



Avaliação dos Efeitos da Incorporação de Polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* em Filmes de PVA/Quitosana

Sinésio Virgílio Alves de Melo ¹

Laís de Brito Rodrigues ²

Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira ³

Flavio Marques Lopes ⁴

RESUMO

O desenvolvimento de materiais com propriedades eficientes e menores custos é foco de muitos estudos com hidrogéis em forma de filmes. Os objetivos deste trabalho foram extrair e caracterizar os polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*, desenvolver e caracterizar hidrogéis à base de PVA/quitosana em forma de filmes e avaliar neles o efeito dos polissacarídeos. Caracterizações: espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e avaliação do perfil de citotoxicidade. Os hidrogéis foram testados na ausência e presença dos polissacarídeos com variação nas concentrações de: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0%, todas com PVA a 10%. Os filmes foram caracterizados por meio de espectroscopia na região do infravermelho por refletância total atenuada (ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), cor e ensaios mecânicos à tração. Os polissacarídeos apresentaram não citotóxico nas concentrações 0,5 e 1,0%. Os filmes apresentaram aspecto flexível e propriedades mecânicas de resistência e alongamento.

Palavras-Chave: Polissacarídeos; Hidrogel; Filmes Poliméricos; Testes Mecânicos.

¹ Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. Docente na Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-3400-7828>. sinesio.melo@ueg.br

² Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. Docente na Faculdade União de Goyazes, FUG, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-2757-5536>. brittolais@gmail.com

³ Doutorado em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, FCFRP/USP, Brasil, com período sanduíche em Centre de Recerca en Toxicologia, Parc Científic de Barcelona. Docente na Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-0758-2707>. gisele23.rodrigues@hotmail.com

⁴ Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. Docente na Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-0718-3992>. flaviomarques@ufg.br

A ciência dos polímeros tem evoluído grandemente nas últimas décadas, demonstrando uma potencialidade ilimitada na produção de novos materiais, dentre eles os homopolímeros, copolímeros, termopolímeros, blendas, compósitos, micro e nanopartículas, tendo múltiplas propriedades e aplicações industriais com avanço tecnológico notável em todos os campos de aplicação, incluindo a indústria farmacêutica. As modificações dos polímeros já existentes e a criação de novos com uma estrutura química diferenciada incluindo produtos naturais no processo reacional, obtendo propriedades finais dos materiais adequadas à finalidade de uso, tem permitido serem aplicados com maior segurança, durabilidade e custo reduzido (Rabello 2011).

Estratégias tecnológicas na produção de novos materiais para uso na área farmacêutica têm demonstrado viabilidade por meio de polímeros naturais, naturais modificados e sintéticos, biodegradáveis e com biocompatibilidade, funcionando como excipiente em medicamentos convencionais e de liberação modificada como o uso de hidrogéis com capacidade de intumescimento e dissolução a estímulos fisiológicos (Villanova et al. 2010). Materiais poliméricos em forma de filmes desenvolvidos à base de álcool polivinílico (PVA), quitosana, com a adição de polissacarídeos da *Gardenia jasminoides*, melhora as propriedades mecânicas do material, tornando-o mais resistente, minimizando a sua fragilidade (Chen et al. 2009).

Filmes poliméricos utilizando o glutaraldeído como agente reticulador entre as cadeias tem se mostrado eficiente e de custo acessível, tendo alta reatividade dos aldeídos, utilizando polímeros naturais como polissacarídeos com boa acessibilidade e acondicionamento (Distantina et al. 2013). Há perspectivas de bioprospecção com fontes naturais, destacando-se o *Anadenanthera macrocarpa*, utilizando o seu exsudato em formulações de hidrogéis, promovendo melhora das características físico-químicas do produto polimérico (Carneiro et al. 2013).

Na busca de materiais versáteis com características de hidrogel, o objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar os polissacarídeos do exsudato do *Anadenanthera macrocarpa*, avaliar sua citotoxicidade e os efeitos da sua incorporação em filmes à base de PVA/quitosana e glutaraldeído como reticulador. Foram avaliados formulações com ausência e presença de polissacarídeos em concentrações diferentes, analisando os efeitos nas propriedades físico-químicas, ópticas e mecânicas dos filmes.

EXPERIMENTAL

MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes materiais para a extração e produção dos filmes: exsudato do *Anadenanthera macrocarpa*; polissacarídeo extraído da resina do *Anadenanthera macrocarpa*; álcool etílico absoluto 99,5° INPM da marca Celeste; quitosana – Ch: (média massa molar); polietilenoglicol – PEG: (massa molar média 6.000); poly(vinyl alcohol) – PVA: 87-90% hidrolizado (massa molar média 30.000-70.000); solução de glutaraldeído – GA: (grade II, 25% em H₂O); glicerol (glicerina P.A.) P.M. 92,09 adquirido do Labsynth Ltda produtos para laboratórios; propilenoglicol P.A./ACS (teor > 99,9%) adquirido da Neon Comercial Ltda. Os materiais reagentes (Ch, PEG, PVA, GA) foram todos adquiridos de Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

MÉTODOS

Os procedimentos experimentais para a extração e caracterização dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* e o desenvolvimento e caracterização dos filmes à base de PVA/quitosana, seguiram a seguinte rotina:

A coleta do exsudato do *Anadenanthera macrocarpa* foi realizada em áreas de cerrado na região da cidade de Catalão / GO, às margens das rodovias BR-050 (18° 15' S e 47° 59' O) e GO 330 (GPS: 18° 03' S e 47° 59' O). A identificação da espécie foi realizada pelo Herbário da Universidade Estadual de Goiás, Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET), Anápolis – Goiás, por meio do depósito das exsicatas registradas sob o n° de tomo 9235.

O procedimento de extração dos polissacarídeos iniciou-se com a trituração da resina até obter pó fino, utilizando triturador e liquidificador. A extração do polissacarídeo ocorreu em cinco fases: 1ª. extração do material em água destilada na concentração de 20% (p/v), mantido 24 horas sob agitação à temperatura ambiente; 2ª. filtração do material em filtro sintético, 100% polipropileno de material conhecido como “tecido não tecido” – TNT; 3ª. precipitação do polissacarídeo em álcool etílico absoluto (99,5° INPM) resfriado, misturando álcool e o material precipitado numa proporção de 3:1, permanecendo no freezer por 24 horas; 4ª. separação e lavagem do material precipitado com álcool etílico absoluto (99,5° INPM), centrifugando-se por 15 min a 4.000 rpm. Esta etapa foi repetida por 03 a 04 vezes até obter-se um álcool numa tonalidade límpida. 5ª. secagem do material em dessecador a vácuo com sílica até obter peso constante (Silva et al. 2013). Finalizadas todas as etapas, obteve-se a purificação parcial dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* em forma de pó, o qual ainda foi triturado em gral de porcelana com pistilo e depois peneirado em tamis com malha de 250 mm/µm. A

caracterização dos polissacarídeos extraídos do exsudato do *Anadenanthera macrocarpa*, foram caracterizados por meio de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa por transformada de Fourier – DRIFT, por método de pastilhamento com KBr (brometo de potássio). As análises de citotoxicidade foram realizadas de acordo com a OECD 432 com as amostras dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* nas concentrações [0,5; 1,0; 2,0 e 4,0% (p/v)] utilizadas na elaboração dos filmes, avaliando *in vitro* o efeito citotóxico na busca de um perfil de segurança para a sua aplicação *in vivo*. Os ensaios foram realizados em cultura de fibroblastos, linhagem 3T3, pelo teste de incorporação do vermelho neutro, verificando a viabilidade celular em contato com o corante contendo os polissacarídeos (Mendanha da Cunha et al. 2013). As análises estatísticas (ANOVA) e o índice de citotoxicidade (IC₅₀) foram obtidos, com auxílio do programa *GraphPad 5.0 software*[®], considerando-se diferenças estatística com (p<0,05).

O desenvolvimento dos filmes ocorreu a partir de uma mistura física de polímeros sintéticos e naturais com ausência e presença dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4% para análise das propriedades dos filmes. A formulação do hidrogel é composta por 6 mL de solução de PVA – álcool polivinílico, pH 2,0, nas concentrações de 5% e 10%, 2 g de quitosana em soluções 2% (v/v) de ácido acético e 2 ml do polissacarídeo, 80 µL de glutaraldeído (GA), 0,2 g de polietilenoglicol (PEG), 0,2 g de glicerol e 0,5 g de propilenoglicol (PG). Mantido em ambiente com temperatura (38-40°C) e umidade (50-55%) por 48 horas até evaporação dos solventes, apresentando aspecto de membrana (Nesseem et al. 2011). Após evaporação dos solventes, o filme foi mantido em dessecador a vácuo com solução salina saturada de cloreto de sódio (NaCl) mantendo a umidade à temperatura ambiente. Os filmes foram caracterizados por meio de espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada – ATR (4000–700 cm⁻¹), utilizando o acessório para ATR acoplado ao aparelho *PerkinElmer FT-IR*.

Os filmes foram produzidos por método *casting*, sendo avaliado o nivelamento, formação de bolhas de ar e grumos, dispersão irregular, variações de temperatura e umidade, afetando diretamente na qualidade da espessura dos filmes (Sobral 2000).

A espessura dos filmes foi avaliada utilizando um micrômetro de precisão 0,01 mm, com ponteiros de diâmetro 6,5 mm, sendo as medidas tomadas aleatoriamente em dez pontos na área do filme com verificação em triplicata.

A análise de cor e opacidade dos filmes foi realizada baseada no espaço de cores CIE L*a*b*, tendo como referência de luminosidade L* variando de: 0 a 100, a* e b* variando cada um de: –80 a

+80. Utilizou-se um colorímetro acoplado a um computador com software *Master Color Data*® (CIELAB 10°/D65) (Sobral 2000).

As propriedades mecânicas dos filmes foram analisadas por meio de um texturômetro (TA. XT. Plus, Surrey – Inglaterra) acoplado a um computador, avaliando resistência à tração (TS), alongação (E) em mm, porcentagem de alongamento (% E) na ruptura e módulo de elasticidade (EM) (Batista et al. 2013). As corridas de avaliação foram padronizadas de acordo com a ASTM D882-10, com célula de carga de 50 kg, velocidade de pré-teste (0,10 mm.s⁻¹), teste (0,21 mm.s⁻¹) e pós-teste (10 mm.s⁻¹), obtendo-se a tração axial longitudinal do filme até a sua ruptura, com os registros da relação tensão/deformação pelo software *Texture Experi*® (*Stable Micro Systems*) com intervalos de 0,02 segundos. O tempo de corrida foi previamente estabelecido com a porcentagem limite de 100%. Os corpos de prova (CP) foram produzidos em seções lineares, com forma retangular, gerando duas tiras em cada filme medindo 60 mm de comprimento e 15 mm de largura, portanto 900 mm² de área transversal.

A alongação do filme ou alongamento específico (ε), cuja unidade é expressa em milímetros, dada a Equação (1):

$$\Delta l = lf - l_0 \quad (1)$$

onde $\varepsilon = (\Delta l / l_0)$.

Módulo de elasticidade ou módulo de Young (E), dada a Equação (2):

$$E = \sigma / \varepsilon \quad (2)$$

onde $E = (F/A_0)/(\Delta l/l_0)$.

Onde: (F) é a força de resistência medida em Newtons (N); (A_0) é a área da seção do corpo de prova medido em m²; (Δl) é a variação do comprimento do material medido em metros (m); (l_0) é o comprimento inicial do material medido em metros (m).

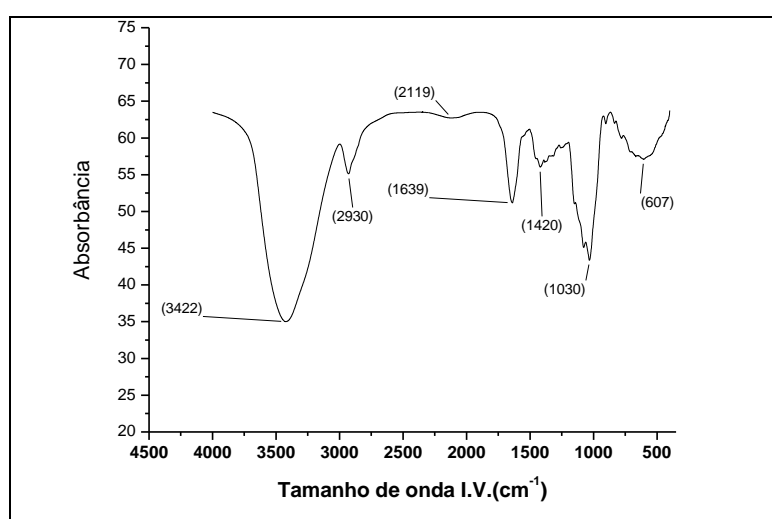
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro das amostras dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* (Figura 01) correspondente às bandas na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Lopes & Fascio 2004; Silverstein et al. 2006).

Foram analisados espectros no infravermelho de polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* em aplicação biotecnológica na substituição do ágar em meios de cultura sólidos, apresentando bandas e estiramentos semelhantes, com presença das mesmas vibrações dos grupos funcionais descritos (Silva

Filho et al. 2012). Outros polissacarídeos como a xantana, produzidos pela bactéria *Xanthomonas campestris*, apresenta banda (1.630 cm^{-1}) característica de grupos carboxílicos ionizados e sinal largo (3.420 cm^{-1}) dos estiramentos de ligações OH e intensidade (1.060 cm^{-1}) também indicativo de presença de carboidratos (Horn 2008). Estudos de polissacarídeos pépticos e hemicelulose de paredes celulares vegetais confirmaram banda (1.030 cm^{-1}), estiramento C-O-C atribuída a polissacarídeos com ligações glicosídicas, característica de arabinogalactanas (principal componente dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*) (kacuráková et al. 2000).

Figura 01. Espectro no I.V. dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*.



Legenda: 3.422 cm^{-1} : apresenta um ombro largo na região espectral (3.700 a 3.100 cm^{-1}) com vibração OH (ν O-H) de alcoóis e fenóis com ligação de hidrogênio e moléculas de água ou ao estiramento de NH de lactamas (ν N-H); 2.930 cm^{-1} : estiramento de compostos saturados C-H (ν C-H) de metileno, alifáticos saturados (3000 - 2800 cm^{-1}); 2.119 cm^{-1} : estiramento assimétrico do grupo $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ (2273 cm^{-1}); 1.639 cm^{-1} : estiramento do grupo (C=C) amidas primárias. Carboxilatos e aromáticos (1650 - 1450 cm^{-1}); 1.420 cm^{-1} (COO⁻): estiramento simétrico do grupo $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ (1460 - 1340 cm^{-1}); 1.030 cm^{-1} : vibrações de anéis de polissacarídeos com C-O-C, C-O, C-O-P e P-O-P; 607 cm^{-1} : região de janela espectral de *fingerprint* (proteínas, lipídeos e carboidratos).

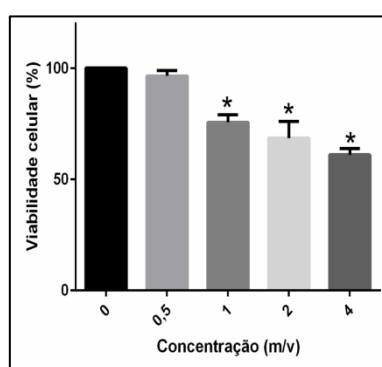
Fonte: Autores.

Os ensaios de citotoxicidade deste trabalho apresentaram viabilidade celular (Figura 02), quando em contato com as concentrações dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* utilizadas na formulação dos filmes, comparado com o grupo de células controle negativo (100%) após a exposição de 48 horas ao extrato dos polissacarídeos, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 (m/v). Considerou-se a porcentagem de viabilidade não comprometida pela substância analisada de 80%, o que determina a não citotoxicidade, sendo o seu uso definido como perfil de segurança para uso em seres vivos, inclusive em humanos.

A concentração dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* de 0,5% obteve perfil médio de 96,33% de viabilidade celular. A concentração de 1,0% apresentou média de 75,63% de viabilidade,

o que também poderá ser considerado não citotóxico limítrofe com limite de segurança. A concentração de 2,0% (68,57%) e de 4% (61,00%), considerados valores determinantes citotóxicos, de acordo com a metodologia utilizada *in vitro*, não sendo recomendado o uso de tal substância para fins de aplicação em seres vivos. A concentração de 3% utilizada na formulação do filme, a citotoxicidade está implícita no intervalo de 2 – 4%, portanto considerada restrita pelo comprometimento da viabilidade celular. Foi realizado ANOVA ($p < 0,05$) para o valor de intervalo de confiança ($IC_{50} = 5,97\%$).

Figura 02. Viabilidade celular após a exposição por 48 horas a diferentes concentrações do extrato dos polissacarídeos.



*Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autores.

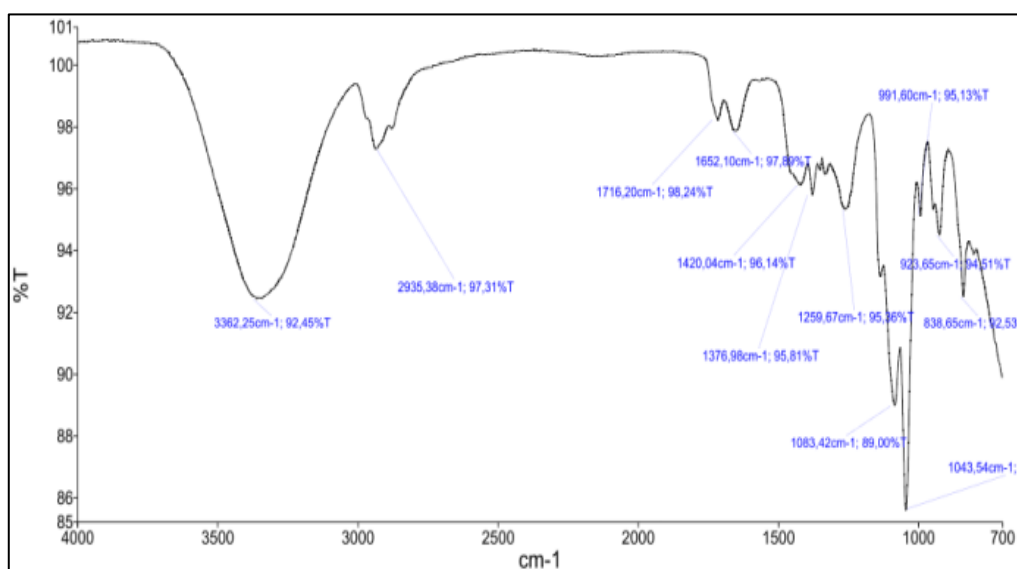
Foi investigado no extrato da casca do *Anadenanthera columbrina*, a citotoxicidade dos metabólicos secundários presentes, pelo método da absorção do sal MIT nas mitocôndrias celulares e concluiu um perfil de ausência de citotoxicidade com boa viabilidade quando em contato com as principais substâncias bioativas: taninos e flavonoides (Weber Sobrinho 2010).

Na revisão sistemática sobre o potencial terapêutico do *Anadenanthera columbrina*, revelou um crescente número de investigações para esclarecer o perfil fitoquímico e farmacológico da planta, porém ainda mais explorada do ponto de vista etnobotânico (Weber et al. 2011). Atividades biológicas por meio de bioensaios *in vitro* e *in vivo* foram publicados com ênfase nas folhas e casca do caule, inclusive com resultados de perfil de toxicidade de galhos e das folhas do *Anadenanthera macrocarpa*, especialmente quando jovens em brotos do que maduras, apresentando toxicidade neuromuscular em coelhos (Brito et al. 2000; Tokarnia et al. 1999). Moretão et al. (2003) e Moretão et al. (2004), investigaram a atividade fagocitária da resina do *Anadenanthera columbrina* pela exposição *in vitro* do ácido heteropolissacarídeo (aragal) e observaram o aumento da atividade fagocitária, sugerindo potencial mediador imunológico. Estudo do extrato da casca, galho e folha de *Anadenanthera macrocarpa*, avaliando seu perfil citotóxico e atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antiaderente e

antinociceptiva, revelando rico potencial biológico da espécie e prospecção de materiais bioativos (Silva 2011).

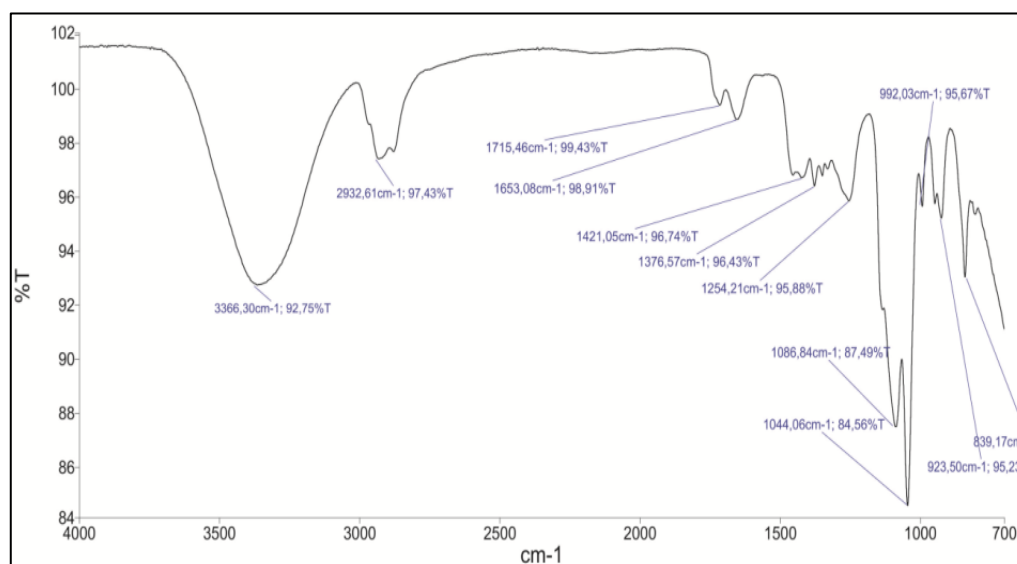
A caracterização química dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* foi analisada por meio das bandas espectrais no infravermelho por refletância total atenuada (ATR), com amostras com ausência de polissacarídeos (Figura 03a) e com presença na concentração de 2% (Figura 03b).

Figura 03a. Espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada (sem polissacarídeos).



Fonte: Autores.

Figura 03b. Espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada (polissacarídeos a 2%).



Fonte: Autores.

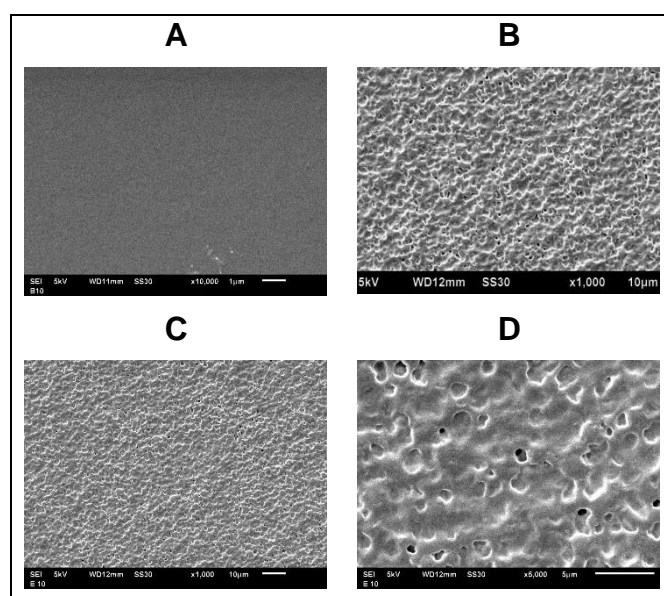
Uma onda larga na faixa de 3.366 cm^{-1} revela presença de ligação O-H de água, quitosana e PVA e estiramento N-H da quitosana; as bandas na região 2.932 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico de C-H da quitosana e PVA; vibrações na faixa de 1.715 cm^{-1} demonstra estiramento C=O da reticulação, características entre ($1.700 - 1.732\text{ cm}^{-1}$) relacionadas aos grupos aldeídicos livres, os quais reagiram com o polímero, sendo esta banda também atribuída ao grupo carbonila da quitosana; vibrações em 1.653 cm^{-1} indica deformação angular N-H e deformação do grupamento -OH das moléculas de água adsorvidas no material, atribuídas à ligação imina N=C, banda da amida I – *ν*-estiramento da carbonila identificando a quitosana. Esta faixa é confirmatória das reações de reticulação do PVA/quitosana pelo glutaraldeído que ocorre pela perda da molécula de água pelo deslocamento do oxigênio do aldeído, base de *Schiff*; vibrações na faixa de 1.421 cm^{-1} revelam deformação angular do grupamento (CH)-CH₂ do PVA e quitosana, como também na faixa de 1.376 cm^{-1} apresenta deformação angular do grupo (CH)-R-CH₃ do PVA. Vibrações na faixa de 1.321 cm^{-1} representam estiramento C-N, de amina primária da quitosana; onda característica de estiramento C-N, de amina secundária da quitosana e estiramento =CO-C do PVA e deformação do OH devido à mistura dos polímeros na faixa de 1.254 cm^{-1} . Na faixa de 1.086 cm^{-1} observa estiramento (C-O)-C-OH do PVA e PEG (estiramento C-C, onde o 1º carbono tem ligado um oxigênio e no 2º tem ligado um -OH), associado ao PVA e em 1.044 cm^{-1} , estiramento C-O e C-C da quitosana, PVA e vibrações de anéis de polissacarídeos com ligações glicosídicas. Vibrações em 992 cm^{-1} caracteriza deformação angular no plano C-OH do PVA; 923 cm^{-1} deformação angular (CH)-CH₂ do PVA e finalizando o espectro, vibração na faixa de 839 cm^{-1} representa estiramento da ligação C-C do PVA. Tais análises nos espectros dos filmes revelaram uma alta similaridade nas bandas e vibrações, elucidando os grupos funcionais presentes nas amostras envolvidas e nas interações químicas dos reagentes utilizados na formulação. Verificou-se que não há diferenças significativas na estrutura do material com presença ou ausência dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* (Silverstein et al. 2006; Costa-Júnior & Mansur 2008).

A análise dos espectros de infravermelho em trabalhos com blendas de amido/PVA/quitosana observa-se bandas e vibrações semelhantes às encontradas neste trabalho com identificação dos grupos que compõem o PVA e a quitosana correspondentes às mesmas bandas (Gomes 2013). Trabalho com filmes híbridos de PVA/quitosana com sílica bioativa com finalidade de produção de tecidos para implantes esqueléticos apresentou resultados semelhantes, confirmando a interação entre as cadeias do PVA – quitosana e o glutaraldeído como agente reticulador, quando comparados com os resultados do presente trabalho, inclusive com estiramento e vibrações

coincidentes (Dias et al. 2011). Trabalho que desenvolveu de filmes poliméricos de PVA/quitosana reticulado com glutaraldeído para fins de obtenção de matriz dérmica, variando todos os três componentes, identificou as bandas características dos componentes dentro das mesmas faixas de vibração do presente trabalho, apresentando como região de referência à quitosana o intervalo (1.420 e 1.320 cm^{-1}) pela maior estabilidade independente do grau de desacetilação (Costa-Júnior & Mansur 2008). Outro trabalho que corrobora os achados apresentou em seus resultados espectros semelhantes, definindo o estiramento vibracional na faixa de 1.715 cm^{-1} como sugestivo de plena reticulação pelo glutaraldeído com a quitosana, pela disponibilidade dos grupos amina da quitosana e dos grupos carbonila do glutaraldeído (Airoldi & Monteiro Jr. 2000).

A caracterização física estrutural foi realizada por meio da microscópica eletrônica de varredura (MEV) das amostras com ausência e presença dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* (Figura 04).

Figura 04. Microscopia eletrônica de varredura (ampliação: A: 10.000X – filme sem polissacarídeos, B: 1.000X – filme com polissacarídeos, C: 1.000X – em detalhe – filme com polissacarídeos, D: 5.000X – filme com polissacarídeos).



Fonte: Autores.

As fotomicrografias da microscopia eletrônica de varredura do filme sem polissacarídeos (A) com ampliação de (10.000 x) revela uma superfície com relevo regular, compacta, sem porosidade. Os filmes (B, C e D) revelam uma superfície com aspecto de relevo irregular, microvilosidades em toda a sua área e presença de microporosidade difusa que permite permeabilidade ao vapor de água e a gases O_2 e CO_2 , demonstrando que houve plena incorporação dos polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*

junto à matriz polimérica reticulada, observado características morfológicas do hidrogel semelhantes às encontradas no trabalho com hidrogéis de quitosana-xantana, portanto um material polimérico que permita permeação e trânsito gasoso ou líquido e dependendo da finalidade de aplicação, propriedade de liberação de componente incorporado à matriz e extremamente importante na engenharia de regeneração de tecidos (Horn 2008).

Produção de filmes à base de PVA, amido de mandioca e nanoargila, obteve boa compatibilização na matriz com característica lisa e homogênea na superfície do material (Faria et al. 2012). Dias et al. (2011) analisaram uma superfície de um filme híbrido PVA/quitosana e vidro bioativo, com objetivo de aplicação em tecido de reparo, contendo aspecto superficial irregular, globoso e com presença de porosidade quando imerso por 28 dias em fluido corporal simulado (SBF) com 23% de vidro bioativo, havendo formação de uma camada de fosfato de cálcio.

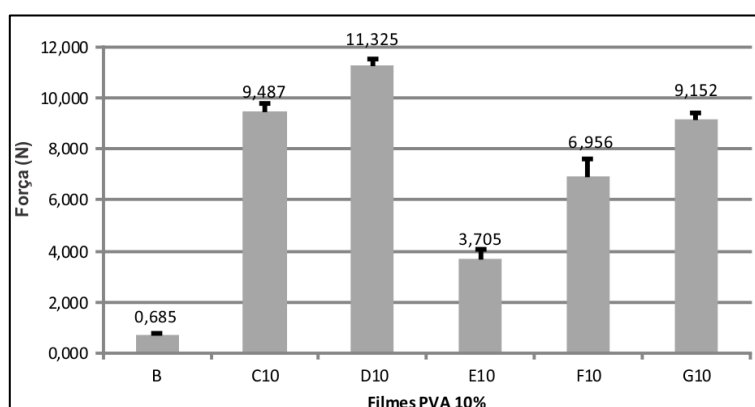
As propriedades de cor e opacidade dos filmes apresentaram valores de a^* predominantemente positivos ($1,43 \pm 0,48$ a $9,48 \pm 0,87$), b^* positivo, que podem alcançar 80 ($32,94 \pm 1,77$ a $46,86 \pm 1,19$). Os valores de L^* , que tendem a 100 para materiais de tonalidade clara ($69,01 \pm 0,68$ a $84,67 \pm 2,44$), caracterizando os filmes como amarelos claros com tonalidade marrom devido aos valores de a^* , influenciados pela presença de quitosana, glutaraldeído e pela concentração de polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*.

Corroborando com os resultados apresentados nesse trabalho, estudos confirmam que as cores atribuídas aos produtos com aplicação alimentícia, biofilmes de amido ou amiláceos têm melhores aceitações do público consumidor, confirmado com os resultados obtidos com a determinação de diferença de cor em biofilmes elaborados com três tipos de amido: fécula de batata, fécula de mandioca e amido de milho. A cor foi afetada pela fonte do amido sendo maior na fécula de mandioca, tendo característica transparente e brilhante (Silva et al. 2007). Filmes misturados com PVA, amido de mandioca e nanoargila apresentaram opacidade aparente, variando de 1,76 a 2,56 ocorrendo uma tendência de redução nesses valores quando adicionado a nanoargila concluiu que a opacidade e a diferença de cor (ΔE) aumentaram linearmente com a espessura dos filmes de proteína e plastificante glicerol (Faria et al. 2012). Foi verificado na elaboração de blendas, que a luminosidade (L^*) diminui com a diminuição da concentração de amido tornando menos transparentes (Costa-Júnior & Mansur 2008). Gontard et al. (1992) observaram que a presença de glúten na formulação de filmes gerava uma tendência de maior opacidade quanto maior a concentração, afirmando que filmes destinados à aplicação alimentícia é fundamental uma aparência homogeneia, transparente e brilhante. Em filmes de

amido e poly(lactic acid) há menor opacidade quando plastificado com adipato éster e quando plastificado com citrato éster não houve alteração da opacidade com as diferentes concentrações (Shirai et al. 2013). Outro trabalho encontrou diferenças de cores (ΔE) e Opacidade (Y) em pequenas intensidades, comparados com o presente trabalho, com valores médios respectivamente $3,3 \pm 0,18$ e $1,55 \pm 0,36$ em filmes biodegradáveis à base de blendas de gelatina e PVA e a luminosidade apresentou-se alta, variando de $91,4 \pm 0,11$ e $91,7 \pm 0,09$ demonstrando tonalidade clara (Silva et al. 2008). Trabalho com filmes de quitosana reticulados com polissacarídeos da *Gardenia jasminoides*, com coloração amarelo claro e espessura dos filmes similares ao presente trabalho, verificou-se a influência da concentração do reticulante na cor dos filmes, justificando que a cor em substâncias orgânicas é atribuída às ligações insaturadas de sua estrutura química (Bispo 2009).

Os ensaios mecânicos dos filmes foram analisados por meio de testes de tração utilizando um texturômetro, verificando a sua resistência à tração, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade (Young) das amostras com as variações da concentração de polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*. Os filmes que apresentaram maior força de resistência (Figura 05) foram aqueles que continham 1% de polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*, filme D10 (11,32N), seguido dos filmes contendo 3%, filme C10 (9,48 N), não apresentando assim uma relação entre a concentração de polissacarídeos e a força (N), no entanto o filme controle B (sem polissacarídeos), claramente apresentou a menor resistência entre todas as amostras avaliadas, demonstrando que a presença dos polissacarídeos na composição dos filmes produz efeito de maior resistência à tração.

Figura 05. Ensaios mecânicos – Resistência (N).



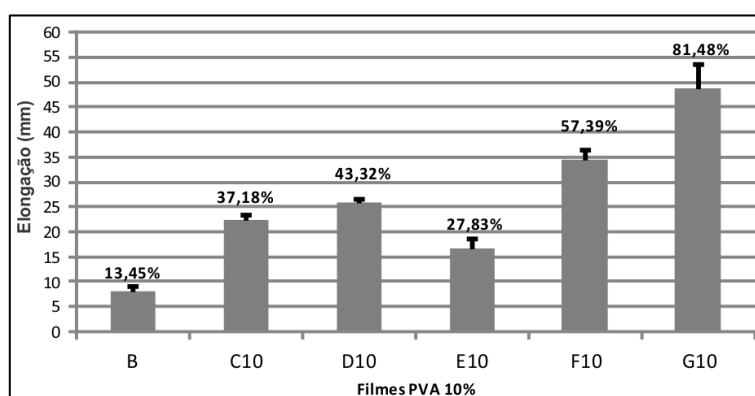
Fonte: Autores.

De acordo com o trabalho com filmes de amido e poly(lactic acid), quanto maior a resistência dos filmes poliméricos menor a elasticidade (Shirai et al. 2013). Nos resultados levantados neste trabalho não é confirmado esta relação direta, porém todos os filmes contendo os polissacarídeos

alcançaram maior alongação, comparados aos filmes sem os polissacarídeos. Alguns filmes que apresentaram maior resistência tiveram menor alongação em relação a outros, não caracterizando efeito diretamente proporcional. A utilização do método *casting* com glicerol como plastificante, filmes de PVA/amido de mandioca/nanoargilas tem um comportamento que demonstra uma influência pela adição dos polímeros com boa compatibilidade na matriz justificada pelas ligações de hidrogênio, levando ao aumento da resistência, especialmente com a incorporação de nanoargilas esfoliadas (Faria et al. 2012). Trabalhos produziram e caracterizaram filmes flexíveis de amido e poly(lactic acid) com plastificante adipato, observando propriedade de força (0,6 – 0,9 N) e com glicerol (13 N) (Shirai et al. 2013).

Na análise da propriedade mecânica de alongamento dos filmes na ruptura (Figura 06), descrita em milímetros (mm) e em porcentagem (%), as amostras apresentaram uma tendência linear progressiva, conforme a concentração de polissacarídeos. O filme com ausência dos polissacarídeos foi o que apresentou menor elasticidade, demonstrando que mesmo com o fator de hidrofilição pelo PVA e a mesma quantidade de plastificantes apresenta maior fragilidade, demonstrando o efeito dos polissacarídeos, nas demais formulações, havendo compatibilidade e interação entre os três principais polímeros da matriz (PVA / quitosana / polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa*) apresentando efeito positivo na estabilidade dimensional do material polimérico.

Figura 06. Ensaios mecânicos – Resistência (N).



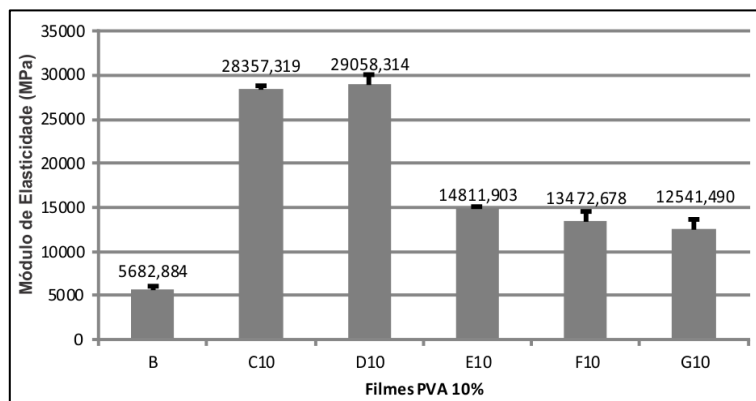
Fonte: Autores.

Filmes desenvolvidos com PVA e amido de mandioca apresentaram aumento na flexibilidade (valores maiores), porém quando adicionado nanoargila houve redução dessa propriedade (valores menores) explicada pela interação da nanoargila na matriz conferindo maior rigidez diminuindo a flexibilidade intermolecular, havendo aumento na elongação dos filmes com variação de 25 – 61% (Faria et al. 2012). Filmes de amido apresentaram quebradiços e frágeis até a adição de PVA e

quitosana, o que proporcionou melhora das propriedades mecânicas principalmente o alongamento das blendas, justificado pela formação de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas do amido e os grupos reativos do PVA e da quitosana (Gomes 2013). Estudos com filmes flexíveis de amido e poly(lactic acid) com plastificante adipato, observaram boa propriedade de flexibilidade com valores de (120 – 148%) de alongação quando comparado ao plastificante glicerol apresentando alongação (13%) (Shirai et al. 2013). Filmes de quitosana e amido de milho apresentaram alongamento máximo dentre as amostras de $20,13 \pm 0,29$ % de acordo com Horn (2012). Segundo Carvalho (2010), filmes de PVA/quitosana e CuO obtiveram valores que variaram de $68,30 \pm 1,9$ a $90,53 \pm 3,73$ e quando adicionado glicerol como plastificante obteve-se valores que variaram de $79,12 \pm 2,78$ a $104,30 \pm 5,16$ evidenciando a alteração do comportamento dos filmes. Estudos avaliaram o comportamento mecânico de filmes de amido de fécula de mandioca e evidenciaram influência dos plastificantes glicerol e sorbitol na alongação, sendo o glicerol mais eficiente do que o sorbitol e que a presença de água na matriz tridimensional promove efeito plastificante por permitir melhor arranjo das cadeias e ajuste nos momentos de tração, portanto mantendo uma maior umidade dos filmes a dependência de aditivação com plastificantes pode ser minimizada (Mali et al. 2005). De acordo com Cuq et al. (1997), não houve diferença significativa nas propriedades funcionais de filmes à base de proteína miofibrilar, com a introdução de plastificantes glicerol, sorbitol e sacarose nas mesmas proporções, devido à suas semelhanças estruturais.

Módulo de elasticidade ou módulo de Young é uma grandeza proporcional à rigidez de um material quando este é submetido à tensão externa de tração uniaxial, representada pela razão entre a tensão aplicada e a deformação sofrida pelo material. Os resultados dos testes com os filmes produzidos neste trabalho (Figura 07) apresentaram os maiores valores nos filmes com as menores concentrações de polissacarídeos ($C10 = 28357,32 \pm 412,44$ com 0,5% e $D10 = 29058,31 \pm 1042,73$ com 1,0%), sendo mantida a mesma quantidade de plastificante glicerol utilizada na formulação em todas as amostras, não caracterizando uma relação de efeito direto em relação à concentração de polissacarídeos.

Figura 07. Ensaio mecânico – Módulo de elasticidade (MPa).



Fonte: Autores.

O trabalho de Carvalho (2010) com filmes de PVA/quitosana e CuO, apresentou módulo de elasticidade (MPa) com valores que variaram de $163,75 \pm 8,71$ a $199,98 \pm 4,15$ e quando adicionado glicerol como plastificante obtiveram valores variando de $109,52 \pm 12,5$ a $170,79 \pm 5,07$. Trabalho com filmes utilizando em sua formulação glicerol e sorbitol como plastificantes revelou maior alongação e diminuição do módulo de elasticidade (Mali et al. 2005). Trabalho com amostras de filmes comestíveis demonstrou que quando adicionado glicerol como plastificante, os valores do módulo de elasticidade foram menores, demonstrando ser inversamente proporcional às concentrações do plastificante utilizado. Mesmo aumentando a concentração de polissacarídeo (amido) mantendo a concentração de plastificante não houve alteração significativa no módulo de elasticidade (Rigo 2006).

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram produzidos hidrogéis em forma de filmes poliméricos de PVA/quitosana reticulados com glutaraldeído, adicionado polissacarídeos do *Anadenanthera macrocarpa* e agentes plastificantes.

Os espectros no FTIR confirmaram plena interação química entre os grupos PVA/quitosana e polissacarídeos, não formando novos picos e o perfil de espectro mantido.

As fotomicrografias obtidas por MEV sugerem que a estrutura dos filmes seja influenciada pelos polissacarídeos, apresentando porosidade.

Após os ensaios para caracterização física, química, biológica e mecânica, na perspectiva de produção de um biomaterial, constatou-se melhora das propriedades mecânicas dos filmes, resultando em maior resistência e capacidade de alongamento ao material, possibilitando ajustes nas concentrações para adequações funcionais do produto.

Os filmes com a concentração de 0,5 e 1% de polissacarídeos e PVA a 10% apresentaram desempenho satisfatório nas propriedades testadas e biocompatibilidade com perfil não citotóxico. A coloração padrão foi amarelada, transparente com textura lisa e brilhante, não obstante a sua característica frágil e tênue, configurando perspectivas promissoras no desenvolvimento de novos materiais.

AGRADECIMENTOS

À FAPEG e ao Programa de Mestrado RENAC-UEG pelo apoio financeiro e aos laboratórios da Faculdade de Farmácia da UFG e à CCET da UEG pela realização dos testes de caracterização.

REFERÊNCIAS

Airoidi C, Monteiro Jr. OAC 2000. Chitosan-Organosilane Hybrids-Syntheses, Characterization, Copper Adsorption, and Enzyme Immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(4):797-804. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(20000725\)77:4<797::AID-APP12>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(20000725)77:4<797::AID-APP12>3.0.CO;2-Z).

Batista KA, Lopes FM, Yamashita F, Fernandes KF 2013. Lipase entrapment in PVA/Chitosan biodegradable film for reactor coatings. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3):1696-1701. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.082>.

Bispo VM 2009. *Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 206 pp.

Brito MF, França TN, Oliveira KD, Cerqueira VD 2000. Estudos experimentais em coelhos com plantas cianogênicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 20(2):65-70. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2000000200002>.

Carneiro ACO, Vital BR, Frederico PGU, Carvalho AMML, Vidaurre GB 2013. Propriedades de chapas de aglomerado fabricadas com adesivo tânico de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*) e uréia-formadeído. *Revista Árvore*, 33(3):521-531. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622009000300014>.

Carvalho EP 2010. *Preparação e caracterização de filmes compósitos de quitosana/poli(ál-cool vinílico) com nanopartículas de óxido de cobre(II)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 72 pp.

Chen MC, Liu CT, Tsai HW, Lai WY, Chang Y, Sung HW 2009. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. *Biomaterials*, 30(9):5560-5571. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.039>.

Costa-Júnior ES, Mansur HS 2008. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(Ál-cool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. *Química Nova*, 31(6):1460-1466. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000600034>.

Cuq B, Gontard N, Cuq J-L, Guilbert S 1997. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3):622-626. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf960352i>.

Dias LLS, Mansur HS, Donnici CL, Pereira MM 2011. Synthesis and characterization of chito-san-polyvinyl alcohol-bioactive glass hybrid membranes. *Biomatter*, 1(1):114-119. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/biom.1.1.17449>.

Distantina S, Rochmadi R, Fahrurrozi M, Wiratni W 2013. Preparation and Characterization of Glutaraldehyde-Crosslinked Kappa Carrageenan Hydrogel. *Engineering Journal*, 17(3):57-66. Disponível em: <https://doi.org/10.4186/ej.2013.17.3.57>.

Faria FO, Vercelheze AES, Mali S 2012. Propriedades Físicas de Filmes Biodegradáveis à Base de Amido de Mandioca, Álcool Polivinílico e Montmorilonita. *Química Nova*, 35(3):487-492. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000300009>.

Gomes SRR 2013. *Desenvolvimento de matrizes biomiméticas como substitutos de pele destinados ao tratamento de queimaduras*. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 220 pp.

Gontard N, Guilbert S, Cuq J-L 1992. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1):191-199. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>.

Horn MM 2008. *Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 73 pp.

Horn MM 2012. *Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 147 pp.

Kacuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner N, Ebringerová A 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2):195-203. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X).

Lopes WA, Fascio M 2004. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, 27(4):670-673. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000400025>.

Mali S, Sakanaka LS, Yamashita F, Grossmann MVE 2005. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60(3):283-289. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.01.003>.

Mendanha da Cunha CR, Mendanha Neto SA, Carlos da Silva C, Cortez AP, Gomes Mdo N, Martins FI, Alonso A, Rezende KR, Menegatti R, de Magalhães MT, Valadares MC 2013. 4-Nerolidylcatechol and its synthetic analogues: Antioxidant activity and toxicity evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62:371-378. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.028>.

Moretão MP, Buchi DF, Gorin PAJ, Iacomini M, Oliveira MBM 2003. Effect of an acidic heteropolysaccharide (Aragal) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, 89(2-3):175-185. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00136-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00136-6).

Moretão MP, Zampronio AR, Gorin PAJ, Iacomini M, Oliveira MBM 2004. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (Aragal) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunology Letters*, 93(2-3):189-197. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.03.021>.

Nesseem DI, Eid SF, El-Houseny SS 2011. Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sciences*, 89(13-14):430-438. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.026>.

Rabello MS 2011. *Aditivação de Polímeros*. Artliber Editora, São Paulo, 240 pp.

Rigo LN 2006. *Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis*. Dissertação de mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 130 pp.

Shirai MA, Grossmann MVE, Mali S, Yamashita F, Garcia PS, Müller CMO 2013. Development of biodegradable flexible films of starch and poly(lactic acid) plasticized with adipate or citrate esters. *Carbohydrate Polymers*, 92(1):19-22. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.038>.

Silva FEF, Di-Medeiros MCB, Batista KA, Fernandes KF 2013. PVA/Polysaccharides Blended Films: Mechanical Properties. *Journal of Materials*, 2013:1-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/413578>.

Silva Filho RR, Di-Medeiros MCB, Batista KA, Fernandes KF 2012. Uso da goma de angico em substituição ao ágar em meio de cultura. In: *Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão – IX COMPEEX*. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p.4601-15.

Silva GGD, Sobral PJA, Carvalho RA, Bergo PVA, Mendieta-Taboada O, Habitante AMQB 2008. Biodegradable Films Based on Blends of Gelatin and Poly (Vinyl Alcohol): Effect of PVA Type or Concentration on Some Physical Properties of Films. *Journal of Polymers and the Environment*, 16(4):276-285. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-008-0112-9>.

Silva KO 2011. *Avaliação das atividades antimicrobiana, aderência, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva de Anadenanthera macrocarpa (Benth) brenan*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 96 pp.

Silva WA, Pereira J, Carvalho CWP, Ferrua FQ 2007. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. *Ciência e Agrotecnologia* 31(1):154-63. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000100023>.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, Bryce DL 2006. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7.ed. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 530 pp.

Sobral PJA 2000. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(6):1251-1259. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000600022>.

Tokarnia CH, Peixoto PV, Brito MF, Duarte MD, Brust LAC 1999. Estudos experimentais com plantas cianogênicas em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 19(2):84-90. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X1999000200006>.

Villanova JCO, Oréfice RL, Cunha AS 2010. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros*, 20(1):51-64. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009>.

Weber CR, Soares CML, Lopes ABD, Silva TS, Nascimento MS, Ximenes ECPA 2011. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. *Revista Brasileira de Farmácia*, 92(4):235-244. Disponível em: <http://rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-4-1-235-244.pdf>.

Weber Sobrinho CR 2010. *Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) Von Reis Alt. (Angico-de-carço)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 158 pp.

Evaluation the Effect of the Merger the Polysaccharide *Anadenanthera macrocarpa* in PVA/Chitosan Films

ABSTRACT

The development of materials with efficient properties and lower costs is focus of many studies of film-shaped hydrogels. This work aims to extract and characterize polysaccharides *Anadenanthera macrocarpa*, production and characterization of a film-shaped hydrogels PVA/chitosan. Based on these evaluations the effect of the polysaccharides has been characterized as: Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and the evaluation of cytotoxicity profile. The hydrogels have been tested with the absence and with the presence of polysaccharides by varying the concentration of 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0% and PVA 10%. The films were characterized by using infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (ATR), scanning electron microscope (SEM), color and mechanical testing. The polysaccharides showed non-cytotoxic concentrations of 0.5 and 1.0%. The films showed flexible aspect with mechanical properties of strength and elongation.

Keywords: Polysaccharides; Hydrogel; Polymeric Films; Mechanical Tests.

Submissão: 08/07/2017
Aceite: 03/09/2018