

Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – PosMat

**“UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE BORRACHA NATURAL COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DE
PARASITAS DE *Leishmania braziliensis*”**

Caroline Silva Danna

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Presidente Prudente

2012



Caroline Silva Danna

**“UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE BORRACHA NATURAL COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE
PARASITAS DE *Leishmania braziliensis*”**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Processamento de Materiais, Desenvolvimento de Dispositivos e Aplicações, sob a orientação do Prof. Dr. Aldo Eloizo Job.

Presidente Prudente
2012

Dedico este trabalho á minha mãe, Cleci Catarina Silva, que mesmo estando longe geograficamente, sei que sempre esteve comigo, com seu amor enorme.

Dedico também aos meus tios, Terezinha e Antônio Fregolente que desde meus primeiros passos rumo ao que conquistei até hoje na vida acadêmica me apoiaram e guiaram.

Agradecimentos

Agradeço a todas as minhas famílias.

A família de sangue e de amigos, que tiveram papéis distintos, porém muito importante em minha vida e em minhas realizações.

Agradeço ao meu orientado Prof. Dr. Aldo Eloízo Job, não só pela orientação, mas também pelo companheirismo e as puxadas de orelha, as quais vieram sempre em boa hora. Sem elas não teria chegado à finalização deste trabalho.

As minhas companheiras de casa, Paula Melques (minha truta) e Luciana Viotto (filha).

Aos meus amigos de trabalho diário, Carlos Gomes, Flávio (le Pac), Eltão, Pira, Diogão, Nelissa, Fernandinho e todos os outros colegas.

Aos meus amigos de vida, Juninho, Aline (linão), Aline (Broto), Diego (cavalo), Yuri, Inácia e todos os demais que sempre que podemos estamos juntos.

Faço um agradecimento em especial ao Alexandre Fregolente, que é parte integrante e fundamental na minha vida. Sem ele não sei se conseguiria.

A todos os professores do Departamento de Química, Física e Biologia que em ajudaram a formar a base do que sei hoje.

Aos professores integrantes da banca avaliadora, por terem contribuído de maneira extremamente positiva para a finalização desta Dissertação.

Agradeço aos grupos NanoBioNet e NanoBioMed pelo apoio financeiro ao projeto.

Obrigada a todos!!!

"Não há nada que seja maior evidência de insanidade, do que fazer a mesma coisa dia após dia e esperar resultados diferentes".

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

SUMÁRIO	
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
CAPITULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 BORRACHA NATURAL.....	12
1.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA	14
1.3 <i>LEISHMANIA (LEISHMANIA) BRAZILIENSIS</i>	18
1.4 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE PARASITAS PARA GERAÇÃO DE BIOMASSA VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE	29
1.4.1 Aglutinação pela lecitina do amendoim (PNA – <i>peanut agglutinin</i>).....	30
1.4.2 A cromatografia em coluna de lã de vidro	33
1.4.3 Lise mediada pelo sistema complemento.....	34
1.4.4 A adsorção em membranas de borracha natural com nanopartículas de prata.	35
CAPITULO 2 – MÉTODOS EXPERIMENTAIS	36
2.1 MATERIAIS.....	36
2.2 OBTENÇÕES DO LÁTEX	36
2.3 MEMBRANAS DE BORRACHA NATURAL	37
2.4 REDUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE Ag NA PRESENÇA DA BN.....	38
2.5 SISTEMAS DE CULTIVO DE PROMASTIGOTAS	38
2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	41
2.6.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis	41
2.6.2 Comportamento Térmico.....	43
2.6.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	43
2.6.2.2 Análise Termogravimétrica (TG)	45
2.6.2.3 Técnica TG/FT-IR acoplados	46
2.7 Difração de Raios X (DRX)	46
2.8 TESTES BIOLÓGICOS	47
2.8.1 Cinética de Crescimento Populacional de Promastigotas em Ambientes Contaminados pelas Nanopartículas.....	47
2.8.2 Cromatografia em Coluna de Lã de Vidro (Controle Experimental).	48
2.8.3 Processo de Infecção dos Animais.....	49
2.8.4 Teste de Hipersensibilidade Tardia (DTH – <i>Delay Test Hypersensitivity</i>)	50
2.8.5 Obtenção de Macrófagos Peritoneais Murinos	51
2.8.6 Determinação da Liberação de Óxido Nítrico.	52
CAPITULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
3.1 MEMBRANAS DE BN/AG.....	57
3.2 ESPECTROSCOPIA ULTRA-VIOLETA VISÍVEL	58

3.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	61
3.4 TG acoplado ao FT-IR.....	65
3.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	69
3.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....	70
3.7 PROCESSO DE SEPARAÇÃO	72
3.8 CINÉTICA DE CRESCIMENTO POPULACIONAL <i>IN VITRO</i>	75
3.9 SÍNTESE DE ÓXIDO NITRICO	78
3.10 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS	79
3.11 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA	84
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos fabricados com Borracha Natural.....	2
Figura 2 - Produção de Borracha Natural nos Estados Brasileiros. Fonte http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php [6].	4
Figura 3 - Produção, consumo e importação de borracha natural no Brasil no período de 1995 a 2008. http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php	5
Figura 4 - Produção x Consumo de Borracha Natural no Brasil no período de 1970 à 2020. Dados do instituto Agrônômico de Campinas (IAC)	6
Figura 5 - O cálice de <i>Lycurgus</i> no acervo do British Museum com diferentes iluminações. (A) peça iluminada por fora, (B) peça iluminada por dentro [10].	7
Figura 6 - (A) Vitral multicolorido da Catedral de Notredame; (C) Cerâmica iraquiana policromática no acervo do British Museum; (C) Moedas fabricadas com prata metálica [10].	8
Figura 7 - (A) Lesão ulcerativa do tipo exsudativa, forma comum não tratada da leishmaniose cutânea de um paciente de Araraquara/SP, localizada na perna direita; (B) Imagem tronco-abdominal de uma criança com leishmaniose visceral, evidenciando a posição e o aumento do fígado e do baço, imagem disponível no site da WHO/Leishmaniasis; (C) Imagem de um baço canino extraído de um cão infectado durante epidemia de leishmaniose visceral em Araraquara/SP, evidenciando lesões adenocorticais e falência do órgão, justificando o Tabela anêmico do paciente e posterior morte; (D) Imagem de paciente vítima da leishmaniose tegumentar difusa, com lesões no palato, bochecha e lábios, também na forma exsudativa	10
Figura 8 - Formas de vida do protozoário de <i>Leishmania braziliensis</i> . (A) forma promastigota; (B) forma amastigota.	11
Figura 9 - Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural. Imagem cedida por Flávio Camargo Cabrera da FCT-UNESP, [34].	13
Figura 10 - Efeito da interação dos íons de prata com a parede celular de microorganismos [57].	16
Figura 11 - Pesquisadores importantes na história da leishmaniose, em (A) Sir William B. Leishman; em (B) Charles Donovan.....	19
Figura 12 - Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (foto ampliada) [20].	20
Figura 13 - Mapas do Estado de São Paulo, evidenciando relação entre as vias de acesso ao Estado e as cidades onde existem registros de casos de leishmaniose no ano de 2010 (dados da Sucen/2010). (A) Mapa epidemiológico apontando onde foi registrada a ocorrência de alguma forma clínica de leishmaniose, tanto humano quanto animal. (B) Mapa epidemiológico apontando onde foi registrada a ocorrência de casos autóctones da doença e onde já existem epidemias notáveis [20].	22
Figura 14 - Mapa evidenciando a densidade de casos de leishmaniose por município do país, [20].	23
Figura 15 - Microscopia óptica de macrófago murino obtido do coxim da pata esquerda de um camundongo isogênico BALB/c. Aumento obtido de 1500 vezes, fixado e corado por hematoxilina. Imagem cedida gentilmente por Carlos Gomes Barboza-Filho (UNESP/FCT – Presidente Prudente).	24
Figura 16 - Os diferentes estágios de transição entre a forma promastigota (a) e amastigota (f) de <i>Leishmania braziliensis</i> . Imagem cedida gentilmente por Carlos Gomes Barboza-Filho, obtida em pesquisa em parceria com Fred Oppendoes em De Duve Institute, na Bélgica.	25
Figura 17 -Ciclo de vida do parasita adaptado de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm	26
Figura 18 - (A) Estrutura molecular da aglutinina do amendoim. (B) Um frasco contendo a aglutinina do amendoim solubilizada. (C) Microscopia óptica de frações de parasitas <i>L. infantum</i> separados pela técnica do PNA.....	31
Figura 19 - Processo em espiral da seringueira do clone RRIM 600.....	37
Figura 20 - Fotografias evidenciando a sequência passo a passo da obtenção dos parasitas na forma amastigota a partir dos hamsters. Imagem cedida por Carlos Gomes Barboza-Filho.....	41

Figura 21 - Representação da oscilação da nuvem eletrônica da nanopartícula interagindo com um campo elétrico externo.	42
Figura 22 - Câmara de Neubauer [74].	47
Figura 23 - Gabarito de uma câmara de Neubauer especificando os quadrantes A, utilizado para contagem de células maiores, B para células e tamanho médio e C para células menores [74].	48
Figura 24 - Amostra das diferenças visuais dos animais utilizados na pesquisa. Em (A) estão os camundongos isogênicos da raça BALB/c e em (B) estão indivíduos da raça C57BL/6.	50
Figura 25 - Imagem aproximada das placas de leitura de ELISA onde foram inoculados os macrófagos peritoneais. Note na imagem que as placas tem poços (<i>wells</i>) com colunas numeradas e linhas identificadas por letras. Assim, tem-se condição de ter amostras diferentes em cada poço, com sua leitura individual sem que haja contaminação.	54
Figura 26 - Uma das placas de leitura de ELISA utilizada nos experimentos de dosagem de NO. Note que existem variações entre as tonalidades dos poços, já que eles apresentam diferentes amostras e assim também demonstraram diferentes leituras de concentrações de nitrito. É importante ressaltar que essa tonalidade em vermelho que aparece não corresponde a realidade, já que o conjunto presente nos poços é altamente fotossensível, sofrendo alteração de tonalidade em virtude do flash da máquina fotográfica.	55
Figura 27 - Leitor de ELISA, mostrando a área onde se introduz a placa com as amostras, que posteriormente é fechada para a leitura por um espectrofotômetro no seu interior.	56
Figura 28 - (A) Membranas de borracha natural pura; (B) membranas de borracha natural com nanopartículas de prata nos diferentes tempos de redução.	57
Figura 29 - Curvas do espectro de absorvância no UV-VIS para as membranas de BN pura e as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.	59
Figura 30 - Relação entre o tempo de redução e a absorvância das membranas de BN/Ag.	60
Figura 31 - Análises TG para membrana de BN e BN/Ag em diferentes tempos de redução.	61
Figura 32 - Ampliação na parte onde é mais evidenciada a perda de massa para a membrana de BN/Ag 120'.	62
Figura 33 - Primeira derivada da curva de TG.	63
Figura 34 - Ampliação na região de maior perda de massa da curva de DTG.	63
Figura 35 - Imagem 3D gerada no FT-IR/TG para a borracha natural pura.	65
Figura 36 - Espectro extraído da imagem 3D FT-IR da borracha natural nas temperaturas de 40°C, 355°C, 423°C e 542°C.	66
Figura 37 - Imagem em 3D gerada pelo FT-IR para as membranas de BN/Ag em diferentes tempos de redução. (A) BN/Ag 9 minutos; (B) BN/Ag 30 minutos e (C) BN/Ag 120 minutos de redução.	67
Figura 38 -Espectro extraído da imagem 3D do espectro de FT-IR das membranas de BN/Ag na temperatura de 354°C.	68
Figura 39 - Espectro extraído da imagem 3D do espectro de FT-IR das membranas de BN/Ag na temperatura de 402°C.	68
Figura 40 - Espectro extraído da imagem 3D do espectro de FT-IR das membranas de BN/Ag na temperatura de 493°C.	69
Figura 41 - Curva de DSC para as membranas de BN pura e em diferentes tempos de redução.	70
Figura 42 - Picos de difração de raio-X para membrana de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.	71
Figura 43 - Processo de Separação; (A) e (B) Membrana de BN/Ag colocada no meio de cultura; (C) Protozoários de <i>L. brasilienses</i> no meio de cultura com as membranas de BN/Ag; (D) Protozoários aderidos à membrana de BN/Ag.	74
Figura 44 - Cinética de crescimento populacional.	75
Figura 45 - Cinética de crescimento populacional em contato com as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.	76
Figura 46 - Dosagem de óxido nítrico produzido pelo macrófago infectado com parasitas que estiveram em contato com as membranas de BN/Ag e grupo controle negativo.	78

Figura 47 - Infecção experimental em grupos de camundongos isogênicos BALB/c expostos aos parasitas processados por adsorção em membrana de BN/Ag (A) e por cromatografia em coluna de lã de vidro (B).	81
Figura 48 - Infecção experimental em grupos de camundongos isogênicos C57BL/6 expostos aos parasitas processados por adsorção em membrana de BN/Ag (em A) e por cromatografia em coluna de lã de vidro (em B).....	83
Figura 49 - Resultados dos testes de hipersensibilidade tardia (DTH) nos principais grupos controle e experimental no decorrer de todo o período de análise (uma semana).	87
Figura 50 - Resultados dos testes de hipersensibilidade tardia (DTH) dos principais grupos experimentais durante apenas o período em que apresentou-se positividade para o teste.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Panorama da produção mundial de borracha natural. Adaptado de http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php [6].	3
Tabela 2 - Panorama do consumo mundial de Borracha Natural. Adaptado de http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php [6].	3
Tabela 3 - Relação entre o tamanho das partículas de prata e a taxa de eliminação dos microrganismos em contato com ela [16].	17
Tabela 4 - Correlação entre os comprimentos de ondas obtidos na análise de UV-VIS com o tamanho das partículas de prata, de uma solução padrão. Fonte: SOLOMON, S et all. Journal of Chemical Education. Vol. 84 No. 2; 2007 [83].....	58
Tabela 5 - Distribuição do número de indivíduos por grupo que foi analisado nos testes de infectividade experimental in vivo.	80
Tabela 6 - Distribuição do número de indivíduos por grupo que foi analisado nos testes de hipersensibilidade tardia.	85

DANNA, Caroline Silva. Utilização de membranas de borracha natural com nanopartículas de prata como métodos de separação de parasitas infectantes de *Leishmania braziliensis*. 2012. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2011.

RESUMO

As membranas de BN foram obtidas do látex da seringueira *Hevea braziliensis*, através da técnica de *casting*. Este trabalho apresenta as fases de obtenção e caracterização de membranas de borracha natural (BN) com incorporação coloidal de nanopartículas metálicas de prata (AgNPs) gerando compósitos de BN/Ag. A incorporação das nanopartículas de prata na membrana de BN se deu através do método de reação *in situ*, no processo de redução química do sal de nitrato de prata (AgNO_3), utilizando água como meio reacional, para diferentes tempos de redução. Os compósitos de BN/Ag foram utilizados para aplicação no processo de separação dos parasitas infectantes de *Leishmania braziliensis*. Esta etapa é necessária na busca de uma vacina eficiente contra a leishmaniose causada pela espécie original do Brasil. A eficácia do processo foi verificada por meio dos estudos comparativos com o método de separação de protozoários utilizando a lã de vidro. Três testes biológicos foram realizados, sendo (i) a cinética de crescimento populacional *in vitro* das formas promastigotas e amastigotas; (ii) a síntese de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos e; (iii) infecção experimental de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL6. A caracterização do compósito de BN/Ag foi realizada através das técnicas de Espectroscopia no Ultravioleta visível (UV-VIS), análises térmicas por calorimetria exploratório diferencial (DSC) termogravimetria (TG) e acoplamento de termogravimetria com infravermelho (TG/FT-IR). Os resultados mostram a ocorrência da redução das nanopartículas de prata na membrana de BN, em diferentes tempos, e que não interfere nas propriedades termomecânicas, nas temperaturas de transições de fase e na estabilidade térmica, quando comparado com a membrana de BN pura. Os testes biológicos

comprovaram que o compósito BN/Ag tem a propriedade de separar a duas fases do protozoário, e mantém a fase procíclica viva.

Palavras-chave: borracha natural, nanopartículas de prata, processo de separação, *Leishmania braziliensis*

ABSTRACT

The natural rubber membranes (NR) were obtained from the latex *Hevea brasiliensis* rubber tree, using the technique of casting. This work presents the stages of obtainment and characterization of NR membranes with colloidal incorporation silver metallic nanoparticles – AgNPs, producing composites of NR/Ag. The NR/Ag membranes were used for application into separation process of the *Leishmania braziliensis* parasites. This stage is very important in the research for an effective vaccine against leishmaniasis, caused by the original species in Brazil. The effectiveness of the process will be done through comparative studies across the methods of separation of protozoa, using the membranes NR/Ag and glass wool. Three biological tests were accomplished: (i) the growth kinetics of population of promastigotas and amastigotes in vitro; (ii) the synthesis of nitric oxide NO by murine macrophages; and (iii) experimental infection of inbred mice BALB/c and C57BL6. The characterization of the composite NR/Ag was performed using the techniques of ultraviolet visible spectroscopy (UV-Vis), thermal analysis differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG) and thermogravimetry coupled with infrared (TG/FT-IR) . The result show the occurrence of the reduction of silver nanoparticles in the membrane of NR in different reduction times and does not interfere in the thermomechanical property, at temperatures of phase transitions and thermal stability compared with the membrane of pure NR. The biological tests to maintain non-infectious phase without cell damage that the composite BN / Ag has the capacity to separate the two stages of the protozoan, and keeps the stage alive procyclical.

Keywords: natural rubber, silver nanoparticles, separation process and *Leishmania braziliensis*

INTRODUÇÃO

Muitas espécies vegetais são capazes de produzir uma seiva leitosa, com características muito próximas a do látex. No entanto o número de espécies que geram essa seiva em quantidade e qualidade suficientes para exploração comercial é bem reduzida, sendo a espécie *Hevea brasiliensis*, originária da Amazônia, a principal produtora de borracha natural comercialmente viável [1].

O primeiro registro do emprego da borracha natural foi sua utilização, pela civilização Maia, como matéria prima para a fabricação de artefatos utilizados para o entretenimento da população. Eles fabricavam esses artefatos, que em sua maioria tinham o formato de uma bola, coagulando o látex e posteriormente aquecendo-o nas cinzas das fogueiras para imprimir maior resistência ao material [2,3]. Os portugueses a utilizavam para fabricar uma espécie de aparato para armazenagem e transporte de vinho e também como apagador [4].

No século XVII com o crescimento do cenário industrial na Europa, a borracha se torna também uma importante matéria prima aplicada na indústria de materiais a prova d'água, que necessitavam apresentar leveza e maleabilidade. A borracha começou a ser utilizada pra diversos fins. Essa foi uma época conhecida como “febre” da borracha, onde se queria fabricar uma grande variedade de artefatos a base de borracha. Foram fabricados desde peças do vestuário, como ligas elástica, suspensórios e calçados, até recipiente para armazenamento para diferentes utilidades.

Essa “febre” não durou por muito tempo, pois com a mudança no clima, devido às estações do ano, os produtos a base de borracha sofriam mudanças que desagradavam os consumidores. À medida que eram expostos a um aumento de temperatura, se tornavam moles e pegajosos e ainda exalavam um odor muito forte, sendo que em épocas em que o invernos se mostravam mais rigorosos, convertiam-se em materiais com rigidez elevada.

Em 1826 pesquisadores mostram que a natureza química da borracha consistia em carbono e hidrogênio, sendo que W. Tilden estudou separadamente as frações que constituem a borracha natural, sendo uma dessas parcelas o isopreno, um material volátil, que após algum tempo de estocagem tornou-se borracha.

No ano de 1839, Charles Goodyear publicou alguns estudos que mostram a influência da temperatura e o acréscimo de enxofre à borracha natural como forma de modificar suas propriedades, eliminando os problemas antes enfrentados diante à variação do clima, tornando-a mais resistente e assim mais nobre para a indústria. A borracha que passa por esse processo de cura a base de enxofre é chamada borracha vulcanizada, em homenagem ao deus romano do fogo Vulcano [5]. Com essa descoberta a demanda de utilização deste polímero aumentou consideravelmente, sendo que nos dias atuais ainda se utiliza esse processo de cura da borracha natural, possibilitando a fabricação de diversos materiais, que vão desde artefatos para indústria pneumática até luvas cirúrgicas, como mostrado na Figura 1.



Figura 1 - Produtos fabricados com Borracha Natural.

O Brasil, na década de 50, representava uma parcela significativa no abastecimento deste mercado em constante expansão, detendo 90% da produção de borracha natural. Essa matéria prima era proveniente da região Amazônica no Brasil, o que levou ao desenvolvimento econômico desta região, produzindo também um alto fluxo migratório de trabalhadores para o local.

No ano de 2011, a produção mundial de borracha natural atingiu a marca de 10.974 toneladas, sendo esta produção quase toda consumida pelo mercado [6]. Os valores da produção mundial de borracha no ano de 2011 são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Países produtores de Borracha Natural

Países produtores	Produção (10³ toneladas)	Porcentagem da produção mundial
Tailândia	3.394	30,93%
Indonésia	2.487	22,66%
Malásia	996	9,98%
Brasil	135	1,23%

Tabela 1 - Panorama da produção mundial de borracha natural. Adaptado de <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php> [6].

O maior mercado consumidor dessa matéria prima é a China, seguida pelos países da Comunidade Européia, Estados Unidos e Japão; os dados do consumo desses países seguem organizados na Tabela 2 [6].

Tabela 2- Países consumidores de Borracha Natural

Países consumidores	Porcentagem consumida
China	32,98%
Comunidade Européia	11,13%
Estados Unidos	9,42%
Japão	7,00%

Tabela 2 - Panorama do consumo mundial de Borracha Natural. Adaptado de <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php> [6].

No Brasil a produção está concentrada na região Sudeste e Centro-Oeste, com um sistema de cultivo de plantas de alta produtividade que se adaptou muito bem ao clima da região [6,7]. A Figura 2 mostra um Tabela com os estados brasileiros produtores e também as quantidades de matéria de borracha natural gerada por cada um, em relação à produção do País no ano de 2011[6].

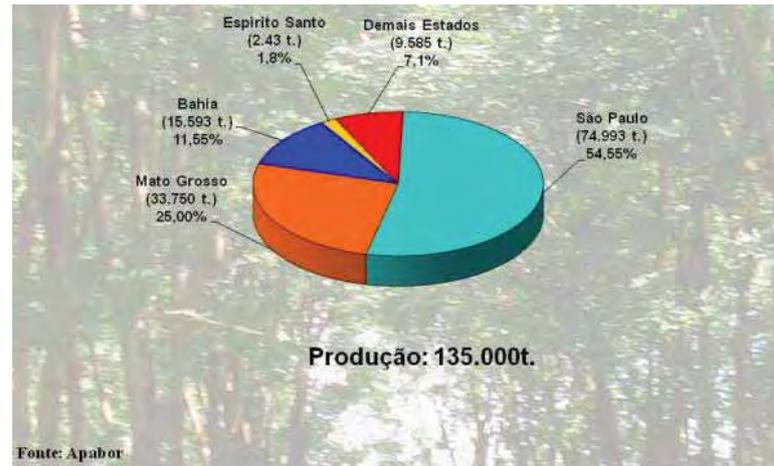


Figura 2 - Produção de Borracha Natural nos Estados Brasileiros. Fonte <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php> [6].

Mesmo sendo um país com características favoráveis para o plantio da seringueira, como grande área territorial e clima propício, o país ainda apresenta um déficit muito grande na produção, tendo que importar a maior parte da borracha natural aqui consumida.

Dados do *International Rubber Study Group* (IRSG) mostram que mesmo a produção interna atingindo o máximo de 135 mil toneladas no ano corrente, esse valor ainda não é o suficiente para atender a demanda do mercado consumidor do País.

A Figura 3 mostra uma relação entre a produção, importação e o consumo de borracha natural no período que vai do ano de 1995 até o ano de 2008.

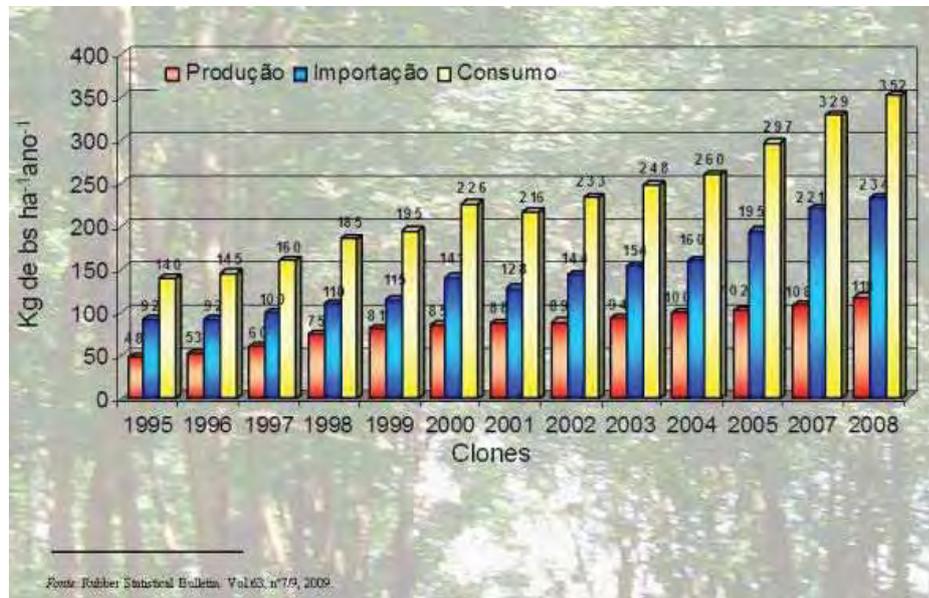


Figura 3- Produção, consumo e importação de borracha natural no Brasil no período de 1995 a 2008.

<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php>

Essa discrepância entre o consumo e a produção está longe de terminar, estimativas do instituto Borracha Natural Brasileira mostram que no ano de 2020 o consumo interno de borracha natural será cerca de duas vezes maior do que a produção brasileira. A Figura 4 mostra o perfil de consumo e produção de borracha natural no Brasil até os dias de hoje assim como uma previsão para os anos que se seguem.

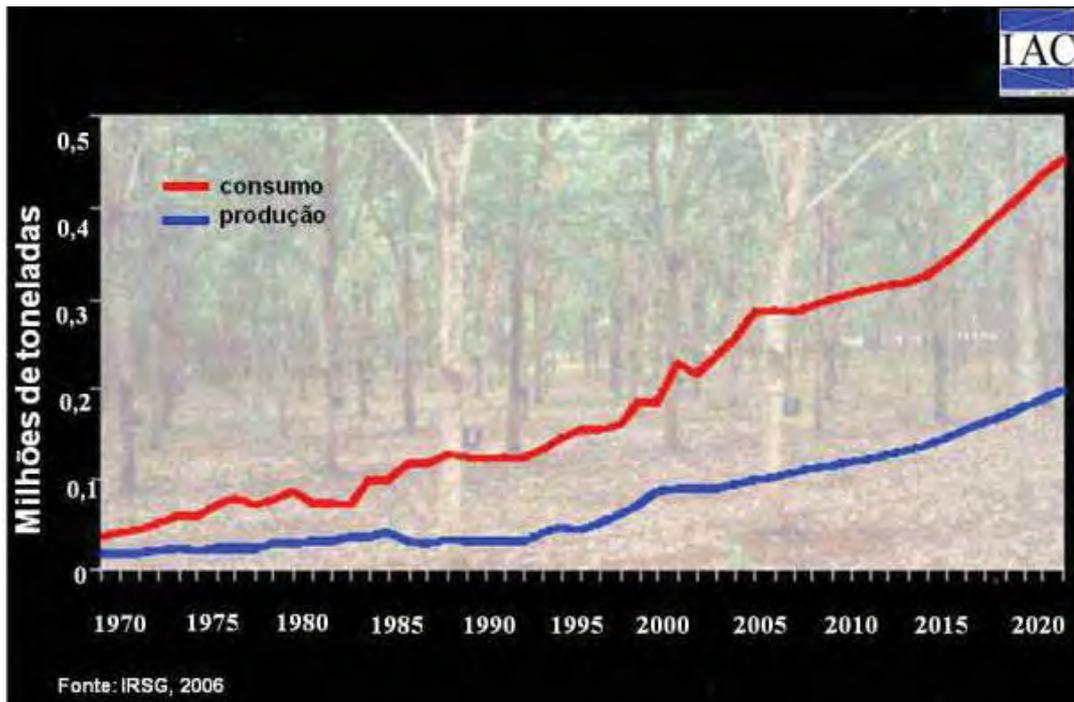


Figura 4- Produção x Consumo de Borracha Natural no Brasil no período de 1970 à 2020. Dados do instituto Agrônomo de Campinas (IAC)

A borracha natural tem um papel muito importante no mercado mundial, seja como matéria prima para produtos da construção naval, civil até produtos na área médica, devido a sua biocompatibilidade. Muitos grupos de pesquisas estão focados em combinar essas propriedades com as de outros materiais, como por exemplo, os metais nobres [8, 9].

A utilização de nanopartículas metálicas é conhecida desde a antiguidade, sendo que a primeira civilização a dominar a extração e fabricação de materiais utilizando a prata foram os Caldeus.

Essa civilização desenvolveu uma forma de extrair este metal através do processamento de minérios de chumbo. Esse minério era utilizado na fabricação de moedas e

utensílios domésticos, como jarras para armazenar água, pois eles acreditavam que a prata presente no artefato mantinha a água sempre limpa e fresca.

O primeiro relato da utilização das nanopartículas foi a mistura de pequenas partículas de prata com o intuito de modificar a cor de alguns objetos, sendo o caso mais conhecido “A Copa do Licurgo”. Essa é uma taça de fabricação romana, feita de bronze onde partículas de prata e ouro foram incorporadas, gerando uma variação em sua cor dependendo do ângulo de incidência da luz na taça, como pode ser visto na Figura 5 [10].



Figura 5 - O cálice de Lycurgus no acervo do British Museum com diferentes iluminações. (A) peça iluminada por fora, (B) peça iluminada por dentro [10].

A aplicação de nanopartículas com a mesma finalidade pode ser encontrada em vitrais e também em coloração de peças cerâmicas. A forma metálica da prata também era muito utilizada na confecção de moedas, como mostrado na Figura 6.

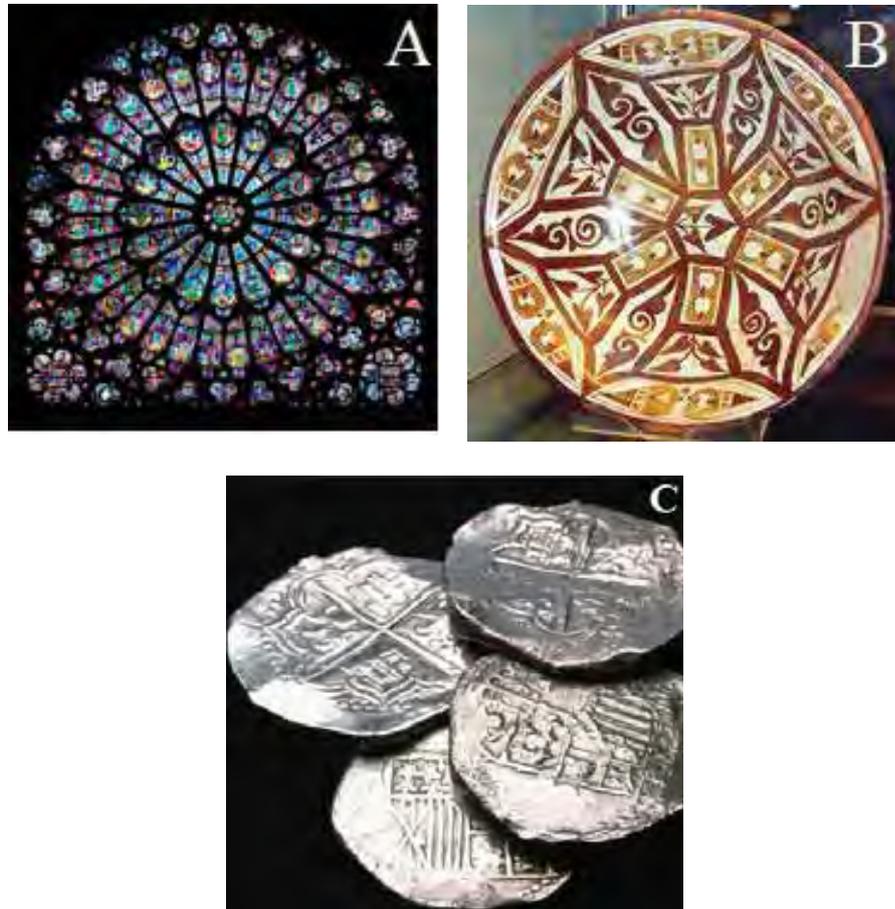


Figura 6 - (A) Vitral multicolorido da Catedral de Notre-dame; (B) Cerâmica iraquiana policromática no acervo do British Museum; (C) Moedas fabricadas com prata metálica [10].

Durante algum tempo a mineração e utilização de prata ficou estabilizada, sem novos avanços. No século XII, com a descoberta do Novo Mundo, a prata volta à evidência, sendo que os países Bolívia, México e Peru detinham 85% na produção mundial e do comércio desse metal.

A aplicação tecnológica da prata teve seu ápice nos anos de 1876 a 1920 com o aumento da produção mundial devido às descobertas de fontes de prata em outras regiões, com na Austrália, na América Central e Europa.

Esse aumento na procura da prata para diversas aplicações contribuiu para a melhoria nos métodos de obtenção de tal material, sendo que nos dias de hoje a produção chega à de 671 milhões de *onças troy*¹.

A utilização de Nanopartículas de Prata é ampla por apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas muito interessantes. Dentre essas propriedades destacam-se as propriedades bactericida [11,12] e antibacteriana [13], abrangendo uma grande gama de bactérias Gram positivas/negativas [14], biocompatibilidade elevada e baixa toxicidade em células animais.

Também se têm estudos sobre a ação antiviral das nanopartículas de prata [15] e também para desinfetar dispositivos médicos, aparelhos eletrodomésticos e até no tratamento da água [16]; esses fatos geram interesse em associar esse material nobre às pesquisas na área da saúde.

Existe uma enormidade de doenças, principalmente enfermidades tropicais que não apresentam mecanismos de tratamento ou prevenção que sejam claros e se faz necessário o estudo do comportamento de micróbios patogênicos na presença de nanopartículas metálicas, como a prata [17, 1818].

A leishmaniose se trata de uma infecção provocada por um parasita do gênero *Leishmania*, que se manifesta no ser humano na forma cutânea, como úlceras na pele [19, 20], na forma visceral, com hepato e esplenomegalia [21] e na forma tegumentar difusa, que gera lesões que ultrapassam a barreira superficial da pele atingindo cartilagens, articulações e tecidos conjuntivos mais profundos [22].

¹ *Onça troy* é uma unidade de medida utilizada para avaliar metais preciosos. Uma onça troy corresponde à 31,108 gramas.

A Figura 7 mostra os diferentes tipos de lesões causadas pelo protozoário da *L.*

brasiliensis

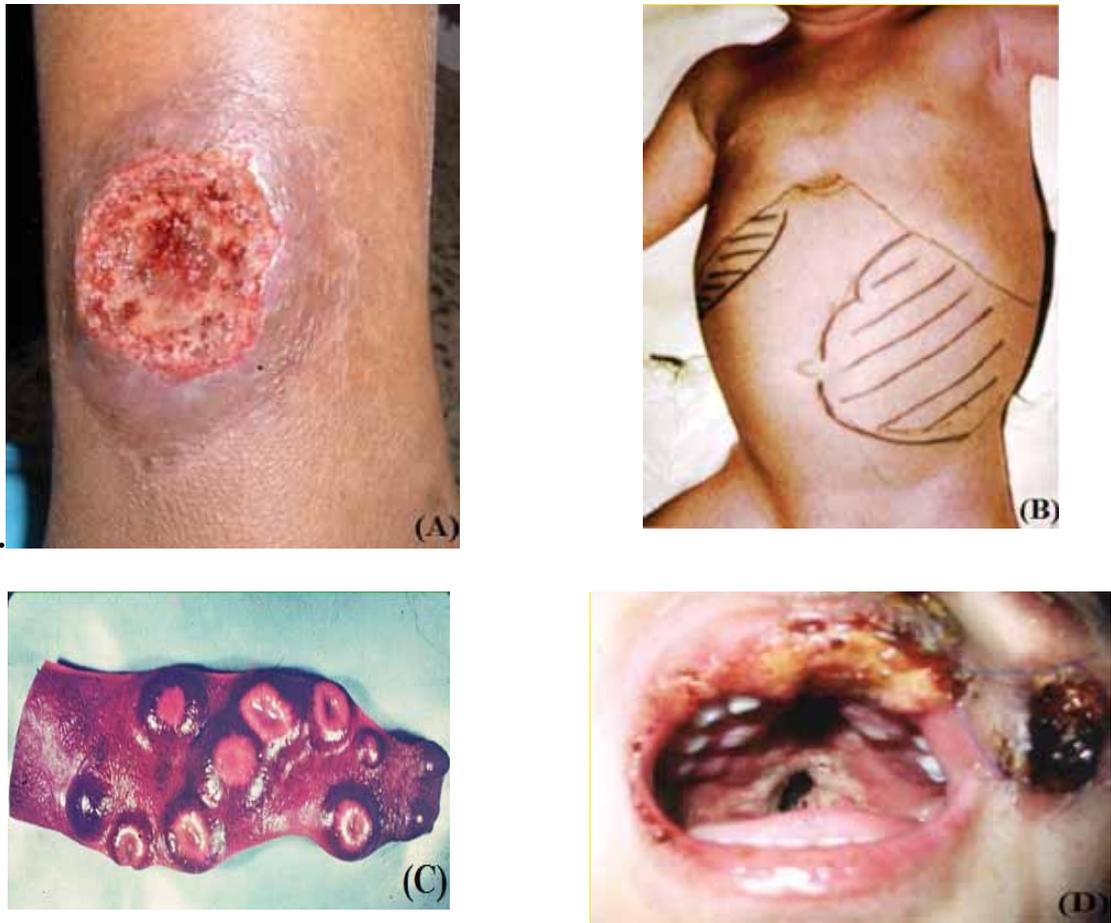


Figura 7 - (A) Lesão ulcerativa do tipo exsudativa, forma comum não tratada da leishmaniose cutânea de um paciente de Araraquara/SP, localizada na perna direita; (B) Imagem tronco-abdominal de uma criança com leishmaniose visceral, evidenciando a posição e o aumento do fígado e do baço, imagem disponível no site da WHO/Leishmaniasis; (C) Imagem de um baço canino extraído de um cão infectado durante epidemia de leishmaniose visceral em Araraquara/SP, evidenciando lesões adenocorticais e falência do órgão, justificando o Tabela anêmico do paciente e posterior morte; (D) Imagem de paciente vítima da leishmaniose tegumentar difusa, com lesões no palato, bochecha e lábios, também na forma exsudativa.

O gênero *Leishmania* agrupa mais de 50 espécies de protozoários, todos causadores de formas da doença, variando sobre aspectos como a patogenicidade, a forma clínica da doença e até posição geográfica, já que os parasitas podem ser divididos entre micróbios do Velho e Novo Mundo. Isso é um fator que gera dificuldade no tratamento da infecção já que para cada tipo diferente de doença e espécie causadora é preciso um tratamento diverso.

Sabe-se que boa parte das espécies conhecidas de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* passa por um processo de amadurecimento celular denominado

metaciclo-gênese [23,24] que habilita tal microorganismo a sobreviver em ambientes hostis, como o intestino médio do inseto flebotomíneo e o plasma sanguíneo humano [22].

Tal amadurecimento é evidente pela ativação de uma série de genes que aumentam a mobilidade do parasita e a síntese de glicoconjugados e lipoproteínas que compõem um novo glicocálix protetor à membrana plasmática do ser [25].

As células que completam tal ciclo de amadurecimento, promastigotas metacíclica, são mais resistentes ao ataque do sistema imunológico humano, atingindo de maneira efetiva os macrófagos disseminando-se para os tecidos conjuntivos [26].

Células promastigotas procíclicas, que ainda não passaram pela metaciclo-gênese não são capazes de atacar o sistema imunológico a ponto de gerar o aparecimento da doença [22].

As fases de amadurecimento do protozoário podem ser diferenciadas, não só através da modificação de suas proteínas de superfície, mas também através da modificação em seu formato. Essa diferença pode ser vista na Figura 8.

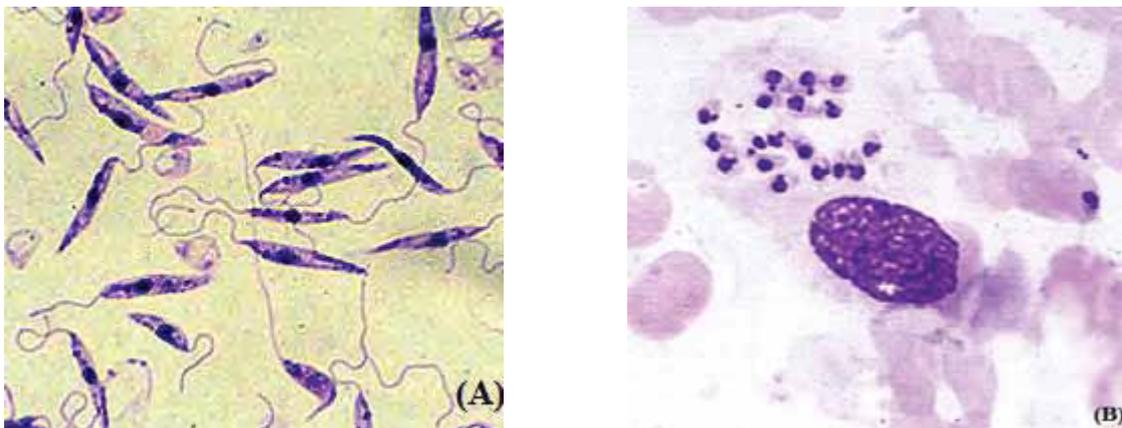


Figura 8 - Formas de vida do protozoário de *Leishmania braziliensis*. (A) forma promastigota; (B) forma amastigota.

Para a confecção de novos métodos de diagnósticos específicos para as espécies de *Leishmania* e subprodutos imunogênicos para proteção contra a leishmaniose, como uma vacina, é necessário um processo bem padronizado de separação dessas culturas celulares mistas em laboratório e aquisição de biomassas metacíclica e procíclica [27].

CAPITULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 BORRACHA NATURAL

Dentre as inúmeras espécies de plantas pertencentes à família das Euforbiáceas, a que mais se destaca como produtora de borracha é a espécie *Hevea brasiliensis*, apresentando borracha de alta qualidade e com baixo custo de cultivo [28].

Essa espécie tem origem na América do Sul, sendo que a região da Malásia e norte da Tailândia tem destaque na produção e exportação [29], de onde provem 90% da produção mundial de borracha [6,30].

Nessas regiões as seringueiras são fonte tanto de borracha quanto de madeira. Passados alguns anos de cultivo, a árvore começa apresentar defasagem na produção de borracha, então se tornam matérias-primas para a produção de móveis, painéis de madeira entre outros artigos derivados da madeira [31,29].

O consumo da borracha natural pelo mercado interno está voltado principalmente para indústria de pneumáticos, cerca de 80% da produção, sendo o restante empregado para fabricação dos demais artefatos que utilizam a borracha como matéria-prima, como por exemplo, indústria bélica, artefatos cirúrgicos, biomédicos entre outros [32].

O látex é um sistema coloidal polifásico sendo a parte dispersa constituída por micelas de borracha, proteínas, lutóides e partículas Frey-Wyssling e o meio dispersivo constituído do soro aquoso [33].

A borracha natural é obtida através da coagulação do látex provenientes de árvores do gênero *Hevea brasiliensis*. A borracha é composta em sua totalidade pelo polímero cis 1,4 poliisopreno; a Figura 9 mostra a estrutura da cadeia polimérica da borracha natural [34].

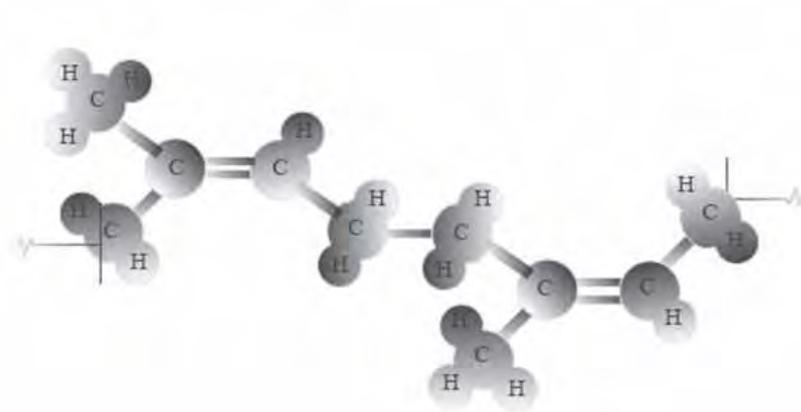


Figura 9 - Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural. Imagem cedida por Flávio Camargo Cabrera da FCT-UNESP, [34].

Algumas características específicas dos polímeros como biocompatibilidade, biodegradabilidade e até a reciclagem, além de sua estabilidade química e física, fazem destas macromoléculas aliadas também na fabricação de materiais para aplicações biomédicas [35].

Essas aplicações vão desde tecnologias como *drug delivery* [36,37], *biochips* para diagnóstico médico [38,39] e também para cultivo de celular, entre outras [40].

Em particular a borracha natural, um polímero natural com alto peso molecular, é utilizada para a fabricação de diferentes materiais, sendo que na utilização como um biomaterial se mostra um importante aliado na cicatrização de úlceras crônicas, estimulador de angiogênese [30,36], prótese arterial e regeneração óssea [41,42,43].

O processo de angiogênese é um processo natural que ocorre no corpo, a fim de promover a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes. Pode ocorrer em condições fisiológicas, como no endométrio uterino da fêmea ou no processo de cicatrização de traumas causados no corpo, além de ser um processo determinante em condições patológicas, como é o caso de ocorrência em células tumorais [44].

O primeiro processo, conhecido como angiogênese do tipo I, é responsável pelo processo de reformulação da rede de veias, que por algum tipo de trauma foi rompida. Após o trauma, ou rompimento dessa veia, há a liberação de proteínas inflamatórias, que tem um papel importante em todo o processo. O início do processo de recuperação desta veia rompida se dá com a dilatação de veias menores já existentes, processo de brotamento. Este processo gera pontes entre a veia saudável e a veia rompida, sendo que as proteínas inflamatórias servem como um “guia” para o processo de angiogênese, assim dependendo da quantidade dessas proteínas os canais gerados podem se conformar de acordo com o tecido danificado.

Um dos materiais que podem ajudar no processo de angiogênese é o látex de borracha natural, que apresenta em uma de suas fases proteínas, aminoácidos e grupos funcionais capazes de estimular o processo [30]. Até o momento sabe-se que o componente responsável pelo estímulo é protéico, apesar de não se conhecer as características básicas dele, como peso molecular e conformidade espacial [45]. Acredita-se ainda que, talvez não seja apenas uma proteína, mas várias que agem de forma simbiótica promovendo a cicatrização.

Pesquisadores brasileiros têm contribuído para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades elastoméricas utilizando borracha natural e/ou sintética, para a utilização em diversas áreas de aplicação [30,46,47,48].

1.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Os gregos empregavam a prata como matéria-prima para diferenciadas aplicações que vão desde moedas até agentes de desinfecção, e também para tratar epilepsia e doenças venéreas, além de colorir alguns artefatos, como já foi citado anteriormente [49].

Estudos mais recentes mostram novas aplicações deste metal, como colírios para recém-nascidos e no tratamento de queimaduras entre outras doenças de pele [50,51].

As nanopartículas de metais nobres são foco de pesquisas em áreas diferenciadas, que buscam esclarecer a formação das mesmas, pois já é sabido que mudanças de morfologia nas Nanopartículas geram no produto final, variações de suas propriedades [9].

Assim várias rotas de síntese para a obtenção das nanopartículas foram estudadas ao longo dos anos, como redução química, ablação a laser, radiólise e método de evaporação a vácuo [10], na tentativa de minimizar a dispersão morfológica das NPs [52] e também minimizar os danos ao meio ambiente, uma vez que alguns estabilizantes e/ou precursores disponíveis podem gerar produtos tóxicos ao ambiente. Sendo assim a química “verde” se torna o foco para a realização das sínteses dessas partículas metálicas, realizando então uma biossíntese de nanopartículas.

As rotas de síntese para a obtenção de nanopartículas comumente utilizadas são as que fazem uso da água como meio reacional [53]. Por intermédio desta rota é possível obter nanopartículas em forma coloidal, com partículas dispersas de tamanho entre 10^{-9} a 10^{-6} m [54,55] sendo que esses coloides apresentam em suspensão tanto AgNPs quanto seus íons, com a presença ou não de agentes estabilizantes [56].

As partículas de prata ainda podem ser obtidas através da síntese do sal de nitrato de prata utilizando substâncias orgânicas tais como, álcoois, carboidratos, ácido ascórbico entre outros.

Tanto a prata na forma metálica quanto na forma de nanopartículas apresentam efeitos bactericidas, no entanto as nanopartículas por apresentarem maior superfície de contato apresentam efeito bactericida intensificado. A prata consegue combater cerca de 650 organismos patogênicos.

Para que as nanopartículas sejam efetivas contra os microorganismos bacterianos elas precisam passar pelo mecanismo de liberação de prata iônica no meio onde estão as células; assim, esses íons interagem com grupos sulfidrilas, aminos, imidazol, fosfatos e

grupos carboxilatos de membranas ou enzimas levando a desnaturação das mesmas e ainda a morte celular dos microorganismos.

As AgNPs interagem fortemente com os grupos sulfidrilas da parede celular comprometendo a permeabilidade da célula e causando um dano ao transporte de eletrólitos para o interior celular.

O efeito biocida e a concentração de prata no meio são fatores de relação direta, ou seja, o aumento de um, conseqüentemente leva ao aumento do outro.

A Figura 10 mostra uma ilustração do mecanismo de interação dos íons de prata com a membrana celular [57].

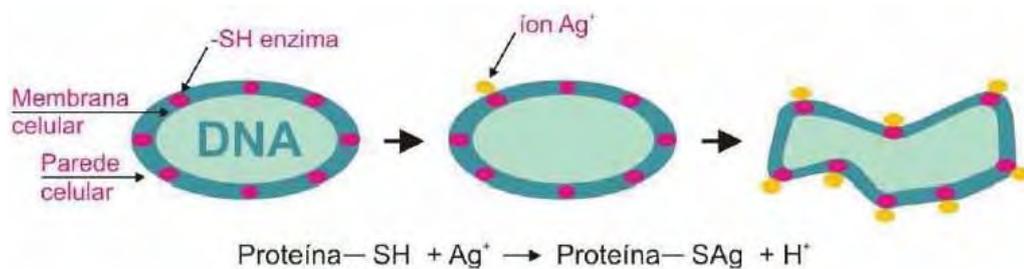


Figura 10 - Efeito da interação dos íons de prata com a parede celular de microorganismos [57].

Os íons de prata ainda se ligam ao DNA da célula. Esse processo desnatura a proteína e ainda danifica de forma definitiva o DNA da célula [58].

O tamanho das nanopartículas é um fator importante para o combate á microorganismos. Quanto menor a dimensão das nanopartículas maior é a taxa de eliminação dessas células. Na Tabela 3 poder ser observado a relação entre o tamanho e porcentagem de eliminação de microorganismos.

Tamanho da partícula	Taxa de eliminação de microorganismos
30 nm	99,9 %
70 nm	99,4 %
150 nm	97,7 %
300 nm	97,5 %

Tabela 3 - Relação entre o tamanho das partículas de prata e a taxa de eliminação dos micoorganismos em contato com ela [16].

1.3 *LEISHMANIA (LEISHMANIA) BRAZILIENSIS*

O nome do termo taxonômico *Leishmania* é uma homenagem ao médico britânico Sir William Boog Leishman (1865-1926) que ficou famoso por seus trabalhos envolvendo a leishmaniose visceral e febre tifóide.

Sir Willian Boog Leishman inicia suas pesquisas após ser enviado à Índia pelo Exército Britânico em 1900, com o intuito de tratar soldados infectados, por uma doença que provocava anemia e morte.

Os povos hindus identificavam a doença por *kal-a-azar*, ou febre negra, sendo que esta era epidemia naquela região tropical da Indochina. Sir Willian identificou o micróbio causador da doença, que foi novamente confirmada por outro compatriota médico, Charles Donovan, três anos mais tarde [59].

Após a divulgação da descoberta, em 1903, foi criado pelo cientista Sir Ronald Ross o termo *Leishmania*, para o protozoário. Apesar de Sir Leishman ter ficado mais conhecido pela sua descoberta na protozoologia, suas pesquisas acabaram tomando outro rumo, já que durante a I Guerra Mundial ele precisou se dedicar mais às doenças que atacam as trincheiras e retirava os soldados da batalha. Assim também fez grandes contribuições na bacteriologia com seus estudos sobre a febre tifóide.

A Figura 11 mostra Sir William B. Leishman e Charles Donovan, dois pioneiros no estudo da leishmaniose.



Figura 11 – Pesquisadores importantes na história da leishmaniose, em (A) Sir William B. Leishman; em (B) Charles Donovan.

Baseado nos princípios de fabricação de uma vacina desenvolvida por Edward Jenner, Sir Leishman estudou meios para a elaboração de antígenos vacinais para o tifo, que ficou conhecido na época como inoculação antitifo, que posteriormente foi a base para elaboração da vacina que se utiliza até hoje contra essa doença.

A leishmaniose é uma doença considerada tropical, transmitida pela picada de um inseto, o mosquito palha, que pode atingir tanto animais quanto humanos. A doença pode atingir diferentes partes do corpo, tais como a pele, mucosas e vísceras dependendo da espécie do parasita [21].

Essa doença começou acometer os seres humanos após mudanças nos hábitos de vida do homem. Este foi se instalando cada vez mais em áreas florestais, gerando uma possibilidade de o mosquito vetor expandir sua área de ataque atingindo os animais domésticos, facilitando a chegada da doença ao homem.

O homem que antes não era alvo preferencial do mosquito acabou virando hospedeiro acidental do parasita com a invasão do ser humano no habitat de cães do mato, tatus, macacos e outros animais que eram originalmente vítimas das diversas formas de leishmaniose. Como

o parasita se adaptou bem a esse novo organismo acabou se tornando tão patogênico quanto sua versão em outros mamíferos.

Na Figura 12 é possível observar a fêmea de flebotomíneos ingurgitada, ou seja, se alimentando, no caso de sangue humano.



Figura 12 - Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (foto ampliada) [20].

No Brasil a leishmaniose é uma zoonose presente por toda extensão territorial, sendo registrados cerca de 35 mil novos casos no país.

Mudança nos padrões de vida da sociedade moderna leva a variações na forma de transmissão de algumas doenças. A leishmaniose era considerada uma doença zoonose de animais silvestres e que havia apenas alguns casos em pessoas com contato direto com a floresta. Nos dias de hoje já é tida como uma doença tipicamente urbana e que se acomete pessoas e animais em toda a extensão do país.

As formas de transmissão sofreram modificações ao longo das décadas, como é possível observar nos perfis epidemiológicos descritos abaixo.

- a) Silvestre – Essa forma de transmissão ocorre em áreas com predominância de vegetação primária sendo considerada uma zoonose exclusiva de animais **silvestres**,

ou ainda podendo atingir seres humanos quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia.

- b) Ocupacional e Lazer – Este padrão de transmissão está ligado à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo, onde os trabalhadores e/ou visitantes do local, ficam mais expostos ao mosquito transmissor devido à interferência direta em seu habitat.
- c) Rural e periurbano em áreas de colonização – Esta forma de transmissão é resultado de um processo desordenado de migração, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos onde ainda é possível encontrar matas secundárias ou residuais [19].

No Estado de São Paulo a doença é especialmente evidenciada nos entornos de grandes vias rodoviárias que dão acesso ao Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país.

Como o raio de ataque do mosquito é curto, eles acabam sendo trazidos via caminhões e cargas dessas localidades e se espalhando em cidades que ficam às margens dessas rodovias.

O microambiente desses caminhões são locais favoráveis à reprodução e a alimentação desses insetos, propiciando, devido ao alastramento do mosquito vetor, um aumento no número de casos de leishmaniose, tanto na forma visceral como cutânea no Estado, tornando isso um caso de Saúde Pública grave, sendo necessários atenção e estudos epidemiológicos mais aprofundados.

A Figura 13 mostra dois mapas epidemiológicos do Estado de São Paulo evidenciando as regiões onde foram registradas ocorrências de alguma forma clínica de leishmaniose tanto em humano, quanto em animal.

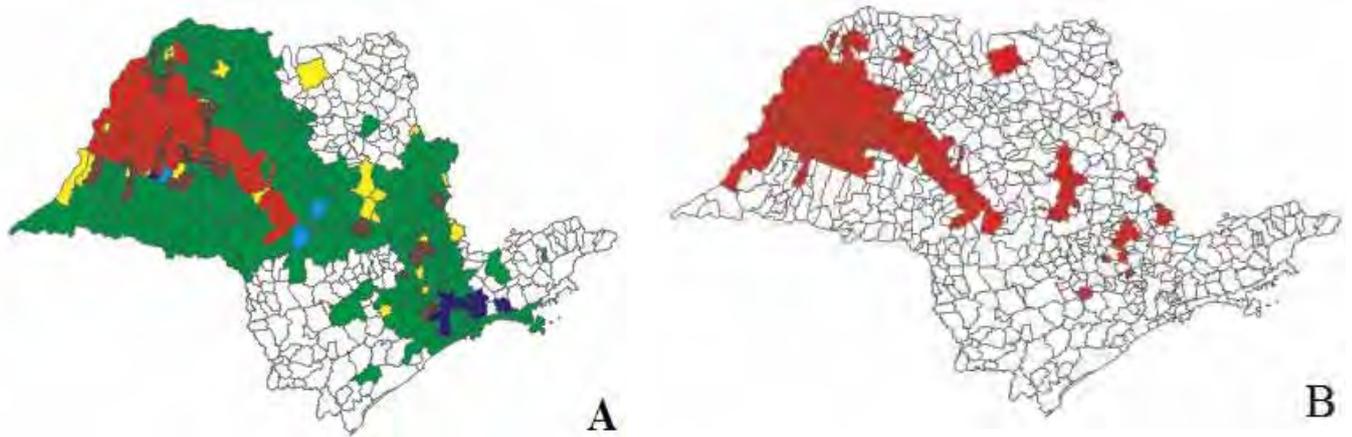


Figura 13- Mapas do Estado de São Paulo, evidenciando relação entre as vias de acesso ao Estado e as cidades onde existem registros de casos de leishmaniose no ano de 2010 (dados da SUCEN/2010). (A) Mapa epidemiológico apontando onde foi registrada a ocorrência de alguma forma clínica de leishmaniose, tanto humano quanto animal. (B) Mapa epidemiológico apontando onde foi registrada a ocorrência de casos autóctones da doença e onde já existem epidemias notáveis [20].

Observando os mapas apresentados na Figura 13 é possível notar que em algumas áreas há disparidade entre os casos registrados da doença. Isto se deve ao fato de serem regiões onde o tráfego de caminhões, com cargas alimentícias, é uma atividade intensa do local. Este tipo de carga gera o ambiente favorável ao desenvolvimento mosquito, como citado anteriormente.

As rotas de maior incidência da doença são as que cortam o estado de São Paulo em direção ao Norte do país e também em direção ao Sul de Minas, onde as culturas da soja e café respectivamente são predominantes.

Outras regiões do País também sofrem com o grande número de casos da doença, sendo que esses se concentram, em sua maioria, na região Norte e Nordeste do país.

Na Figura 14 é possível notar a distribuição dos casos registrados no Brasil.

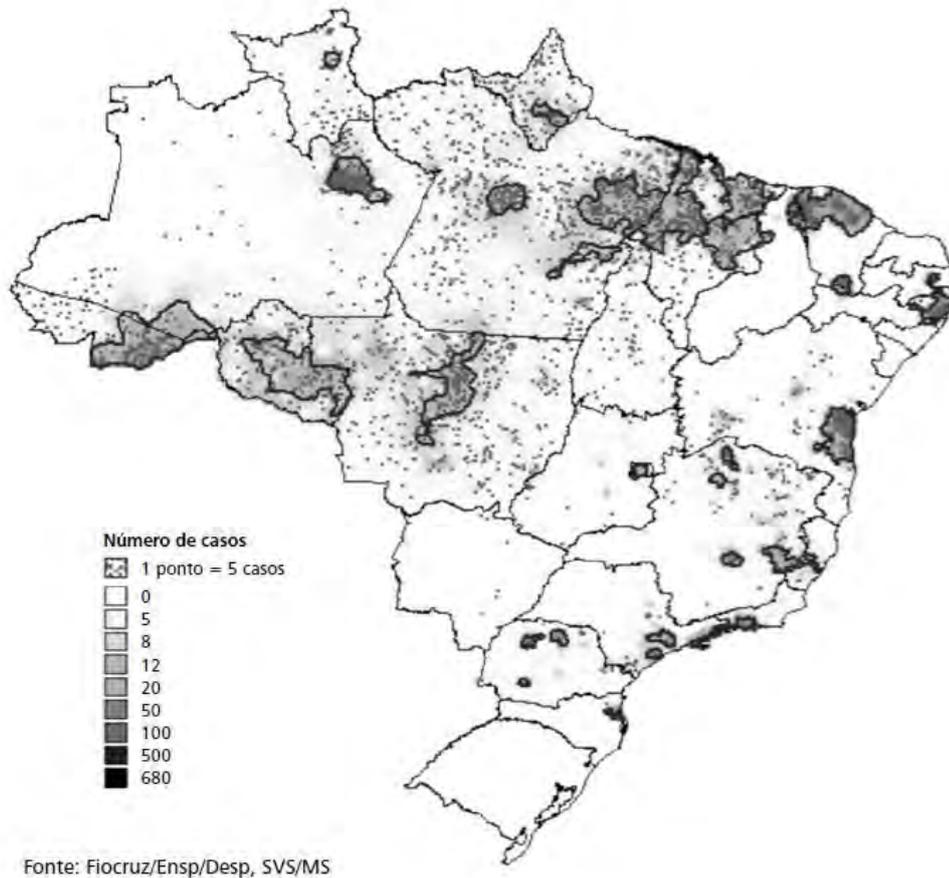


Figura 14 - Mapa evidenciando a densidade de casos de leishmaniose por município do país, [20].

Para que o parasita se torne infecto, ele passa por um ciclo de vida com fases bem definidas, as quais são descritas abaixo.

i. Ciclo de vida do Parasita

Os protozoários do gênero *Leishmania* são seres unicelulares eucariotas heterotróficos com reprodução assexuada por fissão binária, ou seja, são seres compostos por células completas com citoplasma e núcleo, se alimentam via captação de alimentos não-autogerados e se reproduzem por um método simples de divisão celular simples, gerando células-filhas clones.

São considerados parasitas, logo depende de outros seres vivos para sobreviver e se reproduzirem. No organismo humano tais células se alimentam de proteínas presentes no plasma sanguíneo ou de proteínas intracelulares de certas células e se reproduzem exclusivamente no interior de outras células, em vesículas membranosas, que são encontradas no interior de macrófagos ou outro tipo de células que fazem parte do sistema imune celular.

A Figura 15 mostra uma imagem de microscopia óptica de um macrófago murinho infectado por formas amastigotas do protozoário. É possível notar todas as estruturas habituais das células, além da inúmera quantidade de formas amastigotas do protozoário.

As formas amastigotas se multiplicam dentro do macrófago gerando uma pressão nas paredes celular a ponto de rompê-las, o que pode levar a morte do hospedeiro.

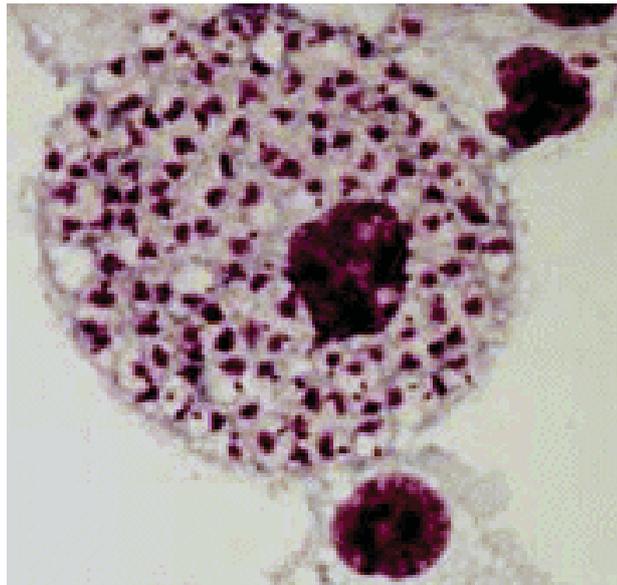


Figura 15- Microscopia óptica de macrófago murinho obtido do coxim da pata esquerda de um camundongo isogênico BALB/c. Aumento obtido de 1500 vezes, fixado e corado por hematoxilina. Imagem cedida gentilmente por Carlos Gomes Barboza-Filho (UNESP/FCT – Presidente Prudente).

Ao gênero *Leishmania* pertencem diferentes espécies de protozoários que são capazes de viver em hospedeiros vertebrados, mamíferos, ou em insetos vetores, flebotomíneos.

Para transitar entre esses dois tipos tão diferentes de hospedeiros, o parasita passa por mudanças morfológicas significativas. Nos hospedeiros vertebrados o parasita é

aflagelado e denominado amastigota; já no interior do trato digestório de flebotomíneos o parasita é flagelado e fusiforme e recebe a denominação de promastigotas, como representado na Figura 16.

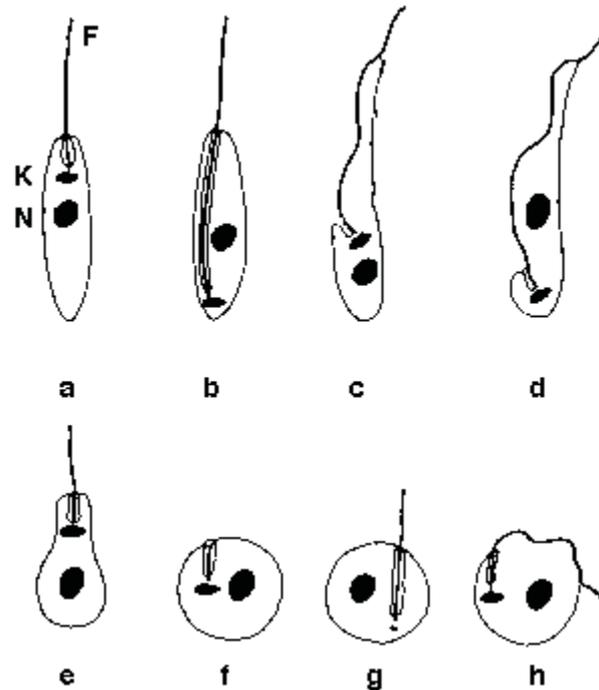


Figura 16 - Os diferentes estágios de transição entre a forma promastigota (a) e amastigota (f) de *Leishmania braziliensis*. Imagem cedida gentilmente por Carlos Gomes Barboza-Filho, obtida em pesquisa em parceria com Fred Opperdoes em De Duve Institute, na Bélgica.

A Figura 16 evidencia duas estruturas celulares importantes na identificação dos parasitas, o núcleo, apontado pela letra N na primeira imagem e, o cinetoplasto, apontado pela letra K, essas estruturas permanecem nos distintos estágios de mudança do protozoário.

Após completar o ciclo de modificação citado anteriormente, o protozoário está apto a infectar as células dos mamíferos.

As fêmeas do flebotomíneos são as responsáveis por transmitir todas as formas de *leishmaniose*. Elas dispõem de uma adaptação do aparelho bucal que ao entrar em contato com o sangue de mamíferos infectados, o mosquito hospedeiro ingere, juntamente com o sangue deste, protozoários na forma de amastigotas, aflageladas.

Estas formas passam pelo processo de diferenciação, assumindo a forma de promastigotas, flageladas, que posteriormente, podem ser inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada, completando assim o ciclo de transmissão da doença.

Na Figura 17 é possível acompanhar o esquema do ciclo de vida do parasita.

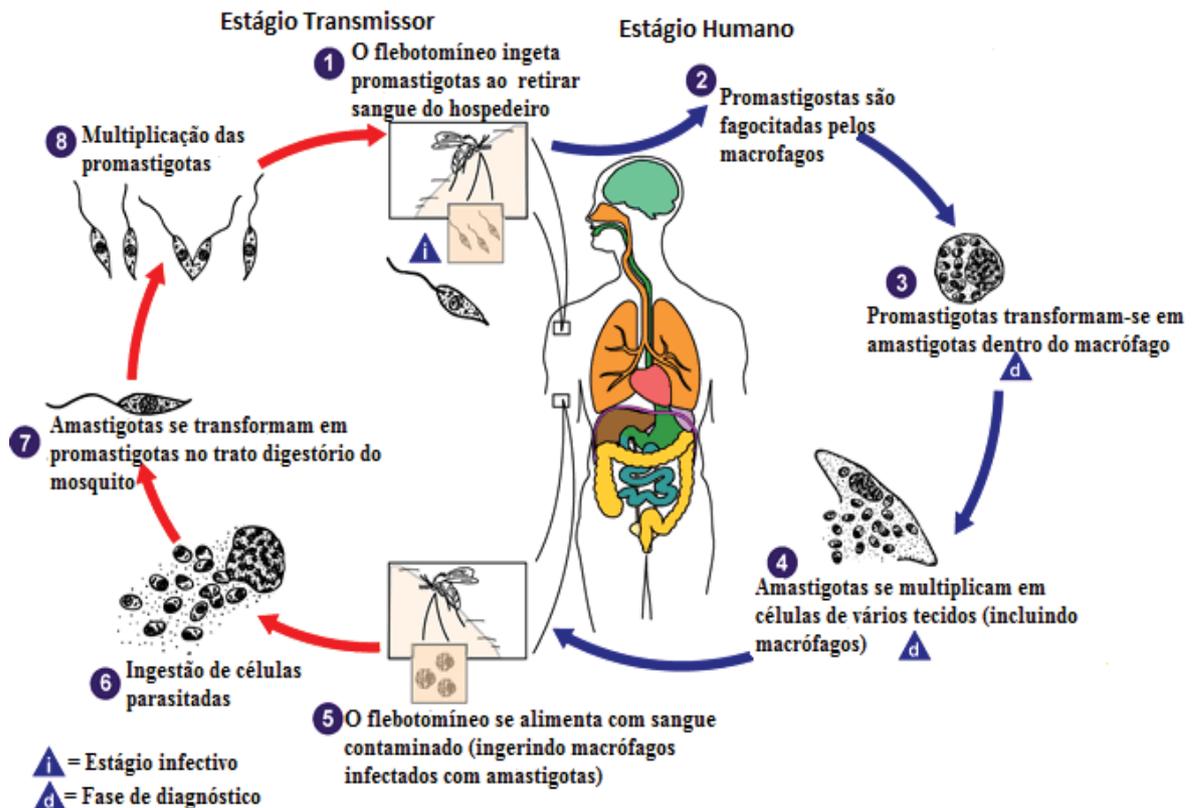


Figura 17-Ciclo de vida do parasita adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>.

ii. Metaciclologênese

A metaciclologênese é o processo de amadurecimento sofrido pelo protozoário do gênero *Leishmania*. No processo, que ocorre no trato digestivo do inseto-vetor, as proteínas de superfície do parasita passam por modificações bioquímicas, que resultam na diferenciação das fases de vida das promastigotas. Estas fases que caracterizam a metaciclologênese são: a fase não-infectante, denominada procíclica, e infectante, metacíclica.

Durante a fase procíclica, o parasita perde as propriedades de reprodução e de aderência na parede intestinal do pernilongo, atingindo então a fase metacíclica, onde as promastigotas já estão prontas para serem transmitidas para um hospedeiro mamífero.

O glicocálix é uma estrutura formada por proteínas especializadas no processo de defesa e de reconhecimento celular, uma vez que células com glicídios iguais apresentam o mesmo revestimento. O grau de patogenicidade dos protozoários é definido por suas proteínas de superfície.

A fase promastigota metacíclica utiliza as proteínas do glicocálix como ferramenta para interação com os macrófagos. Através de tal interação as promastigotas são capazes de invadir a célula de defesa do hospedeiro e manter-se viva em seu interior.

O glicocálix que recobre a superfície da fase promastigota é constituído em sua maioria por proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo que, as moléculas presentes em maior quantidade são fosfoglicanos (LPG) ancorados por GPI e a proteína gp63.

O LPG e a gp63 têm papel importante para a sobrevivência do parasita durante a transmissão pelo vetor, na adesão ao epitélio intestinal do flebotomíneos. Agem ainda como agentes de ligação no processo de invasão do macrófago, e também são fatores importantes para a virulência do parasita [23].

Ao passar pela fase de diferenciação da fase metacíclica para a fase metacíclica as moléculas LPG sofrem mudanças estruturais gerando menor afinidade com lectinas fazendo com que os parasitas na fase promastigota metacíclica se soltem da parede intestinal do vetor e migrem para a faringe, estando aptos à infecção do hospedeiro.

iii. Vacinas contra a leishmaniose

Na primeira prática de vacinação contra a leishmaniose ainda não se tinha o conhecimento de que se tratava de uma doença microbiana. A antiga prática chamada de leishmanização baseava-se na inoculação secreções de uma lesão ativa de um paciente em outra pessoa sã, gerando assim uma lesão auto-curativa.

A partir desta, outras técnicas foram desenvolvidas com o intuito de aumentar a eficiência profilática e evitar o transtorno causado pelo desenvolvimento de uma lesão, para que se imune contra novas infecções.

Até hoje, a literatura especializada relata quatro tipos de vacinas já criadas contra as diversas formas de leishmaniose que são: a vacina com parasitas mortos, a vacina com parasitas vivos, porém atenuados, a vacina com fragmentos antigênicos de parasitas e a vacina gênica, baseada em DNA. Contudo, até agora nenhuma das vacinas já elaboradas apresenta uma eficiência superior a 80%, o que inviabiliza a possibilidade da realização de testes em humanos. Com essa eficiência só é possível prosseguir os estudos com testes animais para um estudo aprofundado do mecanismo de resposta imunológica profilática para então aprimorar a vacina.

A resposta imunológica ideal que levaria a uma memória imunológica duradoura seria do tipo Th1, provocada por células do tipo T *helpers*, e que geram a secreção de citocinas inflamatórias que apenas ativam macrófagos contra a presença de parasitas intracelulares, como é o caso da amastigota de *Leishmania* spp. Entretanto, pesquisas atuais mostram que não se consegue reproduzir esse tipo de resposta que seria naturalmente ideal. Sendo que, o que ocorre é a resposta do tipo Th2, que garante a persistência do parasita no hospedeiro e é especialmente perigosa em indivíduos imunocomprometidos, como portadores do vírus HIV e vítimas de alguns tipos de câncer.

Outro fator que dificulta a geração de uma vacina de alta eficiência é que a biomassa vacinal obtida até o momento estimula a secreção de interleucinas inflamatórias, como é o caso da IL-4, que pode desencadear uma infecção ainda mais grave.

1.4 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE PARASITAS PARA GERAÇÃO DE BIOMASSA VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE.

A cromatografia em coluna de lã de vidro é capaz de separar uma colônia dessas células maduras das imaturas de acordo com a diferença de glicocálix que existe entre este grupo de células, pois as moléculas que compõem tal glicocálix apresentam diferentes cargas elétricas que se aderem ao vidro.

Outro método de separação já foi criado, como a separação feita com aglutinina de amendoim, um processo bem eficiente, porém caro e de difícil obtenção de células procíclicas vivas já que no final desse processo elas ficam todas coladas entre si.

A avaliação da eficiência dos métodos citados é feita através de testes *in vivo*. O teste se trata da infecção dos camundongos isogênicos com diferentes perfis de defesa imunológica, onde receberam diferentes frações de promastigotas, separadas pela cromatografia [60]. Os materiais reagentes envolvidos no processo de obtenção de frações celulares, tanto a metacíclica como a procíclica são de baixo custo e o processo pode ser facilmente reproduzido [61]. Outra vantagem da cromatografia em lã de vidro é não estar restrita às espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo sendo que já se mostrou eficiente até na separação de epimastigotas de *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas [62].

O processamento demonstrou eficácia diante dos resultados apresentados nos quais animais com sistema imunológico mais resistente, camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, quase não apresentam lesões cutâneas, quando infectados por células procíclicas, enquanto que aqueles infectados com promastigotas metacíclicas apresentam extensas lesões tanto entre camundongos resistentes como nos knock-out, linhagem BALB/c [63].

Outro aspecto a ser evidenciado neste experimento é o tempo de incubação do patógeno: bem mais curto entre os hospedeiros que receberam doses de *L. braziliensis* metacíclicos, mostrando que tais parasitas são mais eficientes na invasão do organismo [64, 65].

Porém, o método da cromatografia em lã de vidro ainda pode ser melhorado, já que se trata de um experimento longo e desgastante para seus executores e pode ser otimizado por substituição da lã de vidro por membranas biocompatíveis de BN com a adsorção de nanopartículas metálicas.

Diferenças bioquímicas e morfológicas entre os parasitas do gênero *Leishmania* na forma promastigota necessitam de um estudo aprofundado de suas características. Para tal, é preciso o desenvolvimento de métodos de separação das promastigotas *in vitro*.

Para desenvolvimento de tal método várias pesquisas foram realizadas. No entanto apenas três métodos apresentaram alta eficiência; entretanto, eles apresentam alguma desvantagem técnica ou gera algum impacto sobre o ambiente.

Os métodos de separação mais utilizados nos dias de hoje são: a aglutinação pela lecitina do amendoim (PNA), a cromatografia em coluna de lã de vidro e a lise mediada pelo sistema complemento.

1.4.1 Aglutinação pela lecitina do amendoim (PNA – *peanut agglutinin*)

A aglutinina do amendoim é uma lecitina extraída da casca deste fruto, *Arachis hypogaea* composta de quatro unidades protéicas e peso molecular de 110 kDa. Sua natureza protéica possibilita a ligação a apenas compostos com sequências específicas de carboidratos, mais exatamente as ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 3) N-acetil-glicosamida presentes em polímeros com galactoses na sua constituição, criando enormes conglomerados que pode ser visível a microscopia óptica [66].

Devido a sua especificidade vem sendo utilizado para detectar taxas nanométricas de certos compostos ricos nessas ligações glicosídicas.

Na Figura 18 é possível observar a estrutura molecular da aglutinina de amendoim, onde estão evidenciadas por diferença na coloração as suas quatro unidades homoméricas. Na mesma figura tem-se um frasco com aglutinina solubilizada e também uma microscopia óptica de frações de *L. infantum* separadas pela técnica do PNA que utiliza a aglutinina de amendoim.

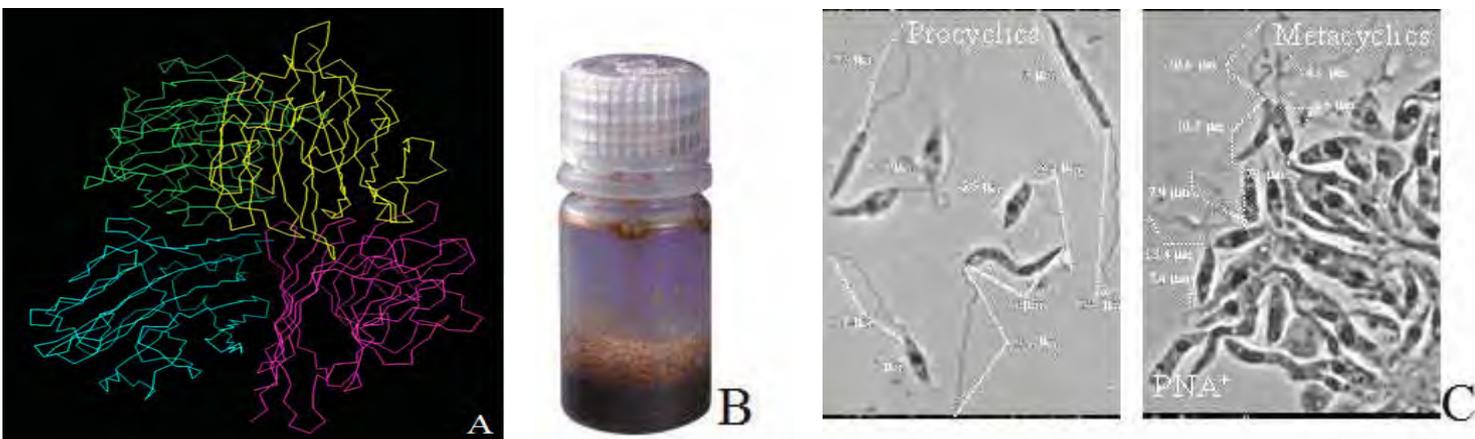


Figura 18 - (A) Estrutura molecular da aglutinina do amendoim. (B) Um frasco contendo a aglutinina do amendoim solubilizada. (C) Microscopia óptica de frações de parasitas *L. infantum* separados pela técnica do PNA.

A purificação desse material assim como sua primeira aplicação era destinada à melhoria de métodos bioquímicos de detecção de carboidratos em compostos protéicos complexos, como receptores celulares, glicoconjugados de superfície encontrados nas membranas de muitas células, reconhecendo tipos específicos de células, etc. Tem a tarefa também de reconhecer: (i) tipos específicos de células como é a aplicação da técnica para separação de diferentes populações de linfócitos T do sistema imune humano; (ii) detecção de células tumorais em alguns tipos de câncer e de compostos potencialmente tóxicos em quantias-traço em princípios ativos pouco processados a partir de vegetais.

Somente em 1989, foram publicados trabalhos em que se analisava o comportamento de células de parasitas humano diante da presença da aglutinina de

amendoim. No caso da *L. major*, a pesquisa notou que em determinados períodos do ciclo celular ocorria uma maior adesão das promastigotas ao PNA.

Percorrendo estudos bioquímicos a respeito nota-se que a população aderida ao PNA, denominado em vários trabalhos como PNA⁺, correspondia a uma grande parcela de parasitas em estágio inicial de desenvolvimento, já que nesta etapa, os microorganismos apresentavam muitos sítios de ancoragem de proteínas ainda não sintetizadas ricos em ligações glicosídicas como a que esta lecitina costuma aderir.

Por outro lado, parasitas em que os sítios de ligação glicosídica não estavam mais disponíveis, pois havia proteínas recobrando e formando uma barreira, só surgiria em etapas mais avançadas do desenvolvimento parasitário, grupo chamado PNA⁻, quando as promastigotas se mostram mais infectantes e com mais espessa parede celular. Mais do que isso, notou-se que quando a reação de aglutinação era feita a partir de populações *in vitro*, mistas e em fase estacionária, separava-se os parasitas nesses dois grupos uma proporção quase exata de 50-50%.

Atualmente, a reação de aglutinação ao PNA é considerada a técnica clássica de separação de parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, sendo esta, a referência teórica e prática de estudos desse cunho.

Tal técnica é rápida, de fácil execução e o reagente em questão não é tóxico, facilitando seu manuseio. Entretanto, a técnica pode apresentar algumas falhas consideráveis que são:

- i. a associação dos sítios de ligação glicosídica entre galactoses pode sofrer competição inespecífica com compostos como a lactose;
- ii. uma vez utilizada para separar parasitas, aqueles que permanecem aderidos a lecitina não podem ser separados novamente de modo a manter as células vivas e íntegras;

- iii. se a dose de aglutinina não for convenientemente muito maior que o de células, pode indicar que parte da população PNA^- , seja na verdade parasitas que pertencem ao grupo PNA^+ , mas que não se aderiram por falta de sítios de associação;
- iv. apesar de não ser pré-requisito, a presença de certos cátions bivalentes, como o cálcio, aumentam a capacidade de adesão dessa proteína, gerando resultados falso-positivos.

1.4.2 A cromatografia em coluna de lã de vidro

A cromatografia trata-se de um processo de separação de células baseado em características de superfície. Neste caso, as superfícies que entram em contato, tanto de uma matriz sólida e fixa, a lã de vidro, quanto da matriz fluida, promastigotas de *L. braziliensis*, reagem de forma diferente entre si, separando seus diversos componentes.

Este método separa colônias de células maduras das imaturas de acordo com a diferença de glicocálix existente entre as células, pois as moléculas que compõem tal glicocálix apresentam diferentes cargas elétricas que se aderem ao vidro.

Para confirmação a validade de tal método, vários testes *in vivo* foram realizados como: a infecção de camundongos isogênicos com diferentes perfis de defesa imunológica que receberam diferentes frações de promastigotas [59].

O processo apresenta vantagens como o baixo custo dos materiais reagentes envolvidos e a fácil obtenção de frações celulares, tanto a metacíclica como a procíclica, em alta escala. Outra vantagem da técnica é seu uso irrestrito às espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo, sendo eficiente até na separação de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas [62].

Tal experimento demonstrou sucesso diante dos resultados apresentados nas quais animais com sistema imunológico mais sensível, camundongos isogênicos da linhagem

C57BL/6, quase não apresentam lesões cutâneas, quando infectados por células procíclica. Já animais infectados com promastigotas metacíclicas apresentam extensas lesões tanto entre camundongos resistentes como nos *knock-out*, linhagem BALB/c. O tempo de incubação do patógeno é menor entre os hospedeiros que receberam doses de *L. braziliensis* metacíclicos, mostrando que tais parasitas são mais eficientes na invasão do organismo [67].

1.4.3 Lise mediada pelo sistema complemento.

No plasma sanguíneo existe um grupo específico de proteínas que agem em cascata para a defesa inata para a destruição de patógenos. A este grupo de proteínas dá-se o nome de sistema complemento.

O mecanismo-base para que essas proteínas do plasma eliminem qualquer agente estranho é a ligação química entre a primeira proteína do sistema complemento (C1) com uma proteína de superfície microbiana. Assim que uma proteína plasmática se ligar a outra se forma um complexo que gera a lise do parasita [68].

Um dos métodos mais antigos de separação de frações metacíclicas e procíclicas de *Leishmania* é a lise mediada pelo sistema complemento [69]. Neste caso, adiciona-se o soro do sangue de um coelho ao meio de cultura processado onde estão os parasitas. Como as células procíclicas não apresentam resistência alguma às proteínas do sistema complemento, elas são eliminadas facilmente; já quando aparecem as células metacíclicas, o fato de elas apresentarem tantas diferenças na sua superfície celular evita a instalação das primeiras proteínas do sistema complemento e assim não ocorre a lise celular [70].

A dificuldade no desenvolvimento dessa técnica como método de separação é o fato de gerar apenas uma fração viável, as promastigotas metacíclicas, e mesmo assim, a biomassa sobrevivente é baixa já que mesmo estas células tendo resistência à reação com sistema complemento, as podem ser mortas pela adsorção de algumas poucas proteínas desse sistema cascata. Além disso, as células sobreviventes apresentam quedas graves do seu

metabolismo geral, já que a presença de outras substâncias do soro plasmático interfere na fisiologia parasitária, impedindo, por exemplo, a aplicação dessa biomassa celular para pesquisas sobre vacinas e medicamentos contra a leishmaniose [60, 68].

1.4.4 A adsorção em membranas de borracha natural com nanopartículas de prata.

As membranas de borracha natural com nanopartículas de prata, BN/Ag, colocadas em um meio de cultura contendo protozoários de *L. braziliensis* agem de forma seletora para as diferentes fases de amadurecimento do parasita.

Essa aplicação surge como forma alternativa para os métodos de separação já existentes, uma vez que as formas promastigotas de *L. braziliensis* apresentam comportamento anômalo na presença dessas membranas de borracha natural com nanopartículas de prata.

As nanopartículas de prata são capazes de eliminar as formas mais infectantes do parasita e deixar aderida às membranas as formas susceptíveis do parasita, que são um alvo para a confecção de materiais de interesse imunológico, como soros e vacinas.

Atualmente, os métodos de obtenção dessas populações de parasitas são baseados em procedimentos de alto custo financeiro e pouca rentabilidade, já que gera uma amostra muito pequena e com um resultado final pouco eficiente, o que dificulta a aprovação da vacina para uso da população humana.

O método usando borracha natural e nanopartículas de prata é capaz de aumentar a eficiência do processo de fabricação da vacina e reduzir drasticamente os gastos e o tempo empregado na confecção dos antígenos.

CAPITULO 2 – MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.1 MATERIAIS

Neste item são apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Destacam-se a borracha natural, nitrato de prata, redução das nanopartículas de prata na presença da membrana de borracha natural, sistema de cultivo de promastigotas, métodos de caracterização e testes biológicos.

2.2 OBTENÇÕES DO LÁTEX

Obtém-se o látex de borracha natural através do método de sangria, feito em diferentes árvores do gênero RRIM 600 da Fazenda Indiana na região de Presidente Prudente.

A sangria é exercida sobre o caule da árvore a uma altura de 1,2 m a partir do solo, com uma ferramenta cortante que possui a forma de U. O corte é feito a um ângulo de 30° com a horizontal e atinge cerca de metade da circunferência do tronco, onde é removido por volta de 1,5 mm de córtex para cada incisão.

Por fim, o látex é estabilizado em amônia com conteúdo de 2% sobre o volume do látex líquido e armazenado em recipientes de vidro, de coloração escura, para que evite o contato do látex com a luz solar, prevenindo a degradação do material. O objetivo desta estabilização em curto período de tempo é evitar que o látex comece a coagular e perder suas propriedades.

A Figura 19 mostra uma imagem do processo de sangria em meio espiral para a coleta do látex.



Figura 19 - Processo em espiral da seringueira do clone RRIM 600 [71].

2.3 MEMBRANAS DE BORRACHA NATURAL

As membranas de borracha natural foram obtidas pela técnica de *casting*, inserindo 10 mL de látex natural de seringueira em Placas de Petri, de 9,5 cm de diâmetro interno e fundo reto. Em seguida, as placas com o látex são levadas a estufa com circulação de ar forçado, para o processo de secagem e obtenção das membras de BN pura com uma espessura de aproximadamente 0,6 mm.

O processo de secagem foi realizado utilizando uma estufa, modelo 520, da marca FANEM® com circulação de ar forçado a temperatura de 65°C, com um tempo de secagem de 10 horas.

Para realização deste trabalho, foram utilizadas somente as membranas obtidas através destes parâmetros, por manter suas propriedades químicas estáveis e apresentar melhor estabilidade de manuseio.

2.4 REDUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE Ag NA PRESENÇA DA BN

As membranas já secas foram divididas em seis partes iguais. Todas as partes foram imersas em água destilada, processada no modelo Millipore – Progard® / Lot: F7BN05480, durante 15 minutos, para que seus poros dilatasse.

A preparação das membranas de BN/Ag foi realizada através do método de reação *in situ*, usando nitrato de prata (AgNO_3) e água como meio reacional, sendo que todo o processo foi realizado a luz ambiente.

A solução foi preparada utilizando 80 mL de água destilada, aquecida separadamente até a temperatura de 80°C. Após a água atingir a temperatura determinada acrescentou-se 0,0424 gramas de nitrato de prata para obter uma solução na concentração de $2,00 \times 10^{-5}$ mol/L de AgNO_3 e pH = 6,8.

Após o nitrato de prata ser dissolvido na água as membranas de BN intumescidas foram imersas nessa solução e retiradas em diferentes tempos de permanência na solução, 9, 15, 30, 60 e 120 minutos, sendo que uma das seis partes da membrana não passou pelo processo de imersão na solução de AgNO_3 .

2.5 SISTEMAS DE CULTIVO DE PROMASTIGOTAS

A obtenção e o cultivo das promastigotas foram realizados em parceria com o Doutorando, que faz parte do nosso grupo de pesquisa, Carlos Gomes Barboza-Filho, biólogo especialista na área de pesquisas com *L. braziliensis*, em parceria com a Unidade da Unesp situada na cidade de Assis.

O sistema de cultivo de promastigotas *in vitro*, foi feito utilizando, como meio de cultura, o meio BHI (*brain heart infusion*), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), urina humana a 2% (v/v) conforme descrito por HOWARD *et al.* (1991), acrescido de 100 UI/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. O controle do desenvolvimento celular das promastigotas foi realizado semanalmente.

A composição do meio de cultura acima citada é utilizada por apresentar altos índices nutricionais. O soro fetal bovino é um complemento protéico ao meio de cultura, já que é constituído basicamente por albumina. A urina humana masculina é incorporada ao meio por ser um complemento mineral rico em sódio, potássio e amônia além de hormônios que regulam positivamente o metabolismo microbiano, acelerando os processos de amadurecimento celular. Já a estreptomicina e a penicilina são antibióticos de amplo espectro, aplicados para prevenção de contaminações do meio de cultura por bactérias, que competiriam com as promastigotas por espaço e alimento.

A temperatura do meio de cultura tem que permanecer a 28°C. Assim são reproduzidas as condições de temperatura que o parasita encontraria no interior do hospedeiro.

A escolha dessa temperatura, que está abaixo da temperatura ótima de reprodução bacteriana, retarda o desenvolvimento bacteriano e fungicida sem prejudicar o crescimento axênico dos protozoários.

Como medida preventiva, de possível perda da cepa por contaminação *in vitro*, fez-se a manutenção da cepa *in vivo*. Um grupo contendo três hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram previamente infectados, de acordo com a técnica já bem descrita e utilizada por Alexander & Vickerman, 1975.

O procedimento segue as seguintes etapas:

- i. a partir de lesões nodulares de pelo menos 3 cm de diâmetro foi realizado um processo de biópsia por fragmento, também conhecido por *core biopsy*, utilizando como ferramenta um *putch*, que é um instrumento capaz de extrair amostras de tecido com medidas específicas;
- ii. o material extraído foi introduzido em um almofariz de porcelana acrescido de uma solução salina fosfato. O fragmento foi macerado para liberação das células e também das amastigotas, que possivelmente estavam dentro das células fagocíticas;
- iii. a solução resultante do processo pôde ser usada na infecção de novos hamsters ou então adicionada a um meio de cultura BHI enriquecido para o desenvolvimento de formas promastigotas *in vitro*.

A Figura 20 mostra uma sequência de imagens evidenciando o processo de obtenção dos parasitas, descrito anteriormente.



Figura 20 – Fotografias evidenciando a sequência passo a passo da obtenção dos parasitas na forma amastigota a partir dos hamsters. Imagem cedida por Carlos Gomes Barboza-Filho.

O processo de cultivo das formas promastigotas *in vitro* passa pelas etapas descritas acima e logo são acondicionadas em estufa biológica à temperatura de 28°C por um período de 7 a 15 dias para permitir a transformação de amastigota em promastigotas. Esse processo de desenvolvimento foi acompanhado por microscopia óptica.

2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

2.6.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Espectroscopia é o estudo da interação da luz, radiação eletromagnética, e matéria, abrangendo o comportamento físico e químico. Esta interação é representada por um

espectro que exhibe a intensidade de resposta (absorção, espalhamento, etc.) em função da frequência da luz.

O estudo das propriedades ópticas das nanopartículas tem como base a eletrodinâmica clássica utilizando as teorias de Rayleigh e Mie, e ainda quando se trata de partículas com tamanhos inferiores a 4 nm se faz necessário o apoio da teoria quântica.

Quando as partículas metálicas se apresentam em escala nanométrica alguns efeitos quânticos, como o surgimento de uma intensa cor, é diretamente relacionado com o formato e o tamanho de tais partículas, sendo que o efeito responsável por essa intensa coloração é o efeito plasmon ressonante. Esse efeito é muito intenso em nanopartículas metálicas devido sua relação superfície/volume. Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma nanopartícula faz com que sua nuvem eletrônica oscile, gerando uma frequência de oscilação entre o núcleo e a nuvem por meio das interações de Coulomb.

Segundo a teoria de Mie [72], onde foi proposta uma solução geral para as partículas esféricas interagindo com um campo magnético externo [73], esse efeito se trata da formação de um plasma eletrônico, que envolve a partícula e é excitado pela luz visível, gerando assim a oscilação plasmon, como pode ser visto na Figura 21.

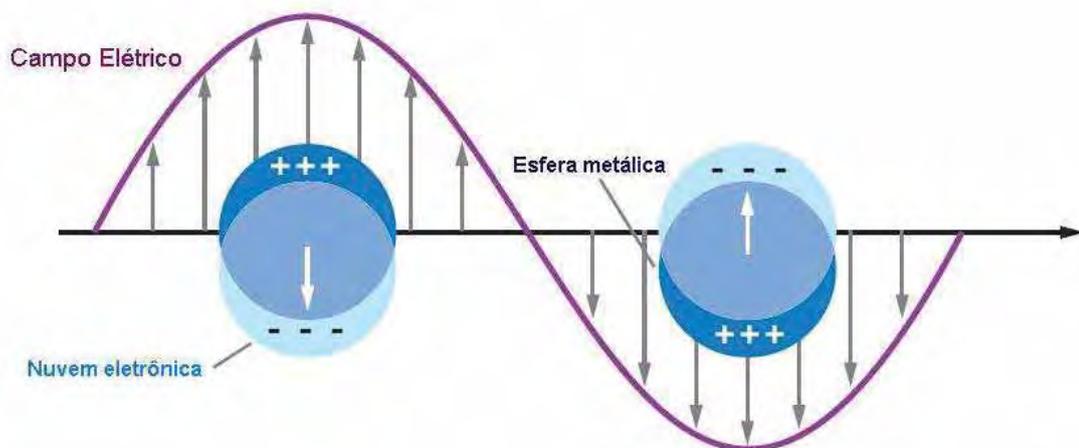


Figura 21 - Representação da oscilação da nuvem eletrônica da nanopartícula interagindo com um campo elétrico externo.

Através da espectroscopia UV-VIS é possível deduzir características tais como tamanho, forma, distribuição das nanopartículas na solução e verificar as bandas características das espécies em estudo, e ainda, se há ou não incorporação de material a cada tempo de redução.

A variação no tamanho das nanopartículas pode ser avaliada pelo deslocamento do pico de absorção, já que com o aumento de tamanho há um deslocamento para o vermelho. Sendo assim, a utilização da técnica de espectroscopia UV-VIS se mostra importante para confirmar a presença das AgNPs na membrana de BN.

O equipamento utilizado para a realização da técnica foi um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50, operando numa faixa de 190 a 1100 nm.

2.6.2 Comportamento Térmico

O conhecimento do comportamento térmico das membranas de BN pura e com nanopartículas é um fator relevante, pois muitas das propriedades físicas e químicas da BN são influenciadas pela variação de temperatura e ainda pela incorporação de algum outro material. Foram feitos estudos de transição de fase, recristalização, fusão, amolecimento, estabilidade térmica e degradação.

As medidas de análises térmicas foram realizadas pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e termogravimetria acoplada com infra-vermelho (TG/FT-IR).

2.6.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Esta técnica é utilizada para detectar mudanças físicas e/ou químicas, geradas pela perda ou ganho de energia térmica (calor) de uma amostra, comparada a um material utilizado como referência.

As mudanças observadas, relacionadas ao tempo, podem determinar os processos sofridos pela amostra se houver mudança na capacidade calorífica, ou seja, com a absorção de energia pela amostra, tem-se um processo endotérmico, mas se ocorrer liberação de energia, então essa mudança na entalpia é denominada exotérmica.

Portanto, os dados obtidos através de técnica de DSC fornecem informações sobre os efeitos térmicos característicos da mudança na entalpia da amostra em relação à faixa de temperatura analisada, como por exemplo, ponto de fusão, cristalização e reações químicas. Pode-se ainda verificar a capacidade calorífica da amostra em questão bem como o grau de cristalinidade, ou ainda as transições de fase, como por exemplo, a transição vítrea (T_g), a condutividade térmica, entre outros.

Neste trabalho essa técnica foi aplicada com o intuito de investigar qual a influência das AgNPs, em relação aos parâmetros anteriormente citados, nas membranas de BN.

Para realização da técnica, para analisar as membranas de BN pura e as de BN/Ag, foi utilizado o equipamento de calorimetria exploratória de varredura da marca Netzsch, modelo DSC 204 – Phoenix.

Os parâmetros utilizados na realização do processo foram uma massa de aproximadamente de 6 mg colocada em um cadinho de alumínio com tampa furada no centro tendo a temperatura variando a uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em uma faixa de temperatura que varia de -120°C a 500°C .

A atmosfera utilizada foi o N_2 , por ser um gás inerte, com fluxo controlado de $25 \text{ mL}/\text{min}$.

2.6.2.2 Análise Termogravimétrica (TG)

Esta técnica é utilizada para medir a variação da massa, por meio de uma termobalança ou analisador termogravimétrico, em função da temperatura a que é submetida a amostra.

À medida que as substâncias são aquecidas ou resfriadas ocorrem processos químicos e/ou físicos característicos de cada material, relacionados com a razão de temperatura aplicada, em geral graus Celsius por minuto ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Esta análise pode fornecer informações sobre a estequiometria de redução, cinética de reação, os múltiplos estágios de decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos, bem como a composição de cinzas, determinação da temperatura Curie, umidade, volatilidade, entre outros.

O conteúdo dos componentes voláteis como, solventes ou a água contida na amostra, reagentes, ou demais, são observados nas curvas do TG caracterizados através das fases de transição, porém apenas podem ser identificados com a utilização de outros equipamentos.

Em geral as análises dos componentes voláteis emitidos da amostra são realizadas por meio de combinações de equipamentos, o acoplamento - termo utilizado quando há aplicação de duas ou mais técnicas a uma mesma amostra e os instrumentos envolvidos estão conectados entre si através de interfaces.

Para tais medidas foi utilizado o equipamento da marca Netzsch modelo 209, a massa foi de aproximadamente 7 mg colocada em um cadinho de alumina, mantendo a atmosfera inerte de N_2 com fluxo de 25 ml/min, tendo a razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, com temperatura variando entre 25°C , ambiente, até 800°C .

2.6.2.3 Técnica TG/FT-IR acoplados

Nesta técnica de análise termogravimétrica (TG), acoplado com o espectrômetro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

Todos os gases regados nos estudos termogravimétricos são canalizados, por diferença de temperatura, para uma câmara que faz medidas no infravermelho simultaneamente, e no final da medida, o *software* reúne todas as medidas de absorção no infravermelho e forma uma imagem em três dimensões, podendo assim relacionar em determinada temperatura ou tempo de análise o que evaporou do material analisado.

Para essa análise foi utilizado o equipamento da marca NETZSCH modelo 209, na faixa de temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) até 600°C , a uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, em um cadinho de alumina em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 25 mL/min.

Os espectros FT-IR foram registrados num espectrômetro da marca Bruker modelo Vetor 22 com número de onda que percorre o intervalo de $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ com 4 cm^{-1} de resolução espectral, e um detector MCT.

2.7 Difração de Raios X (DRX)

O estudo da difração de raios X foi realizado empregando-se radiação $K\alpha$ do Cu com comprimento de onda $\lambda = 0,154060 \text{ nm}$, com uma voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. A velocidade contínua de varredura de $2^{\circ} \text{ min}^{-1}$, no intervalo de 2θ que varre de 20 a 80° .

A análise estrutural das amostras foi efetuada por comparação dos difratogramas experimentais com as fichas cristalográficas do JCDPS (*Joint Committee of Diffraction Standards*), realizada através do software *Crystallographica Search-Match*® (versão 2,1,1).

2.8 TESTES BIOLÓGICOS

Uma vez conhecendo as propriedades físico-químicas do material, efetuaram-se testes biológicos para analisar a interferência dos componentes da membrana no metabolismo do parasita e a resposta imune do hospedeiro infectado por *L. braziliensis*.

2.8.1 Cinética de Crescimento Populacional de Promastigotas em Ambientes Contaminados pelas Nanopartículas

Este teste visa reconhecer o efeito das nanopartículas na fisiologia celular, controlando a curva de crescimento de biomassa celular diante de vários ambientes com diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Essas diferentes concentrações se devem às membranas de BN/Ag com tempos de redução distintos.

A biomassa celular é estimada utilizando um método de contagem populacional muito utilizado em laboratórios de análises clínicas, conhecido como contagem por câmara de Neubauer. A Figura 22 mostra uma imagem da lâmina da câmara de Neubauer [74].

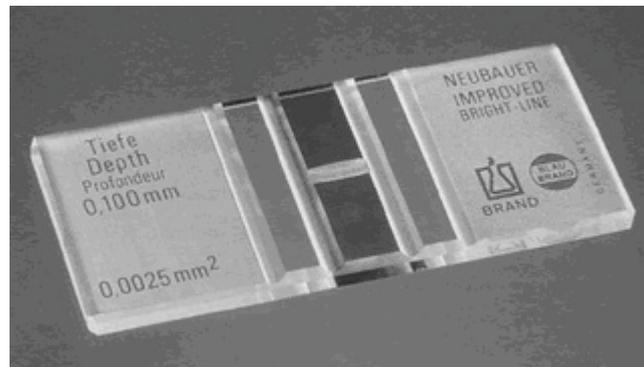


Figura 22 - Câmara de Neubauer [74].

Esse tipo de contagem é feita através da determinação da concentração por contagem de células na suspensão utilizada para análise. Essa contagem celular é feita com o auxílio de um microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubauer.

A câmara contém três tipos diferentes de áreas de contagem determinadas por A, B e C, sendo que cada quadrante possui dimensões diferentes entre si. Esse fato permite que

células apresentando diferentes tamanhos possam ser contadas na câmara. Sabendo que cada quadrado é de dimensões conhecidas, e a profundidade da solução utilizada também, encontra-se então o volume delimitado pelas marcações da câmara.

Na Figura 23 é possível ver a imagem dos quadrantes referidos da câmara de Neubauer, onde nos quadrantes A, são contadas as células de tamanhos maiores, no quadrante B as células de tamanho médio, e no quadrante C as células de menor tamanho.

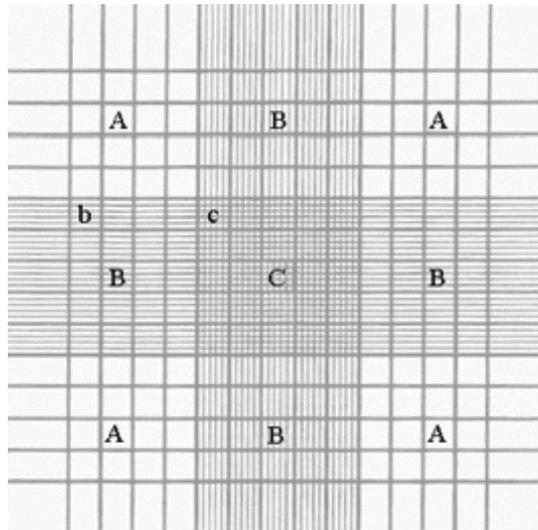


Figura 23- Gabarito de uma câmara de Neubauer especificando os quadrantes A, utilizado para contagem de células maiores, B para células e tamanho médio e C para células menores [74].

Para obter a concentração das células é realizada a contagem da quantidade de célula em cada quadrado menor e divide-se pelo volume do mesmo, gerando assim a concentração de células por mm^3 . Esse procedimento de contagem é repetido por diversas vezes, em quadrados diferentes, com o intuito de se obter a média e o desvio padrão das contagens.

2.8.2 Cromatografia em Coluna de Lã de Vidro (Controle Experimental).

A lã de vidro é utilizando uma solução sulfocrômica e 1,3 g da matriz e colocada em colunas de 1,6 cm de diâmetro, 5,5 cm de comprimento; forradas por papel de filtro, que

impede a perda da matriz durante o processamento dos parasitos, unidas a uma cânula de látex com cerca de 10 cm.

Após a montagem da coluna lã de vidro, o material é submetido à autoclavação. A coluna é equilibrada com 30 mL de solução salino-fosfato (PBS) a 0,15 mol/L e pH 7,2. O fluxo através da cânula é regulado por uma pinça de Hoffmann a 8 mL/h.

Os parasitas inoculados na coluna são concentrados a $5 \pm 1 \times 10^7$ parasitas/mL de PBS. Frações de 7,5 mL são coletadas para determinação do rendimento de cada coluna por microscopia óptica, com o auxílio de uma câmara de Neubauer [60, 74].

2.8.3 Processo de Infecção dos Animais

Para realização do processo de infecção animal, utilizam-se linhagens de camundongos isogênicos, ou seja, camundongos com perfil genético modificado [75].

Esse tipo de animal é obtido com o cruzamento de mesmas gerações para assegurar um alto grau de consanguinidade para assim fixar algumas características, porém com a consequência de perder outras, dependendo da linhagem utilizada [76].

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de camundongos isogênicos. A linhagem conhecida por BALB/c que são os animais com perfil genético modificado, a fim de se torna-los susceptível às infecções. Este perfil é característico de um sistema orgânico deficiente de certas moléculas e células responsáveis pela resposta imunológica do organismo do animal.

A linhagem conhecida como C57BL/6 são animais em que seu perfil genético sofreu variações que resultou em animais que apresentam sistema imunológico resistente às infecções. A Figura 24 mostra a diferença visual entre as duas linhagens utilizadas no trabalho.

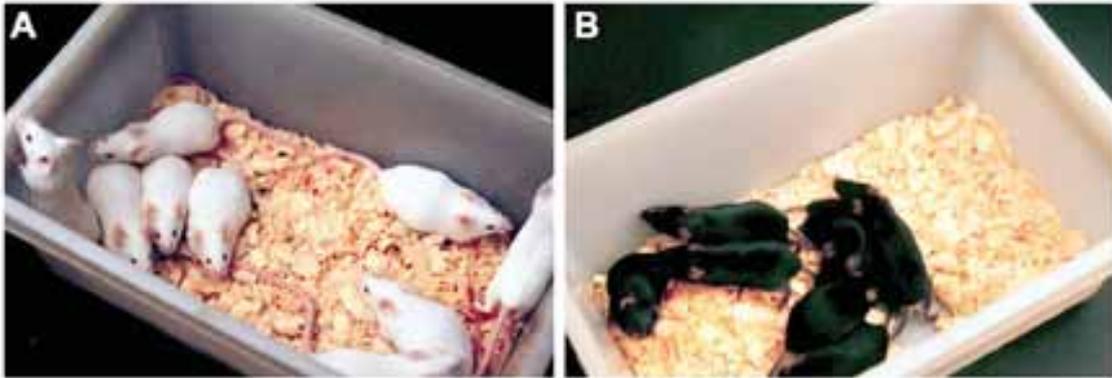


Figura 24 - Amostra das diferenças visuais dos animais utilizados na pesquisa. Em (A) estão os camundongos isogênicos da raça BALB/c e em (B) estão indivíduos da raça C57BL/6.

A infecção das duas linhagens é feita pela inoculação de frações contendo os protozoários de *L. braziliensis*, na parte traseira da pata do animal. Após a inoculação faz-se o acompanhamento do desenvolvimento da infecção.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com as frações separadas de parasitas e de acordo com as linhagens isogênicas a fim de se obter uma curva de infectividade *in vivo*. Este teste comprova o evento que já conhecemos em ensaios *in vitro*, e ainda abre espaço para a análise da resposta imunológica de mamíferos, frente ao ataque de parasitas com diferentes graus de patogenicidade, item este, pouco conhecido e descrito na literatura especializada.

Os animais receberam uma dose de 1×10^8 parasitas separados pela cromatografia em coluna de lã de vidro e pela adsorção usando membranas de BN/Ag [64] e pós infecção foram acompanhados por 24 semanas.

2.8.4 Teste de Hipersensibilidade Tardia (DTH – *Delay Test Hypersensitivity*)

Hipersensibilidade é toda resposta imunológica que é considerada exagerada sob o ponto de vista de síntese de anticorpos, reagentes ou migração de células, provocando de alguma forma alguma lesão tecidual na área onde o antígeno se encontra.

Existem quatro tipos de reações de hipersensibilidade, sendo especialmente importante aquela denominada hipersensibilidade tardia. Ela recebe este nome, pois leva mais

de 12 horas para demonstrar sintomas clínicos consideráveis, eritema e endureção, devido ao o envolvimento direto de células imunitárias.

Essa técnica ajudar a identificar reações alérgicas a materiais estranhos ao organismo, reações auto-imunes e na infecção da leishmaniose e doença de Chagas. Em testes feitos em animais são inoculadas frações de parasitas mortos por criogenia, para poder analisar a dinâmica de resposta imunológica primária frente às diversas inoculações.

Para a realização dos testes de hipersensibilidade tardia introduziu-se no coxim direito da pata traseira de hamsters amostras experimentais, separadas pela cromatografia em coluna de lã de vidro e pela membrana BN/Ag, enquanto que no coxim esquerdo da pata traseira apenas solução salina fisiológica, sendo este, controle negativo.

O acompanhamento do animal pós-inoculação foi feito a cada quatro horas, durante as primeiras 48 horas, a fim de constatar se houve alguma mudança no local inoculado.

Para a constatação da presença de eritema e sua intensidade, o que justifica o desenvolvimento de uma hipersensibilidade tardia e sua intensidade, foi realizada a medição da endureção das patas utilizando-se um paquímetro.

As medições continuaram por um prazo de sete dias consecutivos, calculando uma diferença entre as medidas encontradas entre um coxim e o outro do mesmo animal, uma vez ao dia.

2.8.5 Obtenção de Macrófagos Peritoneais Murinos

Os camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com 3 mL de solução de tioglicolato de sódio, Difco, a 3%. Após três dias, os animais foram sacrificados em câmara de vidro contendo clorofórmio.

Após a morte e exposição do peritônio, abrindo-se a pele do animal, injetou-se 5,0 mL de tampão fosfato estéril, PBS pH 7,2, com seringa e agulha estéreis, e realizou-se leve massagem manual.

As células foram coletadas do peritônio com a mesma seringa e agulha, utilizadas anteriormente, e acondicionadas em um tubo estéril, Corning, Inc, mantidas em banho de gelo.

Para o preparo da suspensão celular, centrifugou-se 200 g do material coletado, três vezes durante 5 minutos em centrífuga da marca Fanem, à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI – 1640 da marca Sigma, e suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1U/mL de estreptomicina, 1U/mL de penicilina e 5×10^{-2} M β -mercaptoetanol designado como RPMI completo (RPMI-1640-C).

O número celular foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer da marca Boeco Germany, fez-se o uso de corante vital líquido de Lázarus, ajustado para a concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI completo. As células foram incubadas em estufa a 37°C, com tensão constante, 5 % CO₂ para formação do tapete celular, ou seja, cultura de macrófagos peritoneais.

2.8.6 Determinação da Liberação de Óxido Nítrico.

O óxido nítrico é um gás incolor à temperatura ambiente e insolúvel em água, encontrado em apenas pequenas quantidades no ar atmosférico. Devido à presença de elétrons desemparelhados em sua configuração eletrônica ele se torna altamente reativo em ambientes biológicos, visto que as reações de interação química são baseadas em estabilização de cargas excessivas, esse fato também faz com que o óxido nítrico torne-se tóxico, pois as cargas em excesso agem como radicais livres [77].

No processo biológico o óxido nítrico é produzido pela catálise enzimática de um aminoácido essencial, α L-arginina, e desempenha papel importante no auxílio de sua

detecção, a partir da dosagem de seus nitritos e nitratos, e ainda participa do controle de muitas infecções, atividade bactericida, antiparasitária e antiviral [78].

O organismo usa o NO em processos onde haja urgência na resposta de defesa, como no caso de infecções virais, parasitárias, entre outras patogêneses. O corpo produz altas concentrações de NO, que acabam tornando-se tóxico às células estranhas ao corpo, sendo que os valores de concentração variam de acordo com o tecido invadido.

Poucas horas depois do organismo detectar a infecção, os macrófagos, que são as células responsáveis pela defesa do organismo, começam a liberação de enzimas específicas que sintetizam o NO, sendo que este processo pode ter a duração de várias horas.

Depois de sintetizado o NO se difunde para parte externa ao macrófago a fim de invadir as células do microrganismo detectado como estranho ao corpo, bloqueando as enzimas que são responsáveis pela respiração celular [77,79].

Para comprovar e dosar a síntese de NO a suspensão celular de macrófagos peritoneais de camundongos, ajustada a 5×10^6 cels/mL e as amostrais, foi diluída em meio RPMI completo na concentração de 100 μ L de suspensão celular/cavidade e 100 μ L da diluição de cada amostra em placa estéril de 96 cavidades planas.

Em outras cavidades são acondicionados 100 μ L de LPS de *E. coli* sorotipo 0111:B4 a 10 μ g/mL em meio RPMI-1640C, como controle positivo, ou seja, na presença dos macrófagos reagem, mostrando que os mesmos sintetizaram óxido nítrico. Sobre todos os poços das placas são introduzidas lamínulas que suavemente imergem sobre o líquido, após esta etapa as placa são incubadas em estufa a 37°C, com pressão constante de CO₂ a 5% por 24 horas.



Figura 25- Imagem aproximada das placas de leitura de ELISA onde foram inoculados os macrófagos peritoneais. Note na imagem que as placas tem poços (*wells*) com colunas numeradas e linhas identificadas por letras. Assim, tem-se condição de ter amostras diferentes em cada poço, com sua leitura individual sem que haja contaminação.

Após o período de incubação são transferidos 50 μL para uma nova placa e adicionados, a cada cavidade, mais 50 μL de reagente de Griess, composto de N-(1-naftil)-etilenodiamino, sulfonilamida, os dois adquirido da Merck, e ácido ortofosfórico, da Mallinckrodt Chemical, (GREEN et al., 1982).

As células fagocitárias que estão no interior de cada poço não são transferidas junto com o líquido, pois todas estas estão fortemente aderidas ao vidro da lamínula, assim como a possível presença microbiana no meio.

Para a confirmação da presença de nitrito no meio celular é necessária uma reação entre o meio e o reagente de Griess, que se dá por uma mudança de coloração do meio, que inicialmente é incolor e varia para violeta na presença do nitrito. É importante ressaltar que quanto maior a concentração de nitrito no meio aquoso, mais intensa é a tonalidade do poço, sendo a partir dessa variação que se faz a medição dos níveis de óxido nítrico do meio.

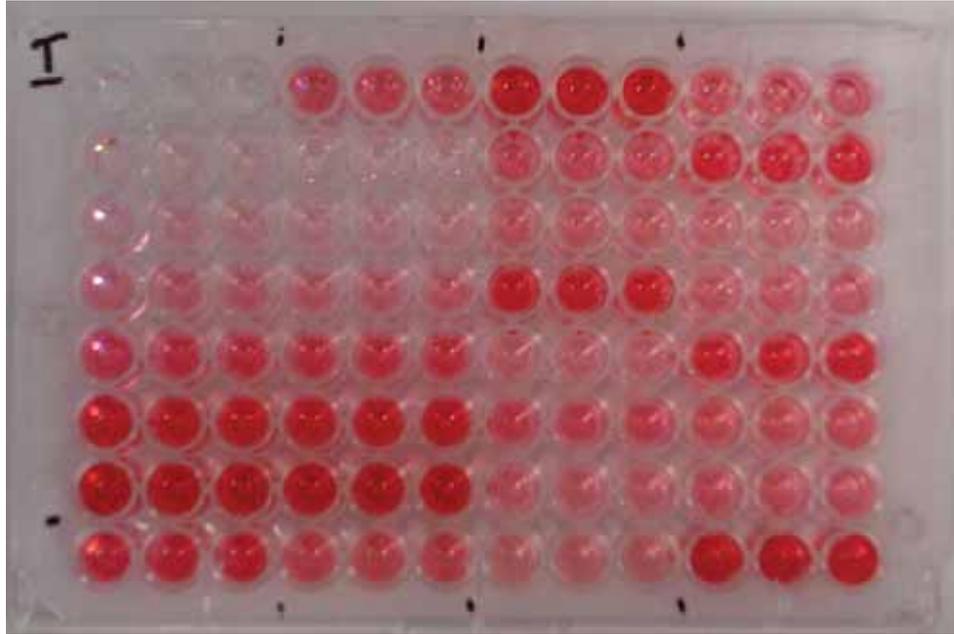


Figura 26- Uma das placas de leitura de ELISA utilizada nos experimentos de dosagem de NO. Note que existem variações entre as tonalidades dos poços, já que eles apresentam diferentes amostras e assim também demonstraram diferentes leituras de concentrações de nitrito. É importante ressaltar que essa tonalidade em vermelho que aparece não corresponde a realidade, já que o conjunto presente nos poços é altamente fotossensível, sofrendo alteração de tonalidade em virtude do flash da máquina fotográfica.

Após 10 min. de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz ambiente, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV/Visível, CYBERLAB, Helsinki, Finland, com filtro de 540 nm.

Este mesmo aparelho libera uma planilha que tabula os valores das concentrações de nitrito baseado em um poço “branco” onde só existe o meio de cultura e não existe o reagente, geralmente o poço A1, criando assim uma linha de corte nos valores de concentração. Todos os outros poços, que tem uma letra e um número correspondente, recebem valores de acordo com a leitura individual feita pelo aparelho. A Figura 27 mostra uma imagem do equipamento leito de ELISA.

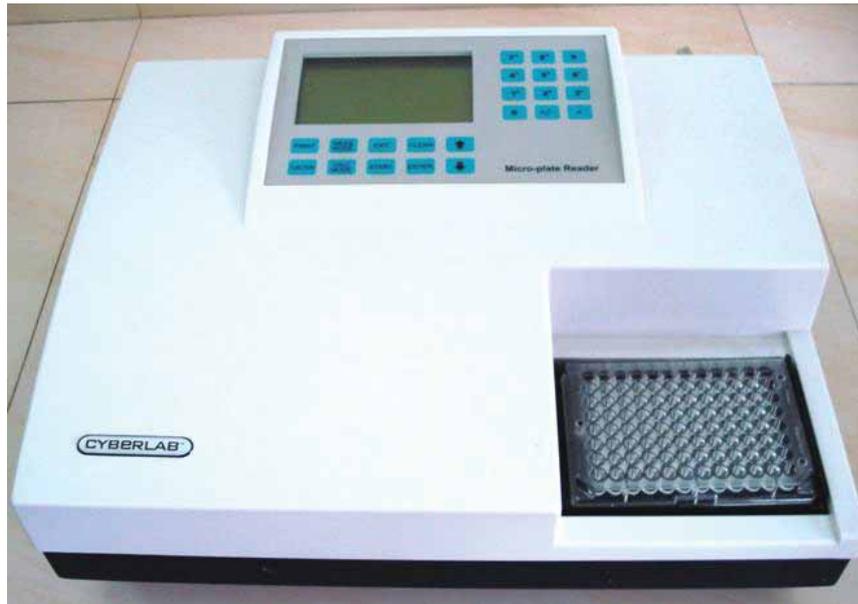


Figura 27- Leitor de ELISA, mostrando a área onde se introduz a placa com as amostras, que posteriormente é fechada para a leitura por um espectrofotômetro no seu interior.

As concentrações de nitrito foram obtidas a partir de uma curva padrão prévia, preparada com concentrações nanomolares conhecidas de NaNO_2 .

CAPITULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 MEMBRANAS DE BN/AG

Após a secagem em do latéx em estufa obteve-se a membrana de borracha natural pura, Figura 28 (A).

Em seguida, com a realização do processo de síntese das nanopartículas de prata, como descrito no item 2.4, obteve-se as membranas de BN/Ag.

As membranas são retiradas da solução de sal de prata em diferentes tempos de redução, sendo estes 9, 15, 30, 60 e 120 minutos, como apresentado na Figura 28 (B). Essas membranas são colocadas em um dessecador por um tempo de 12 horas para a secagem completa.

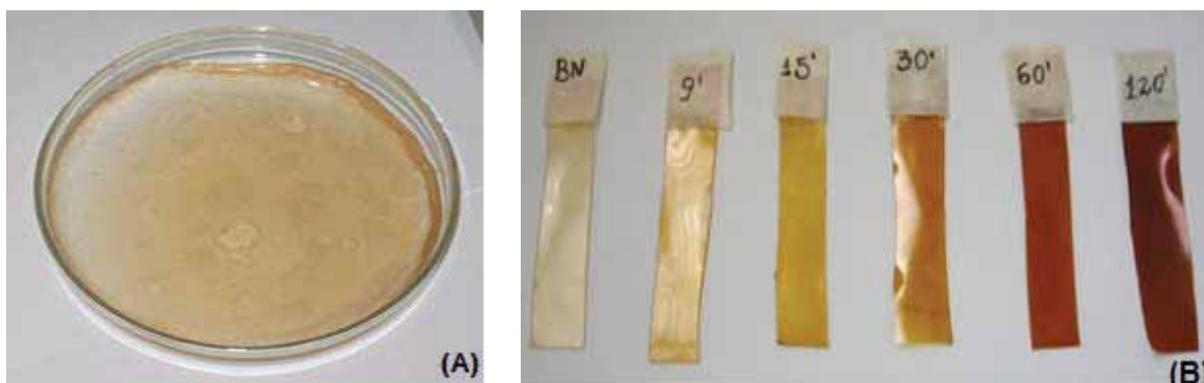


Figura 28 - (A) Membranas de borracha natural pura; (B) membranas de borracha natural com nanopartículas de prata nos diferentes tempos de redução.

Observa-se que a coloração das membranas varia com o tempo de redução partindo do amarelo claro para o marrom escuro, resultado este também obtido por outros pesquisadores [80, 81]. Este fenômeno se dá devido o aumento da concentração das nanopartículas de prata reduzidas em função do tempo.

3.2 ESPECTROSCOPIA ULTRA-VIOLETA VISÍVEL

A técnica foi realizada, com o intuito de monitorar o crescimento das nanopartículas incorporadas nas membranas de borracha natural.

Através da curva do UV-VIS pode-se observar se houve a incorporação das nanopartículas na membrana de borracha natural [82]. Este fato se confirma pela presença de bandas de absorção que variam entre 380 a 450 nm. Sendo que para cada faixa de absorção é possível fazer uma correlação com o diâmetro das partículas estudadas [83] como é mostrado no Tabela 4. Os dados deste Tabela são utilizados como comparação aos dados obtidos utilizando a mesma técnica para analisar as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

Comprimento de onda (nm)	Tamanho da partícula (nm)
380 - 390	5 - 10
395 - 405	10 - 14
420 - 435	35 - 50
438 - 450	60 - 80

Tabela 4 - Correlação entre os comprimentos de ondas obtidos na análise de UV-VIS com o tamanho das partículas de prata, de uma solução padrão. Fonte: SOLOMON, S et all. Journal of Chemical Education. Vol. 84 No. 2; 2007 [83]

Na Figura 29 é possível observar as curvas do espectro de absorbância no UV-VIS para as membranas de borracha natural.

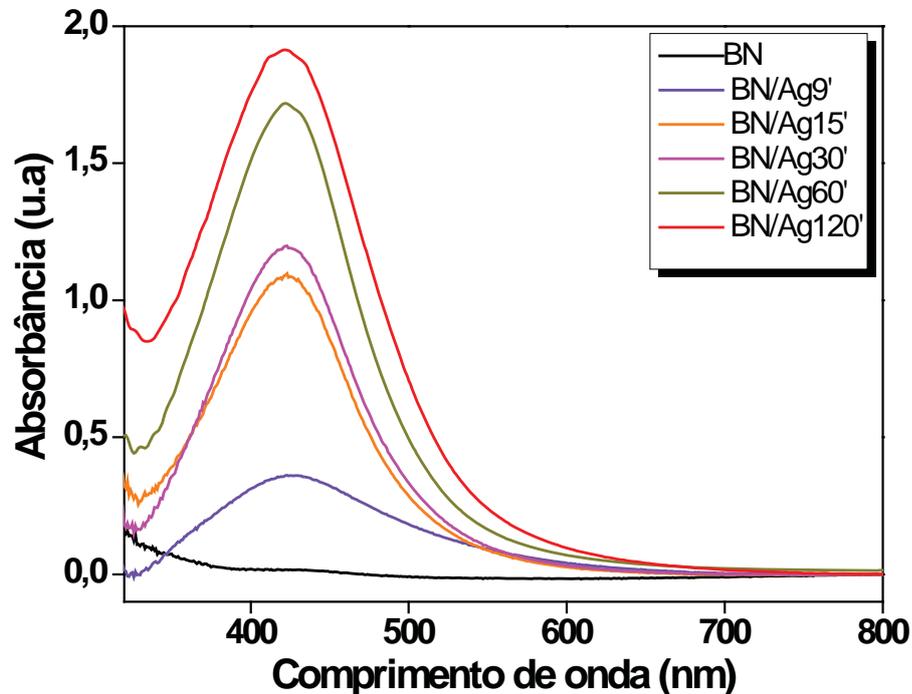


Figura 29 - Curvas do espectro de absorbância no UV-VIS para as membranas de BN pura e as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

Nota-se a presença de bandas de absorção em torno de 420 nm, para as membranas com diferentes tempos de redução, correspondentes ao comprimento de onda da superfície de ressonância plasmon das nanopartículas de prata.

Os dados anteriormente citados corroboram com os dados obtidos, confirmando então a presença de AgNPs na membrana de BN.

Segundo a teoria de Mie [72, 73] bandas de absorção nessa faixa de comprimento de onda podem ser atribuídas também ao formato esférico das AgNPs, e ainda podem ser relacionadas a partículas com diâmetro na faixa de 35 a 50 nm [83].

A largura a meia altura das bandas de absorção das nanopartículas pode ser associada à forma de agregação das mesmas. Bandas de absorção mais largas, como as obtidas para as membranas de BN/Ag, indicam que as NPs se agregaram de forma irregular,

gerando uma dispersão nos tamanhos de agregados formados na superfície da matriz de BN [1616, 81,82].

Já a intensidade de absorvância se relaciona com a concentração dessas partículas no meio. Quanto maior intensidade nas curvas de absorvância, maior será a concentração das AgNPs.

Os resultados obtidos para as membranas de BN/Ag mostram que o aumento na intensidade de absorvância cresce de forma exponencial. Este aumento é representado na forma gráfica, na Figura 31.

Com o transcorrer do tempo de redução a síntese tende a estabilização. Esse fato pode estar relacionado com a interação das AgNPs com as proteínas da BN, sendo que quanto maior a quantidade de nanopartículas menos proteínas para interação ficaram disponíveis na superfície da membrana.

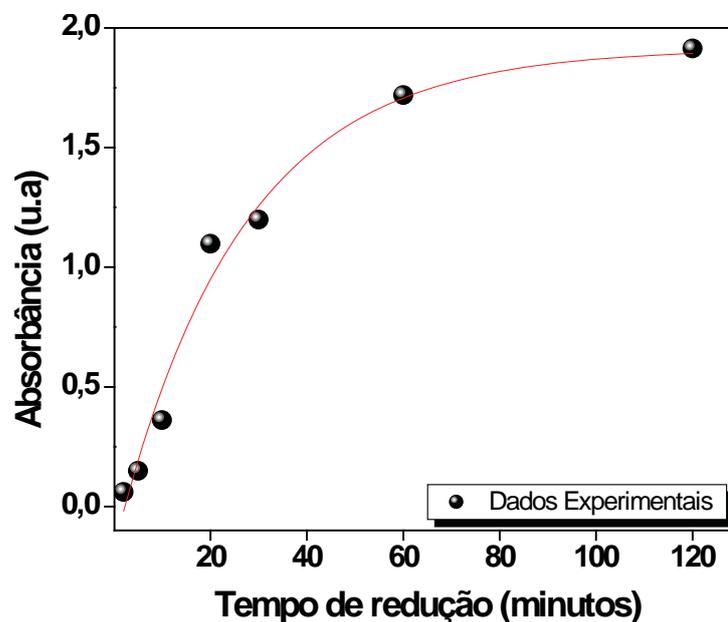


Figura 30 - Relação entre o tempo de redução e a absorvância das membranas de BN/Ag.

3.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Nas Figuras 31 e 32 são mostrados o comportamento termogravimétrico, TG e DTG, realizados para as membranas BN/Ag em diferentes tempos de redução.

Na Figura 31 é possível notar que a curva referente à membrana de BN/Ag com tempo de redução de 120 minutos, apresenta uma diferença acentuada em relação às curvas relacionadas às outras membranas.

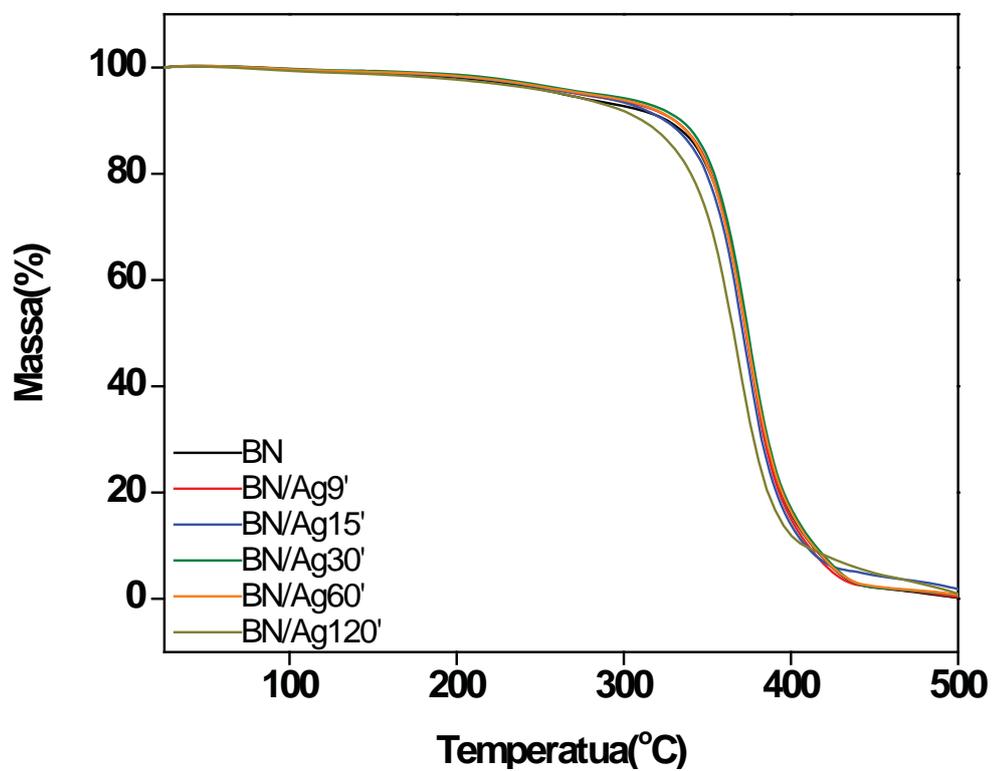


Figura 31 - Análises TG para membrana de BN e BN/Ag em diferentes tempos de redução.

Para uma melhor visualização dessa diferença a Figura 32 mostra uma ampliação da área em questão.

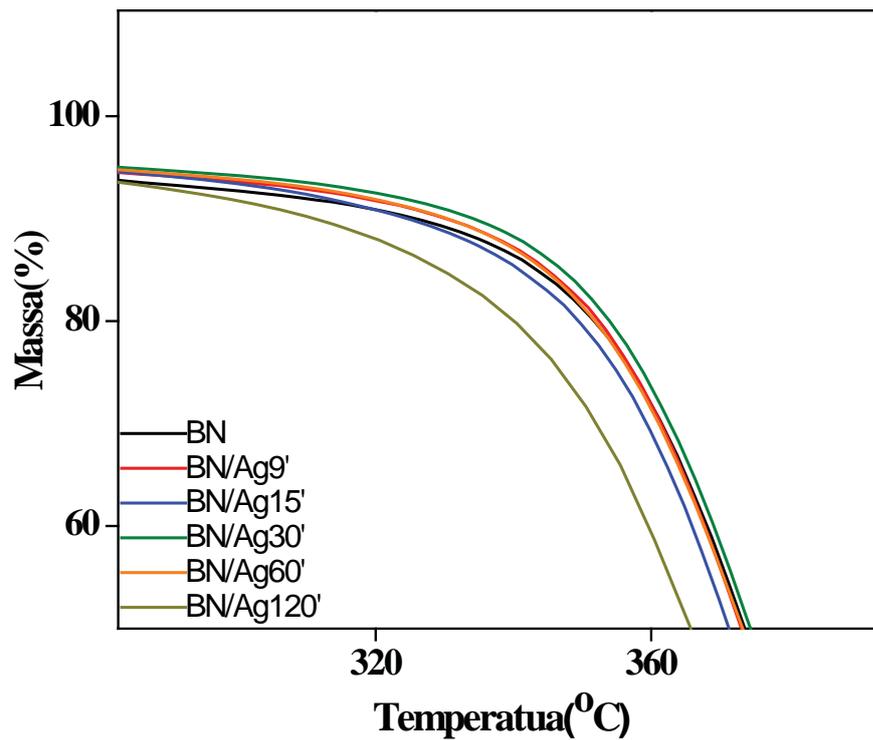


Figura 32 – Ampliação na parte onde é mais evidenciada a perda de massa para a membrana de BN/Ag 120'.

É possível observar que a membrana de BN/Ag com maior tempo de redução apresenta uma perda de massa mais acentuada quando comparada às outras membranas de BN/Ag.

Já para as outras membranas, a variação da massa não é significativa, mostrando que estabilidade térmica da membrana de BN/Ag se mantém, quando comparadas às membranas de BN sem nanopartículas de prata, em até 350°C. As perdas de massa para essas temperaturas podem ser vistas de maneira mais clara analisando a curva gerada pela primeira derivada da curva de TG, a DTG, apresentada em seguida.

A Figura 33 refere-se à primeira derivada das curvas de TG, onde é possível notar as perdas de massa da membrana de BN e das membranas de BN/Ag em função da variação da temperatura.

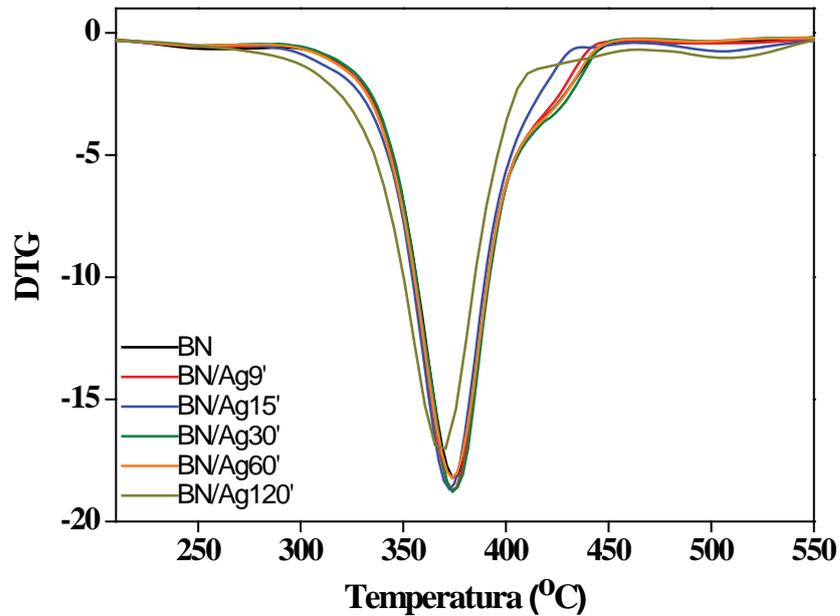


Figura 33 - Primeira derivada da curva de TG.

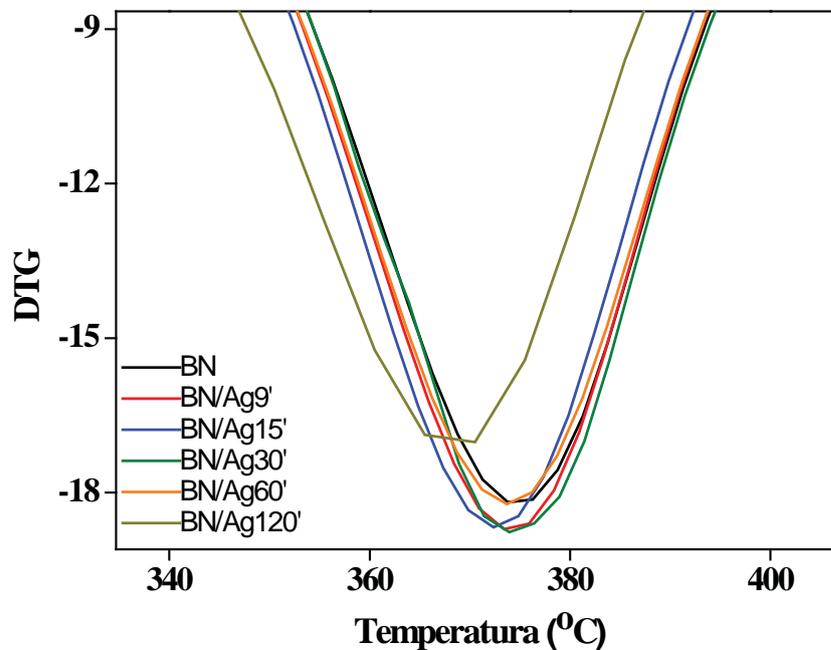


Figura 34 - Ampliação na região de maior perda de massa da curva de DTG.

Na Figura 34 é possível observar a ampliação da curva de DTG, na região de maior perda de massa em relação à temperatura.

Mais uma vez fica evidente a diferença entre a membrana de BN/Ag 120 minutos para as demais.

O aumento na concentração de AgNPs na membrana de BN leva a diminuição da temperatura de degradação das cadeias poliméricas, ou seja, desestabilização térmica da membrana, podendo estar relacionada com o excesso de Ag^+ provocando a saturação das ligações duplas das cadeia do polímero e também interagindo de alguma forma com os compostos mais reticulados da cadeia polimérica.

Na faixa de temperatura entre 30 e 272°C há uma variação da quantidade de massa bem pequena, podendo estar relacionada à evaporação de alguns compostos não borracha que estariam presentes em todas as membranas.

Com o aumento da temperatura as demais membranas, quando comparadas a membrana de borracha natural pura, mantém-se estáveis seguindo o processo de degradação descrito a seguir.

Com o aumento na temperatura a degradação da membrana se torna mais evidenciada, como pode ser observado na formação do primeiro degrau no termograma. Essa mudança é referente à queima da borracha natural, evidenciando de forma acentuada a ocorrência da degradação estrutural das cadeias poliméricas do isopreno, principal constituinte da BN, juntamente com outros compostos ligados à membrana, que está entre 99,8 e 84,35% de perda de massa, ocorrendo por volta de 380°C.

Já em um segundo ponto, há um segundo degrau do termograma, presente no intervalo de temperatura entre 428 a 467°C, e é associado à decomposição mais lenta de cadeias poliméricas ou resíduos poliméricos altamente reticulados [84,85, 86].

3.4 TG acoplado ao FT-IR

Com o intuito de identificar algum tipo de interação, entre a membrana de BN e as AgNPs, que gerasse algum tipo de mudança na estrutura química foi realizada simultaneamente à técnica de termogravimetria o acoplamento ao FT-IR.

Nesta técnica, todo gás evaporado durante a medida de TG é canalizado simultaneamente, por diferença de temperatura, para o FT-IR onde são obtidos os espectros, em três dimensões (3D), o que facilita a visualização das reações que ocorrem na análise termogravimétrica.

A Figura 35 mostra a imagem em 3D gerada pelo equipamento de FT-IR, para a borracha natural pura. Acima de 600°C não foi observada nenhuma mudança, portanto as análises foram feitas a partir da temperatura ambiente até 600°C.

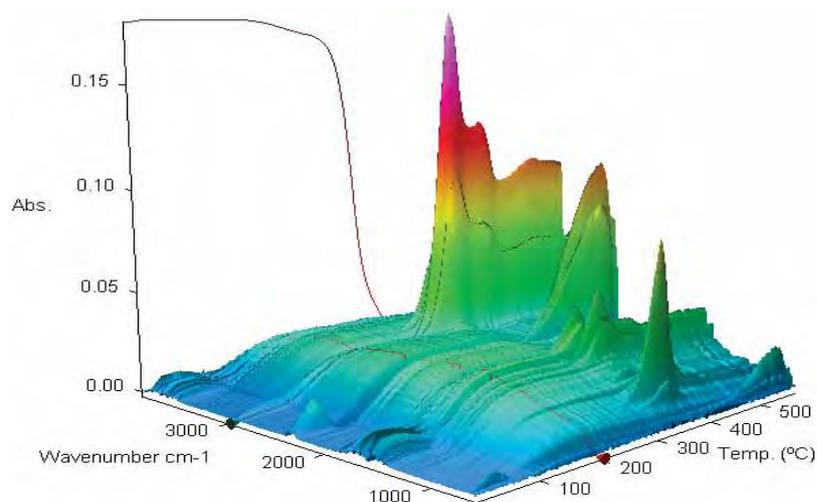


Figura 35 - Imagem 3D gerada no FT-IR/TG para a borracha natural pura.

Na Figura 35, é possível observar entre o intervalo de temperatura, que vai de 300 a 600°C, picos consideráveis de absorção, que para melhor analisar as reações físicas ou químicas, foi extraído os espectros desta imagem.

A Figura 36 mostra espectro extraído da imagem em 3D da borracha natural pura.

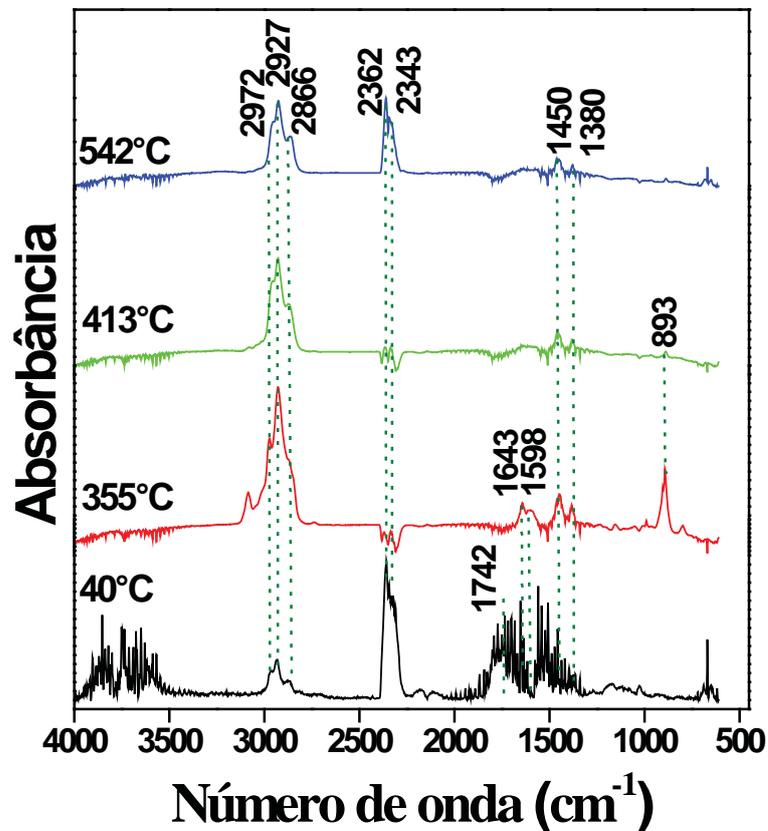


Figura 36 - Espectro extraído da imagem 3D FT-IR da borracha natural nas temperaturas de 40°C, 355°C, 423°C e 542°C.

No intervalo de temperatura compreendido entre os valores de 25 até 100°C, é possível observar uma perda de massa de aproximadamente 7%, os picos evidentes em 40°C apresentam aumento de escala quando comparados aos espectros referentes a outras temperaturas.

Já quando é feito a análise dos espectros extraídos em outras temperaturas é possível notar a presença de um pico em 1380 e 1450 cm^{-1} , que não estavam presentes a temperaturas mais amenas. Estes picos são atribuídos à deformação angular no plano dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente.

Os picos evidenciados com o aumento 2866, 2927 e 2972 cm^{-1} , são referentes ao estiramento simétrico do CH_2 , deformação simétrica do C-H, e deformação assimétrica de C-H e CH_3 . Absorção nessa faixa de comprimento de onda é característico da cadeia do

isopreno. Ainda na faixa de temperatura mais elevada é possível observar picos relativos ao estiramento simétrico dos grupos C=O de ácido dimérico, em 1742 cm^{-1} . Observa-se ainda a presença dos picos em 2362 e 2343 cm^{-1} , demonstrando a liberação do dióxido de carbono para o ambiente.

As membranas de BN/Ag com diferentes tempos de redução de prata também foram analisadas utilizando a técnica TG/FT-IR, para então fazer um comparativo com os dados obtidos para a membrana de BN pura. Os dados para as membranas de BN/Ag são mostrados na Figura 37.

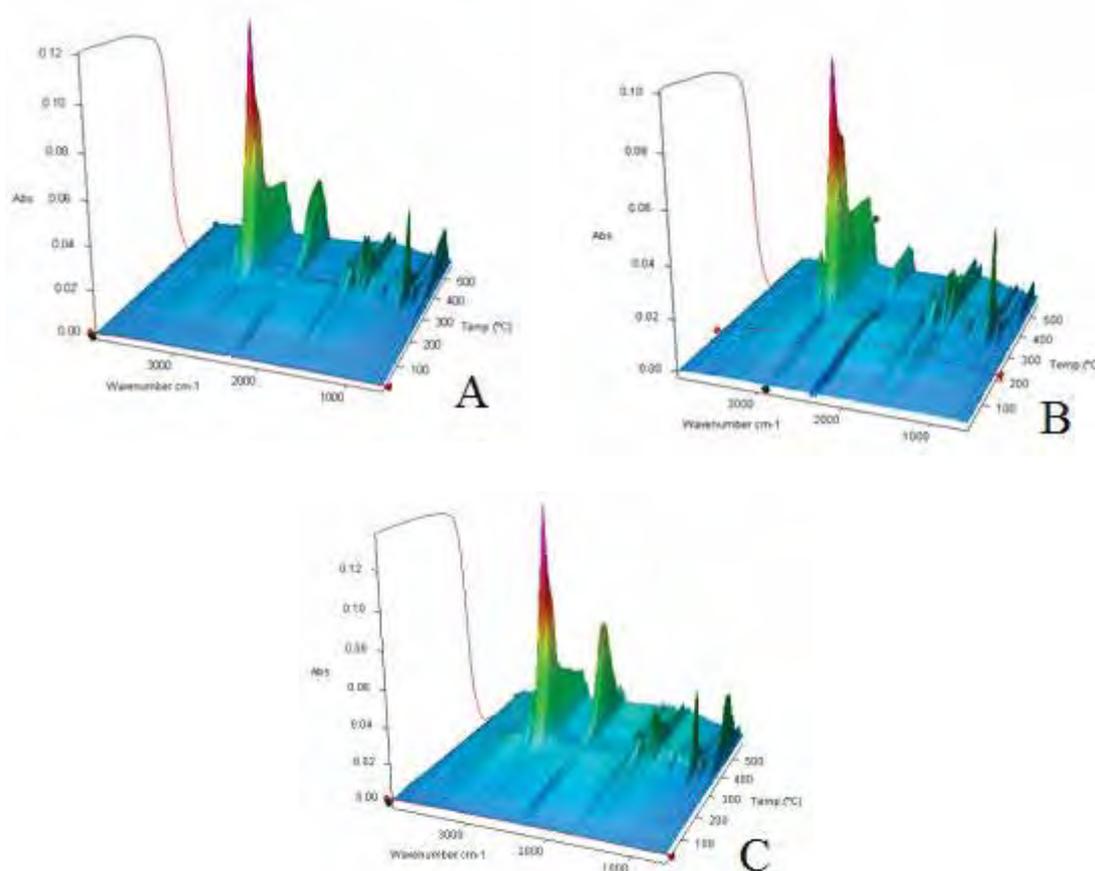


Figura 37 - Imagem em 3D gerada pelo FT-IR para as membranas de BN/Ag em diferentes tempos de redução. (A) BN/Ag 9 minutos; (B) BN/Ag 30 minutos e (C) BN/Ag 120 minutos de redução.

Para uma melhor análise dos dados apresentados na Figura 37 foi realizada a extração dos espectros para três temperaturas, à 354°C , 402°C e 493°C , que são as temperaturas onde os dados de absorvância sofrem maior variação.

As Figuras 38, 39 e 40 mostram os espectros obtidos das imagens em 3D apresentados na Figura 37.

A análise dos dados é realizada através da comparação dos picos referentes a absorção das amostras de BN e BN/Ag.

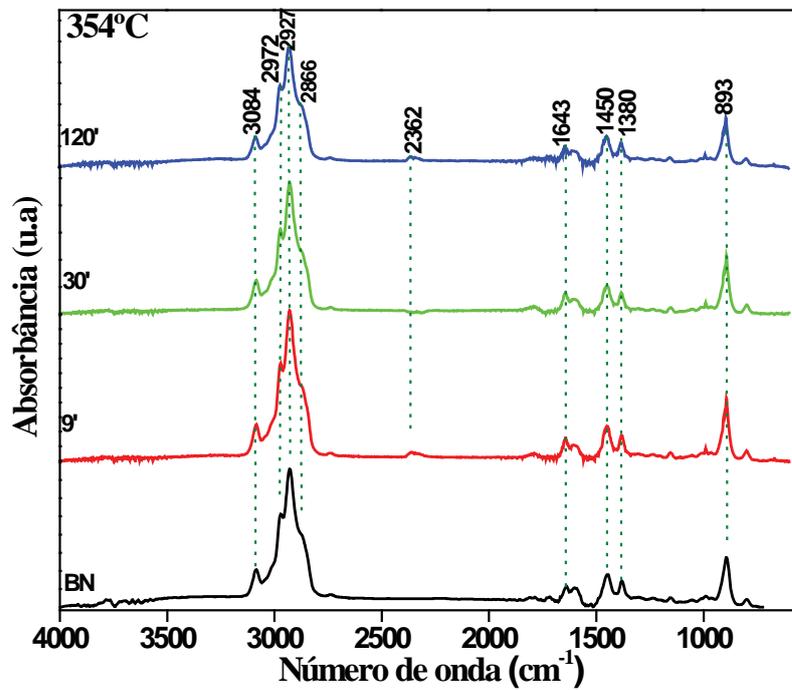


Figura 38 - Espectro extraído da imagem 3D do espectro de FT-IR das membranas de BN/Ag na temperatura de 354°C.

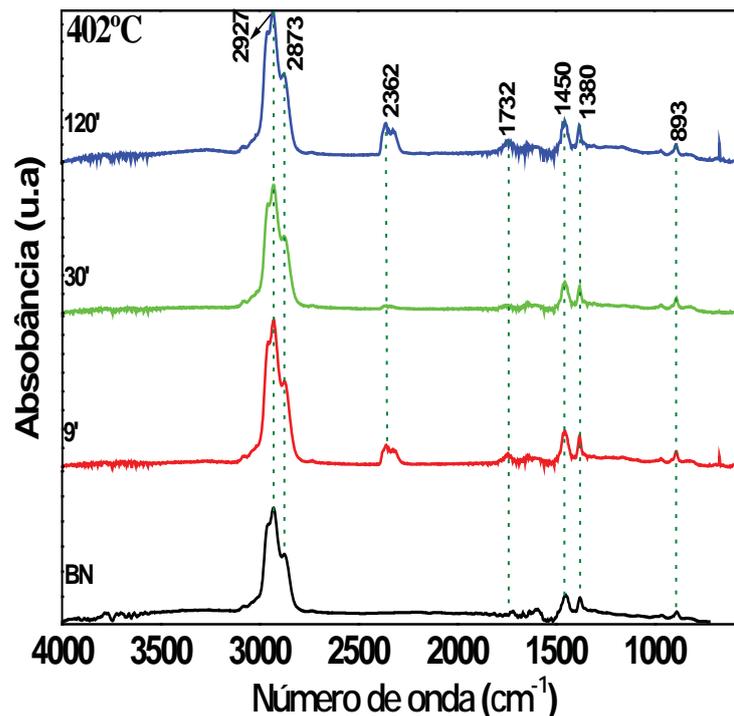


Figura 39- Espectro extraído da imagem 3D do espectro de FT-IR das membranas de BN/Ag na temperatura de 402°C.

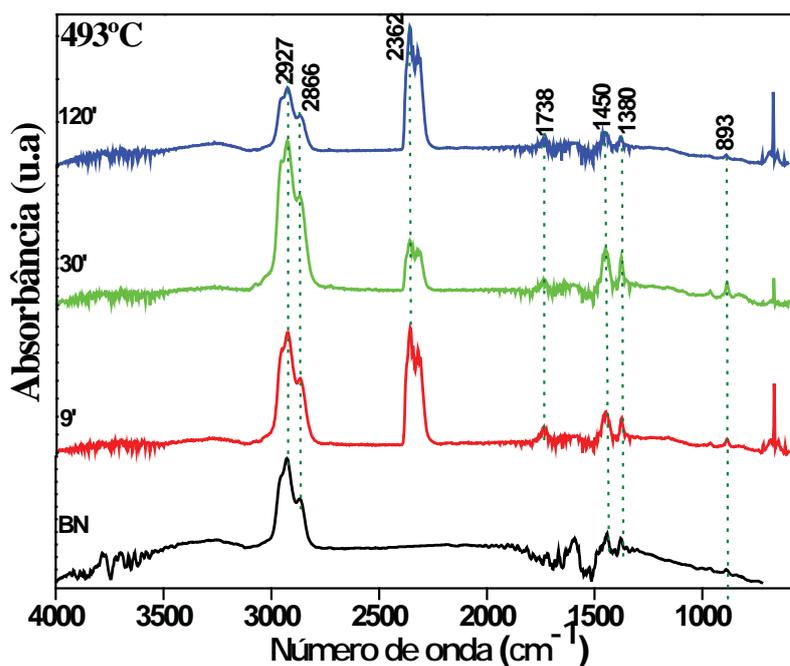


Figura 40 - Espectro extraído da imagem 3D do espectro de FT-IR das membranas de BN/Ag na temperatura de 493°C.

Como já analisado anteriormente, o espectro da BN pura, os picos que aparecem nas seguintes frequências, 2972, 2927, 2866, 1643, 1450, 1380 e 893 cm^{-1} são referentes ao isopreno. Assim quando se compara a BN pura com as membranas de BN/Ag é possível notar a permanência desses mesmos nos diferentes tempos de redução.

O pico em 3084 cm^{-1} é característico da deformação assimétrica da ligação C=C, em 2362 cm^{-1} mostra a presença de CO_2 na amostra, sendo este pico também apresentado pela borracha natural pura, porém em menor intensidade.

As frequências dadas em 1732 e 1738 cm^{-1} são atribuídos às ligações C=O de aldeídos e cetonas e C=O de éster, respectivamente [30, 87, 88, 89].

3.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Figura 41 apresenta as curvas referentes às medidas de DSC da membrana de BN pura e das membranas de BN/Ag.

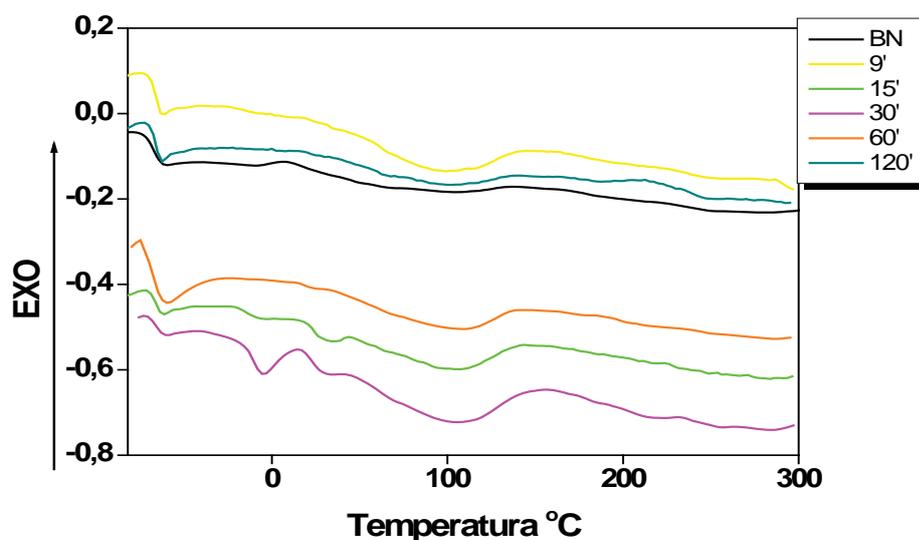


Figura 41 - Curva de DSC para as membranas de BN pura e em diferentes tempos de redução.

Um dos dados importantes que podemos analisar através da técnica de DSC é se houve modificações importantes na temperatura de transição vítrea (T_g) da amostra pura em relação à adição de algum componente a ela. Sendo assim, analisando as curvas, na faixa de temperatura de T_g , entre -63°C a -68°C para BN [32, 47, 86], nota-se que não há variações importantes nessa temperatura quando comparadas as membranas de BN puras às de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

Nota-se um padrão de variação endotérmica importante em torno de 98°C , presente em todas as membranas, tanto para BN pura quanto para as BN/Ag em diferentes tempos de redução, e a formação dessa curva endotérmica é devido à evaporação da água, que é bastante presente nas membranas [90,91,92,93].

3.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A difração de raios X foi utilizada com o intuito de investigar as possíveis fases cristalinas presentes na membrana de BN contendo prata e dar indícios de como o metal está estabilizado em meio ao polímero.

Como a concentração da solução utilizada para a obtenção das membranas de BN/Ag é muito baixa, conseqüentemente a concentração de nanopartículas na membrana também deverá ser baixa, podendo ficar abaixo da sensibilidade do método. Para serem observados picos de difração de uma determinada fase cristalina, a mesma tem que estar acima de 1% em massa do valor total do material analisado.

No entanto com a análise dos dados obtidos através dessa técnica, foi possível comprovar a presença de nitrato de prata na membrana de BN/Ag. A Figura 42 mostra os dados da difração tanto para a membrana de BN pura quanto para as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

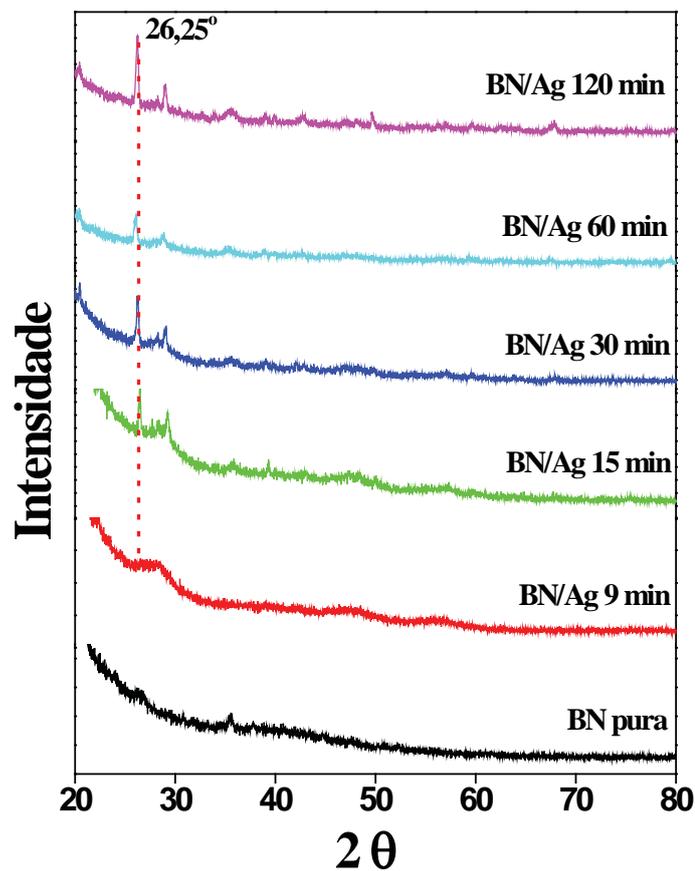


Figura 42 - Picos de difração de raio-X para membrana de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

Os dados representados na curva de BN pura são característicos de um material de baixa cristalinidade, típico do material polimérico utilizado. Nas curvas para as amostras de BN/Ag nos diferentes tempos é possível identificar um padrão de cristalinidade com picos

situados em $2\theta=26, 25^\circ$. Com base nas fichas de catalogação foi possível indexar estes picos como sendo característicos da fase nitrato de prata, a qual está presente nas membranas de BN/Ag. Em termos relativos, é possível observar que a amostra com maior tempo de redução, ou seja, 120 minutos, apresenta maior número de picos de reflexão assim como picos mais definidos e de maior intensidade indicando que nesta membrana deve haver uma maior quantidade de nitrato de prata cristalizado incorporado na mesma. Pelos dados de absorção no UV-VIS discutidos anteriormente, esta também foi a membrana que apresentou a maior intensidade de absorção e, portanto a maior quantidade relativa de prata reduzida. Desta forma, o maior tempo de exposição da membrana à solução de nitrato de prata leva também, além da formação de maior quantidade de nanopartículas de prata, maior incorporação do sal de prata cristalino. Nas medidas de DTG, também analisadas anteriormente, justamente a membrana com 120 minutos de redução apresenta maior desestabilização térmica, o que foi correlacionado com o excesso de Ag^+ no material. Estes íons prata realmente estão presentes no sistema na forma de nitrato ou mesmo coordenados provocando a saturação das ligações duplas das cadeias do polímero e também interagindo de alguma forma com os compostos mais reticulados da cadeia polimérica.

Desta forma, a presença desse sal na membrana indica que os íons presente na solução, são transferidos para a membrana. Ao submeter tais membranas ao processo de secagem os íons ali complexados interagem com o meio voltando a forma de sal.

3.7 PROCESSO DE SEPARAÇÃO

Depois de realizado todos os testes físicos, citados anteriormente, confirmando que há a incorporação de AgNPs nas membranas de BN, foram realizados os testes biológicos.

As membranas foram colocadas em contato com o meio de cultura contendo os parasitas de *L. braziliensis*. No meio de cultura os protozoários existem de forma mista, ou

seja, tanto na fase de amaduracimento proteico promastigota procíclica, quanto na promastigota metacíclicas, sem que se possa distingui-los.

Quando inserido ao meio de cultura, a membrana de borracha ainda pura, este se mantém inalterado, e segue se desenvolvendo normalmente. Já após a inserção das membranas de BN/Ag, com os diferentes tempos de redução, observa-se uma alteração no padrão de desenvolvimento da cultura, sendo que cada fase de vida do protozoário interage de forma distinta com tal membrana.

A Figura 43 ilustra através do sequenciamento das imagens, o processo de separação, no qual é colocada a membrana de BN/Ag dentro do meio de cultura contendo os protozoários de *L. Braziliensis*.

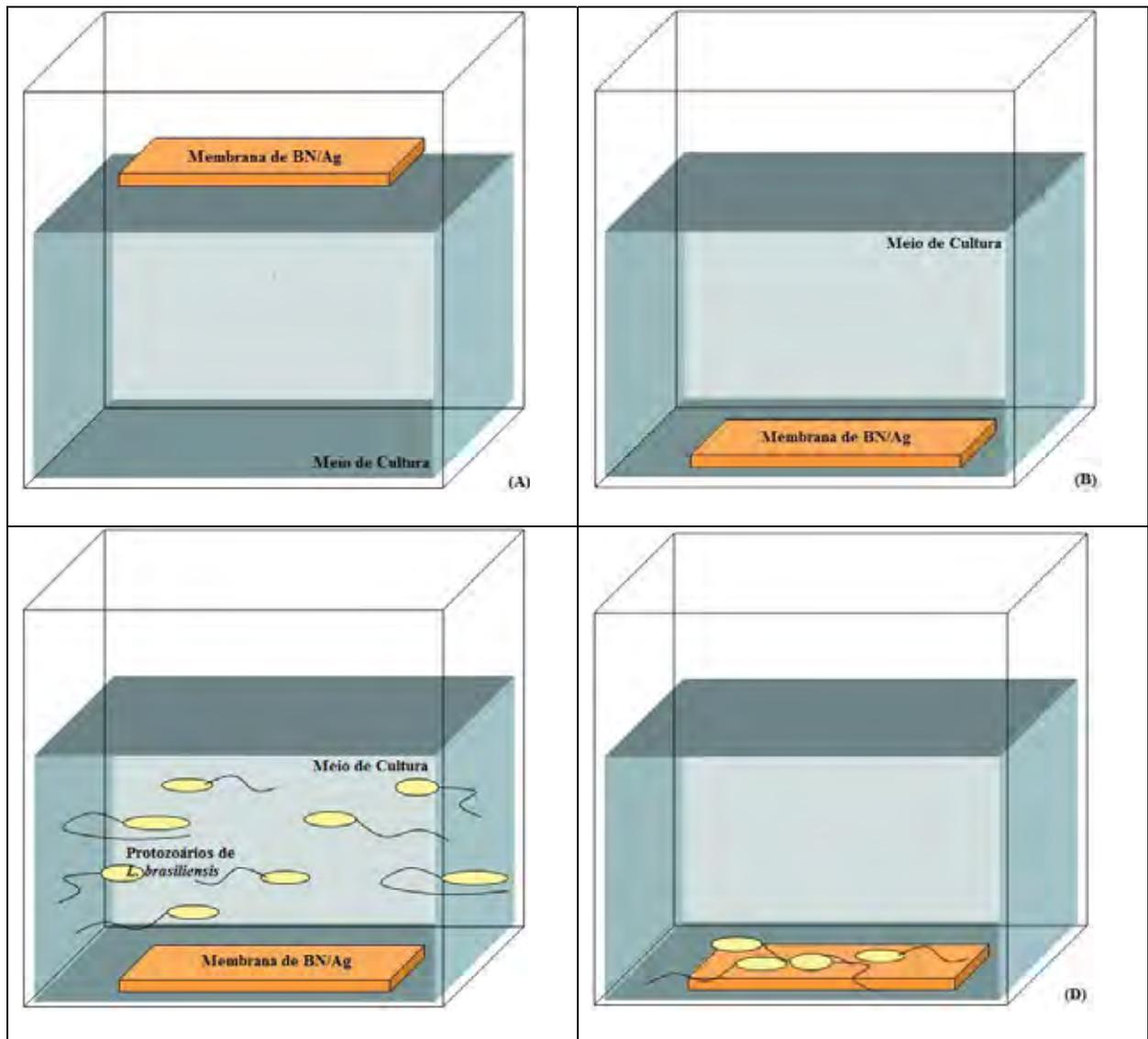


Figura 43 - Processo de Separação; (A) e (B) Membrana de BN/Ag colocada no meio de cultura; (C) Protozoários de *L. brasiliensis* no meio de cultura com as membranas de BN/Ag; (D) Protozoários aderidos à membrana de BN/Ag.

Devido às diferenças nas proteínas de superfícies dos protozoários nas distintas fases de amadurecimento, fase promastigota procíclica e metacíclica, a interação entre os parasitas e as membranas de BN/Ag dá-se de forma diferenciada.

Os parasitas que se encontram na fase procíclica, os quais apresentam baixo poder patogênico, ainda não passaram pela completa mudança em suas proteínas de membrana celular e interagem com as membranas de BN/Ag de forma que ficam aderidas em sua superfície sem que haja dano à estrutura celular, mantendo assim o parasita vivo.

Já as fases metacíclicas, com alto poder patogênico, apresentam diferenciação de suas proteínas de superfície, o que leva a uma possível interação dessas proteínas com íons de

prata presentes na membrana. Essa interação resulta na desnaturação das proteínas de superfície da membrana do parasita, além de influenciar, de maneira decisiva, no processo de respiração celular, eliminando então os parasitas que se apresentam nesta fase de amadurecimento metabólico.

3.8 CINÉTICA DE CRESCIMENTO POPULACIONAL *IN VITRO*

O gráfico apresentado na Figura 44 é referente ao crescimento populacional quando o parasita está no meio de cultura puro, o controle, quando está em contato com a membrana de BN pura, e em contato com a membrana de BN/Ag com o maior tempo de redução.

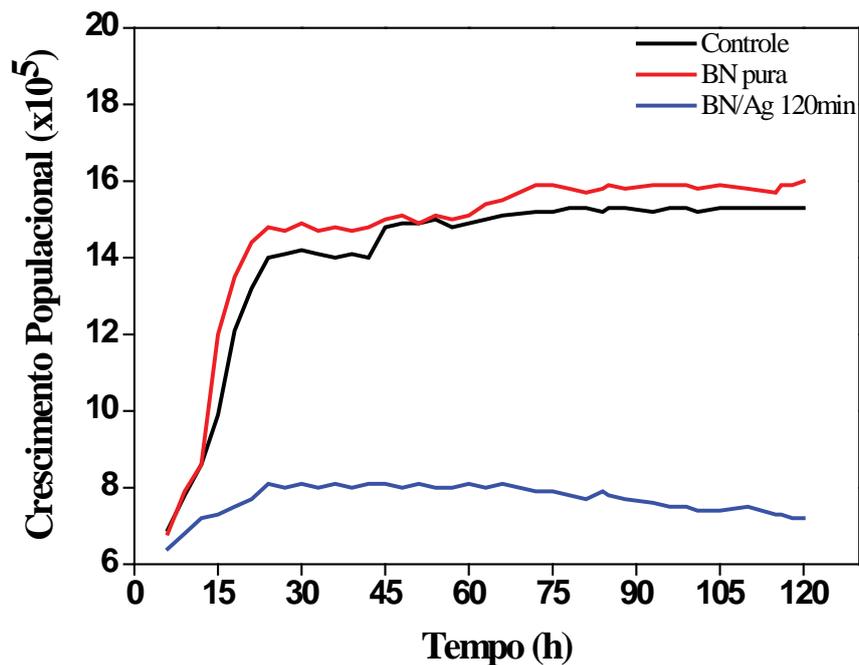


Figura 44 - Cinética de crescimento populacional.

Este acompanhamento foi feito inicialmente para confirmar se há ou não uma mudança no padrão de crescimento celular quando a membrana de BN/Ag entra em contato com o parasita.

Os resultados para o meio de cultura usual e com a presença da BN pura não se diferenciam de forma significativa, mostrando que a presença da BN pura não gera interferência no crescimento populacional dos protozoários.

Ao expormos o meio de cultura à membrana contendo a prata, tanto na forma de nanopartículas como na forma de sal, o crescimento populacional de parasitas sofre uma queda abrupta, mostrando, então, forte influência das AgNPs e do sal na mudança da cinética de desenvolvimento. Isso se deve ao fato de que o a prata na forma de nitrato ao entrar em contato com o meio de cultura, que é aquoso, pode estar liberando Ag^+ pela solubilização do nitrato incorporado na membrana.

Sabendo disso, o procedimento foi repetido utilizando as membranas de BN/Ag com diferentes tempos de redução e comparado com o resultado obtido para a membrana de BN pura. Os resultados dessa comparação são mostrados na Figura 45.

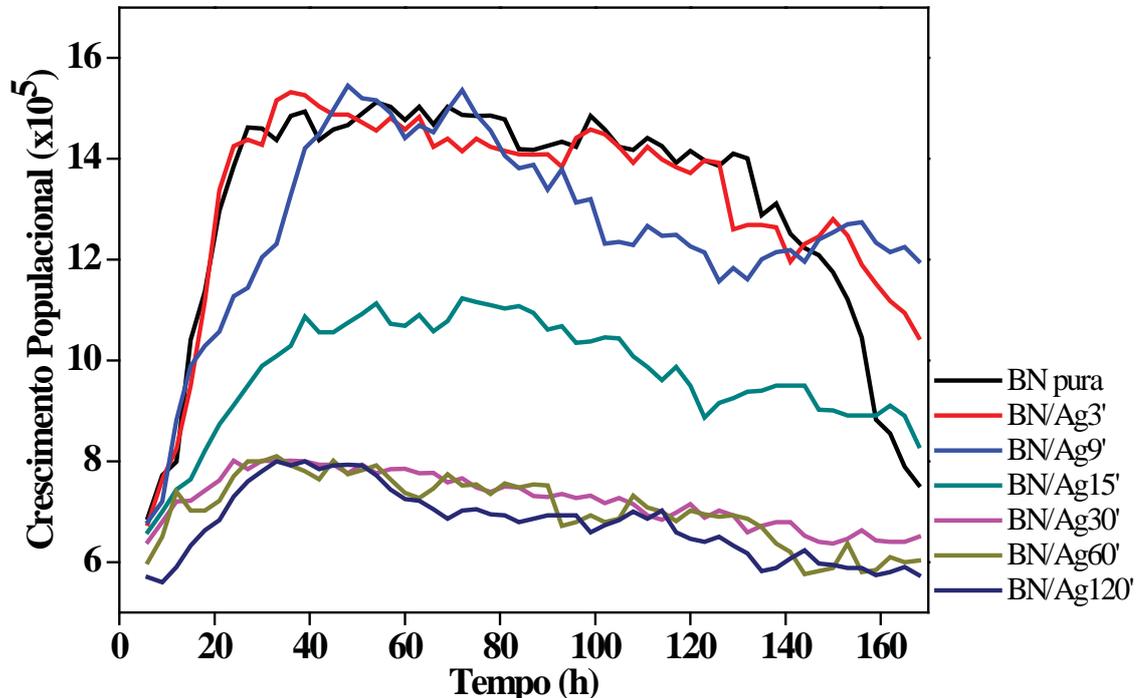


Figura 45 - Cinética de crescimento populacional em contato com as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

Comparando o crescimento populacional dos parasitas de *L. braziliensis* em contato com as membranas de diferentes tempos de redução, é possível observar que as membranas com maior tempo de redução são responsáveis pela maior diminuição populacional.

Isso pode estar relacionado ao fato de que, quanto maior o tempo de redução, maior será a concentração das nanopartículas na membrana e também de Ag^+ . Assim, mais íons de prata são liberados no meio e interagem com um número maior de células na fase metacíclica, gerando a morte das mesmas, justificando a queda de população, ou seja, membranas com maior tempo de redução são mais eficientes no processo de eliminação das fases infectantes dos protozoários.

Ao analisar as curvas de crescimento populacional nestas diferentes amostras nota-se um detalhe importante quanto à presença das três fases de crescimento microbiano, fases logarítmica, estacionária e fase *fall*. A fase logarítmica corresponde a um breve período do crescimento microbiano onde há uma massiva expansão da biomassa viva, pois o meio de cultura é riquíssimo em nutrientes. Já a fase estacionária é caracterizada apenas pelo amadurecimento celular sem uma variação considerável no número de indivíduos da população. Na fase *fall* existe uma queda progressiva no número de indivíduos na população celular, sendo justificado pelo aumento das substâncias tóxicas presentes no meio e uma importante redução na quantidade de alimento disponível na cultura.

Quando o parasita é exposto às membranas com maior tempo de redução, há uma tendência natural ao desaparecimento da última etapa e um prolongamento da fase estacionária. A fase estacionária é caracterizada pela estabilização metabólica do parasita, onde suas funções catabólicas estão bem definidas e este desempenho biológico só muda quando reduz os componentes nutricionais do meio – quando se inicia a fase de morte parasitária conhecida como fase *fall*.

Acredita-se que a presença da prata prorroga a fase estacionária de crescimento celular, inibindo assim o consumo de componentes do meio de cultura. Desta maneira, as características patogênicas, que tornam o parasita metacíclico, aparecerem de maneira mais evidente, evitando que estas células morram.

3.9 SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

A partir da quantidade de óxido nítrico (NO) sintetizado pelos macrófagos, que são as células de defesa do organismo, é possível avaliar o quão nocivo à célula é o protozoário em contato com a mesma.

A dosagem de NO sintetizada pelo macrófago na presença de promastigotas que estiveram em contato com as membranas de BN/Ag.

O resultado dessa dosagem é mostrado no gráfico da Figura 46.

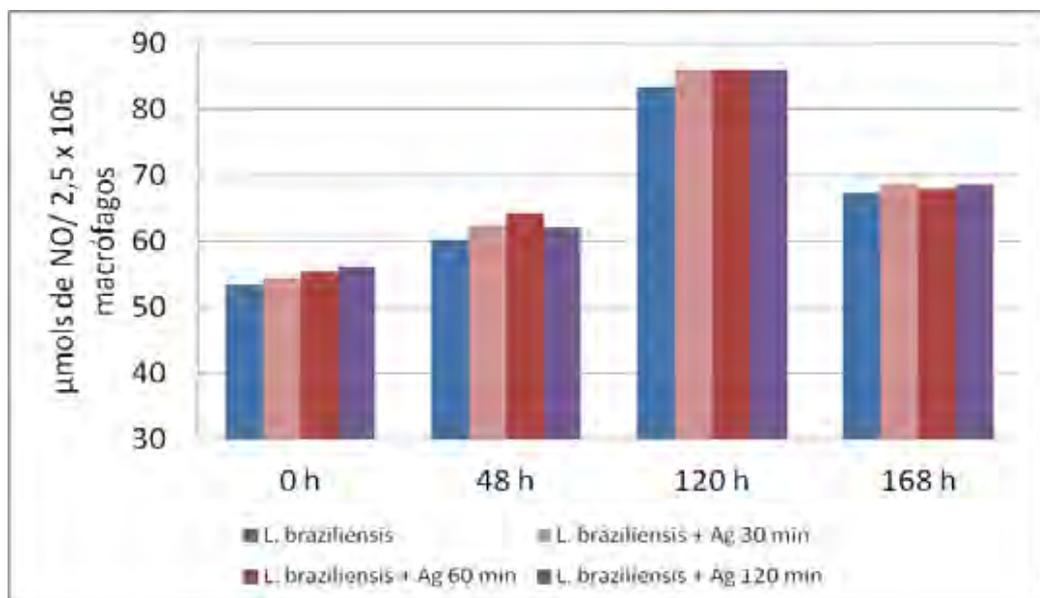


Figura 46 – Dosagem de óxido nítrico produzido pelo macrófago infectado com parasitas que estiveram em contato com as membranas de BN/Ag e grupo controle negativo.

Analisando os dados observa-se que há a produção de NO pelo macrófago. Isso é um fator que confirma células parasitárias que estiveram em contato com as membranas de

BN/Ag se mantêm vivas. Porém, o hospedeiro ainda é capaz de fazer o reconhecimento da célula invasora e se defender de maneira efetiva dos parasitas na fase metacíclica.

O máximo de produção de óxido nítrico se deu às 120 horas do início do contato entre a célula murina e o parasita em todas as amostras.

Os parasitas que estiverem em contato com as membranas de BN/Ag com maior tempo de redução, são responsáveis pelo aumento gradativo na síntese de NO. Sugere-se então, que os protozoários destas amostras tenham maior susceptibilidade à defesa imunológica inata. Isso quer dizer que eles têm uma menor habilidade de desviar da resposta de ataque vinda do hospedeiro e provavelmente morre na presença de um aporte celular completo de imunidade.

3.10 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS

A infecção animal foi feita de acordo com a seguinte divisão de grupos experimentais e controle, de forma a ficar estatisticamente significativo e bioeticamente preservado. A Tabela 5 mostra a distribuição dos grupos analisados.

Grupos analisados	Linhagem de camundongos isogênicos BALB/c	Linhagem de camundongos isogênicos C57BL/6
Grupo I: animais infectados com uma população mista de parasitas, sem separação.	5	5
Grupo II: animais infectados com parasitas adsorvidos à lã de vidro.	5	5
Grupo II: animais infectados com parasitas não adsorvidos à lã de vidro.	5	5
Grupo IV: animais infectados com parasitas adsorvidos á membrana BN/Ag.	5	5
Grupo V: animais infectados com parasitas não adsorvidos na membrana BN/Ag.	5	5
TOTAL	25	25

Tabela 5 - Distribuição do número de indivíduos por grupo que foi analisado nos testes de infectividade experimental in vivo.

O Grupo I apresentado na tabela, animais infectados com uma população mista de parasitas, não separada nem por cromatografia em lã de vidro nem por adsorção por BN/Ag, corresponde ao grupo controle positivo, pois apresentará os resultados previstos de qualquer infecção, sem que haja qualquer processamento prévio do parasita, portanto, no seu estado natural sem intervenção laboral.

Os Grupos II e III foram infectados por parasitas separados pelo processo de cromatografia em coluna de lã de vidro. Esse método de separação tem eficácia conhecida e apresenta dados estatísticos de fácil análise. Estes grupos foram utilizados como controle experimental para a comparação com o método de separação de membrana de BN/Ag.

Os Grupos IV e V são animais que foram infectados por frações separadas pelo método de separação utilizando as membranas de BN/Ag. Os dados obtidos a partir desses grupos correspondem aos dados novos, já que se trata da aferição de dados ainda não conhecidos em literatura especializada.

Ao infectar camundongos isogênicos de linhagens suscetíveis, como BALB/c, com parasitas obtidos através de métodos de fracionamento como é o caso da adsorção por membrana de BN/Ag e a cromatografia em coluna de lã de vidro observa-se os resultados apresentados na Figura 47.

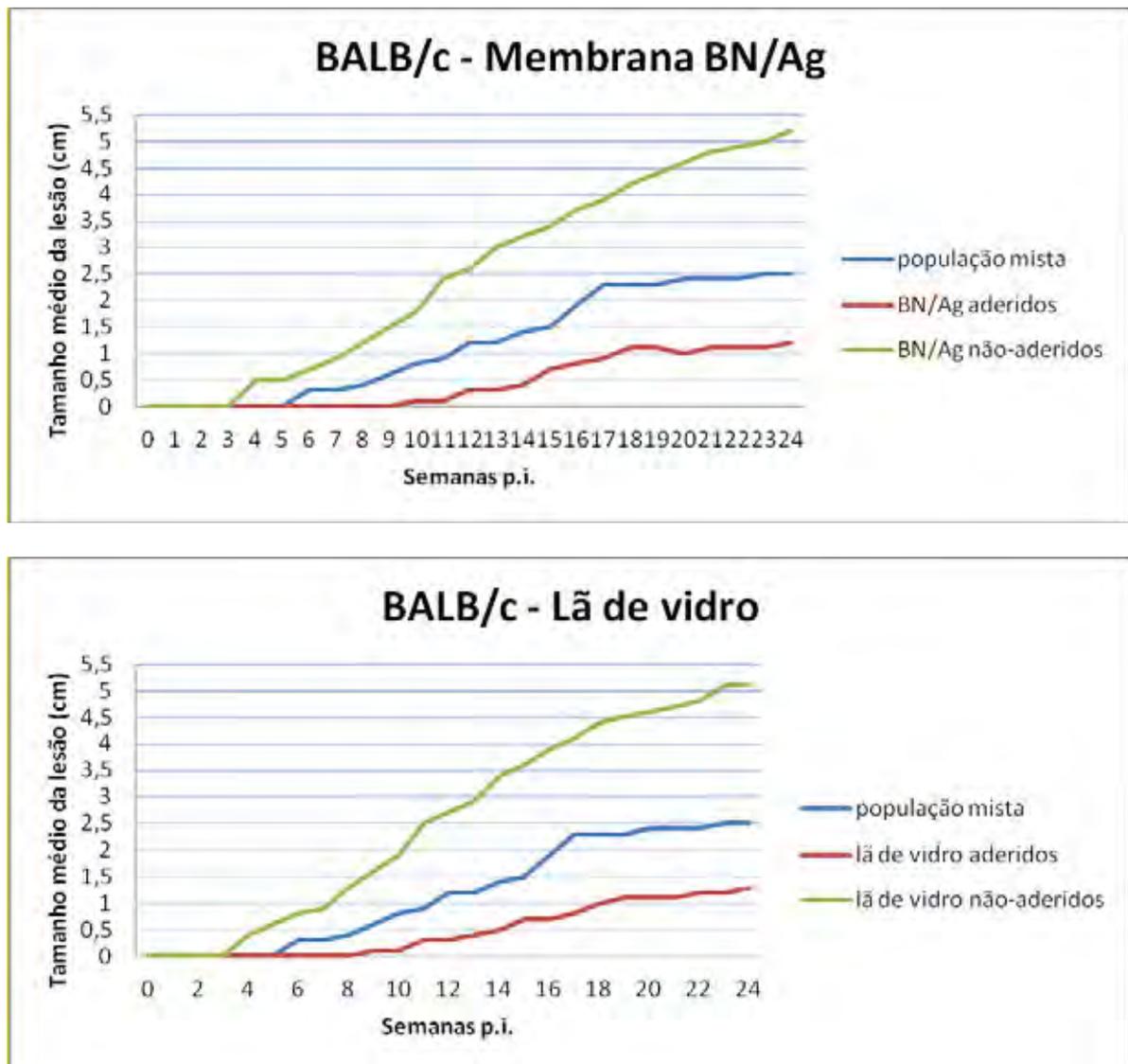


Figura 47 – Infecção experimental em grupos de camundongos isogênicos BALB/c expostos aos parasitas processados por adsorção em membrana de BN/Ag (A) e por cromatografia em coluna de lã de vidro (B).

Em uma análise global da Figura 47 é observado que existe uma similaridade entre as curvas de infectividade quando se descreve simplesmente o tamanho médio das lesões apresentadas. Isso fica claro quando se observa que sempre existirá o perfil de infectividade pelo grupo controle positivo, ou seja, que recebeu parasitas não-fracionados, intermediário às duas parcelas resultantes. Esse perfil demonstra que durante os dois processos de separação de parasitas, um grupo de protozoários apresenta uma virulência superior à outra, que inclusive se inicia mais tardiamente.

Como a literatura já descreve [60,59], na separação por cromatografia em coluna de lã de vidro, os parasitas que ficam aderidos à matriz sólida, apresentam baixa infectividade, sendo enquadrados como promastigotas procíclicas, da mesma forma como os parasitas que ficam adsorvidos em membranas BN/Ag.

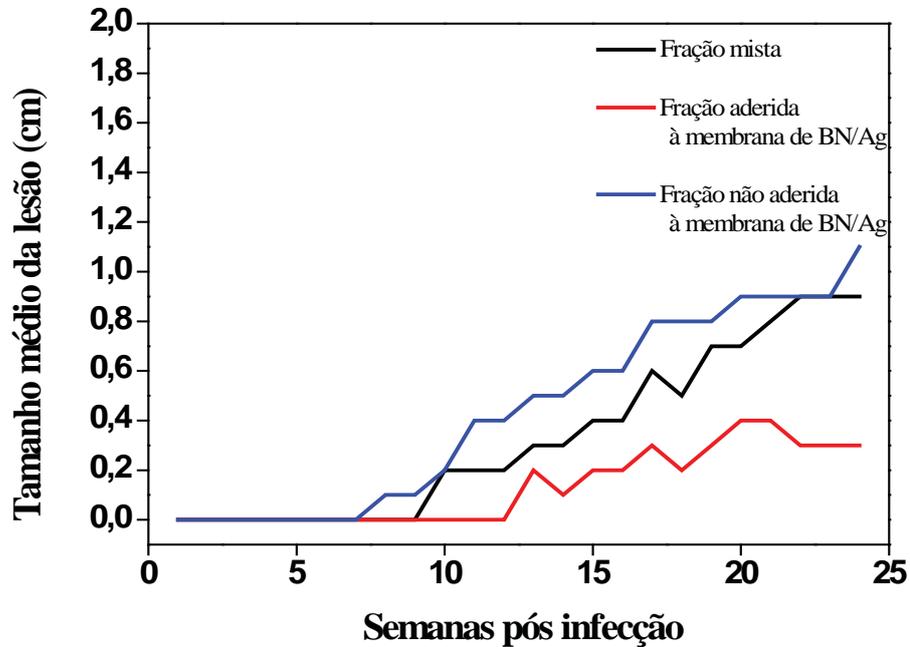
Igualmente, notamos que os parasitas não aderidos à lã de vidro, passando incólumes ao processo de separação apresentam alta infectividade, são enquadrados então como promastigotas metacíclicas, e este grupo seria equivalente ao grupo de parasitas que permaneceram vivos e eluídos no meio de cultura sem se adsorver a membrana de BN/Ag.

Olhando mais criticamente para estes resultados podemos chegar a conclusões ainda mais interessantes. Existe um desvio-padrão muito baixo para os valores médios encontrados nos tamanhos das lesões (cerca de 0,03 cm em geral para todos os grupos analisados), demonstrando que existiu uma homogeneidade considerável nos inóculos embutidos em cada animal utilizado nos grupos experimentais. Isso garante que tanto um método quanto o outro apresenta uma alta eficiência no processo de separação, já que não perde parasitas não-fracionados (o que seria uma população mista) durante sua execução.

Ao infectar camundongos isogênicos de linhagens resistentes, como C57BL/6, com parasitas obtidos através de métodos de fracionamento como é o caso da adsorção por

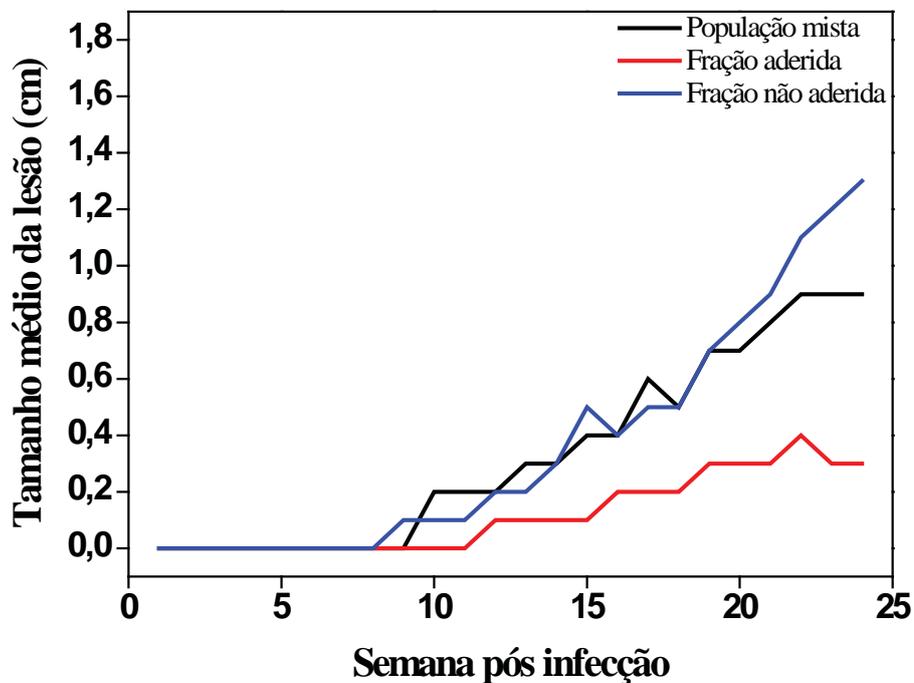
membrana de BN/Ag e a cromatografia em coluna de lã de vidro observamos os seguintes resultados:

Linhagem C57BL/6 infectada com frações em contato com as membranas de BN/Ag



(A)

Linhagem C57BL/6 infectada com frações em contato com a lã de vidro



(B)

Figura 48 - Infecção experimental em grupos de camundongos isogênicos C57BL/6 expostos aos parasitas processados por adsorção em membrana de BN/Ag (em A) e por cromatografia em coluna de lã de vidro (em B).

De maneira análoga ao que foi observamos na infecção experimental em camundongos isogênicos suscetíveis, encontramos respostas equivalentes com camundongos resistentes. A diferença é evidenciada no tempo de evolução da lesão que é mais tardia e também no tamanho médio das lesões, reforçando então que os métodos de separação de promastigotas são válidos [60, 64, 59].

Outro detalhe importante é que a amostra que não passou por fracionamento algum apresenta perfil de infectividade que se aproxima estatisticamente em vários pontos dos gráficos com o grupo que representaria a amostra mais infectante, o que demonstra que apesar de altamente infectante o grupo de promastigotas metacíclicas (obtidas tanto por cromatografia em lã de vidro quanto por adsorção em membrana BN/Ag) não sobrevivem eficientemente nos macrófagos de camundongos C57BL/6. Já os animais infectados com promastigotas procíclicas, nas últimas medições (por volta da 23^a e 24^a semana pós-infecção) apresentavam perfis de regressão das lesões.

3.11 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA

Os resultados mais significativos foram realmente os apresentados pela separação por adsorção de BN/Ag. O teste de hipersensibilidade tardia foi feito de acordo com a seguinte divisão de grupos experimentais e controle, de forma a ficar estatisticamente significativo e bioeticamente preservado. Na Tabela 3 estão apresentados grupos utilizados para a realização dos testes.

Grupos analisados	Hâmmsters do tipo champanhe
Grupo I: Antígeno extraído de população mista de parasitas não separados por adsorção por BN/Ag	6
Grupo II: Antígeno extraído de população de parasitas que ficaram adsorvidos pela membrana BN/Ag	5
Grupo III: Antígeno extraído de população de parasitas que não ficaram adsorvidos pela membrana BN/Ag	7
Grupo IV: Solução salina	6
Grupo V: Solução salina usada na lavagem nas membranas BN/Ag estéreis	6
TOTAL	30

Tabela 6 - Distribuição do número de indivíduos por grupo que foi analisado nos testes de hipersensibilidade tardia.

O Grupo I corresponde ao controle positivo do DTH, porque representa as circunstâncias em que os resultados seriam os ideais quanto a uma infecção habitual sem interferência de processos de separação.

Os Grupos II e III apresentados na tabela correspondem aos grupos experimentais, onde se testou a hipersensibilidade tardia dos animais à presença de parasitas separados e não-separados por membranas de BN/Ag.

Os Grupos IV e V representam os controles negativos (ambos sem antígenos parasitários): um sem nenhum produto reativo (somente a solução salina) e outro contendo no máximo fragmentos ou nanopartículas soltas das membranas de BN/Ag estéreis.

Essa diferença quanto ao número de animais testados corresponde diretamente ao grau de dificuldade de se adquirir biomassa para geração dos antígenos. O Grupo III apresenta um número maior de animais testados baseando-se no fato de que a prata se mostra tóxica às promastigotas livres no meio de cultura antes de coletá-las.

O teste de hipersensibilidade tardia (DTH) em hâmmsters foi feito com o intuito de detectar possíveis respostas alergênicas destes animais com sistema imunológico completo à membrana de BN/Ag ou então a complexos formados após a adsorção. Desta forma, ao comparar a enduração dos coxins das patas traseiras, direita (com o inóculo testado) com a esquerda (com solução salina) podemos analisar o quanto tais materiais são tóxicos ou estimulam a ação do sistema imunológico [60, 59, 67].

Para garantir que não haveria resposta imune ao ataque parasitário, todas as amostras vivas de promastigotas selecionadas foram fragmentadas pela ação do nitrogênio líquido, preservando apenas algumas características de superfície de suas células.

A presença de um grupo controle negativo (como o que só recebe solução salina em ambas as patas) serve para criar uma linha-base de corte para possível enduração provocada pela entrada da agulha da injeção. Desta forma, analisamos somente resultados referentes à hipersensibilidade tardia gerada diretamente pelas amostras consideradas experimentais.

A Figura 49 mostra o perfil geral do teste e a positividade encontrada durante todo o período de análise, que foi de uma semana:

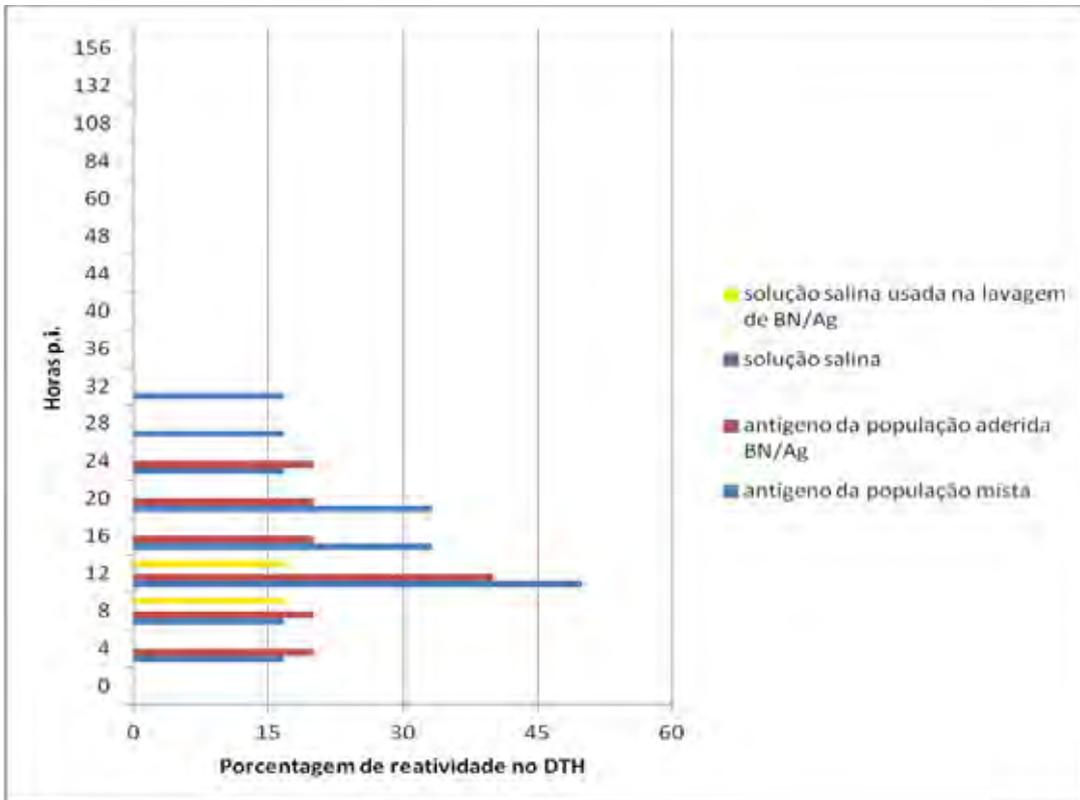


Figura 49 - Resultados dos testes de hipersensibilidade tardia (DTH) nos principais grupos controle e experimental no decorrer de todo o período de análise (uma semana).

Como se espera, o grupo controle negativo contendo somente solução salina não apresentou nenhum grau de reação, permanecendo durante todo o período com 0 % de reatividade.

Os resultados só podem ser percebidos a partir da primeira medição (na 4ª hora pós-inoculação) e mesmo assim não é evidente em todos os grupos. Nota-se, por exemplo, que a solução salina de lavagem das membranas BN/Ag estéreis apresentaram endureção durante dois momentos, justificando a toxicidade apresentada basicamente por nanopartículas de prata ou seus conjugados com a borracha natural junto ao tecido conjuntivo dos coxins traseiros dos hamsters.

Foi feita ainda uma observação quanto às duas amostras que apresentam antígenos de *Leishmania*, uma amostra processada e outra não-processada. Observa-se, especificamente ao comparar esses dois casos, que a amostra processada apresenta uma endureção menor que a amostra de população *in vitro* mista não-processada. Não só, a porcentagem de animais positivos para esse teste foi maior entre os que entraram em contato com antígenos totais de *Leishmania*, como também a endureção aconteceu por mais tempo.

Os parasitas processados pela membrana de BN/Ag apresentavam antígenos de superfície diferentes dos antígenos totais encontrados na população mista, caracterizados assim como antígenos procíclicos que geram respostas de baixa hipersensibilidade tardia.

Mesmo assim, é importante destacar que em todos os grupos analisados até aqui, não apresentou positividade superior a $46 \pm 2\%$, o que significa que existe baixa responsividade à estes antígenos criopreservados. E isso, sob o ponto de vista médico, é considerado bom, já que desencadeia resposta imunológica sem provocar efeitos colaterais indesejáveis, quando inoculados como justificativa vacinal.

Analisando em detalhes, agora, só as amostras experimentais durante os períodos de resposta ao teste de hipersensibilidade tardia, pode-se tirar algumas conclusões interessantes.

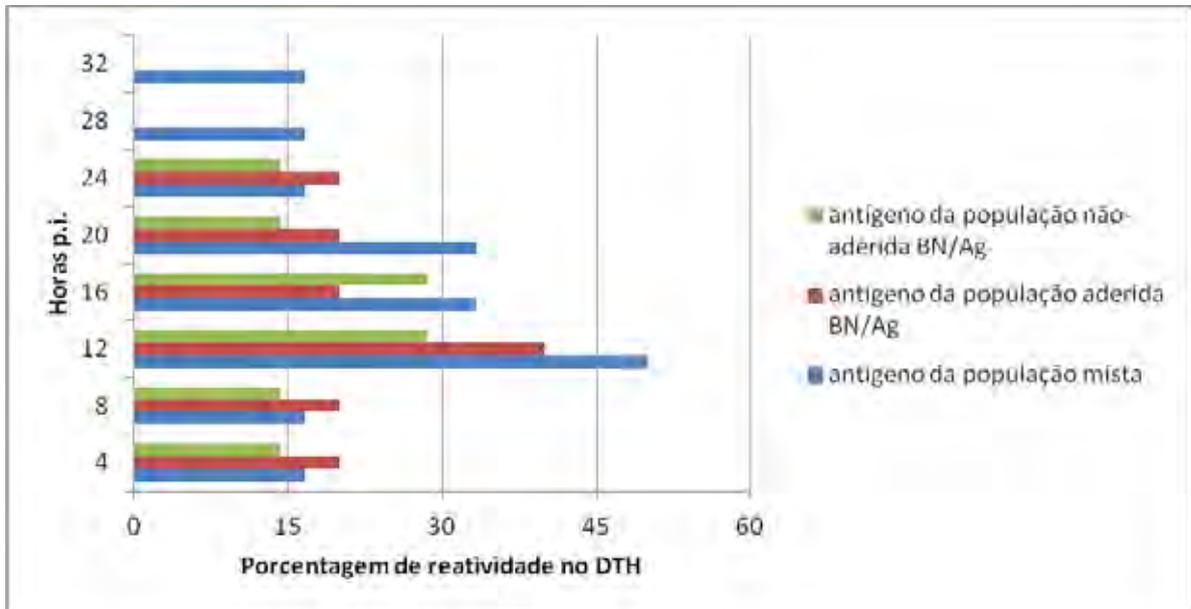


Figura 50 - Resultados dos testes de hipersensibilidade tardia (DTH) dos principais grupos experimentais durante apenas o período em que apresentou-se positividade para o teste.

Em uma análise da Figura 50, vê-se que existe uma maior positividade ao teste DTH quando a amostra recebida pelo hêmster são antígenos totais não-processados e, que, quando os parasitas são fracionados em dois grupos antes de serem convertidos à antígenos, eles acabam gerando uma resposta menos intensa nos testes de hipersensibilidade tardia.

Nos antígenos de promastigotas aderidas à membranas de BN/Ag, ou seja, de promastigotas com características tipicamente procíclicas, o pico de positividade acontece às 12 horas pós-inoculação e permanece constante até as 24^a hora p.i., quando ela desaparece totalmente.

Algo bem parecido ocorre com os antígenos de promastigotas que não-aderiram à BN/Ag, ou seja, de promastigotas com características tipicamente metacíclicas; o diferencial fica por conta do avanço do tipo de positividade e que na maioria dos instantes marcados essa porcentagem é inferior à endureção encontrada na amostra que estava aderida à membrana de BN/Ag.

Novamente, destacamos que o processamento dos parasitas e a possível presença de membranas de BN/Ag no meio de cultura ou aderidos à superfície do microorganismo faz com que a resposta cesse mais rapidamente e justificamos que talvez seja porque a via de resposta imunológica segue outro trajeto de intervenção e eliminação de corpos estranhos no organismo que não seja a via celular de defesa, como por exemplo, a ação de anticorpos e interleucinas inflamatórias [60, 59, 70].

CAPITULO 4 – CONCLUSÕES

Para este trabalho foi realizado e apresentado um estudo bibliográfico referente ao tema do projeto, tais como: borracha natural, nanopartículas de prata, protozoários de *L. braziliensis* e métodos de separação, tendo como objetivo principal confirmar a eficácia do método de separação utilizando as membranas de BN/Ag.

A interação das nanopartículas com a membrana de BN ocorre apenas após a imersão da membrana na solução contendo o sal de prata, assim é possível dizer que o fator desencadeante da síntese das AgNPs ocorre com a liberação de alguns componentes da membrana em solução, fazendo com que haja um recobrimento desta membrana por nanopartículas. Não é observada a presença de nanopartículas em solução, apenas nas membranas.

Nos espectros de absorção obtidos pela técnica de UV-VIS foi possível confirmar que a composição da membrana de BN induz à formação das nanopartículas de prata. Essa confirmação se dá pelo fato do aparecimento das bandas referentes ao *plasmon* de superfície, característicos da presença de partículas metálicas, no caso da prata, bandas de absorção com maior intensidade para comprimentos de onda por volta de 420 nm.

Em relação à variação na intensidade de absorbância é possível concluir que aumento no tempo de redução gera um aumento na concentração das AgNPs na superfície da membrana de BN. E ainda que o surgimento de bandas mais largas possa estar relacionado com a distribuição irregular no tamanho ou agregação das nanopartículas.

Foi possível fazer uma estimativa de tamanho da AgNPs, relacionando os comprimentos de ondas característicos das partículas de prata. Assim pode-se concluir que as partículas apresentam um formato esférico com diâmetro variando entre 35 a 50 nm.

Através dos resultados obtidos com as análises térmicas é possível notar que as membranas de BN/Ag com tempos de redução até 60 minutos apresentam boa estabilidade térmica da temperatura ambiente até 300° quando comparadas às membranas de BN pura.

Assim, mesmo que as nanopartículas interajam com as membranas de BN, elas não modificam as características estruturais do polímero, tendo em vista que, para diferentes tempos de redução as temperaturas de transição vítrea e degradação térmica se mantiveram sem alterações significativas, sendo estas propriedades intrínsecas da borracha natural.

No caso das membranas de BN/Ag com 120 minutos de redução a concentração das partículas de prata influenciam de forma a diminuir a temperatura de decomposição dos constituintes poliméricos da borracha, causando a desestabilização térmica da mesma.

Com as análises feitas por difração de raios X foi possível constatar a presença do nitrato de prata na membrana de BN/Ag. O aumento no tempo de redução leva a uma maior concentração de íons Ag na membrana que ao final do processo de secagem, contém uma maior concentração de nitrato de prata.

O sal presente na membrana sofre dissociação quando essas são colocadas em meio aquoso novamente, no meio de cultura. Esse fator faz com que haja a liberação de íons de prata no meio de cultura. Sendo estes íons os responsáveis pela morte celular de uma das fases de vida dos protozoários.

Durante a realização dos testes biológicos, foi possível constatar que as membranas de BN/Ag, ao serem colocadas no meio de cultivo dos protozoários, são capazes de separá-los sem matar a população por completo, sendo capazes de eliminar apenas as células que completaram seu ciclo celular de amadurecimento e que já se tornaram altamente infectante para os hospedeiros. Já as células ainda imaturas, que não são capazes de gerar a doença, mantêm sua estrutura protéica inalterada, sendo mantidas vivas. Esse processo é o

que gera a biomassa importante para um futuro estudo focando a fabricação da vacina contra a doença.

O passo seguinte foi analisar a infecção animal, utilizando camundongos com perfis imunológicos modificados, camundongos isogênicos, com as frações de parasitas obtidas pelos dois métodos de separação. A infecção da primeira linhagem, os camundongos BALB/c, mais suscetíveis a infecções, mostram que as frações separadas pelos métodos que estão sendo comparados, são capazes de gerar lesões que apresentam baixo desvio padrão em relação aos tamanhos. Na infecção da linhagem mais resistente, os C57BL/6, também é possível notar o surgimento da lesão, porém de maneira tardia que na outra linhagem, isso indica que a defesa imunológica dos C57BL/6 é mais eficaz no ataque do parasita, o que era esperado. Contudo, esses resultados são importantes para mostrar que o processo de separação utilizando as membranas de BN/Ag é capaz de separar frações de parasitas infectantes das não infectantes de maneira eficaz quando comparado ao método já existente, o de lã de vidro, pois nos dois métodos é possível observar o surgimento da lesão.

Através da análise do teste de hipersensibilidade tardia pode-se concluir que os parasitas processados quando transformados em antígenos geram resposta alérgica diferenciada. Nos grupos de antígenos total a resposta alérgica é superior ao encontrado no grupo de antígenos de parasitas procíclicos, sendo uma vantagem a sua utilização como inóculo vacinal com baixos efeitos colaterais.

Sendo assim, o método de separação de promastigotas por adsorção às membranas de BN/Ag comparado a outros métodos clássicos aplicados à *L. braziliensis*, tendo a vantagem de ser mais rápido, exigir menor esforço técnico de execução, gera menos resíduos tóxicos e ainda, sintetiza uma biomassa vacinal com altíssima pureza.

REFERENCIAS

-
- [1] SANTOS, G. R.; MOTHÉ, C. Prospecção e perspectivas da borracha natural, *Hevea brasiliensis*. *Analytica* v. 26, p. 32-40, 2006.
- [2] LEBER, A. P. Overview of isoprene monomer and polyisoprene production processes. *Chemico-Biological Interactions*, 135-136, 169-173, 2001.
- [3] HERCULANO, R. D. Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas. Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia, 2009.
- [4] ALFREY, T., GURNEE, E. F.; *Polímeros Orgânicos*. São Paulo, Edgard Blücher, 1971.
- [5] REZENDE, D. A.; LOPES, L. A Extraordinária História da Borracha, 2º Semana de Polímeros, 2008.
- [6] A Importância da Borracha Natural. Web site: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php>. Acesso em :02/03/2012.
- [7] Rota Brasil Oeste. Brasil responde apenas por 1,3% da produção mundial de borracha. Web site. <http://www.brasiloste.com.br/noticia/1038/>. 2004. Acesso em: 10/06/2011.
- [8] BARBOSA-FILHO, C.G. ; CABRERA, F. C. ; SANTOS, R. J. ; Saez, J. A. S. ; JOB, A. E. . The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania braziliensis*. *Experimental Parasitology*, 2011.
- [9] ABU BAKAR, N.H.H.; ISMAIL,J.; ABU BAKAR, M. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in natural rubber. *Materials Chemistry and Physics*, 104, 276 - 283, 2007.
- [10] External Review Draft: Nanomaterial Case Study: Nanoscale Silver in Disinfectant Spray, United States Environmental Protection Agency, 2010.
- [11] HAILE, T., et al. Mechanistic study of the bactericidal action of silver-loaded chabasite on *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Microporous and Mesoporous Materials*,127, 32-40, 2010.
- [12] SANPUI, P.; et al. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*,124, 142-146, 2008.
- [13] LI Q., et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research*, 42, 4591-4602, 2008.
- [14] MORONIS, J. R., et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 10, 2346-2353, 2005.
- [15] SUM, R. W. Y.; et al. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *The Royal Society of Chemistry*, 40, 5059-5061, 2005.
- [16] NETO, E. A. B.; CAUE, R.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens. *Comunicado Técnico* 99, 1, 300, 1-4, 2008. Disponível <<http://www.clickciencia.ufscar.br/portal/edicao19/Artigo.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2010.
- [17] FONG J, WOOD F, FOWLER B. A silver coated dressing reduces the incidence of early burn wound cellulitis and associated costs of inpatient treatment: comparative patient care audits. *Burns*, 31, 5, 562 - 567, 2005.
- [18] MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Jornal of Nanoparticles Research*, 10, 507 - 517, 2008.
- [19] TATO, L. M. P.; et al. Visceral childhood leishmaniasis: diagnosis and treatment. *Anales de Pediatría*, 72, 347-351, 2010.KASTHURI, J.; VEERAPANDIAN, S.; RAJENDIRAN N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agente. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 55 - 60, 2009.
- [20] Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

-
- [21] GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8, 4, 419-433, 2010.
- [22] SPÄTH, G. F.; et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 97, 9258-9263, 2000.
- [23] SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 69, 100-103, 1989.
- [24] REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Jornal of Clinical Microbiology*, 45, 21-25, 2007.
- [25] YAO, C. DANIELSON, J. E. WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology* 132, 1, 1-16, 2003.
- [26] LOPEZ-JARAMILLO, P., et al. A controlled, randomized-blinded clinical trial to assess the efficacy of a nitric oxide releasing patch in the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (V.) panamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 1, 97-101, 2010.
- [27] BELKAID, Y., et al. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 97, 12, 6704-6709, 2000.
- [28] ADIWILAGA, K.; KUSH, A. Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Plant Molecular Biology*, 30, 935, 1996.
- [29] BLOG DA GEO - Investimentos na heveicultura devem aumentar, <http://geoamb.wordpress.com/2010/12/16/investimentos-na-heveicultura-devem-aumentar>, Acesso em: 10/02/2011.
- [30] AGOSTINI, D. L. S. Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese. Dissertação aprovada na área Materiais Poliméricos, Híbridos e Nano-Estruturados no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, POSMAT, 2009.
- [31] SITTICHAYA, W.; BEAVER, R. Rubberwood-destroying beetles in the eastern and gulf areas of Thailand (Coleoptera: Bostrichidae, Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Songklanakarin Journal Science and Technology*, 31, 4, 381-387, 2009.
- [32] DALL'ANTONIA, A. C. et al; Avaliação de clones de borracha natural crua por ensaios padrão e análise dinâmico-mecânica de polímeros: *Ciência e Tecnologia*, 16, 3, 239-245, 2006.
- [33] WITITSUWANNAKUL, R. et al. A rubber particle protein specific for *Hevea latex* lectin binding involved in latex coagulation. *Phytochemistry*, 69, 1111-1118, 2008.
- [34] F.C. Cabrera, P.H.B. Aoki, R.F. Aroca, C.J.L. Constantino, D.S. dos Santos, A.E. Job. Portable smart films for ultrasensitive detection and chemical analysis using SERS and SERRS. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011.
- [35] LEE, L. J. Polymer Nanoengineering for Biomedical Applications. *Annals of Biomedical Engineering*, 34, 1, 75 - 88, 2006.
- [36] LANGER, R., AND N. A. PEPPAS. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *Aiche Journal*. 49, 12, 2990 - 3006, 2003.
- [37] HERCULANO, R. D., et al. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). *Materials Research*, 12, 253-256, 2009.
- [38] EFFENHAUSER, C. S., et al. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Analytical Chemistry*, 69, 17, 3451 - 3457, 1997.
- [39] CHOU, H.-P., SPENCE, C.; SCHERER, A., QUAKE, S. A microfabricated device for sizing and sorting DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 1, 11-13, 1999.
- [40] NAKAYAMA, Y. et al. Surface microarchitectural design in biomedical applications: *In vivo* analysis of tissue ingrowth in excimer laser-directed micropored scaffold for cardiovascular tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51, 520-528, 2000.

-
- [41] MRUÉ, F. Neoformação tecidual induzida por biomenbrana de látex natural com polilisina. [tese] – Ribeirão Preto (SP): Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, 2000.
- [42] FREITAS, M. A. S. Uso de próteses do composto de látex natural em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães. Tese de doutorado aprovado na área de Pós Graduação em Cirurgia da FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2001.
- [43] ERENO C., et al Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 95, 3, 932 - 939, 2010.
- [44] MENDONÇA, R. J, MAURÍCIO, V. B.; TEIXEIRA, L. D. E. B.; LACHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Phytoterapy research*, 24, 5, 764-768, 2010.
- [45] ZIMMERMANN, M ; et al. Teste de Biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães.. *Ciência Rural*, 37, 1719 - 1723, 2007.
- [46] REIS, E.A.P.; BUDEMBERG, E. R.; JOB, A. E. Estudo das propriedades térmicas utilizando dsc, dma e tg, dos compósitos obtidos através da mistura de borracha natural com raspa de couro. In: VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, 2010, São Pedro-SP. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria-Livro de Resumos, 2010.
- [47] RIPPEL. M. M.; BRAGANÇA. F. do C. Borracha Natural e nanocompósitos com argila. *Quimica Nova*, 32, 3, 818-826, 2009.
- [48] PAZ Jr. E. M., et al. Avaliação de Compostos de Borracha Natural Utilizados em Equipamentos de Segurança. *Polímeros*, 20, 3, 236-239, 2010.
- [49] FONG, J.; WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 4, 441 - 449, 2006.
- [50] CAMPOS, D. L. P. et al. Uso de curativo com prata nanocristalina sobre enxerto em malha em queimaduras colonizadas por cepas multirresistentes. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 24, 4, 471-478, 2009.
- [51] KIM, J. KWON, S. OSTLER, E. Antimicrobial effect of silver-impregnated cellulose: potential for antimicrobial therapy. *Journal of Biological Engineering*, 3, 20, 2009.
- [52] NETO, E. A. B. Desenvolvimento de nanocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas. Dissertação de Mestrado em Ciências – Área de concentração: Física Aplicada, Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.
- [53] SHAHVERDI, A. R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H. R.; MINAIAN, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3, 168-171, 2007.
- [54] SICHANI, G. N.; et al. *In Situ* Preparation, Electrospinning, and Characterization of Polyacrylonitrile Nanofibers Containing Silver Nanoparticles, *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 2, 1021-1029, 2010.
- [55] PREMA, P.; RAJU, R. Fabrication and Characterization of Silver Nanoparticle and its Potential Antibacterial Activity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 6, 842-847, 2009.
- [56] LEE, S. M.; SONG, K. C.; LEE, B. S. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27, 2, 688-692, 2010.
- [57] SONAI, G. G. - Preparação e caracterização de nanopartículas de Prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone contendo $\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$ para fim antimicrobiano, Trabalho de conclusão de curso – UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- [58] WIJNHOFEN, S. W. P. et al. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 2009; 3, 2; 109-138.
- [59] BARBOZA-FILHO, C. G. Análise Imunológica de promastigotas metacíclicos de *Leishmania major* purificados por cromatografia em coluna de lã de vidro. Dissertação aprovada na área Análise Imunofarmacêutica de infecções tropicais no Programa de Pós-Graduação em Biociência aplicada às Ciências Farmacêuticas (antigo-Análises Clínicas), 2006.

-
- [60] DÓREA, R. C. C., et al. W. Behavior of *Leishmania major* metacyclic promastigotes during course of infection and immune response development in resistant versus susceptible hosts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 1, 7-20, 2003.
- [61] MIRANDA, S., et al. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allupurinol. *Veterinary Parasitology*, 144, 251-260, 2007.
- [62] PINHO, R. T., et al. A glass-wool based method for purifying *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes and identification of an epimastigotes-specific glass adherent surface peptide. *Acta Tropica*, 50, 29-38, 1992.
- [63] EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24, 3, 335-340, 2010.
- [64] ALMEIDA, M. C. Infective inoculum for *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, 18, 4, 154-155, 2002.
- [65] LIMA, M. I. S., Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime. *Archives Toxicology*, 84, 3, 227-232, 2010.
- [66] KOHRI, M; SATO, M; ABO, F; INADA, T; KASUYA, M; TANIGUCHI, T; NAKAHIRA, T - Preparation and lectin binding specificity of polystyrene particles grafted with glycopolymers bearing S-linked carbohydrates. *European Polymer Journal* 47 (12): 2351-60, 2011.
- [67] ALMEIDA, M. C. Infective inoculum for *Leishmania*. *Trends in Parasitology* (18) , 154-155, 2002.
- [68] SILVA-LÓPEZ, R E - Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova* 33 (7): 1541 – 48, 2010.
- [69] PICCOLI, A K; ALEGRETTI, A P; SCHNEIDER, L; LORA, P S; XAVIER, R M - Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 na artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia* 51 (5): 503 – 510, 2011.
- [70] SACKS, D L and MELBY, P - Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Current Protocols* 19 (2) 435-40, 2001.
- [71] AGOSTINI, D. L. S.; Tese de Mestrado, Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese - Presidente Prudente: 87 f., 2009, Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia FCT/UNESP.
- [72] KLABUNDE, K. J. *Nanoscale materials in chemistry*, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001;
- [73] GENTRY, S. T.; FREDERICKS, S. J.; KRCHNAVEK, R. Controlled particle growth of silver sols through the use of hydroquinone as a selective reducing agent. *Langmuir* 2009, 25, 2613-2621.
- [74] LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A. da; BIANCHI, R. A. C. Um sistema para contagem semi-automática de microorganismos. *Revista pesquisa e tecnologia FEI, São Bernardo do Campo*, 26, 36-40, 2004.
- [75] STORER J. B. (1966) Longevity and gross pathology at death in 22 inbred strains of mice. *J. Gerontol.* 21, 404-409.
- [76] McCLEAN G. E., WILSON J. R., and MEREDITH W. (1970) The use of isogenic and heterogenic mouse stocks in behavioral research, in *Contribution to behavior genetic analysis. The mouse as a prototype* (LINDZEY G. and THIESSEN D. D., eds), pp. 3-32. Appleton-Century-Crofts, New York.
- [77] QUEIROZ, S. L. ; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quím. Nova* vol.22 n.4 São Paulo July/Aug. 1999.
- [78] FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Revista Associação Médica Brasileira*, 46, 3, 265-271, 2000.
- [79] COSTA, M. T. et al Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciências Rural*, 33,5; 967-974; 2003.
- [80] NAIK, R. R ; STRINGER, S.J.; AGARWAL, G.; JONES, S.; STONE, M. O. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nature Materials*, 1, 169-172, 2002.
- [81] AHMAD, N. et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 81–86, 2010.

-
- [82] NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *Journal of Physical Chemistry. C*, 111, 3806- 3819, 2007.
- [83] SOLOMON, S.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAN, A.; RUTKOWSKY, S.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. *EUA: Journal of Chemical Education* • Vol. 84 February 2007 No. 2 . p. 322.
- [84] RIPPEL, M. M. Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural, Tese (Doutorado em Ciências na área de Físico-Química) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química- UNICAMP – Campinas, SP, 2005.
- [85] LI, S. D.; YU, H, P.; ZHU, C.S., LI, P. S. Study on thermal degradation of sol and gel of natural rubber. *Journal Applied. Polymer. Science*, 75, 1339-1344, 2000.
- [86] SIRCAR, A.K. Characterization of isomeric estomers using thermal analysis. *Journal of Thermal Analises*, 49, 293-301, 1997.
- [87] VERNOOIJ, E.A.A.M., KETTENES-VAN DEN BOSCH, J.J., CROMMELIN, D.J.A. Fourier transform infrared spectroscopic determination of de hydrolysis of poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine-containing liposomes. *Langmuir*, v. 18, p. 3466-3470 2002.
- [88] HEALEY, A. M.; HENDRA, P. J.; WEST, Y. D.; *Polymer*, V. 37, N. 18, 4009 - 4024, 1996.
- [89] NALLASAMY, P.; MOHAN, S.; *The Arabian Journal for Science and Engineering*, V. 29, N. 1^a, 2004.
- [90] RIPPEL, M.M.; LEE, L.; LEITE, GALEMBECK, F. Skim and cream rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 268, 330-40, 2003.
- [91] BURFIELD, D.R., LIM, K.L. Differential scanning calorimetry analysis of natural rubber and related polysoprenes – measurement of glass transition temperature. *Macromolecules*, 16, 1170-1175, 1983.
- [92] LOADMAN, M.J.R. The glass transition temperature of natural rubber. *Journal Thermal Anal*, 30, 929-941, 1985.
- [93] CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. P.; Temperature-Induced Phase Transitions of the Ordered Superlattice Assembly of Au Nanoclusters; *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 2552-2558, 2005.