

PRODUÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS BASEADOS EM ÁGAR VISANDO A PRODUÇÃO DE SUBSTITUTOS DE PELE

Y. E. O. Silva*, N. A. Onofre*, D. R. Pereira**, K. X. F. R. Sena***, C. S. A. Lima**, R. Yara*

*Departamento de Engenharia Biomédica – Centro de Tecnologia e Geociências – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

**Departamento de Biofísica e Radiobiologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

***Departamento de Antibióticos – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil
e-mail: ricardo.yara@gmail.com

Resumo: Biomateriais na forma de filmes podem ser utilizados com o propósito de prevenir infecções cutâneas e auxiliar no crescimento e regeneração de tecidos lesionados, facilitando o processo de cicatrização, atuando como substitutos temporários da pele. Biopolímeros, como o ágar podem ser utilizados para a confecção de filmes. O ágar é um hidrocolóide obtido de algas marinhas e possui a propriedade de formar uma matriz biologicamente inerte e que facilita a difusão de diversos compostos. Devido à possibilidade de infecção microbiana em tecidos lesionados, é desejável que os substitutos temporários de pele possuam atividade antimicrobiana. Extratos de cascas de *Anacardium occidentale* são utilizados como agentes antimicrobianos devido à presença de taninos e fenóis constituintes e, portanto este é um ativo de potencial uso em substitutos de pele. O objetivo deste trabalho foi verificar a incorporação de extratos de *A. occidentale* em filmes de ágar e verificar sua ação antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas: (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis*), e uma bactéria Gram negativa (*Serratia marcescens*). Os ensaios realizados demonstraram que o melhor resultado foi apresentado pelos filmes que continham 0,006 g de ágar /cm². Os testes de incorporação de extratos também demonstraram que os discos de filme de ágar de 6mm de diâmetro podem incorporar até 20 µL de extrato de *A. occidentale* L, similar ao volume incorporado em discos de papel e que este suporte foi eficaz para a inibição de *S. aureus* e *M. luteus*.

Palavras-chave: ágar, biomateriais, *Anacardium occidentale*, ensaios antimicrobianos, filmes poliméricos.

Abstract: Biomaterials formulated as films can be used for preventing skin infections and support the growth and regeneration of damaged tissues, facilitating the healing process by acting as a temporary skin substitutes. Biopolymers, such as agar can be used for making films. Agar is a hydrocolloid obtained from seaweed and has the property to form a biologically inert, which facilitates the diffusion of various

compounds matrix. The possibility of microbial infection in the injured tissues becomes desirable that temporary skin substitutes have an antimicrobial activity. Extracts from bark of *Anacardium occidentale* are used as antimicrobial agents due to the presence of tannins and phenol content, and therefore there is a potential use of this active in skin substitutes. The objective of this study was to investigate the possibility of incorporating extracts of *A. occidentale* in agar films and verify its antimicrobial action on the Gram-positive bacteria: (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*Serratia marcescens*). The tests performed showed that the best result was films containing 0.006 g of agar / cm². The incorporation tests also demonstrated that extracts of disks of 6 mm diameter agar film may comprise up to 20 µL of extract of *A. occidentale* L. and that this material was effective for inhibition of *S. aureus* and *M. luteus*.

Keywords: agar, biomaterials, *Anacardium occidentale*, Antimicrobial assays, polymer films

Introdução

Ágar-ágar; ágar; gelasse; ágar do Japão; ou agaranas são um complexo de polissacarídeos extraídos de agarócitos de algas da classe Rhodophyceae (algas vermelhas). O Ágar pode ser separado em duas frações, a primeira, gelatinosa neutra - denominada de agarose que possui uma grande variedade de utilizações e uma fração sulfatada não gelatinosa, denominada de agarpectina [1]. Na indústria de alimentos, o ágar desempenha importante papel como agente estabilizante, geleificante e para o controle da viscosidade [2]. Biomateriais na forma de filmes são utilizados com o propósito de prevenir a infecções cutâneas e como auxílio no crescimento e regeneração de tecidos lesionados, facilitando o processo de cicatrização. Estes biomateriais são usados como substitutos temporários da pele e possui a vantagem de não ocasionar dano ou lesão ao paciente, além de serem atóxicos [3],[4].

Em relação aos biopolímeros que podem ser utilizados para a confecção de filmes pode-se citar o ágar. Este material possui a propriedade de formar uma matriz biologicamente inerte e que facilita a difusão de diversos compostos. O ágar é amplamente utilizado na biomedicina e na biotecnologia [2], além de ser um material biocompatível o que possibilita a sua utilização como substituto temporário de pele.

Além dos cuidados necessários durante o processo de regeneração na recuperação de tecidos lesionados, deve-se estar atento as infecções que podem constituir um agravante à recuperação do paciente [5]. Uma alternativa para o uso de antibióticos seria a incorporação de bioativos com ação antimicrobiana [6]. Dentre os bioativos disponíveis, está o extrato hidroalcoólico de casca de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) que possui boa atividade antimicrobiana [7] e vem sendo incorporado em diversos fitoterápicos com ação cicatrizante, tornando-se, portanto um bom candidato para estes ensaios.

O objetivo deste trabalho foi de produzir um filme polimérico a base de ágar e verificar o potencial de incorporação dos extratos de *A. occidentale*, além de observar a ação antimicrobiana dos biomateriais produzidos.

Materiais e métodos

Extrato de *Anacardium occidentale* L- O extrato utilizado foi a partir de casca de *A. occidentale* L. colhidas em Caruaru/PE Estação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) (8°08'00"-8°10'00"S, 36°02'00"-36° 10'00"W) a exsiccata nº 46236 deste material foi depositada no Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Após a coleta das cascas estas foram pesadas e colocadas em estufa de secagem de plantas (Tecnal) por 42°C com circulação forçada de ar por três dias. Depois da secagem as amostras foram trituradas em moinho de facas tipo Willye STAR FT 50 (Fortinox) para garantir um material de menor granulometria, as amostras foram extraídas utilizando-se etanol-água (7:3), a extração ocorreu em três etapas com material imerso por 48h. Após cada extração, o extrato fluido foi submetido à destilação à vácuo em evaporador rotativo (Tecnal) até no máximo 45°C. O extrato bruto foi colocado em dessecador (Vidrolabor) até peso constante.

Produção de filmes de ágar - A obtenção dos filmes por *casting* seguiu o método descrito por Raphael [8] onde 1g de ágar (HIMEDIA) solubilizado em 5,0 mL de água a 100°C a esta solução foi adicionada 1g de glicerol (FMAIA) em seguida esta mistura foi homogeneizada e volume foi aferido a 10 mL e em seguida, o material dissolvido foi vertido em placas de Petri (Perfecta) com 9 cm de diâmetro (o que corresponde a concentração final de 0,016g de ágar/cm²), e levados à estufa a 42°C com circulação forçada de ar para secagem branda.

Foram ainda realizados ensaios qualitativos para verificar o efeito da diminuição da espessura do filme

na flexibilidade dos mesmos. No primeiro ensaio foram avaliadas as seguintes densidades: 0,016, 0,008, 0,004, e 0,002 g de ágar/cm², o ensaio foi realizado em duplicata.

No segundo ensaio foram avaliadas as densidades de 0,008, 0,006 e 0,004 g de ágar/cm² também em duplicata.

Em todos os ensaios as concentrações foram preparadas por sistema de diluições a partir de uma solução de 10% de ágar/glicerol, como descrito anteriormente e todos os filmes foram vertidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro.

Incorporação de extratos de *A. occidentale* L. em filmes de ágar - Após a confecção dos filmes, estes foram recortados com auxílio de um perfurador de papel (Cis), produzindo discos de filmes com 6 mm cada. Estes discos foram embebidos com 10 µL de extrato etanólico de *A. occidentale* (200 mg/mL). Como controle positivo, foram confeccionados discos de papel de mesmo tamanho acrescidos de 10 µL de solução etanólica de *A. occidentale* (200 mg/mL), além de controles adicionais, onde utilizou-se apenas filmes de ágar e de papel com adição de etanol a 70%.

Também foi analisada a capacidade de retenção de extrato do filme polimérico, para tanto em discos de 6 mm foram acrescidas quantidades crescente de extrato até que o filme fosse incapaz de adsorver o volume depositado.

Ensaio antimicrobianos - Os discos de filmes e papel, contendo ou não extratos bioativos foram testados quanto às suas propriedades antimicrobianas, frente à *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, que são bactérias Gram positivas e *Serratia marcescens* como representante das bactérias Gram negativas. Todos os micro-organismos são patógenos para animais e humanos e pertencem à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). Os meios utilizados para o cultivo foram Mueller Hinton sólido (M.H.) (HiMedia) para as bactérias Gram positivas, caldo ágar nutriente (A.N.) (HiMedia) para as bactérias Gram positivas, Glicose extrato de levedura (G.L) sólido e caldo *S.marcescens*.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de difusão em disco de papel [9]. A partir das linhagens dos micro-organismos teste com 24 horas de cultivo, foram preparadas suspensões padronizadas em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, com turvação equivalente ao tubo número 0,5 da escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) para bactérias. Os micro-organismos foram semeados nos respectivos meios de cultura, com auxílio de um *swab* esterilizado. Os discos foram colocados sobre a superfície do meio semeado com os micro-organismos teste, em placas de Petri. Os tratamentos utilizados foram: 1. Extrato de cajueiro em solução alcoólica em discos de papel, 2. Extrato de cajueiro em solução alcoólica em disco de filme de ágar, 3. Filme de ágar sem extrato 4. Papel embebidos em álcool (controle).

As placas foram incubadas a 35°C, durante um período de 18-24 horas. Após o período de incubação

foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco. Foram considerados resultados significativos halos iguais ou superiores a 15 mm de diâmetro para os micro-organismos teste. Estes testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição em mm e calculado a média e o desvio padrão.

Resultados

Extrato de *Anacardium occidentale* L. -Foi obtido um extrato hidro alcoólico de *A. occidentale* L que apresentou-se com aspecto escuro e resinoso.

Produção de filmes de ágar - Os filmes iniciais foram realizados com 0,016 g de ágar/cm² esta quantidade gerou filmes volumosos e de pouca flexibilidade.

Em função deste fato foram realizados ensaio contendo uma quantidade menor de ágar/cm². Este ensaio indicou que a quantidade de 0,016 e 0,008 g de ágar/cm² gerava filmes pouco flexíveis e volumosos, por outro lado filmes contendo 0,002 g e 0,004g de ágar/cm² geraram filmes flexíveis e delicados (Tabela1).

Tabela 1: Avaliação dos filmes de ágar em diferentes concentrações de acordo com seu aspecto.

Quantidade de ágar por cm ²	Avaliação qualitativa do filme obtido
0,016 g/cm ²	Filme volumoso e pouco flexível
0,008 g/cm ²	Filme pouco volumoso e pouco flexível
0,004 g/cm ²	Filme fino, flexível e delicado.
0,002 g/cm ²	Filme fino, flexível e delicado.

Em um segundo ensaio o filme indicou que Neste segundo ensaio 0,008 g ágar/cm² apresentaram novamente volumoso e pouco flexível e os filmes de 0,004 g/cm² filmes finos, flexíveis e delicados, o ensaio utilizando filmes contendo 0,006 g de ágar/cm² gerou filmes finos e flexíveis (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação dos filmes de ágar em diferentes concentrações de acordo com seu aspecto.

Quantidade de ágar por cm ²	Avaliação qualitativa do filme obtido
0,008 g/cm ²	Filme volumoso e pouco flexível
0,006 g/cm ²	Filme fino e flexível
0,004 g/cm ²	Filme fino, flexível e delicado.

Incorporação de extratos de *A.occidentale* L. em filmes de ágar - A utilização do perfurador de papel gerou discos uniformes de 6 mm de diâmetro. Os testes de incorporação de extratos demonstraram que o os discos de ágar podem incorporar até 20 µL de extrato de *A. occidentale* L.

Ensaio antimicrobianos -Os resultados com os extratos *A. occidentale* indicaram que este, apresentou-

se ativo frente ao *S. aureus* e *M. luteus* (Figura 1). A média de inibição foi superior a 15 mm (Tabela 6) e não foi observada inibição de crescimento de *S. marcescens* e *E. faecalis*.

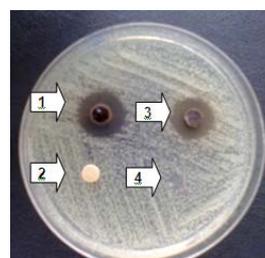


Figura1: Halo de inibição de *Micrococcus luteus*: 1) Filme de ágar acrescido de extrato de *A. occidentale*; 2) Disco de papel com etanol; 3) Disco de papel acrescido de extrato de *A. occidentale*; 4) Filme de ágar.

Discussão

A obtenção do extrato de *A. occidentale* L seguiu o roteiro pré-estabelecido pelo grupo de pesquisa Bionat sendo obtido um material escuro resinoso, como descrito por [7].

Em relação à produção de filmes de ágar, o primeiro ensaio indicou que provavelmente a concentração ideal estaria entre 0,008 e 0,004 g de ágar/cm², pois os filmes obtidos eram pouco flexíveis 0,008 g de ágar/cm² ou demasiadamente 0,004 g de ágar/cm² (Tabela1).

Optou-se então em realizar um novo experimento utilizando-se dosagem intermediária entre 0,008 g/cm² e 0,004 g/cm². O tratamento utilizando 0,006 g de ágar/cm gerou um filme fino e flexível como desejável para substitutos temporários de pele. Tais características assemelha-se com a manta de celulose Bionext® produzida pela Bionext Produtos Biológicos que consiste de uma membrana flexível, semitransparente, amarelada. Este composto tem sido utilizado com sucesso como curativo temporário de pele [10], [11], [12].

Quanto a incorporação de extratos de *A. occidentale* L. em filmes de ágar, a utilização do perfurador de papel gerou discos uniformes de 6mm de diâmetro. Os testes de incorporação de extratos demonstraram que o os discos de ágar podem incorporar até 20 µL de extrato de *A. occidentale* L., sendo a quantidade média utilizada em discos de papel para ensaios microbiológicos é de 10µL. Além deste fato, observou-se que a distribuição do extrato foi uniforme por todo o disco.

Em relação aos ensaios antimicrobianos os resultados indicam a efetividade do extrato a *S. aureus* e *M. luteus* onde a média de inibição foi superior a 15 mm e a resistência de *S. marcescens* e *E. faecalis* ao extrato. Resultado semelhante foi observado por Laurence colaboradores [13] onde foi constatado que o extrato de *A.occidentale* foi efetivo contra bactérias Gram positivas, sendo, entretanto, ineficazes contra Gram negativas. Esta diferença de sensibilidade nas classes de bactérias, que pode estar relacionada às diferenças

morfológicas nas constituições das paredes celulares destas diferentes classes de bactérias [15] e [16].

O ensaio também demonstrou que extratos de *A. occidentale* podem ser incorporados a filmes de ágar e que este tipo de filme possui a capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* e *M. luteus* em ensaios antimicrobianos gerando halos de inibição de 15,3 e 17 mm, respectivamente.

Conclusão

Foram obtidos filmes poliméricos de 0,006 g de ágar/cm², sendo estes finos e flexíveis, estes possuem a capacidade de absorver e distribuir de modo homogêneo e receber até 20µL de extrato de *Anacardium occidentale*. Os filmes com os extratos de cascas *A. occidentale*, mostraram-se ativos frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) e a PROPESQ /UFPE pelo financiamento Edital Apoio a Inovação 2012 nº 21829121.

Referências

- [1] Glicksman, M.1969. Seaweed Extracts. In: Gum technology in the food industry. New York, N. Y.: Academic Press, p. 199-273.
- [2] Mchugh, D. J. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO fisheries. Technical Paper 441, Rome.
- [3] Costa, H.O.; Souza, F. C. 2005. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida à lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®. ACTA/ORL. *Técnicas em Otorrinolaringologia*; v.23, p.23-27.
- [4] Osman, S. A., Souza, F. C.; Dolci, J. E. 2007. Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos. ACTA/ORL. *Técnicas em Otorrinolaringologia*. 25: 304-311.
- [5] Oliveira, F. L.; Serra, M. C. V. F. 2011. Infecções em queimaduras: Revisão. *Revista Brasileira de Queimaduras*.; 10: 96-99.
- [6] Lima, E. O., 2001. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. (Orgs.). *Plantas Mediciniais: Sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, p. 483-501.
- [7] Santos, G. H. F.; Silva, E. B.; Silva, B. L.; Sena, K. X. F. R.; Lima, C. S. A. 2011. Influence of gamma radiation on the antimicrobial activity of crude extracts of *Anacardium occidentale* L., anacardiaceae, rich in tannins. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.21: 444-449.
- [8] Raphael, E. 2010. Estudo de eletrólitos poliméricos à base de ágar para aplicação em dispositivos eletrocromicos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [9] Bauer, A. M., Kirby, M. N. & Sherris, J. C. 1966. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45:493-494.
- [10] De Paola, D. Q. & Souza, M. G. P. P. 1987. Membrana celulósica. Novo curativo biológico para melhoria do leito receptor de enxertia cutânea. *Revista Brasileira de Cirurgia* 77:135-138.
- [11] Rebello, C., Almeida, D. A., Lima Júnior, E. M. 1987. In: Dornelas, M. P. Bio-fill, um novo substituto de pele: nossa experiência. *Revista Brasileira de Cirurgia*; 77(6):407-14.
- [12] Peixoto, R. S., Santos, D. L. N. 1998. Biofill: uso e avaliação clínica de uma membrana celulósica em lesões cutâneas. *Revista Brasileira de Cirurgia*. 78:141-145.
- [13] Laurens A., Giono B., Sylla P., Prince D. 1992. Etude de l'action antibacterienne d'extraits d'*Anacardium occidentale* L. *An pharm fran* 40: 143-146.
- [14] Aliste, A. J. 2006. Uso de substâncias antioxidantes na resposta a radiação dos hidrocolóides carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo.
- [15] Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T. and Perumalsamy, P.L. 2001. Antimicrobial activity of certain indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 217-220.
- [16] Tadeu, H., Mohammed, E., Asres, K. A., Gebre-Mariam, T. 2005. Antimicrobial Activities of some selected traditional ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 168-175.