagentes, mediante aquecimento (150°C) e agitação, até que o sal do metal estivesse completamente dissolvido. Inicialmente foram acrescentados 50 mL de água destilada adicionando-se mais água aos poucos, à medida que a água evaporava, a fim de manter a baixa viscosidade da mistura.

À solução formada foi acrescentado o agente polimerizante etilenoglicol, na proporção indicada anteriormente, mantendo o aquecimento e a agitação. Tendo em vista a obtenção de uma resina líquida e pouco viscosa, esperou-se apenas o tempo necessário para que houvesse a homogeneização da solução.

4.1.2 Impregnação do Substrato Poroso

Como substrato poroso para obtenção das nanoestruturas cerâmicas porosas pela metodologia adaptada dos métodos “*template*” e da réplica, utilizou-se membrana porosa de nitrato de celulose regenerada, produzida pela Sartorius Stedim Biotech S. A., modelo 18407-13-K com $0,2\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro. Este método foi escolhido, principalmente, por formar estruturas cerâmicas com porosidade entre 40% e 95%, sem falhas e vazios dentro dos filetes, e com alta resistência mecânica (STUDART et al., 2006; RAMBO et al., 2008).

A deposição das resinas sintetizadas (HA e TiO_2) no substrato é realizada por meio da técnica “*spin coating*” (cobertura por rotação) com o auxílio de uma micropipeta (0,5 μL – 10 μL), em equipamento *Spin-coater* da marca Chemat Technology Inc., modelo KW-4A.

Microgotículas das resinas sintetizadas são depositadas sobre o substrato poroso, o vácuo do equipamento é então acionado e o sistema é rotacionado em dois estágios: 300 rpm's por 12 segundos e, no segundo estágio 4000 rpm's por 40 segundos. O uso do sistema de “*spin coating*” foi escolhido devido à possibilidade do controle de parâmetros ajustáveis, como a velocidade, a aceleração rotacional e o tempo do procedimento e devido a uniformidade na deposição da resina sobre o substrato.

A fig. 3 ilustra esquematicamente o processo de impregnação do substrato poroso (membrana de ultra filtração de nitrato de celulose) utilizando a técnica de *Spin coating*.



Figura 3 - Demonstração esquemática do processo de impregnação do substrato poroso utilizando a técnica de *Spin coating*.

4.1.3 Tratamento Térmico

Após a impregnação do substrato poroso com as resinas sintetizadas, procede-se a secagem do material em chapa de aquecimento. Em seguida, realiza-se o tratamento térmico, o qual ocorre em forno tipo mufla da marca Maitec/INTI, modelo FL-1300, mediante o aquecimento em atmosfera de ar com programação

para uma queima a 600 ° C durante duas horas, com taxa de aquecimento de 4°C/min para obtenção das cerâmicas porosas de TiO₂ e 800 ° C durante duas horas, com taxa de aquecimento de 4 ° C / min para obtenção das cerâmicas porosas de HA. Posteriormente o material foi resfriado até a temperatura ambiente.

O tratamento térmico nestas condições visa, além da pirólise da matéria orgânica, o crescimento das nanoestruturas cerâmicas, como esquematizado na fig. 4.



Figura 4 - Demonstração esquemática do crescimento das estruturas porosas sobre o substrato durante tratamento térmico.

4.2. Síntese do Polímero a Base de agar

A fig. 5 ilustra esquematicamente o processo de síntese do polímero a base de agar.

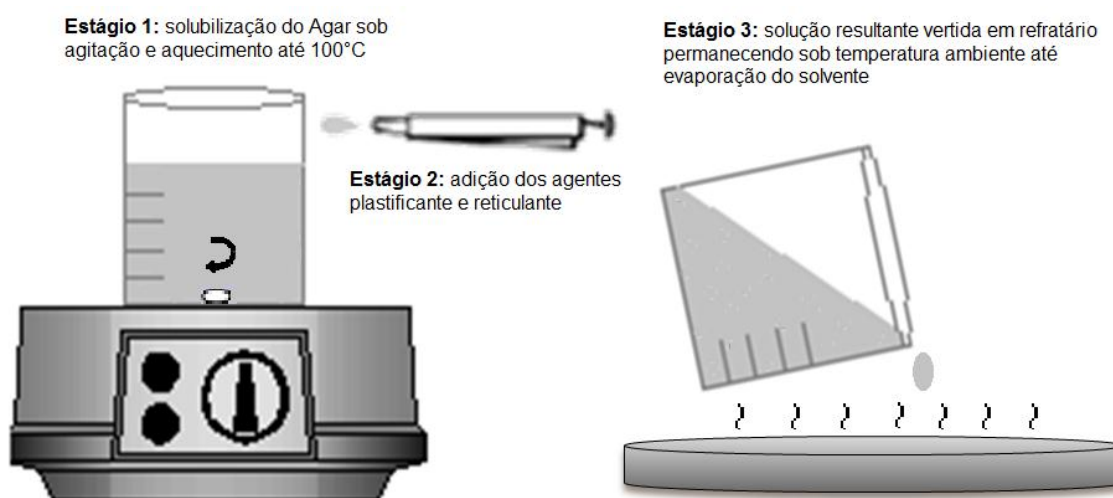


Figura 5 - Esquema do processo aplicado na síntese do polímero a base de agar.

Para obtenção do filme, o agar foi pesado e colocado em béquer com o volume de água destilada necessário para cobrir o fundo do recipiente utilizado como molde. Neste caso, utilizamos um prato refratário com dimensões internas de 15 cm x 27 cm, para o qual se estabeleceu um volume de 180 mL de água destilada. O béquer contendo agar e água foi colocado sob agitação e aquecimento a temperatura de 100  C, até total dissolução do agar.

Nesta etapa, foram testadas diferentes concentrações do agente plastificante e do agente reticulante utilizados, sendo que as quantidades apresentadas na Tab. 3 foram as que apresentaram melhor resultado, ou seja, houve formação de um filme homog neo.

Tanto o agente plastificante quanto o agente reticulante foram adicionados à mistura ainda sob aquecimento e agitação até completa homogeneização.

Os reagentes utilizados na obtenção do polímero, bem como suas fórmulas moleculares, fabricante, pureza e quantidades utilizadas estão descritas na Tab.3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na obtenção do polímero a base de agar.

Reagente	Fórmula molecular	Fabricante	Pureza (%)	Quantidade utilizada *
Agar	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Sigma-Aldrich	-	3,00g
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	Synth	70%	3,0mL
Glutaraldeído	$C_5H_8O_2$	Vetec	50%	300�L

* Quantidade de reagentes estabelecida para um volume de 180mL de água destilada.

A solução formada foi vertida ainda quente (100  C) em prato refratário que serviu de molde para o filme. O material permaneceu a temperatura ambiente, em local plano e sob temperatura ambiente até completa evaporação do solvente e obtenção de um filme homog neo de massa constante, como ilustrado na fig. 6. A secagem completa levou de 10 a 15 dias, dependendo da temperatura e umidade

loais. A secagem em estufa não é recomendada, pois uma taxa de evaporação elevada torna o filme quebradiço.



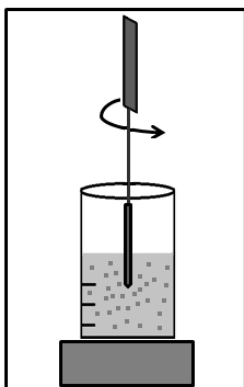
Figura 6 - Filme à base de agar após evaporação do solvente.

Todos os materiais poliméricos obtidos eram transparentes e sem descontinuidades, com espessura de aproximadamente 0,1 mm. As películas foram armazenadas em condições secas até serem testadas, para manter estabilidade (LOPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2010a, 2010b, 2011).

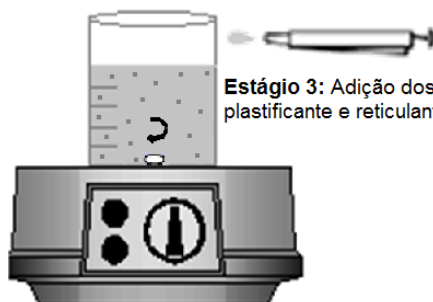
4.3 Síntese dos Nanocompósitos de Matriz Polimérica a Base de agar

A fig. 7 ilustra esquematicamente o processo de síntese do nanocompósito de matriz polimérica à base de agar.

Estágio 1: Dispersão das partículas de TiO_2 ou HA em aparelho de ultrassom



Estágio 2: Solubilização do Agar, na solução do estágio anterior, sob agitação e aquecimento até 100°C



Estágio 3: Adição dos agentes plastificante e reticulante

Estágio 4: Solução resultante vertida em refratário permanecendo sob temperatura ambiente até evaporação do solvente

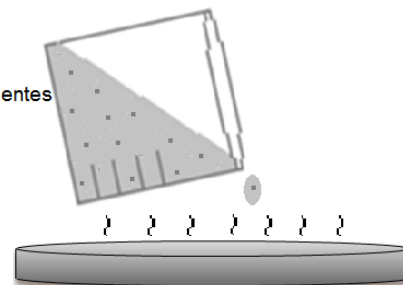


Figura 7 - Esquema do processo aplicado na síntese dos nanocompósitos de matriz polimérica a base de Agar.

Os *nanofillers* obtidos após o tratamento térmico foram pesados e colocados em copo béquer contendo 10 mL de Álcool Etílico Absoluto e 10 % em peso deste volume de TEOS (tratamento da superfície das partículas - silanização). Procedeu-se a evaporação deste material em estufa a 70°C . Após, mais 10 mL de Álcool Etílico PA foram adicionados e o meio foi levemente acidificado (até pH 5,0), com ácido acético glacial. O material passou por nova evaporação em estufa a 70°C . O tratamento de superfície nesta etapa tem por finalidade melhorar a compatibilidade química das partículas com a matriz através da formação de pontes de hidrogênio. Os reagentes utilizados nesta etapa, bem como, suas quantidades, fabricante e pureza encontram-se na Tab. 4.

Tabela 4 - Reagentes utilizados na obtenção do nanocompósito a base de agar.

Reagente	Fórmula molecular	Fabricante	Pureza (%)	Quantidade utilizada *
Agar	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Sigma-Aldrich	-	3,00g
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	Synth	70%	3,0mL
Glutaraldeído	$C_5H_8O_2$	Vetec	50%	300 μ L
Álcool Etílico Absoluto	CH_3CH_2OH	Synth	99,5	10mL
Tetraethyl orthosilicato	$C_8H_{20}O_4Si$	Sigma-Aldrich	98%	1mL

Ao pó resultante do tratamento térmico da etapa anterior foi adicionada água destilada para se proceder a dispersão das nanopartículas em aparelho de ultrassom Sonics Vibra cells pelo período de 30 minutos à uma hora, dependendo da concentração de nanopartícula a ser dispersa. Para concentração de 0,5 % e 1 % de *nanofillers* em relação a massa de Agar utilizada para obtenção do polímero, utilizou-se um tempo de dispersão de 30 minutos, para a concentração de 2 %, utilizou-se um tempo de dispersão de uma hora.

Após dispersão das nanopartículas no volume de água destilada que será utilizado para obter o polímero, procedeu-se a pesagem do Agar e adição deste à mistura, sob agitação e aquecimento até temperatura de 100 °C. Então, acrescentou-se o agente plastificante e reticulante, nas concentrações já demonstradas no item anterior.

A metodologia aplicada nesta etapa corresponde ao procedimento descrito como “intercalação em solução”, onde um solvente é utilizado pra promover a dispersão das partículas e solubilização do polímero, posteriormente o solvente é evaporado e o nanocompósito é formado (ESTEVES; BARROS-TIMONS; TRINDADE, 2004).

A solução formada foi vertida ainda quente (100 °C) em prato refratário, com dimensões internas de 15 cm x 27 cm, que serviu de molde para o compósito. O material permaneceu a temperatura ambiente, em local plano e ao ar livre até completa evaporação do solvente.

Todos os nanocompósitos poliméricos obtidos eram transparentes e sem descontinuidades, com espessura de 0,1 mm. As películas foram armazenadas em condições secas até serem testados, para manter sua estabilidade (LOPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2010a, 2010b, 2011).

4.4. Técnicas de Caracterização

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electronic Microscope – SEM) é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, ou seja, basicamente não transparentes ao feixe de elétrons. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução e à grande profundidade de foco, resultando em imagens com aparência tridimensional (KESTENBCH; FILHO, 1994).

A interpretação da imagem na microscopia eletrônica de varredura é direta, pois geralmente é possível associar a imagem observada às características superficiais da amostra.

A microestrutura (superficial e interna) das nanopartículas cerâmicas, do polímero a base de agar e dos nanocompósitos foram analisadas empregando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM), modelo Quanta 200 (FEI).

Amostras das partículas foram depositadas em porta-amostra de alumínio e recobertas com 30nm de ouro para facilitar a descarga de elétrons. Amostras do polímero a base de agar e dos nanocompósitos, com dimensão de 1 cm de diâmetro cada, foram depositadas em porta-amostras e recobertas com ouro.

As imagens foram obtidas no Nano-Electronics Centre, Advanced Technology Institute (ATI), da Universidade de Surrey, Guildford, Reino Unido.

4.4.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman faz a leitura das variações de energia entre os fótons difundidos, quando os primeiros atingem uma porção da matéria. Este fenômeno é explicado pelos princípios da mecânica quântica que demonstra que o efeito fotoelétrico ocorre devido a luz ser constituída de fótons cuja energia pode ser transferida para um elétron, quando aqueles colidem com uma superfície. A teoria também revela que um elétron, ao receber esta quantidade de energia, poderá passar de um nível de menor energia para um de maior energia, retornando em seguida ao estado de energia anterior, o que implicará na emissão de um fóton.

Especificamente, a Espectroscopia Raman permite ler a diferença de energia entre os fótons incidentes e a energia dos fótons emitidos pela parcela de elétrons que não retornam exatamente para o mesmo nível.

A luz Raman espalhada é coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade é mostrada em função de sua mudança de frequência (deslocamento Raman). Este deslocamento é frequentemente medido em número de onda (cm^{-1}), uma unidade conveniente para relacionar a mudança da frequência de luz espalhada em relação à frequência da luz incidente.

É uma técnica muito utilizada no estudo da estrutura de sistemas moleculares. Não é um processo destrutivo, pode ser realizado na presença de ar, para amostras sólidas, líquidas e gasosas, sem exigência prévia de preparação de amostras, são as principais vantagens deste método.

Amostras dos *nanofillers* obtidos, do polímero a base de agar e dos nanocompósitos foram analisadas em sistema de 2.000 micro Renishaw Raman com laser a 782 nm, no Nano-Electronics Centre, Advanced Technology Institute (ATI), da Universidade de Surrey, Guildford, Reino Unido.

4.4.3 Resistência Mecânica

Métodos clássicos para a avaliação da resistência mecânica de filmes sintéticos podem ser utilizados em filmes comestíveis e/ou biodegradáveis. Os

mesmos, entretanto, são extremamente sensíveis às condições ambientais. Entre os métodos clássicos utilizados na avaliação mecânica, os testes de tração são amplamente utilizados. A tensão na ruptura é definida como sendo a máxima força que um material pode sustentar (ROBERTSON, 1993).

As propriedades mecânicas dos materiais determinam as respostas destes às influências mecânicas externas, estando associadas à capacidade de desenvolver deformações reversíveis e irreversíveis e de apresentar resistência à fratura. O teste mais utilizado para medir resistência mecânica é o teste de tração, onde podem ser derivadas as propriedades de resistência à tração, alongação, força resultante e módulo de elasticidade.

As propriedades de tração são úteis para identificação e caracterização de filmes flexíveis e expressam a resistência do material ao alongamento e mesmo ao rompimento, quando submetido à tração. (OLIVEIRA et al., 1996)

A resistência à tração é medida pela força máxima de tração que o filme pode sustentar. A alongação é geralmente tirada do ponto de quebra e é expressa como porcentagem de aumento do comprimento original da amostra. Força resultante é a força de tração na qual ocorre o primeiro sinal de deformação não elástica. O módulo de elasticidade ou módulo de Young mede também a resistência do filme (BARRETO, 2003).

Nos diferentes testes, as amostras são submetidas a ensaios padronizados, com os corpos de provas tendo dimensões especificadas por normas, e as condições de teste sendo padronizadas (MANO, 1991; CANEVAROLO, 2002).

O ensaio de determinação das propriedades de tração de uma estrutura flexível envolve a separação, a uma velocidade constante, de duas garras que prendem as extremidades de um corpo-de-prova, registrando-se ao longo do ensaio a força ou a resistência que o material oferece à deformação (alongamento). Inicialmente, o material oferece resistência crescente à solicitação de tração, a qual provoca seu alongamento. A partir de certo ponto, o aumento de resistência passa a ser menor para um mesmo aumento de deformação até o ponto de escoamento, a partir do qual é possível alongar o filme sem que este responda com um aumento de resistência. Continuando o alongamento, o material resiste até que ocorra sua ruptura (SARANTÓPOULOS et al., 2002)

Os ensaios de tração foram realizados na máquina universal de ensaios Instron, modelo E3000, com velocidade de tração de 10mm/min e carga de 50 N, conforme norma ASTM D 638 (1989) e ISO 527-1 (1993), sob condições normais de temperatura e pressão.

Os corpos de prova para os ensaios de tração foram confeccionados conforme a norma ASTM D 638 (fig. 8 e fig. 9), sendo os testes realizados após secagem completa do polímero e dos nanocompósitos.

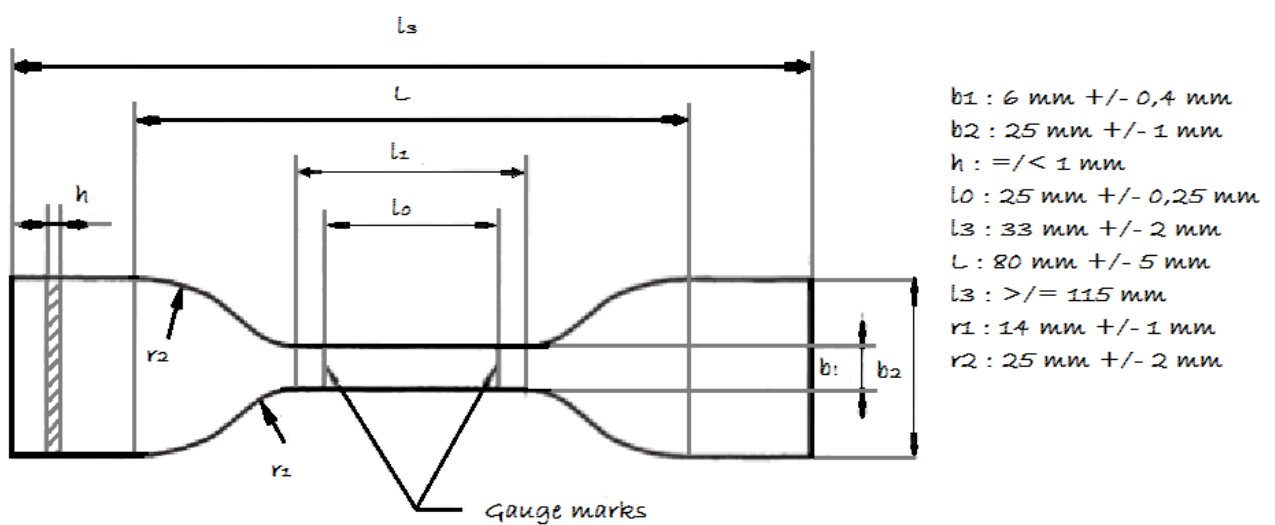


Figura 8 - Corpo de prova conforme estabelecido nas normas ASTM D 638 e ISO 527-1.

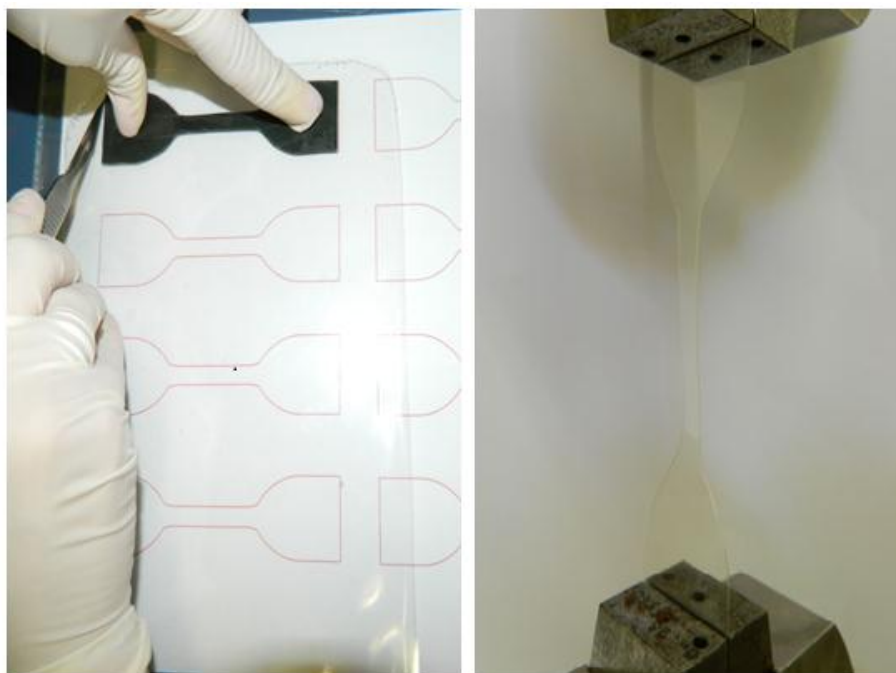


Figura 9 - Corte do corpo de prova em molde confeccionado de acordo com as normas ASTM D 638 e ISO 527-1 e ensaio de tração.

4.4.4 Atividade Antimicrobiana

Os testes para avaliar as propriedades antibacterianas podem ser qualitativos (como o teste de difusão em ágar) ou quantitativos (contagem de colônias bacterianas). As espécies bacterianas *Escherichia coli* (Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) são utilizadas na maioria dos métodos de ensaio. Entretanto, nenhum dos métodos utilizados para determinar a resistência dos materiais poliméricos ao crescimento microbiano permitem avaliações quantitativas do agente antimicrobiano incorporado a esses materiais.

Os agentes antimicrobianos normalmente requerem contato com a célula microbiana para a atividade máxima. Quando suspensões do inóculo bacteriano são aplicadas sobre um material plástico tratado, ou outro material hidrófobo, a tensão superficial do polímero, muitas vezes faz com que a suspensão de inóculo forme uma cúpula, ou seja, bactérias dentro das gotas de inóculo podem não contactar com a superfície tratada.

Este teste-padrão envolve uma suspensão de inóculo em agar que proporciona um contato relativamente uniforme dos inóculos com as superfícies antimicrobianas.

O teste estabelecido pela ASTM E 2180 (2001) é desenhado para avaliar a eficácia antimicrobiana dos agentes incorporados ou ligados dentro ou sobre superfícies essencialmente planas (bidimensionais) ou superfícies poliméricas hidrofóbicas. O método concentra-se principalmente na avaliação atividade antibacteriana, no entanto, outros microrganismos, tais como leveduras e conídios podem ser testados utilizando este método.

O veículo para o inóculo é uma suspensão de agar que reduz a tensão de superfície da solução salina e do inóculo portador, permitindo a formação de um "pseudo-biofilme", oferecendo ainda mais contato do inóculo com a superfície de teste.

Este método pode confirmar a presença de atividade antimicrobiana em plástico ou em superfícies hidrofóbicas e permite a determinação de diferenças na atividade antimicrobiana entre plásticos ou polímeros não tratados.

Esterilização do material

O calor nas formas de água quente, ar quente, vapor e radiações é empregado na remoção de microrganismos aderidos a superfícies (ANDRADE e MACEDO, 1996). Como exemplo de radiação não-ionizante tem-se a radiação ultravioleta, que é amplamente empregada na indústria de alimentos para descontaminação de embalagens e de algumas superfícies de equipamentos, ambientes e água.

A radiação UV é um agente sanificante que elimina inúmeros microorganismos. Na indústria de alimentos, a utilização de radiação ultravioleta apresenta várias vantagens quando comparada com a desinfecção química, visto que esta radiação não deixa resíduos nas superfícies, é um processo a seco, que não necessita de aquecimento, apresenta simples emprego e o sistema é de pequeno custo efetivo para a esterilização de pequenas áreas, não apresentando restrição legal, como é o caso de alguns agentes químicos e de radiação de alta energia (BACHMANN, 1975; WONG et al., 1998).

Para que não ocorresse a interferência de possíveis contaminações do material desenvolvido durante a realização dos ensaios microbiológicos, foi testada a eficiência da radiação UV como método de esterilização. Cinco amostras de cada material polimérico desenvolvido neste trabalho (TiO₂ 0,5%, TiO₂ 1%, TiO₂ 2%, HA 0,5%, HA 1%, HA 2% e filme de ágar), com massa aproximada de 0,01g e com dimensões de 1,0 cm x 0,5 cm, e 0,1 mm de espessura cada, foram esterilizadas por quatro horas, sendo duas horas de exposição ao UV para cada face do material, em capela de fluxo laminar. O material esterilizado foi colocado em tubos contendo 5,0 mL de meio TSB, totalizando três repetições para cada material.

O material permaneceu em estufa a 37 ° C por 72 horas. Após este período o material foi avaliado.

Teste do Halo de Inibição/Difusão em agar

Crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*

Para o crescimento bacteriano, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura sintético, que fornece nutrientes essenciais ao desenvolvimento celular. Essas exigências nutritivas estão relacionadas à fonte orgânica de energia, carbono, nitrogênio e íons orgânicos.

As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (Gram-positivas) e *Escherichia coli* (Gram-negativa). As cepas foram repicadas para meio TSA estéril, e cultivadas por um período de 24 horas em ambiente de aerobiose à 37 °C.

Padronização do Inóculo

Ao atingir a fase estacionária de crescimento, o inóculo das três cepas bacterianas foi colocado em meio TSB e padronizado de acordo com a turbidez do inóculo do tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, contendo $1,5 \times 10^8$ bactérias / mL. Em seguida, cada tubo foi agitado vigorosamente para distribuir uniformemente as bactérias. Uma alíquota de 1,6 mL de cada suspensão de inóculo

padronizado foi colocada em três tubos contendo 80 mL de meio TSA líquido, previamente esterilizado, para posterior utilização no ensaio de difusão em ágar.

Teste de difusão em ágar

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a norma ISO 20645(2004) (Determinação da atividade anti-bacteriana - teste da placa de difusão em ágar), esquematizada nas figuras 10 e 11, onde o material alvo do teste é depositado em placas de duas camadas de ágar. A camada inferior é constituída por meio de cultura livre de bactérias e a camada superior composta pelo meio inoculado com as bactérias de teste, individualmente. Para a camada inferior 25 mL de meio TSA foi vertido em placas de petri que foram esterilizadas em autoclave. Após a esterilização das 24 placas contendo a camada inferior de meio, corpos de prova de cada material polimérico, com 2,0 cm de diâmetro e 0,1 mm de espessura, previamente esterilizados por luz UV, durante 4 horas, em capela de fluxo laminar marca IVECO modelo BIOSEG 12, foram depositados sobre a camada de meio ainda líquido, conforme fig. 10 e 11. Posteriormente, 12,5 mL do meio contendo o inóculo padronizado de cada bactéria foram vertidos sobre o material polimérico depositado sobre o meio TSA solidificado. As placas de petri foram incubadas em estufa com temperatura de 37°C por um período de 24 e 48 horas. Após, esse período, as placas foram removidas da estufa e a área coberta pelas colônias bacterianas foi avaliada. O nível de atividade antibacteriana foi avaliado examinando a extensão do crescimento bacteriano na zona de contato entre o ágar e a amostra de teste. Se uma zona de inibição foi observada próximo ao polímero (comprimento > 1 mm), o efeito antibacteriano é classificado como satisfatório. Se a amostra é totalmente coberta pelas colônias de bactérias, não houve efeito antimicrobiano ou este não foi suficiente.

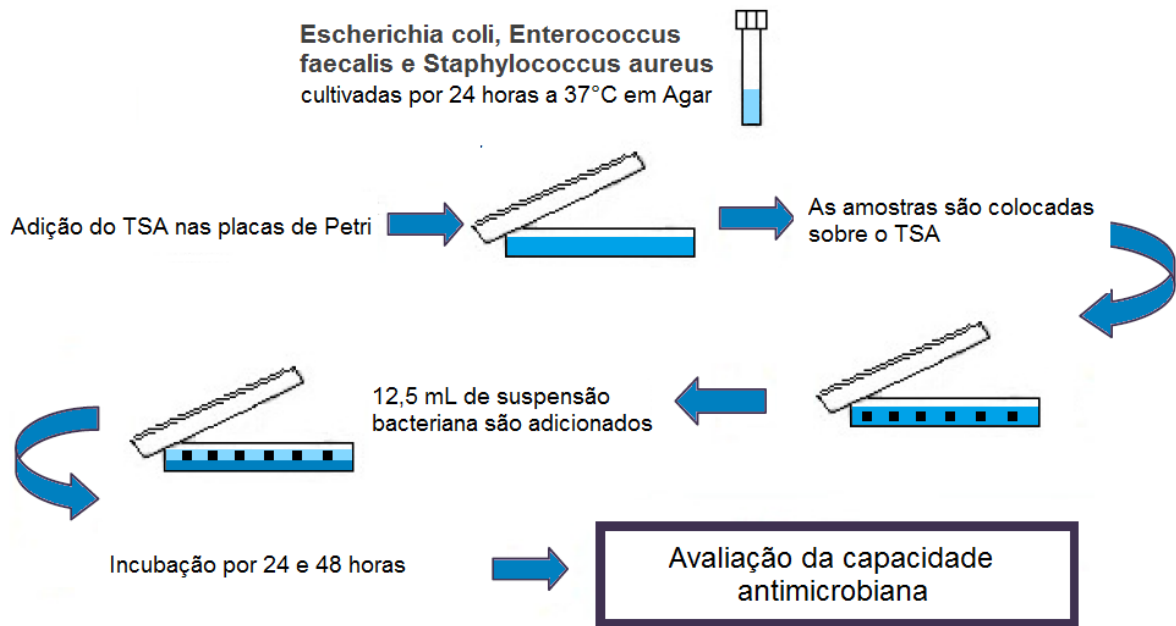


Figura 10 - Esquema do método experimental para avaliação da atividade antibacteriana pelo teste de difusão em ágar.

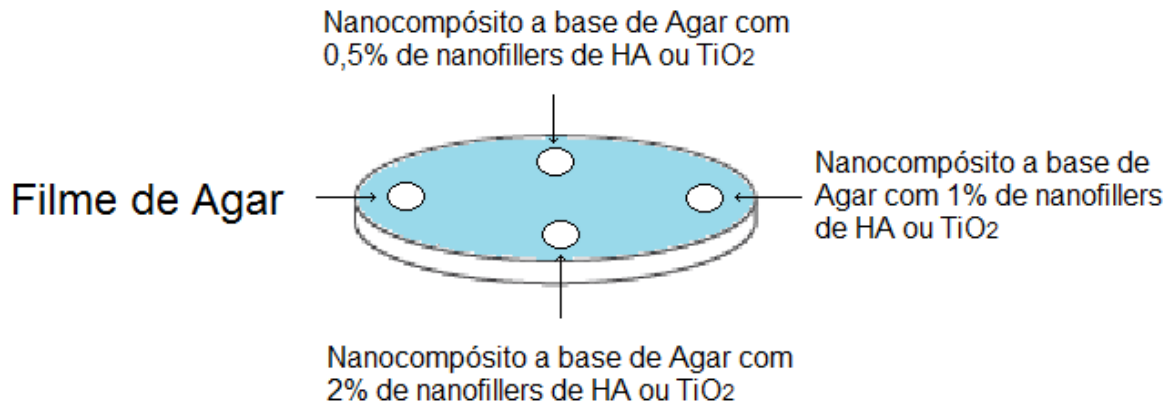


Figura 11 - Demonstração esquemática da disposição dos corpos de prova no teste de difusão em ágar, onde o polímero de ágar foi considerado como controle.

Avaliação da atividade antimicrobiana dos polímeros ao longo do tempo através de contagem bacteriana

Como visto no experimento anterior, a taxa de difusão de materiais sólidos e hidrofóbicos é baixa em meios sólidos e, também a tensão superficial oferecida por estes materiais podem mascarar o resultado dos testes que envolvem a formação de halos de inibição, portanto, este experimento foi realizado com o intuito de determinar o efeito do tempo de imersão dos polímeros, e conseqüentemente a difusão de material destes no meio de crescimento, sobre a atividade microbiana dos mesmos.

O ensaio ao longo do tempo está baseado na metodologia descrita por GAVARA et al. (2012). Em resumo, os materiais foram divididos em 7 grupos (n=3); sendo três grupos com TiO₂ nas concentrações de; 0,5%, 1%, 2%, outros 3 grupos com hidroxiapatita nas mesmas concentrações de 0,5%, 1%, 2% e um ultimo grupo controle o polímero a base de ágar, todos os materiais testados tiveram dimensões de 0,5 cm x 1,0 cm e massa aproximada de 0,01 g, as mesmas foram esterilizadas e depositadas individualmente em tubos rosqueados contendo 4 mL de meio TSB. As amostras permaneceram incubadas em estufa a temperatura de 37° C sendo avaliadas em dois períodos de tempo, dois dias (48 horas) e 5 dias (120 horas).

Após os períodos de incubação os polímeros foram retirados do meio e acrescentou-se em cada tubo uma alíquota de 40 µL de inóculo da bactéria *E. coli*, (padronizado em espectrofotômetro, em fase exponencial 10⁷ bactérias). Os materiais foram incubados a 37° C por 24 horas. Em solução salina foram realizadas 7 diluições seriadas, seguidamente 20 µl de cada diluição foram plaqueadas em meio TSA e incubadas em estufa por 24 h, após este período foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (ufc/cm²).

4.4.5 Citotoxicidade do Material

Cultura de Células

As células NIH/3T3 foram obtidos a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), adquirido a partir de Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, EUA), respectivamente. As células foram cultivadas a 37 ° C numa atmosfera de 95% de ar humidificado e CO₂ a 5%, como descrito anteriormente (HENN et al., 2011; SANTANA et al., 2012; NEDEL et al., 2012a). As experiências foram realizadas com células em fase logarítmica de crescimento.

Determinação da citotoxicidade das partículas (*Nanofillers*)

As células foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células por poço, num volume de 100 µL em placas de 96 poços e cultivadas a 37 ° C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂/95% de ar durante 24 horas antes de serem utilizados no ensaio na WST-1. *Nanofillers* silanizados de TiO₂ e Hidroxiapatita foram dispersos em água destilada, sendo então misturadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS, ajustando-se a concentração da solução a 2%. As células foram incubadas com as partículas de ambos os materiais por 24h e 48 h. Após este período, 20 mL de WST-1 (Roche, Mannheim, Alemanha) foi adicionado ao meio de cada poço e as placas foram incubadas durante 2 h. Em seguida, alíquotas de 100 µL foram retirados de cada poço e a densidade óptica a 450 nm foi determinada num leitor de microplacas (Thermo Placa TP-Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), como descrito anteriormente (NEDEL et al. 2012b) . Todas as observações foram validadas por pelo menos duas experiências independentes para cada e as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da citotoxicidade dos filmes

Amostras dos nanocompósitos poliméricos com diferentes concentrações de *nanofillers* de TiO₂ ou Hidroxiapatita (0,5 %, 1 % e 2 %), foram preparados em uma proporção de 91,6 mm² de área superficial por mL de meio de cultura celular seguindo as recomendações da norma ISO 10993-12 (KRIFKA et al. 2012). As amostras foram então esterilizadas por exposição a luz UV (ultra-violeta) germicida durante 40 minutos, para cada face do filme, e pré-incubados em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de FBS a 37 °C e pH 7,2, durante 24 h, sob condições estáticas, como descrito anteriormente (HENN et al 2011; SANTANA et al 2012). As células foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células por poço num volume de 100 µL em placas de 96 poços e cultivadas a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂/95% de ar durante 24 h. Os corpos de prova de cada material polimérico mantidos no meio por 24 h foram removidos e aliquotas de 200 µL dos meios foram extraídas e incubou-se durante 24 h e 72 h. Após este período, 20 mL de WST-1 (Roche, Mannheim, Alemanha) foi adicionada ao meio de cada poço e as placas foram incubadas durante 2 h. Em seguida, alíquotas de 100 µL foram retiradas de cada poço e a densidade óptica a 450 nm foi determinada num leitor de microplacas (Thermo Placa TP-Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A percentagem de inibição do crescimento das células foi determinada como se segue: taxa de inibição = $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100$ (NEDEL et al 2012b.). Todas as observações foram validadas por pelo menos duas experiências independentes e as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.6 Análise dos Dados

Para os ensaios mecânicos os conjuntos de dados foram analisados através de one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. A significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as análises. Os dados foram expressos em médias $\pm$ SEM.

Para atividade microbiológica os dados obtidos foram analisados usando a t-test, ANOVA e teste complementar de Student Newman Keuls para comparações múltiplas. A significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as análises. Os dados estão expressos como médias $\pm$ SEM.

Para os ensaios de citotoxicidade os conjuntos de dados foram analisados usando uma two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. A significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as análises. Os dados estão expressos como médias $\pm$ SEM.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na análise por SEM dos *nanofillers* (fig. 12) além de observarmos as estruturas formadas pelos “grãos” de TiO_2 e HA, ficam evidentes suas dimensões nanométricas, bem como a porosidade existente no material obtido.

A análise por SEM (fig. 13) dos filmes demonstra que a incorporação de nanopartículas de TiO_2 resulta no desenvolvimento de características de superfície nos polímeros, que se tornam mais pronunciadas à medida que a concentração de nanopartículas aumenta de 0,5 a 2 %. Comparado a isto, não há nenhuma mudança observável na superfície do ágar mediante a incorporação de hidroxiapatita (fig. 13). Isto pode ser atribuído às tensões interfaciais entre as nanopartículas e o polímero, assim como, à relação com o processo de silanização das nanofibras e interface de integração (BRZOSKA; AZOUZ; RONDELEZ, 1994). Esta etapa de limitação de modificação de substratos sólidos (nanopartículas) por revestimento de monocamadas orgânicas pode ser modificada usando alquilsilano (DENG et al., 2010).

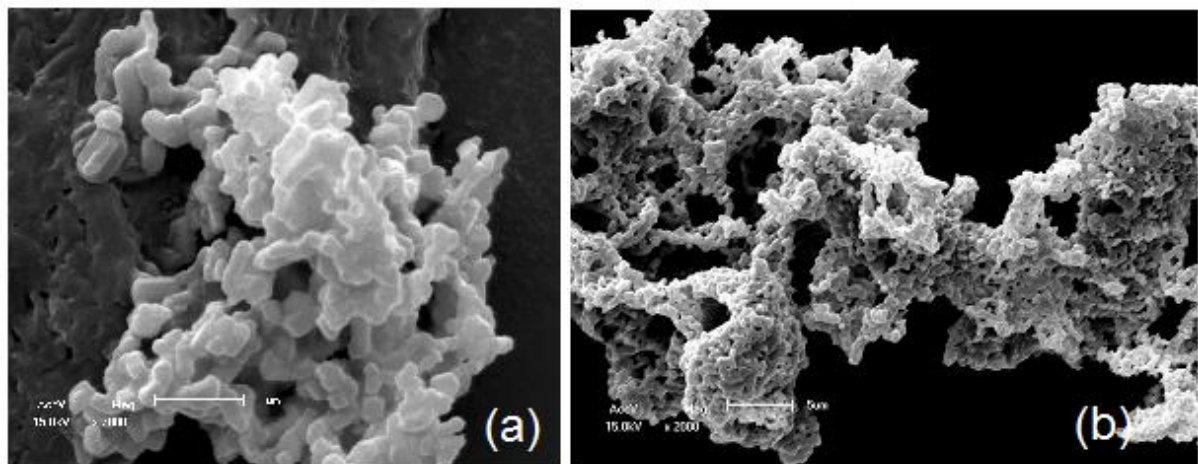


Figura 12 - Micrografias por SEM de *nanofillers* (a) dióxido de titânio e (b) HA.

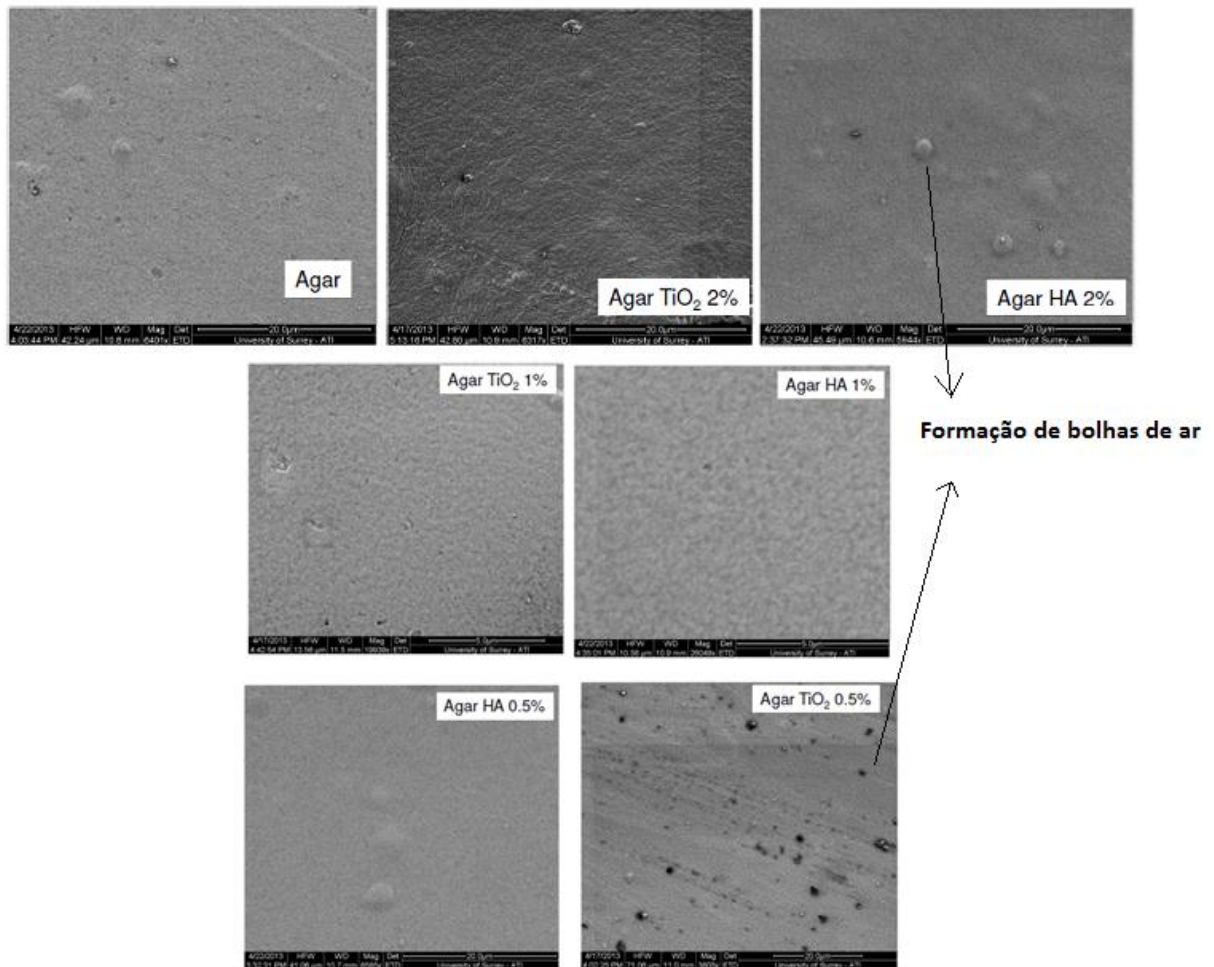


Figura 13 - Micrografias por SEM do polímero a base de ágar e dos nanocompósitos com 2%, 1% e 0,5 de *nanofillers* de TiO₂ e HA, respectivamente.

5.2 Espectroscopia Raman

A figura 14 mostra o espectro Raman dos *nanofillers* silanizados de TiO_2 e HA. O espectro Raman do TiO_2 mostra quatro picos associados a anatase, modos de vibração 637 , 523 , 390 e 144 cm^{-1} , indicando a síntese bem-sucedida do TiO_2 na fase anatase (ZHANG et al., 2000). O espectro Raman das amostras de hidroxiapatita tem picos a 445 , 612 , 970 , e 1.044 cm^{-1} , incluindo os modos vibracionais de fosfato e carbonato (NATHANAEL et al., 2013). Um sinal amorfo significativo também foi detectado, o que é atribuído à presença de silano na amostra.

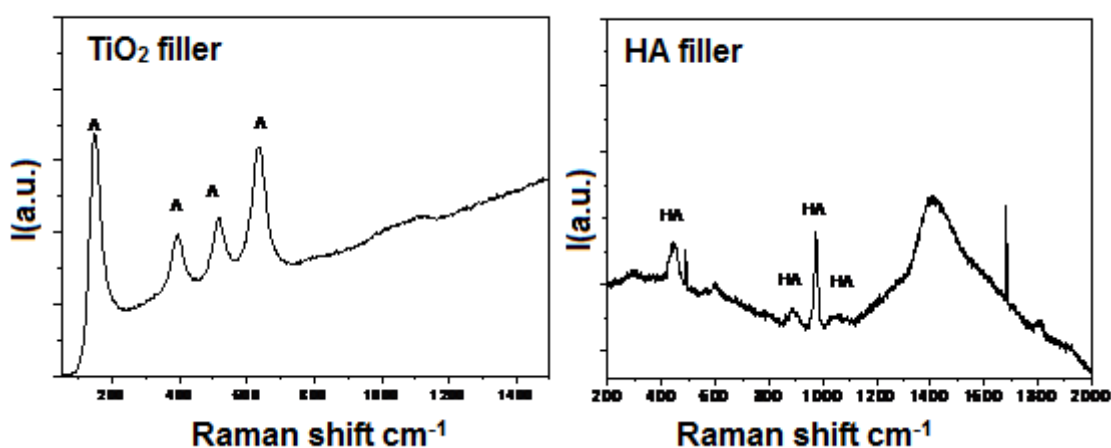


Figura 14 - Espetros Raman dos nanofillers de TiO_2 e HA, respectivamente.

5.3 Resistência Mecânica

As propriedades mecânicas de tração são úteis para identificação e caracterização de filmes, pois expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento quando submetido à tração. Para manter a integridade e a propriedade de barreira, os filmes devem ser hábeis e resistir ao estresse normal encontrado durante sua aplicação subsequente. Normalmente, uma alta resistência é requerida, mas os valores de deformação devem ser ajustados de acordo com a aplicação. (HENRIQUE, 2002).

A incorporação de cargas aos materiais poliméricos visa melhorar, entre outras, as propriedades mecânicas (resistência à tração e módulo de elasticidade) destes materiais. Há relatos de incremento de 35 % no módulo de Young e 25 % na força de tração pela adição de nanopartículas de HA em matriz polimérica (PLGA). (BUCZYNSKA; PAMULA; BLAZEWICZ, 2011). Chan e colaboradores observaram que compósitos de matriz polimérica exibem melhores resultados de resistência mecânica com a incorporação de nanopartículas de óxidos (CHAN et al., 2002).

No presente trabalho, como pode ser observado na fig. 15, em uma análise comparativa entre os compósitos de ágar, a incorporação de nanopartículas de TiO_2 e também HA resulta em uma melhoria das características mecânicas, evidenciada pelo aumento da resistência mecânica demonstrada pelo ensaio de tração, onde o módulo de tração de todos os compósitos foram superiores a matriz de controle a base de ágar ($p \leq 0001$).

A Tabela 5 mostra os resultados do teste de tração, em valores médios absolutos, sobre a matriz de controle a base de ágar e os nanocompósitos a base de ágar contendo 0,5%, 1% e 2% de *nanofillers* de TiO_2 e HA, onde se observa que todos os filmes apresentaram comportamento semelhante quanto a tenacidade, carga até ruptura e tensão na ruptura, respectivamente. Entretanto, com relação ao módulo de Young observa-se que houve um incremento de até 61% dos valores observados em todos os nanocompósitos com relação a matriz de controle, ou seja, o filme formado apenas por ágar, o que demonstra que a adição dos *nanofillers* nas proporções utilizadas foram adequadas para melhorar a resistência mecânicas dos filmes desenvolvidos, além de serem superiores aos valores de incremento relatados na literatura, como visto anteriormente.

Ensaio mecânicos realizados por Sousa (2008) em filmes de ágar da Gracilaria e ágar comercial registraram características mecânicas semelhantes entre si. O módulo de elasticidade para ambos os filmes neste estudo foi igual a 48,7 MPa e para o ágar comercial 48,5 MPa. (SOUSA, 2008). Comparativamente, mesmo sem a adição de *nanofillers* o polímero obtido apresenta módulo de elasticidade muito superior, o que se deve, muito provavelmente, a rede formada pelo ágar com os agentes plastificante e reticulante.

Estes resultados podem ser explicados pela literatura, que relata que polissacarídeos possuem alta resistência à tração e pouca elongação, o que é

justificado pela conformação da cadeia polimérica, que no caso dos polissacarídeos é linear (CHEN, 1995).

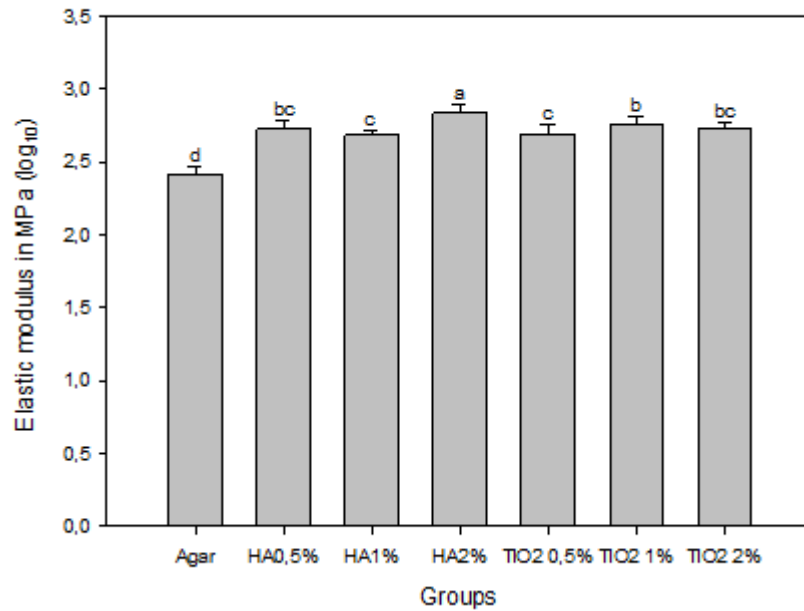


Figura 15 - Análise estatística dos diferentes grupos de materiais, revisada a igualdade de variância e a distribuição normal, sendo os dados transformados em $\log_{10}$. Valores identificados por letras minúsculas semelhantes não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Ensaio de tração em polímero a base de ágar e compósitos a base de ágar com 0,5%, 1% e 2% de nanofillers de TiO₂ e HA – Valores médios absolutos.

	Modulus (MPa)	Tenacity at Yield (Zero slope) (gf/tex)	Load at Yield (Zero Slope) (N)	Tensile stress at Yield (Zero Slope) (MPa)
Agar	271.6867	14.95001	14.66095	23.29716
Agar + 0,5% HA	541.4162	19.59888	19.21993	29.56913
Agar + 1% HA	485.0067	17.13585	16.80453	25.85313
Agar + 2% HÁ	712.4272	21.91751	21.49373	33.06728
Agar + 0,5% TiO ₂	511.3212	18.78428	18.42108	28.34013
Agar + 1% TiO ₂	562.5244	22.85154	22.40971	34.47647
Agar + 2% TiO ₂	532.4774	18.59151	18.23205	23.37442

5.4 Atividade Antimicrobiana

5.4.1 Eficiência da esterilização do material

A eficiência antimicrobiana da radiação UV é variável, aspectos como intensidade de radiação, tempo de exposição, distância da fonte de radiação UV à superfície, vida útil das lâmpadas germicidas comerciais e ação sobre os diversos microrganismos podem interferir na eficiência do processo de esterilização. Neste caso, a inativação dos microrganismos (K) é resultado da exposição à radiação ultravioleta, sendo expressa como um produto da intensidade da energia germicida e do tempo (BACHMANN, 1975; SHECHMEISTER, 1991; FLÜCKIGER, 1995). Em condições práticas, o tempo de exposição é diferente para cada situação (SHECHMEISTER, 1991). Por exemplo, observa-se na prática que o tempo usado para redução da microbiota em polietileno, para embalagem de leite tipo C, é de aproximadamente dois segundos.

Após a permanência do material em estufa a 37°C por 72 horas foi observado que nenhuma alteração ocorreu no meio, o que confirma a eficiência da

técnica utilizada para esterilizar o material. Um processo de esterilização eficiente foi necessário porque o material obtido permaneceu armazenado em dessecador, mas mesmo assim, sujeito a contaminações, o que poderia interferir nos resultados dos ensaios microbiológicos.

5.4.2 Teste de Difusão em Agar

No teste de difusão em ágar foram encontradas amostras com crescimento bacteriano, e nenhuma delas apresentou formação de halo de inibição, independentemente dos grupos testados após 24 e 48 horas (fig. 16). Isso pode ser explicado pela norma ISO 20645, que relata que se não houver zona de inibição e ao mesmo tempo não houver crescimento bacteriano sobre as amostras, se considera que o resultado foi positivo, ou seja, que o tratamento foi eficaz. Por apresentar propriedades antibacterianas, tanto a presença do TiO_2 , quanto da Hidroxiapatita, poderiam inibir o a proliferação bacteriana, no entanto, fatores como a baixa difusão do material incorporado no polímero e a tensão superficial do polímero podem ter contribuído para um resultado de inibição insuficiente. Além disso, no caso dos nanocompósitos de TiO_2 a não utilização de luz ultra violeta durante o período em que o material permaneceu em contato com o meio, provavelmente não ativou a liberação dos radicais, o que não provocou a morte das bactérias presentes em sua superfície (SHIBATA et al., 2007; AKIBA et al., 2005).

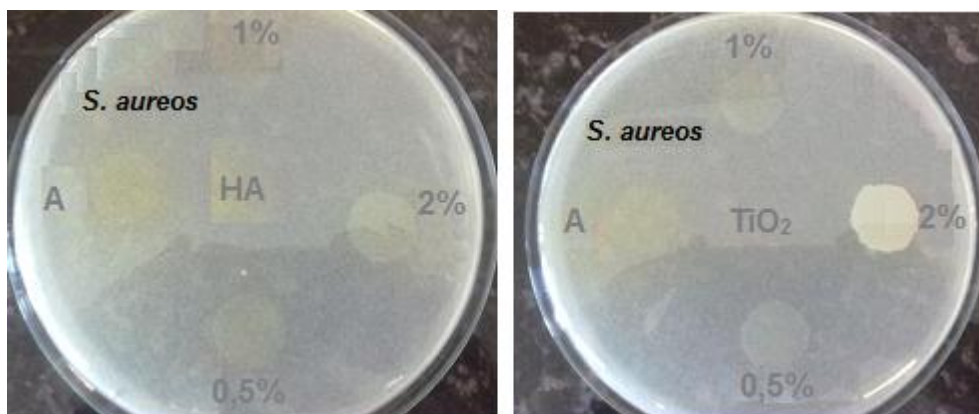


Figura 16 - Amostras dos nanocompósitos de TiO₂ e HA submetidos ao teste de difusão em ágar.

5.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos polímeros ao longo do tempo por contagem microbiana

A fig. 17 mostra as diluições realizadas bem como a formação das colônias bacterianas que foram alvo da contagem para avaliação estatística dos resultados obtidos.

Após 48 horas (fig. 18), o grupo HA 1% foi estatisticamente diferente ao grupo controle (C), HA 2% e TiO₂ 1%, no entanto, foi estatisticamente similar aos demais grupos testados ($p=0,004$).

Após 120 horas (fig. 19), observa-se que o grupo HA 0,5% foi estatisticamente diferente ao grupo HA 2%, no entanto, foi estatisticamente similar aos demais grupos testados ($p=0,028$).

Também, foi analisado cada grupo ao longo do tempo. Na fig. 20 observa-se que quando comparados os grupos de HA 1% e HA 2% houve uma diferença estatística significativa ao longo do tempo, já no grupo HA 0,5% não houve diferença ao longo do tempo ($p=0,252$).

Nos grupos que continham TiO₂ observa-se na fig. 21 que os grupos TiO₂ 0,5% e TiO₂ 2% tiveram diferença estatística significativa ao longo do tempo, já no grupo TiO₂ 1% não houve diferença estatística ($p=0,169$).

Estes resultados demonstram que houve atividade antimicrobiana ao longo do tempo no grupo Hidroxiapatita, o que confirma a propriedade antimicrobiana

relatada na literatura (SHIBATA et al., 2007). Estes autores sugerem que uma concentração de 5% do composto TiO_2 -Apatita exerce efeito antifúngico sobre *Candida albicans*.

Entretanto, verifica-se que após 120 horas houve maior proliferação bacteriana neste mesmo grupo, o que pode se justificar pela possível degradação do material. Também, fatores como o grupo bacteriano utilizado, podem justificar o resultado obtido, visto que organismos gram-negativos têm um maior sistema de defesa e são menos suscetíveis à ação de agentes antibacterianos, uma vez que possuem uma membrana exterior em torno da parede da célula de difusão que restringe a ação destes compostos (VAARA, 1992). Esta maior resistência das bactérias gram-negativas foram observados com outros compostos antimicrobianos (CANILLAC MOUREY, 2001; DELAQUIS et al, 2002;. HARPAZ et al, 2003).

No caso dos nanocompósitos de TiO_2 , como ocorreu no teste de difusão, a não utilização de luz ultra violeta durante o período em que o material permaneceu em contato com o meio, provavelmente não ativou a liberação dos radicais, o que não provocou a decomposição das bactérias (SHIBATA et al., 2007; AKIBA et al., 2005).

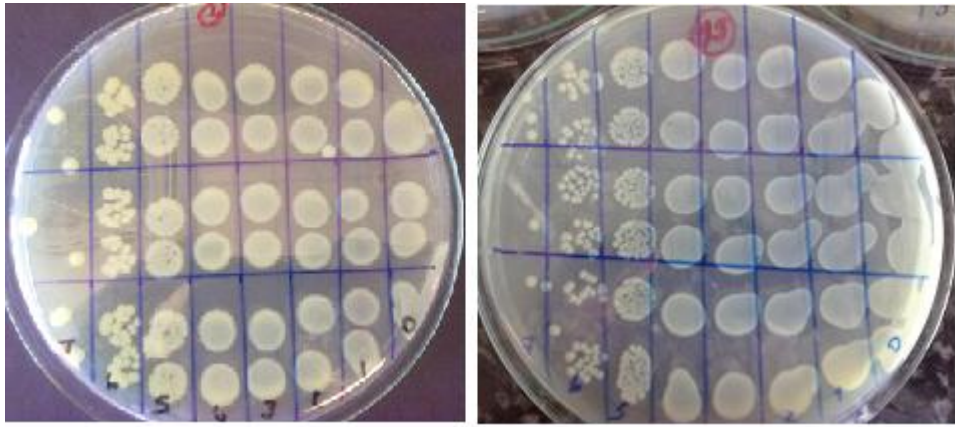


Figura 17 - Placas de diluição seriada, após incubação durante 24 h a 37 °C para a contagem de colônias bacterianas.

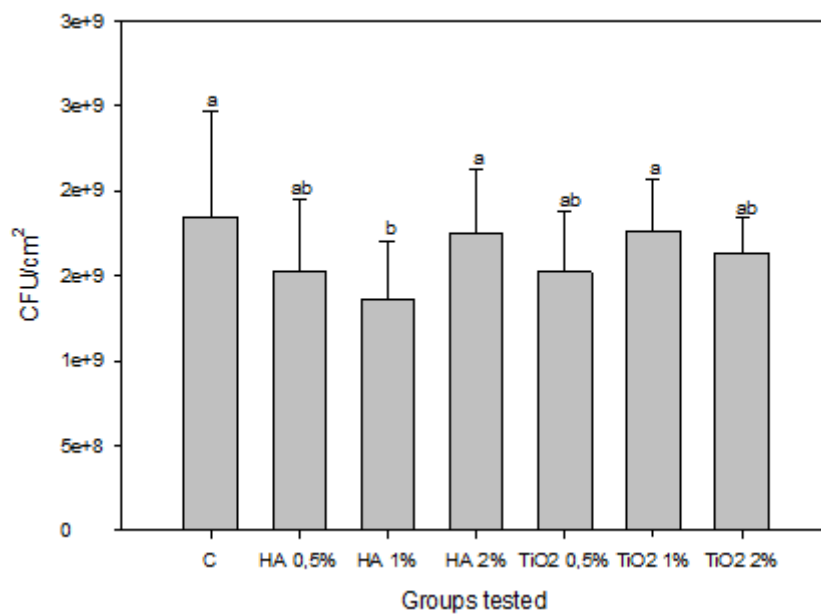


Figura 18 - Comparação entre os dois grupos após 48 h de exposição ($n = 9$) pela média da contagem de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

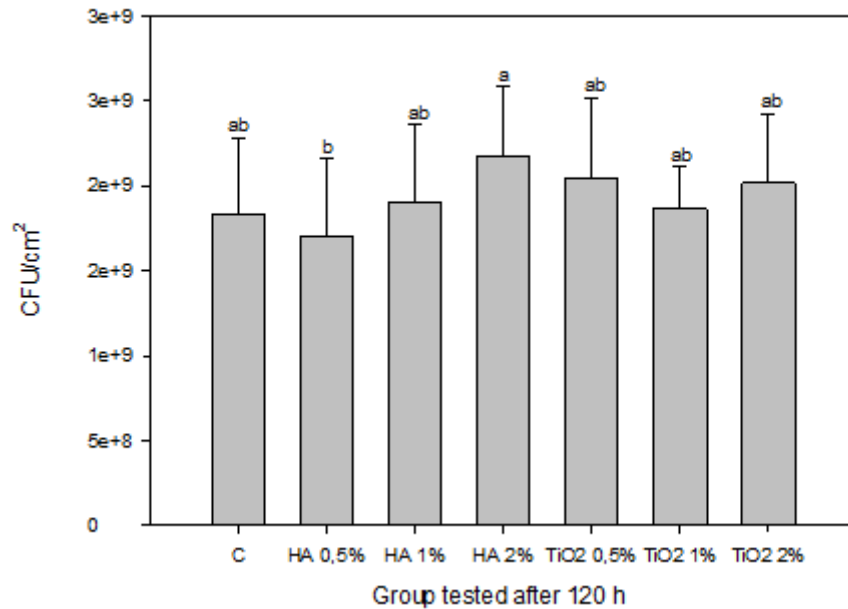


Figura 19 - Comparação entre os dois grupos após a exposição a 120 h (n = 9) pela média da contagem de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p > 0,05).

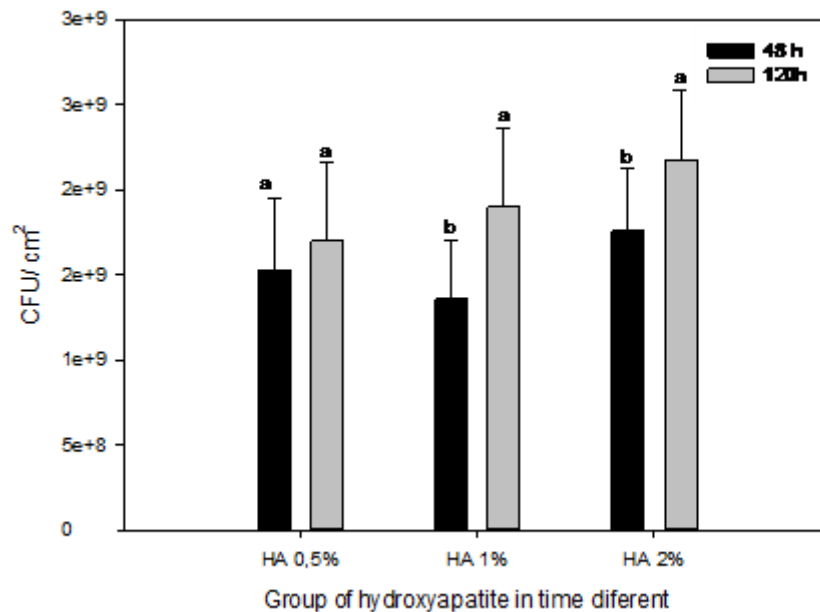


Figura 20 - Análise comparativa do grupo HA após a exposição ao longo do tempo de 48 e 120 horas (n = 9) pelas médias da contagem de bactérias *E. coli* viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p > 0,05).

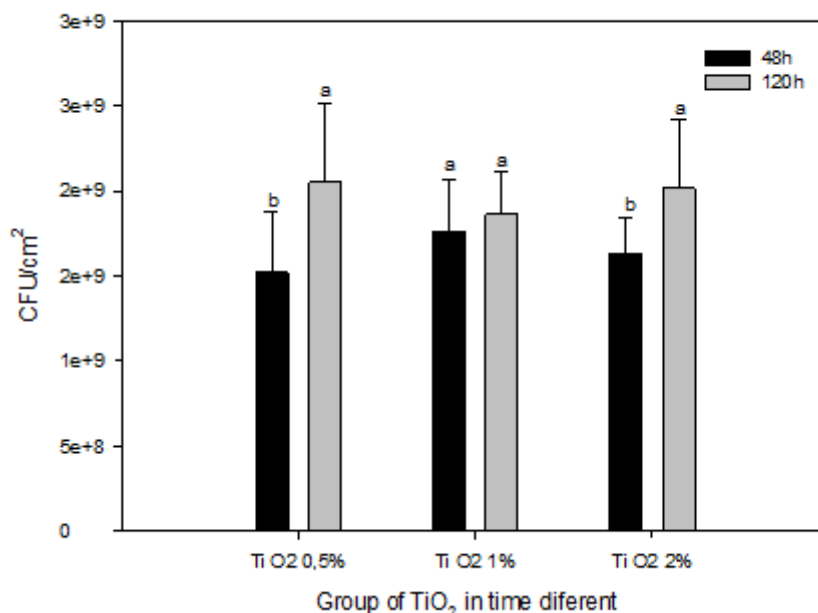


Figura 21 - Análise comparativa do grupo TiO₂ após a exposição ao longo do tempo de 48 e 120 horas (n = 9) pelas médias das contagens de bactérias *E. coli*. viáveis (ufc/cm²). Valores que foram identificados por letras iguais, não foram significativamente diferentes (p> 0,05).

5.5 Citotoxicidade do Material

5.5.1 Citotoxicidade dos Nanofillers

As propriedades citotóxicas das nanopartículas foram avaliadas por meio de um ensaio de WST-1. Este ensaio baseia-se na redução de WST-1 por superóxidos, que estão presentes no ambiente extracelular ou associados a membrana plasmática (NEDEL et al., 2011). Os resultados, representados na fig. 22, demonstram um aumento na viabilidade celular, em todos os três grupos (TiO₂, HA e controle), relacionadas com o período de tempo de exposição das células (24 a 48 h). Além disso, tanto o TiO₂ e HA não apresentaram diferenças significativas para a viabilidade da célula, quando comparados com o grupo de controle, em ambos os períodos de tempo.

Estudos prévios envolvendo HA e TiO₂ têm mostrado que estes materiais são altamente biocompatíveis, e são aplicados em escala macro na ortopedia e odontologia (KUMAR et al., 2011). Entretanto, nanoestruturas de HA e TiO₂ quando implantadas são capazes de atravessar membranas celulares e entrar em organelas tais como as mitocôndrias e núcleos, podendo levar à lesão e inibir o crescimento celular (MOTSKIN et al., 2009; GHOSH; CHAKRABORTY; MUKHERJEE, 2013). Outros estudos sugerem que nanopartículas de TiO₂ tem um baixo efeito genotóxico e citotóxico e que certos tipos de nanopartículas HA podem até mesmo melhorar a viabilidade celular e ajudar na proliferação celular. Esta controvérsia pode ser parcialmente explicada pelas diferenças nas propriedades físico-químicas de nanopartículas de TiO₂ e HA, particularmente, o seu tamanho, forma e carga de superfície (CHEN et al., 2011; ZHU, EATON; LI, 2012).

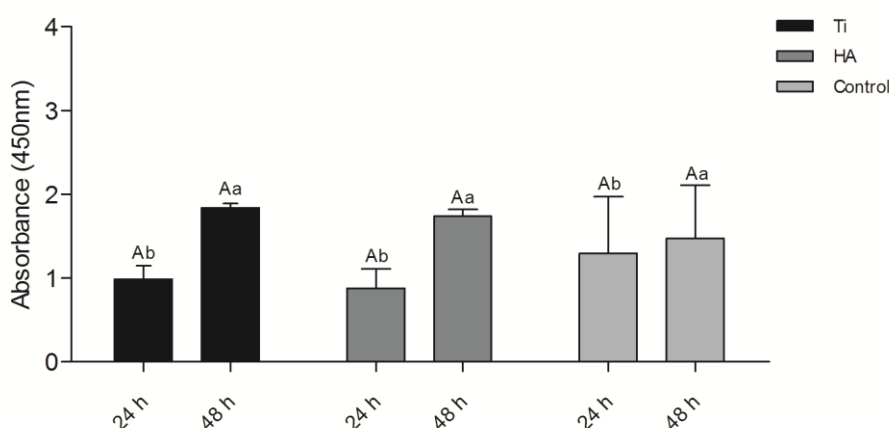


Figura 22 - Efeito de partículas de TiO₂ e HA na inibição da linhagem celular NIH/3T3 exposto a 24 e 48 h. Os dados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre o tipo de partículas e letras minúsculas indicam diferenças significativas no período de tempo testado. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.5.2 Determinação da citotoxicidade dos filmes

A fig. 23 mostra a citotoxicidade de nanocompósitos contendo diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 e HA. Embora possa ser visto que não existe diferença significativa entre a taxa inibidora dos dois tipos de nanopartículas testadas (TiO_2 e HA e Agar), observa-se que o aumento de concentração de qualquer nanopartícula além de 0,5% resulta numa redução significativa da citotoxicidade, o que poderia ser explicado por uma provável degradação, em maior nível, para os nanocompósitos com menor % de partículas, entretanto tal hipótese deverá ser investigada em ensaios de degradação e biodegradação. Além disso, estudos também têm relatado que estruturas nanométricas de HA possuem uma significativa capacidade de diminuir a morte celular por apoptose e, por conseguinte melhorar a proliferação celular e a atividade das células ósseas (CAI et al., 2007; LI et al., 2008). A proliferação e diferenciação celular melhorada podem ser devido às propriedades de superfície superiores em nanopartículas, na verdade materiais nanométricos tem maior área e rugosidade de superfície, o que resulta em melhores adesão celular e interação célula-matriz (WEBSTER et al., 2001; CAI et al., 2007; WANG; LIU; GUO, 2010).

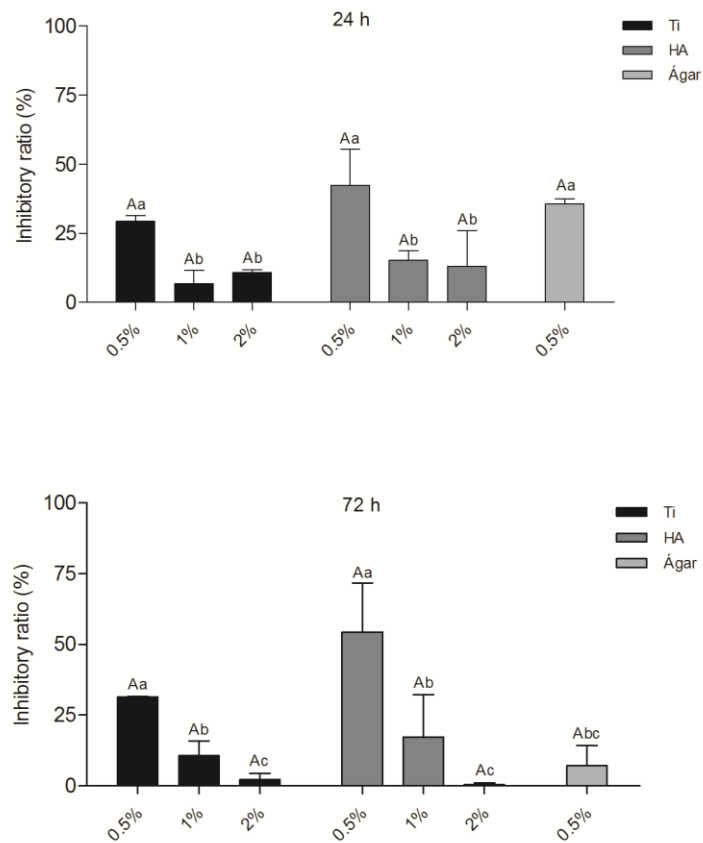


Figura 23 - Efeito de nanocompósitos de TiO_2 e HA na inibição da linhagem celular NIH/3T3 após a exposição do material a meio de crescimento de células durante 24 h e 72 h. Os dados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre o tipo de partículas e letras minúsculas indicam diferenças significativas nas concentrações utilizadas. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

6 Conclusões

1. A adição de nanopartículas de TiO_2 ou HA nas concentrações usadas neste estudo conduziu a melhorias nas propriedades mecânicas dos filmes de Agar, tornando os materiais mais rígidos, o que fica bastante evidente quando observamos o incremento do módulo de elasticidade dos nanocompósitos em relação ao polímero de Agar.
2. O material não apresentou atividade antibacteriana significativa, entretanto os materiais baseados em HA, independentemente do tempo estimado, apresentaram atividade antibacteriana, o que parece ser uma alternativa viável a ser pesquisada, visto que a HA vêm sendo explorada com êxito em diversas aplicações em diferentes áreas.
3. Os materiais não demonstram toxicidade celular, o que demonstra que a metodologia pode produzir um material com características promissoras para várias aplicações, incluindo a engenharia de tecidos.
4. O bom desempenho das propriedades mecânicas dos nanocompósitos aumenta as áreas potenciais para estudo e aplicações em campos que exigem mais mecanicamente.
5. As aplicações de HA e TiO_2 não estão restritas a uma determinada área da ciência, tais materiais têm um grande potencial para material de enchimento reforçado e introdução de híbridos melhorando as propriedades físico-químicas da matriz de polímeros, como também, baixo custo e possibilidade de sua incorporação em outros materiais.
6. Embora as caracterizações realizadas tenham demonstrado resultados positivos e promissores, por tratar-se de um material novo, mais técnicas de caracterização deverão ser empregadas para que se possa melhor compreender o comportamento e as propriedades deste material, a fim de que se determine mais claramente suas possíveis aplicações.

7 Fontes de Financiamento

A execução do presente trabalho conta com o apoio financeiro da CAPES, FINEP e do CNPQ.

8 Cronograma de execução

Atividades	Período (Semestral)			
	1°	2°	3°	4°
Revisão bibliográfica	ok			
Definição dos materiais que serão utilizados	ok	ok		
Definição das partículas e do polímero que serão explorados.	ok			
Definição da metodologia de obtenção das nanopartículas	ok			
Obtenção das nanopartículas	ok			
Caracterização das partículas por MEV e RAMAN	ok			
Definição da metodologia de elaboração do filme e nanocompósito	ok			
Síntese do filme e nanocompósito	ok			
Ensaio mecânicos no polímero e nanocompósito	ok			
Qualificação do projeto		ok		
Caracterização do polímero e nanocompósito por MEV e RAMAN			ok	
Ensaio de citotoxicidade			ok	
Ensaio microbiológicos			ok	
Apresentação de trabalho em Congressos		ok	ok	ok
Publicação de trabalho em revista				ok
Envio da dissertação para banca				ok
Defesa da dissertação				ok
Correções necessárias, publicação e divulgação dos resultados e possível produção de patentes				ok

9 Referências Bibliográficas

AGNELLI, J. A. M. “Reciclagem de Polímeros: Situação Brasileira”. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n. 4, p. 9-18, 1996.

AKIBA, N., HAYAKAWA, I., KEH, E. S.; WATANABE, A. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst. **Journal of Medical and Dental Sciences**, Tokyo, v. 52, n. 4, p. 223-227, Dec. 2005.

AKOLEKAR, D. B.; BHARGAVA, S. K.; FORAN, G.; TAKAHASHI, M.; J. Mol. Studies on gold nanoparticles supported on iron, cobalt, manganese, and cerium oxide catalytic materials. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 238, p. 78-87, 2005.

ALAYOGLU, S., NILEKAR, A. U., MAVRIKAKIS, M., EICHHORN, B. “Ru@Pt core-shell nanocatalysts for enhanced preferential oxidation of Co in hydrogen”. **Nature Materials**, v.7, n.4, p. 333-338, 2008.

ALMEIDA, P. de; VAN DEELEN, J.; CATRY, C.; SNEYERS, H.; PATAKI, T.; ANDRIESSEN, R.; VAN ROOST, C.; DROON, J. M. Microestructure characterization of titanium dioxide nanodispersions and thin films for dye-sensitized solar cell devices. **Applied Physics Letters A**, v. 79, n. 1, p. 1819-1828, 2003.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer international**, v. 47, n. 2, p. 89-144, 1998.

Ambiente Brasil. Reciclagem de Plástico. Classificação dos plásticos, tipos de reciclagem. Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/residuos/reciclagem/reciclagem_de_plastico.html>. Acesso em: maio de 2012.

AMERICAN STANDARDS FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM) D638M. **Standard test method for tensile properties of plastics metric**, Philadelphia, 1989, 11p.

AMERICAN STANDARDS FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM) D833-98. **Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions**, Philadelphia, Annual Book of ASTM Standards, 1998.

AMERICAN STANDARDS FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM) E2180. **Standard test method for determining the activity of incorporated antimicrobial agent(s) in polymeric on hydrophobic materials**, West Conshohocken, n. 7, 2012.

ANDRADE, N.J., MACÊDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1996. 182p.

BACHMANN R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. **The Brown Boveri Review**; v. 62, p. 206-209, 1975.

BARRETO, P. L. M. Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificado com sorbitol. **Tese de Doutorado** em ciências – Universidade Federal de Snta Catarina, Florianópolis, 2003.

BASTIOLE, C. **Global status of the production of biobased packagin materials**. In: The Food Biopack Conference, 2000, Copenhagen. Proceedings Copenhagen: VCH, 2000, p. 2-7.

BENSEBAA, F.; ZAVALICHE, F.; ECUYER, P.L.; COCHRANE, R.W.; VERES, T. Microwave synthesis and characterization of Co–ferrite nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 277, p. 104, 2004.

BENTHIEN, P. F. *Transgenia e Nanotecnologia: Uma reflexão acerca da relação entre Modernidade, Novas Tecnologias e Informação*. Disponível em:

<www.revistatheomai.unq.edu.ar/numero18/Faraco.pdf>. Acesso em março de 2012.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1285-1289, 2007.

BODMEIER, R., PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.152, p.17-26, 1997.

BOURGEAT-LAMI, E. Organic-Inorganic Nanostructured Colloids. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-24, 2002.

BOYD, D.; GOLUNSKI, S.; HEARNE, G. R.; MAGADZU, T.; MALLICK, K.; RAPHU-LU, M. C.; VENUGOPAL, A.; SCURRELL, M. S. Reductive routes to stabilized nanogold and relation to catalysis by supported gold. **Applied Catalysis A: General**, v. 292, p. 76-81, 2005.

BROWN, K. R.; FOX, A. P.; NATAN, M. J. Morphology Dependent Electrochemistry of Cytochrome-C at Au Colloid-Modified SnO_2 Electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, n. 5, p.1154-1157, 1996.

BRZOSKA B, BEN AZOUZ I, RONDELEZ F. Silanization of Solid Substrates: A Step toward Reproducibility. **Langmuir**; v. 10, n. 11, p. 4367-4373, 1994.

BUCZYNSKA J, PAMULA E, BLAZEWICZ S. Mechanical properties of (poly(L-lactide-co-glycolide))-based fibers coated with hydroxyapatite layer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n.6, p. 3702-3709, 2011.

BURDA, C., CHEN, X., NARAYANAN, R., EL-SAYED, M. A. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. **Chemistry Review**, v. 105, p.1025-1102, 2005.

CAI Y, LIU Y, YAN W, HU Q, TAO J, ZHANG M, et al. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. **Journal Material Chemistry**,;v. 17, p. 3780–3787, 2007.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros**. 2. Ed. São Paulo: Artiber, 2002, 183p.

CANILLAC N, MOUREY A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 261–268, 2001.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hidrocolloids**, v. 18, p. 717-726, 2004.

CHAKRABARTI, S.; DAS, D.; GANGULI, D.; CHAUDHURI, S. Tailoring of room temperature excitonic luminescence in sol–gel zinc oxide–silica nanocomposite films. **Thin Solid Films**, v. 441, p. 228, 2003.

CHAN, C.M.; WU, J.; LI, J.; CHEUNG, Y. Polypropylene/calcium carbonate nanocomposite. **Polymer**, v. 43, p. 2981–2992, 2002.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p.1273, 1998.

CHANÉAC, C.; TRONC, E.; JOLIVET, J.P. Magnetic iron oxide-silica nanocomposites. synthesis and characterization. **Journal of Materials Chemistry**, v. 6, p. 1905-1911, 1996.

CHEN, H. Functional properties and application of edible films made of milk protein. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

CHEN, L.; MCCRATE, J. M.; LEE, J. C.; LI, H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. **Nanotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1-10, 2011.

CHIBATA, I. Industrial application of immobilized enzymesystems. **Pure and Applied Chemistry**, v.50, n.7, p.667- 675, 1978.

CHO, S. G.; JOHNSON, P. F.; CONCRETE SR, R. A. "Thermal Decomposition of (BaTi) organic precursors during the Pechini process". **Journal Material Science**, v. 25, p. 4738, 1990.

CHRISTY, R.; VESTA, Z.; ZHANG, J. Magnetic spinel ferrite nanoparticles from microemulsions. **International Journal of Nanotechnology**, v. 1, p. 240, 2004.

COLOMBO, P. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 364, n. 1838, p. 109-124, 2006.

CORDENTE, N.; TOUSTOU, B.; COLLIÈRE, V.; AMIENS, C.; CHAUDRET, B.; VERELST, M.; RESPAUD, M.; BROTO, J-M. "New Procedure Towards Well-dispersed Nickel Oxide Nanoparticles of Controlled Size". **C. R. Acad. Sci Paris, Chimie/Chemistry**, v. 4, p. 143-148, 2001.

COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂. **Cerâmica**, v. 52, p. 255-259, 2006.

COTE, L. J.; TEJA, A. S.; WILKINSON, A. P.; ZHANG, Z. J. Continuous hydrothermal synthesis of CoFe₂O₄ nanoparticles. **Fluid Phase Equilibria**, v. 210, p. 307, 2003.

CUQ, B., GONTARD, N., GUILBERT, S. **Edible films and coatings as active layers**. In: Active Food Packaging, M. Rooney (Ed.), 1995, p. 111-142.

DALMOLIN, T. F. M.; OJEDA, F. A. O.; CAMARGO, M. M. C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 2006, Foz do Iguaçu-PR. **Anais do...** CBECIMat, 2006. Disponível em <http://www.metalium.com.br/17cbecimat/resumos/17cbecimat-404-004.pdf>. acesso em 22 de junho de 2013.

DANCZUK, M. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de quitosana**. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size – Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004.

DELAQUIS PJ, STANICH K, GIRARD B, MAZZA G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, 2002.

DENG, C.; WENG, J.; DUAN, K.; YAO, N.; YANG, X. B.; ZHOU, S. B.; LU, X.; QU, S. X.; WAN, J. X.; FENG, B.; and others. Preparation and mechanical property of poly(ϵ -caprolactone)-matrix composites containing nano-apatite fillers modified by silane coupling agents. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 12, p. 3059-3064, 2010.

DIAMANT, Y., CHAPPEL, S., CHEN, S. G., MALAMED, O., ZABAN, A. Core-Shell Nanoporous Electrode for dye Sensitized Solar Cells: the Effect of Shell Characteristics on the Electronic Properties of the Electrode. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 2748, p. 1271, 2004.

DIEBOLD, U. The surface science of titanium dioxide. **Journal Surface Science Reports**, v. 48, n. 8, p. 53- 229, 2002.

DING, J.; LIU, X.Y.; WANG, J.; SHI, Y. Ultrafine ferrite particles prepared by coprecipitation/mechanical milling. **Materials Letters**, v. 44, n. 1, p. 19-22, 2000.

DING, X. Z.; LIU, X. H. Correlation between anatase-to-rutile transformation and grain growth in nanocrystalline powders. **Journal of Materials Research**, v. 13, n. 9, p. 2556-2559, 1998.

DRAGUNSKI, D. C.; PAWLICKA, A. Starch based solid polymeric electrolytes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A, Molecular Crystals and Liquid Crystals*, v. 374, p. 561-568, 2002.

EANES, E. D. **Program Crystal Growth Characteristics**, v. 3, p. 3-15, 1980.

ESTEVEZ, A. C. C.; BARROS-TIMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégia de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. **Journal Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 2, p. 74-80, 2004.

FILIP, P.; LAUSMAA, J.; MUSIALEK, J.; MAZANEC, K. Structure and Surface of TiNi Human implants. **Biomaterials**, v. 22, p.2131-2138, 2001.

FISHER, H. **Polymer** nanocomposites: from fundamental research to specific applications. **Materials Science & Engineering C- Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 23, p. 763, 2003.

FLÜCKGER, E. Alternative methods to avoid recontamination during aseptic filling and packaging. **Bulletin of the IDF 300**, p.52-56, 1995.

FREITAS, N. L.; ALMEIDA, E. P. COUTINHO, J. P.; LIRA, H. L. COSTA, A. C. F. M. Síntese de TiO₂ por reação de combustão usando dihidrazida oxálica como

combustível. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, BEQ 2008, Recife. **Anais do...XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, COBEQ 2008. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2008.** V. CDrom. p. 1-7.

FROST, M. B.; DIJKSTERHUIS, G. B.; MARTENS, M., 'Sensory perception of fat in milk'.**Food Quality and Preference**, v. 12, p. 327-336, 2001.

FU, Q. et al. In Vitro Study on Different Cell Response to Spherical Hydroxyapatite Nanoparticles. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, p. 37-50, 2008.

FU, X. S. Q. Polymer–clay nanocomposites: exfoliation of organophilic montmorillonite nanolayers in polystyrene, **Polymer**, v.42, p.807–813, 2001.

FUENTES, S.; RETUERT, P. J.; GONZÁLEZ, G. Lithium ion conductivity of molecularly compatibilized chitosan-poly (aminopropyltriethoxysilane)-poly(ethylene oxide) nanocomposites. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 1417-1421, 2007.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.

GALEMBECK, F.; RIPPEL, M. M. **Nanotecnologia: estratégias institucionais e de empresas**. In: NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA. Estudos estratégicos: nanotecnologia. Brasília: NAE, 2006, p.6-120.

GÁLVEZ, J. B.; RODRÍGUEZ, S. M.; GASCA, C. A. E.; BANDALA, E. R.; GELOVER, S.; LEAL, T. **Purificación de aguas por fotocátalisis heterogénea: estado del arte**. In: Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea, Red CYTED VIII G. Ed. Miguel A. Blesa.. Cap. 3, p.51-76, 2001.

GAVARA, R.; MURIEL-GALET, V.; LÓPEZ-GARBALLO, G.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P. Antimicrobial Food Packaging Film Based on the Release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, v. 157, p. 239-244, 2012.

GHOSH M, CHAKRABORTY A, MUKHERJEE A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, 2013.

GILMAN, J. W.; JACKSON, C. L.; MORGAN, A. B.; HARRIS, R. J.; MANIAS, E.; GIANNELIS, E. P.; WUTHENOW, M.; HILTON, D.; PHILIPS, S. H. Flammability properties of polymer-layered-silicate nanocomposites polypropylene and polystyrene nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 1866-1873, 2000.

GOPI, D. et al. **Spectroscopic** investigations of nanohydroxyapatite powders synthesized by conventional and ultrasonic coupled sol-gel routes. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 70, p. 1243-1245, 2008.

GUILBERT, S. **Technology and application of edible protective films**. In Food Packaging and Preservation. M. Mathlouthi (Ed), Elsevier Applied Science Publishers, Ltd, New York, p. 371-394, 1986.

GUZMAN, I. Y. Certain principles of formation of porous ceramic structures: properties and applications (A Review). **Glass and Ceramics**, v. 60, n. 9-10, p. 280-283, 2003.

HAJDU, J.; FRIEDRICH, P. Reaction of glutaraldehyde with amino compounds. **Analytical Biochemistry**. v. 65, p. 273-280, 1975.

HAMDAOUI, O.; NAFFRECHOUX, E.; TIFOUTI, L.; PÉTRIER. C. Effects of ultrasound on adsorption-desorption of p-chlorophenol on granular activated carbon. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, p. 109, 2003.

HANH, N.; QUY, O.K.; THUY, N.P.; TUN, G L.D.; SPINU, L. Synthesis of cobalt ferrite nanocrystallites by the forced hydrolysis method and investigation of their magnetic properties. **Physics of Condensed Materials B**, v. 327, p. 382, 2003.

HARPAZ S, GLATMAN L, DRABKIN V, GELMAN A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 410-417, 2003.

HENN S, NEDEL F, DE CARVALHO RV, LUND RG, CENCI MS, PEREIRA-CENCI T, DEMARCO FF, PIVA E. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 8, p. 1797-1802, 2011.

HENRIQUE, C. M. Caracterização de filmes de féculas modificadas de mandioca como subsidios para aplicação em pós-colheita de hortícolas. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu - São Paulo, 2002.

HERNÁNDEZ, M.T.; GONZÁLEZ, M. Synthesis of resins as alpha-alumina precursors by the pechini method using microwave and infrared heating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 22, p. 2861, 2002.

HSIUE, G. H; LIU, Y. L.; LIAO, H. H. Flame retardant epoxy resins: An approach from organic-inorganic hybrid nanocomposites. **Journal of Polymer Science A**, v. 39, n. 7, p. 986-996, 2001.

HUANG, S. J.; EDELMAN, P. G. **An overview of biodegradable polymers and biodegradation of polymer**. In: Scott, G.; Gilead, D (Ed.) *Degradable Polymers: Principles and Applications*, London, Chapman & Hall, 1995, p. 18-23.

HUANG, S. J. Polymer waste management biodegradation, incineration and recycling. **Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry**, v. A 32, n. 4, p. 593-597, 1995.

HUSSAIN, R.; CECCARELLI, D. L.; MARCHISIO, FINO, D.; RUSSO, N.; GEOBALDO. Synthesis, characterization, and photocatalytic application of novel TiO₂ nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, p. 45-51, 2010.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 527-1: 1993. **Plastics – Determination of tensile properties – Part. 1: General Principles**. 1993, 9p., Berlin.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 20645:2004. (2004). Determination of antibacterial activity-agar diffusion plate test. Technical Committee CEN/TC 248. 2004, 13p. Bruxelles.

IONESCU, M. I. et al. Heart valve replacement with autologous fascia lata. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surg.**, v. 68, n. 3, p. 261-269, 1974.

JIANG, L.; WOLCOTT, M. P.; ZHANG, J. Study of Biodegradable Polylactide/ Poly(butylenes adipate-co-terephthalate) Blends. **Biomacromolecules**. v.7, p.199-207, 2006.

JIU, J.; GE, Y.; LI, X.; NIE, L. Preparation of Co₃O₄ nanoparticles by a polymer combustion route. **Materials Letters**, v. 54, p. 260, 2002.

JORDAN J, JACOB KI, TANNENBAUM R, SHARAF MA, JASIUK I. Experimental trends in polymer nanocomposites – A review. **Material Science Engineering: A**, v. 393, p. 1-11, 2005.

KECSKES, L. J.; CHO, K. C.; DOWDING, R. J.; SCHUSTER, B. E.; VALIEV, R. Z.; WEI, Q. Nanocrystalline and ultra-fine grained Tungsten for kinetic energy penetrator and warhead liner applications. **Materials Science and Engineering A**, 2007, doi :10.1016/j.msea.2007.02.099.

KELLY, A. Why engineer porous materials? **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 364, n. 1838, p. 5-14, 2006.

KENNEDY, J. F. Use of Modified Titanium, etc., species for the Immobilization of Bioactive Compounds-enzymes. **Transition Metal Chemistry**. v. 12, n. 6, p. 481-493, 1987.

KESTENBACH, H. J.; FILHO, W. J. B. **Microscopia Eletrônica: transmissão e varredura**. Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, ABM. São Paulo: A.B.M., 1994, 104p.

KESTER, J. J., FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KHOR, K. A.; LI, H.; CHEANG, P. Significance of melt-fraction in HVOFsprayed hydroxyapatite particles, splats and coatings. **Biomaterials**, v. 25, p. 1177-1186, 2004.

KIM, Y.; KIM, D.; LEE, C.S. Synthesis and characterization of CoFe_2O_4 magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physics of Condensed Matter B**, v. 337, p. 42-51, 2003.

KIRBAS, Z.; KESKIN, N.; GUNER, A. Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, p. 335-342, 1999.

KODAIRA, C.A.; BRITO, H.F.; FELINTO, M.C.F.C. Luminescence investigation of Eu^{3+} ion in the $\text{RE}_2(\text{WO}_4)_3$ matrix (RE= La AND Gd) produced using the pechini method. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 171, p. 410, 2003.

KOO JH “**Polymer nanocomposites: processing, characterization, and applications**”. Nueva York, McGraw-Hill, 2006.

KRIFKA S, SEIDENADER C, HILLER KA, SCHMALZ G, SCHWEIKL H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cell. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 1, p. 215-224, 2012.

KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C 60: Buckminster fullerene. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 162-163, 1985.

KUMAR A, DHARA S, BISWAS K, BASU B. In vitro bioactivity and cytocompatibility properties of spark plasma sintered HA-Ti composites. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v.101, n. 2, p. 223-259, 2013.

LAACHACHI, M.; FERRIOL, M.; COCHEZ, M.; RUCH, D.; LOPEZ-CUESTA, J. M. The catalytic role of oxide in the thermooxidative degradation of poly(methyl methacrylate) TiO₂ nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1131, 2008.

LABERTY-ROBERT, C.; ANSARF, T; DELOGET, C.; GAUDON, M.; ROUSSET, A. Powder synthesis of nanocrystalline ZrO₂-8%Y₂O₃ via a polymerization route. **Materials Research**, v. 36, p. 2083, 2001.

LEE, S. Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxy-butyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, 387-393, 1998.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1-8, 2005.

LEPOITTEVIN, B; DEVALCKENAERE, M; ALEXANDRE, M; PANTOUSTIER, N; CALBERG, C; JEROME, R; DUBOIS, P. Poly(ϵ -caprolactone)/Clay Nanocomposites by in-Situ Intercalative Polymerization Catalyzed by Dibutyltin Dimethoxide. **Macromolecules**, v. 35, p.8385-8390, 2002.

LI B, GUO B, FAN H, ZHANG X. Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro. **Applied Surface Science**; v. 255, p. 357-417, 2008.

LIU, X.M.; FU, S.Y.; XIAO, H.M.; HUANG, C.J. Mass synthesis of nanocrystalline spinel ferrites by a polymer-pyrolysis route. **Physics of Condensed Matter B**, v. 370, p. 14, 2005.

LOPEZ-DE-DICASTILLO, C., ALONSO, J.M., CATALA, R., GAVARA, R., HERNANDEZ-MUNOZ, P. Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10958–10964, 2010a.

LOPEZ-DE-DICASTILLO, C., GALLUR, M., CATALA, R., GAVARA, R., HERNANDEZ-MUNOZ, P. Immobilization of beta-cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. **Journal of Membrane Science**, v. 353, p. 184–191, 2010b.

LOPEZ-DE-DICASTILLO, C., CATALA, R., GAVARA, R., HERNANDEZ-MUNOZ, P. Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 380–386, 2011.

MA Q.Y.; TRAINA S.J.; LOGAN T. J. Lead immobilization from Aqueous Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks. **Environmental Science & Technology**, v. 29, p. 1118-1126, 1995.

MANESS, P.C.; SMOLINSKI, S.; JACOBY, W. A. Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism, **Applied Environmental Science Microbiology**, v.65, n.9, p. 4094-4098, 1999.

MANO, E. **Polímeros como materiais de engenharia**. São Paulo: Edgar Blucher Ltda, 1991, 97p.

MATTHEWS, R.W. Photo oxidative degradation of coloured organics in water using supported TiO_2 on sand. **Water Research**, v.25, p.1169-1176, 1991.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999. 105f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. **Permeability properties of edible films**. In: Edible Coatings to Improve Food Quality. Basel: Lancaster - Technomic Publishing Company, 1994. p.139-187.

McPHERSON, J. M.; SAWAMURA, S.; ARMSTRONG, R. An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 20, n.1, p. 93-107, 1986.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**. n. 18, p. 9 -21, 2004.

MENON, V. P.; MARTIN, C. R.; Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles, **Analytical Chemistry**, v.67, n.13, p.1920-1928, 1995.

MILLS, A., HILL, G., BHOPAL, S., PARKIN, I. P., O'NEIL, S. A. J. Thick titanium dioxide films for semiconductor photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 160, n. 3, p. 185-194, 2003.

MITTAL, V. Polymer Layered Silicate Nanocomposites: A Review. **Materials**, v. 2, p.992-1057, 2009.

MIZUTA, H.; ODA, S. Bottom-up approach to silicon nanoelectronics. **Microelectronics Journal**, v. 39, p. 171-176, 2008.

MOLCHAN, I.S.; GOPONENKO, N.V.; KUDRAWIEC, R.; BRYJA, L.; THOMPSON, G.E.; SKELDON, P. Visible luminescence from europium-doped alumina sol-gel-derived films confined in porous anodic alumina. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 341, p. 251, 2002.

MONSAN, P.; PUZO, G.; MAZARGUIL, H. Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines. **Biochimie**, v. 57, p. 1281-1292, 1975.

MONTANARO, L.; JORAND, Y.; FANTOZZI, G.; NEGRO, A. Ceramic foams by powder processing. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 18, p.1339-50, 1998.

MOTSKIN, M.; WRIGHT, D. M.; MULLER, K.; KYLE, N.; GARD, T. G.; PORTER, A. E.; SKEPPER, J. N. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3307-3324, 2009.

MULLER, R. J., KLEEBERG, I., DECKWER, W. D., Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 87-95, 2001.

MUNRO, B.; CONRAD, P.; KRAMER, S.; SCHIMIDT, H.; ZAPP, P. Development of electrochromic cells by the sol-gel process. **Solar Energy Material and Solar Cells**, v.54, n.1-4, p.131-137, 1998.

MURANO, E.; BRANDOLIN, C.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S.; RIZZO, R. Characterization of an Agar fraction extracted from *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 567 – 571, 1990.

NASSAR, E. J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, J. L. Influência da catálise ácida e básica na preparação da sílica funcionalizada pelo Método sol-gel. **Química Nova**, v.25, n.1, p.27-31, 2002.

NATHANAEL, J.; MANGALARAJ, D.; HONG, S.; MASUDA, Y.; RHEE, Y. H. K. Influence of fluorine substitution on the morphology and structure of hydroxyapatite nanocrystals prepared by hydrothermal method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 137, n. 3, p. 967–976, 2013.

NAVARRO, J. M.; MONSAN, P. Studies on the mechanism of interaction of glutaraldehyde with microorganisms In: **Annals of Microbiology**, p. 295-307, 1976.

NEDEL, F.; SOKI, F. N.; CONDE, M. C.; ZEITLIN, B. D.; TARQUINIO, S. B.; NÖR, J. E.; SEIXAS, F. K.; DEMARCO, F. F. Comparative analysis of two colorimetric assays in dental pulp cell density. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 1, p. 59-64, 2011.

NEDEL, F.; BEGNINI, K.; CARVALHO, P. H.; LUND, R. G.; BEIRA, F. T.; DEL PINO, F. A. Antiproliferative Activity of Flower Hexane Extract Obtained from *Mentha spicata* Associated with *Mentha rotundifolia* Against the MCF7, KB, and NIH/3T3 Cell Lines. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, n. 11, p. 955-958, 2012a.

NEDEL, F.; CAMPOS, V. F.; ALVES, D.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A.; COLLARES, T.; SAVEGNAGO, L.; SEIXAS, F. K. Substituted diaryl diselenides: cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 9-10, p. 345-352, 2012b.

NETTLESHIP, I. Applications of Porous Ceramics. **Key Engineering Materials**, v. 122-124, p. 305-324, 1996.

NOGUEIRA, R. F. P., JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 69-72, 1998.

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M.; GARCIA, E. E. C.; COLTRO, L. Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem – CETEA. 219p. 1996.

ORIAKHI, C. O. Polymer Nanocomposition Approach to Advanced Materials. **Journal of Chemical Education**, v.77, n.9, p.1138, 2000.

OU, Y.; YANG, F.; YU, Z. Z.; A new conception on the toughness of nylon 6/silica nanocomposite prepared via *in situ* polymerization. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.36, n.5, p.789-795, 1998.

PARRIS, G. E.; ARMOR, J. N. Catalytic cracking of organicamides: I. Production of N-vinylformamide. **Applied Catalysis**, v. 78, n. 1, p. 45-64, 1991.

PAWLICKA, A.; DANCZUK, M.; WIECZOREK, W.; ZYGADLO-MONIKOWSKA, E. Influence of plasticizer type on the properties of polymer electrolytes based on chitosan. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, p. 8888-8895, 2008.

PECHINI, M. P. Metedology of preparing lead and alkaline: earth, litanates and niobates and coating. Method using the same to for a capacitor. **Us Patent 3.330.697**, 1967.

PEREIRA, JR. E. S; AVELAR, I. V. Pulpotomia em dentes decíduos com formocresol e glutaraldeído. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**. n,18, 1996.

PETERLIN, A. Dependence of Diffusive Transport on Morphology of Crystalline Polymers. **Journal of Macromolecular Science: Physics**, v.11, n.1, p. 57- 87, 1975.

PHILIPSE, A. P.; VRIJ, A. Preparation and properties of nonaqueous model dispersions of chemically modified, charged silica spheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.128, n.1, p.121-136, 1989.

PILENE, M.P. Fabrication and properties of nanosized material made by using colloidal assemblies as templates. **Crystal Research Technology**, n.33, p.1155, 1998.

PU, X. P.; LIU, X. J.; QIU, F. G.; HUANG, L. P. Novel method to Optimize the Structure of Reticulated Porous Ceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 87, n. 7, p. 1392-1394, 2004.

RAABE, D.; SANDER, B.; FRIÁK, M.; MA, D.; NEUGEBAUER, J. Theory-guide bottom-up design of β -titanium alloys as biomaterials based on first principles calculations: Theory and experiments. **Acta Materialia**, v. 55, p. 4475-4487, 2007.

RAGHAVAN, D. Characterization of Biodegradable Plastics. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v.34, n.1, p.41-63, 1995

RAJABI-ZAMANI, A.H.; BEH NAMGHADER, A.; KAZEMZADEH, A. Synthesis of nanocrystalline carbonate dhydroxyapatite powder via nonalkoxide sol-gel method. **Materials science and Engineering C**, v. 28, p. 1326-1329, 2008.

RAMBO, C. R.; ANDRADE, T.; FEY, T.; SIEBER, H.; MARTINELLI, A. E.; GREIL, P. Microcellular Al_2O_3 Ceramics from Wood for Filter Applications. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 91, n. 3, p. 852-859, 2008.

RAMBO, C. R.; SIEBER, H.; GENOVA, L. A. Synthesis of porous of biomorfhic α/β - Si_3N_4 composite from sea sponge. **Journal Porous Materials**, v. 15, n. 4, p. 419-425, 2008.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st century materials world. **Materials Science**, v.50, p. 962, 2005.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R; RASHIMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview, **Bioresource Technology**, v.87, p.137-146, 2003.

REGIANI, A. M. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de polissacarídeos: Síntese e caracterização**. 2000. 161f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

REICHEL, P. **Development of a chemical gas sensor system**. 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Faculdade de Química e Farmácia, Universidade de Tübingen, Tübingen, 2005.

RICE, R. W. Porosity (and microcrack) dependence of properties. p. 1-17. Summary of porosity and microcracking effects, applications, special fabrication, and engineering. p. 475-526. In: *Porosity of Ceramics*: Marcel Dekker, 1998.

RICHARDSON, T., PENG, Y., REMUE, D. Properties of Ceramic Foam Catalyst Supports: Pressure Drop. **Applied Catalysis A-General**, v. 204, n. 1, p. 19-32, 2000.

ROBERT, D., MALATO, S. Solar photocatalysis: a clean process for water detoxification. **Science of the Total Environment**, v. 291, p. 85, 2002.

ROBERTSON, G. L. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. **Principles and Practice**, New York, Marcel Dekker, p. 63-107, 1993.

RODRIGUES, C. V. M.; SERRICELLA, P.; LINHARES, A. B. R.; GUERDES, R. M.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, M. A.; DUARTE, M. E. L.; FARINA, M. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4987- 4997, 2003.

ROSENBLATT, J.; DEVEREUX, B.; WALLACE, D. G. Injectable Collagen as a pH-Sensitive Hydrogel. **Biomaterials**, v. 15, p. 985-995, 1994.

SAGGIO-WOYANKY, J.; SCOTT, C. E.; MINNEAR, W. P. Processing of porous ceramics. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 71, n.11, p. 1674-82, 1992.

SAKAI, H.; BABA, R.; HASHIMOTO, K.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. Selective killing of a single cancerous T24 cell with TiO_2 semiconducting microelectrode under irradiation. **Chemistry Letters**, v. 24, n. 3, p. 185-186, 1995.

SALLES, C. L. F.; CONSOLARO, A.; PAVARINI, A.; TAVEIRA, L. A. A.; BIJELLA, M. F. T. B. Avaliação do potencial carcinogênico do formocresol diluído a 1/5 e do glutaraldeído a 2% no modelo experimental DMBA-induzido. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 2, n.3, p.5-11, 1994.

SÃO PAULO: **RESOLUÇÃO SS-27 de SP**, de 28 de fevereiro de 2007, Secretaria de Estado da Saúde. Norma Técnica que Institui Medidas de Controle sobre o uso do Glutaraldeído nos Estabelecimentos de Saúde. Disponível em: <http://acpo.org.br/campanhas/glutaraldeido/resolucao.pdf>

SALVADOR, A. M. C.; PASCUAL-MARTI, J. R.; ADELL, A.; REQUENI, J. G.; MARCH, J. Analytical methodologies for atomic spectrometric determination of metallic oxides in UV sunscreen creams. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.22, p.301, 2000.

SANTANA, B. P.; PAGANOTTO, G. F.; NEDEL, F.; PIVA, E.; DE CARVALHO R. V.; NÖR, J. E.; DEMARCO, F. F.; CARREÑO, N. L. Nano-/microfiber scaffold for tissue engineering: physical and biological properties. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 100, n. 11, p. 3051-3058, 2012.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens Plásticas Flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267p.

SCAVUZZI A I F, NASCIMENTO P B L, COLARES V, CARVALHO M L. Uso do formocresol em dentes decíduos. **Rev Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco** v.1, n.2, 1998.

SEPULVEDA, P. Gelcasting foams for porous ceramics. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 76, n. 10, p. 61-65, 1997.

SERRA, O.A.; CICILLINI, S.A.; ISHIKI, R.R. A new procedure to obtain Eu³⁺ doped oxide and oxosalt phosphors. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 303-304, p. 316-319, 2000.

SERTCHOOK, H.; AVNIR, D. Submicron silica/polystyrene composite particles prepared by a one-step sol-gel process. **Chemistry of Materials**, v.15, p.1690-1694, 2003.

SEYMOUR, R. B.; Polimeric composites-new concepts in polymer science, VSP-Ultech, **Netherlands**, 1990, 205p.

SHECHMEISTER, I. L. **Sterilization by ultraviolet irradiation. Desinfection, sterilization and preservation**, 4a Ed. Philadelphia — London: Lea & Febiger, 1991, p. 553-569.

SHEPPARD, L. **Porous ceramics: Processing and applications**. In: INTERNATIONAL FORUM FOR MATERIALS ENGINEERING AT SANJO TSUBAME (IFMEST) 92, 1992, Niigata, Japão. Anais do...Niigata: IFMEST, 1992, p. 3-23.

SHIBATA, T.; HAMADA, N.; KIMOTO, K.; SAWADA, T.; KUMADA, K.; UMEMOTO, T.; TOYODA, M. Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO₂ photocatalyst. **Dental Materials Journal**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 437-444, 2007.

SHIN H., JUNG H. S., HONG K. S., LEE J., Crystal phase evolution of TiO₂ nanoparticles with reaction time in acidic solutions studied via freeze-drying method, **Journal of Solid State Chemistry**, v.178, p.15-21, 2005.

SCHREIBAUM, K. D., KIRNER, U. K., GEIGER, J. F., GOPEL W. Schottky-barrier and conductivity gas sensors based upon Pd/SnO₂ and Pt/TiO₂. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 4, p. 87-94, 1991.

SHRIVASTAVA, K. N. Melting temperature. Brillouin shift, and density of states of states of nanocrystals. **Nano Letters.**, v.2, n.5, p.519-523, 2002.

SOUSA, A. M. M. Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis. **Tese (Mestrado)**. Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, 2008. 113p.

STUDART, A. R.; GONZENBACH, U. T.; TERVOORT, E.; GAUCKLER, L. J. Processing routes to macroporous ceramics: A Review. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 6, p. 1771-1789, 2006.

STUPP, S. I.; CIEGLER, G. W. Organoapatites: Materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 26, p. 169-183, 1992

SUCHANEK, W.; YOSHIMURA, M. Processing and properties of hydroxyapatite based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Journal Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 94-117, 1998.

TAI, L. W. & LESSING, P. A. Modified resin-intermediate processing of perovskite powders. Part I. Optimization of polymeric precursors. **Journal Materials Research**, v.7. p.502, 1992.

TANSIL, N. C.; GAO, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **NanoToday**, v.1, p.28-37, 2006.

TEIXEIRA, R. G.; VIDAL, B. C.; SANTOS, E. P. Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado com cárie – Relato de caso. **Jornal Brasileiro de Ortodontia Facial**, v. 5, n. 30, p. 76-81, 2000.

THANG, P.D.; RIJNDERS, G.; BLANK, D.H.A. Spinel cobalt ferrite by complexometric synthesis. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.295, p.251, 2005.

TIDJANI, A., WILKIE, C. A. Photo-oxidation of polymeric-inorganic nanocomposites: chemical, thermal stability and fire retardancy investigations. **Polymer Degradation and Stability**, v.74, p. 33-37, 2001.

TOMA, H. E. **O Mundo Nanométrico: a dimensão do novo século**. 2. Ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

TORIKAI , A.; HASEGAWA, H. Acceler- ated photodegradation for poly(vinyl chlo- ride). **Polymer Degradation and Stability**, v.63, p.441-445, 1999

TRINDADE, T., O'BRIEN, P., PICKETT, N. L. Nanocrystalline Semiconductors: Synthesis, Properties, and Perspectives. **Chemistry Materials**, v. 13, p. 3843-3858, 2001.

TZONG-MING, W. U.; CHENG-YANG, W. U. Biodegradable poly(lactic acid)/chitosan-modified montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91 p.2198-2204, 2006.

UGO, P.; MORETTO, L. M.; BELLOMI, S.; MENON, V. P.; MARTIN, C. R. Ion-Exchange Voltammetry at Polymer Film-Coated Nanoelectrode Ensembles. **Analytical Chemistry**, v.68, n.23, p.4160-4165, 1996.

VAARA M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Review**, v. 56, n.3, p. 395-411, 1992.

VELMURUGAN, R; MOHAN, T.P. Epoxy-Clay Nanocomposites and Hybrids: Synthesis and Characterization. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, v. 28, p.17-37, 2009.

VERT, M.; LI, S. M.; SPENLEHAUER, G.; GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 3, p.446, 1992.

VIEIRA, D.; AVELLANEDA, C.; PAWLICKA, A. Conductivity study of a gelatin-based polymer electrolyte. **Electrochimica Acta.**, v. 53, n.4, p.1404-1408, 2007.

VIEIRA, D.; AVELLANEDA, C. O.; PAWLICKA, A. AC Impedance X-ray Diffraction and DSC Investigation on Gelatin Based-Electrolyte with LiClO₄. Molecular Crystals and Liquid Crystals, **Molecular Crystals Liquid Crystals**, v. 485, p. 843-852, 2008.

VIEIRA, D. F.; PAWLICKA, A. Optimization of performances of gelatin/libf₄ based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 1489-1494, 2010.

XU, J. L. et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma. **Materials Science and Engineering A**, v. 374, p. 101-108, 2004.

ZAMPIERI, M. **Preparação dos óxidos cerâmicos para aplicação em filmes finos do tipo Pb_{1-x}CaxTiO₃**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP - Brasil, 2009.

ZAN, L.; WANG, S.; FA, W.; HU, Y.; TIAN, L.; DENG, K. Solid-phase photocatalytic degradation of polystyrene with modified nano-TiO₂ catalyst. **Polymer**, v.47, n.24, p.8155-8162, 2006.

ZESCHKY, J.; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J. ; JASON LO, S. H.; KUMMER, B.; SCHEFFLER, M.; GREIL, P. Preceramic polymer derived cellular ceramics. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 2361-70, 2003.

ZHANG, H.; BANFIELD, J. F. Thermodynamic analysis of phase stability of nanocrystalline titania. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 2073-2076, 1998.

ZHANG, W. F.; HE, Y. L.; ZHANG, M. S.; YIN, Z.; CHEN, Q. "Raman scattering study on anatase TiO₂ nanocrystals." **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 33, p. 912–916, 2000.

ZHU, X.; JIANG, D.; TAN, S. Improvement in the strength of reticulated porous ceramics by vacuum degassing. **Journal Materials Letter**, v. 51, n. 4, p. 363-367, 2001.

ZHU, Y.; EATON, J. W.; LI, C. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles preferentially induce cell death in transformed cells in a Bak/Bax-independent fashion. **PLoS One**, v. 7, n. 11: e50607, 2012.

ZHU, X. W.; JIANG, D. L.; TAN, S. H.; ZHANG, Z. Q. Improvement in the Strut Thickness of Reticulated Porous Ceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 84, n. 7, p. 1654-1656, 2001.

ZIOLO, R.F.; GIANNELIS, E.P.; WEINSTEIN, G.A.; OHORO, M.P.; GANGULY, B.N.; MEHROTRA, V.; RUSSEL, M.W. Matrix-mediated synthesis of nanocrystalline - Fe₂O₃: a new optically transparent magnetic material. **Science**, v.257, p.219,1992.

ZOU, H.; GE, X.; SHEN, J. Surface acidity and basicity of Y-AL₂O₃ doped with K⁺ and LA³⁺ and calcined at elevated temperatures. **Thermochimica Acta**, v.397, p.81, 2003.

WALT, D. R.; FLEMING, M. S.; MANDAL, T. K. Nanosphere-microsphere assembly: A novel method for core-shell preparation. **Chemistry of Materials**, v.13, p.2210, 2001.

WANG Y, LIU L, GUO S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 207–13, 2010.

WEBSTER TJ, ERGUN C, DOREMUS RH, SIEGEL RW, BIZIOS R. Enhanced osteoclastlike cell functions on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 22, p. 1327–1360, 2001.

WONG, E., LINTON, R.H., GERRARD, DE. Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella senftenberg* on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. **Food Microbiology**, n. 15, p.415-423, 1998.

YANG, H.; ZANG, K.; SHI, R.; LI, X.; DONG, X. YU, Y. Sol-gel synthesis of TiO₂ nanoparticles and photocatalytic degradation of methyl orange in aqueous TiO₂ suspensions. **Journal of Allys and Compounds**. v. 413, p. 302-306, 2006.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapor properties of edible gellan films. **Food Research International**, v. 33, p. 563-570, 2000.

YANG, J.; ZHANG, Z.; FRIEDRICH, K.; SCHLARB, A. K. Resistance to time-dependent deformation of nanoparticle/polymer composites. **Applied Physics Letters**, v.91, 2007.

YANO, K.; USUKI, A.; OKADA, A. Synthesis and properties of polyimide-clay hybrid films. **Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry**, v.35, p.2289, 1997.

YASMIN, A; DANIEL, I. Mechanical and thermal properties of graphite platelet/epoxy composites. **Polymer**, v.45, n.24, p.8211-8229, 2004.

YU J., ZHOU M., CHENG B., YU H., ZHAO X., Ultrasonic preparation of mesoporous titanium dioxide nanocrystalline photocatalysts and evaluation of photocatalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.227, p.75-80, 2005.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources.
Progress in Polymer Science, v.31, n.6, p.576-602, 2006.