



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Síntese e caracterização de hidrogéis de poli (*n*-vinil-2-pirrolidona)
contendo nanopartículas de prata e argila laponite rd para modulação da liberação de
neomicina**

VINICIUS JUVINO DOS SANTOS

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Tecnologia Nuclear – Materiais**

Orientadora: Dra. Duclerc Fernandes Parra

São Paulo

2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Síntese e caracterização de hidrogéis de poli (n-vinil-2-pirrolidona) contendo nanoprata e argila laponite RD para modulação da liberação de neomicina

Versão Original

Versão Original disponível no IPEN

VINICIUS JUVINO DOS SANTOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Duclerc Fernandes Parra

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: Processo: 2016/19254-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CAPES..

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

SANTOS, V. J. d. ***Síntese e caracterização de hidrogéis de poli (n-vinil-2-pirrolidona) contendo nanoprata e argila laponite RD para modulação da liberação de neomicina.*** 2019. 98 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Vinicius Juvinnno dos
Síntese e caracterização de hidrogéis de poli
(n-vinil-2-pirrolidona) contendo nanoprata e argila laponite
RD para modulação da liberação de neomicina / Vinicius Juvinnno
dos Santos; orientador Duclerc Fernandes Parra. -- São Paulo,
2019.
98 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Hidrogel. 2. nanocompósito. 3. nanopartícula de prata..
4. laponite. 5. Poli(N-vinil-2-pirrolidona). I. Parra, Duclerc
Fernandes , orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meu Pais, a todos os pacientes que sofrem de infecção hospitalar no Brasil e a todos os alunos e professores de Pós-graduação e graduação do Brasil que são as engrenagens da ciência brasileira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades, bênçãos, promessas e desafios.

A meus Pais, Rita e Elias, que foram meus primeiros professores e amigos e sempre estiveram ao meu lado. A minha irmã Adriana por ser uma companheira amiga. A minha namorada Mariana pela paciência e amor.

A minha Orientadora Dra. Duclerc pelo direcionamento acadêmico, paciência, confiança e pela oportunidade de aprendizado.

A todos os meus professores que foram fundamentais para o meu desenvolvimento humano, intelectual e racional.

A todos meus amigos de Laboratório: Isabelle, Rebeca, Angélica, Luiza, Vinícius, Luiz, Camila, Mariana, Julyana, Washington, Tamiris, Jorge, Gustavo, Gabriela, Justine, Lucas, Adriana, Joana.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro através do processo nº 2016/19254-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

A BYK additives and instruments e a Colormix Indústria e Comércio de pigmentos pelo fornecimento da Argila Laponite RD®.

A todos os funcionários do IPEN-USP, IQ-US, ICB-USP que sempre auxiliaram e ajudaram.

A professora Dra. Patrícia Lopes da Unifesp-Diadema que foi fundamental na realização dos ensaios microbiológicos o por aceitar participar da banca.

A Msc. Sizue que realizou os ensaios de citotoxicidade.

Ao Msc. Daniel Lebre do CEMSA por realizar os ensaios de Liberação de fármaco.

Ao professor Dr. Lugão, Dra. Maria e Dra. Mara pelo compartilhamento de conhecimento na área de hidrogéis.

A professora Dra. Claudia, Professor Dr. Oscar, Professor Dr. Lainete pela motivação.

Ao Professor Everton Bonturim por aceitar participar da banca.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”

Marie Sklodowska Curie

RESUMO

SANTOS, V. J. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poli (*n*-vinil-2-pirrolidona) contendo nanoprata e argila laponite RD para modulação da liberação de neomicina.** 2019. 95 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Os procedimentos médicos atuais exigem cada vez mais novos biomateriais. Nesse contexto os hidrogéis que já são biomateriais amplamente utilizados, tornam-se fundamentais para setores da saúde. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um hidrogel com características de um curativo: biocompatibilidade, absorção de fluidos e atividade antimicrobiana. Hidrogéis são materiais compostos por cadeias poliméricas reticuladas e água. Existem diversas técnicas de reticulação de polímeros que podem ser utilizadas para a produção de hidrogéis. Nesse trabalho foi utilizada a reticulação via irradiação gama que além de formar ligações covalentes entre as cadeias poliméricas pode esterilizar o material tornando-o pronto para utilização em uma única etapa. Foram utilizados dois agentes antimicrobianos na obtenção dos hidrogéis: neomicina e nanopartículas de prata. A neomicina é um antibiótico amplamente utilizado em tratamento de feridas e a nanopartícula de prata é um agente biocida historicamente conhecido que ainda não apresenta casos de resistência microbiológica. As nanopartículas de prata desse trabalho foram produzidas via irradiação gama sendo estabilizada com argila laponite, método que se mostrou muito eficiente quanto ao rendimento, estabilidade e tamanho de partícula. Também foi estudado a influência da argila laponite nas propriedades físico-químicas dos hidrogéis de PVP, PEG e ágar reticulados por irradiação gama, onde foi evidenciado uma influência significativa da laponite na estrutura do retículo e em suas características. Os hidrogéis que continham neomicina e nanopartículas de prata apresentaram ação tanto bactericida quanto fungicida mostrando que esse material tem um amplo espectro de ação, além de não apresentarem citotoxicidade.

Palavras-chave: Hidrogel, nanocompósito, nanopartícula de prata, laponite, argila, Poli(N-vinil-2-pirrolidona), radiação gama.

ABSTRACT

SANTOS, V. J. **Synthesis and characterization of poly (n-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels containing nano silver and laponite RD clay for modulation of neomycin release**. 2019. 95 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Current medical procedures increasingly require new biomaterials. In this context, hydrogels that are already widely used biomaterials become fundamental for health sectors. The objective of this work was to develop a hydrogel with characteristics of a dressing: biocompatibility, fluid absorption and antimicrobial activity. Hydrogels are materials composed of crosslinked polymer chains and water. There are several polymer crosslinking techniques that can be used for the production of hydrogels. In this work, gamma irradiation cross-linking was used which, in addition to forming covalent bonds between polymer chains, can sterilize the material making it ready for use in a single step. Two antimicrobial agents were used to obtain the hydrogels: neomycin and silver nanoparticles. Neomycin is an antibiotic widely used in wound care and silver nanoparticle is a historically known biocidal agent that has not yet shown any microbiological resistance. The silver nanoparticles of this work were produced via gamma irradiation and stabilized with laponite clay, a method that was very efficient in yield, stability and particle size. The influence of laponite clay on the physicochemical properties of gamma irradiation crosslinked PVP, PEG and agar was also studied, showing a significant influence of laponite on the reticulum structure and its characteristics. The hydrogels that contained neomycin and silver nanoparticles showed both bactericidal and fungicidal action showing that this material has a broad spectrum of action, besides no cytotoxicity.

Key words: Hydrogel, nanocomposite, silver nanoparticle, laponite, clay, Poli(N-vinil-2-pirrolidona), gamma radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da pele e suas subdivisões: derme e epiderme.....	19
Figura 2 Decaimento do radioisótopo ⁶⁰ Co	37
Figura 3 Macrorradicais gerados durante a irradiação do PVP em solução aquosa	38
Figura 4 Ilustração do mecanismo de intumescimento da argila Laponite RD.....	39
Figura 5 Estrutura molecular do sulfato de neomicina	40
Figura 6 Fluxograma da sequência experimental do projeto	42
Figura 7 Esquema contendo as etapas da preparação e síntese das nanopartículas obtidas pelo método de irradiação gama.....	44
Figura 8 Foto de um frasco contendo nanopartículas de AgNPs/LP sobre o efeito Tyndall de um laser verde.....	46
Figura 9 Esquema de preparo e síntese dos hidrogéis em reator.....	50
Figura 10 Espectrograma (HPLC–MS) modo full scan positive para obtenção dos fragmentos de neomicina.....	53
Figura 11 Curva de calibração de detecção de neomicina (HPLC-MS).....	54
Figura 12 Disposição dos materiais na Placa de petri, 1-Solução de nanopartícula NPG, 2-Solução de Neomicina, 3-HG 2, 4-HGN 2, 5- HGS 2, 6- HGNS 2.	55
Figura 13 Espectrograma de absorção plasmônica (UV-Vis) das AgNPs/LP e NPP (controle).....	57
Figura 14 Micrografia de argila laponite com 200000 e 50000 vezes de magnificação (A e B).....	61
Figura 15 Micrografias de AgNPs sintetizadas por redução com boro hidreto de sódio (NPP) com 5x 10 ⁴ , 1x 10 ⁵ , 2x 10 ⁵ , 5x 10 ⁵ e 1x 10 ⁶ vezes de magnificação (A, B, C, D e E)	62
Figura 16 Micrografias de AgNPs/LP sintetizadas por radiação gama (NPG) com 5x 10 ⁴ , 1x 10 ⁵ , 2x 10 ⁵ , 5x 10 ⁵ e 1x 10 ⁶ vezes de magnificação (A, B, C, D, E e F)	64
Figura 17 EDS de LP puras	65
Figura 18 EDS das AgNPs sintetizadas por irradiação gama	66
Figura 19 Avaliação da concentração mínima inibitória da neomicina.....	67
Figura 20 Avaliação da concentração mínima inibitória da NPG	68
Figura 21 Gráfico de viabilidade celular da nanopartícula de prata/Laponite (50 ppm) e Laponite pura (10%).....	68

Figura 22 Ilustração do intumescimento em função da densidade de retículo.....	70
Figura 23 Grau de Intumescimento dos hidrogéis em função da dose de irradiação	71
Figura 24 Grau de Intumescimento hidrogéis em função da concentração de PVP	71
Figura 25 Grau de Intumescimento para os hidrogéis	72
Figura 26 Gráfico de tensão máxima dos hidrogéis para os hidrogéis da formulação HG	74
Figura 27 Gráfico de Deformação máxima para os hidrogéis da formulação HG ..	75
Figura 28 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HG	76
Figura 29 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HGN	77
Figura 30 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HGS.....	77
Figura 31 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HGNS	78
Figura 32 Correlação entre módulo de armazenamento e concentração de argila	79
Figura 33 Correlação entre módulo de perda e concentração de argila	79
Figura 34 Termograma das perdas de massa (A) e derivadas (B) dos polímeros utilizados para sintetizar o hidrogel e o hidrogel HG	81
Figura 35 Termograma que indica a Tg do hidrogel	83
Figura 36 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HG)	83
Figura 37 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HGN)	84
Figura 38 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HGS).....	84
Figura 39 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HGNS)	85
Figura 40 Gráfico de concentração de neomicina detectada pela técnica de HPLC-MS/MS do ensaio de liberação de neomicina para as formulações de hidrogel: HGN	86

Figura 41 Gráfico de concentração de neomicina detectada pela técnica de HPLC-MS/MS do ensaio de liberação de neomicina para as formulações de hidrogel: HGNS.....	86
Figura 42 Placas do ensaio de inibição de halo para PA onde: 1- NPG; 2- NEO; 3- HG 2; 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2.	87
Figura 43 Placas do ensaio de inibição de halo para EC onde 1- NPG G; 2 -NEO; 3- HG 2, 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2	88
Figura 44 Placas do ensaio de inibição de halo para SA onde 1-NPG; 2- NEO; 3- HG 2; 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2	88
Figura 45 Placas do ensaio de inibição de halo para CA: 1- NPG; 2- NEO; 3-HG 2, 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2.....	89
Figura 46 Gráfico de viabilidade celular dos Hidrogéis (HG1, HG2, HGN2, HGS2 e HGNS2)	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das feridas.....	21
Tabela 2 Tipos de coberturas disponíveis para utilização em pacientes	27
Tabela 3 Classificação dos Hidrogéis	32
Tabela 4 Tabela de materiais utilizados para a síntese dos hidrogéis e das NPs.	41
Tabela 5 Concentração de LP e AgNO ₃ utilizada na síntese das nanopartículas obtidas por irradiação gama.....	43
Tabela 6 Técnicas utilizadas para caracterizar as nanopartículas	45
Tabela 7 Materiais utilizados para a produção dos hidrogéis de cada grupo (HG, HGN, HGS e HGNS) e a concentração de argila LP das variações de acordo com a numeração	49
Tabela 8 Resultados de DLS e Potencial Zeta	59
Tabela 9 Concentração de Ag final das Nanopartículas	60
Tabela 10 Relação entre concentração de extrato e LP; AgNPs/LP.....	69
Tabela 11 Resultados de Tonset do segundo e terceiro evento de degradação dos hidrogéis.	82
Tabela 12 Diâmetro dos halos de difusão (mm).....	89

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata
AgNPs/LP	Nanopartículas de Prata estabilizada com Laponite
CA	<i>Candida Albicans</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	<i>Escherichia Coli</i>
G'	Módulo de Armazenamento
G''	Módulo de Perda
IRAS	Infecções relacionadas à assistência em saúde
LP	LAPNITE RD®
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NEO	Sulfato de Neomicina
NEO	Neomicina
NPs	Nanopartícula
PA	<i>Pseudomonas Aeruginosas</i>
PEG	Politetileno glicol
PVAI	Álcool polivinílico
PVP	Poli(N-vinil-2-pirrolidona)
SA	<i>Staphylococcus Aureus</i>
Tg	Transição Vítrea
TGA	Análise de Termogravimetria
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidades de tratamento intensivo
UV	Ultra-violeta
UV-Vis	Ultravioleta - Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
	3.1 Pele e processo de cicatrização	19
	3.1.1 Pele	19
	3.1.2 Feridas	20
	3.1.3 Processo de Recuperação e Cicatrização.....	22
	3.1.4 Fatores que afetam a cicatrização.....	23
	3.2 Infecções e microrganismos	23
	3.2.1 Contaminação microbiológica ambiental	23
	3.2.2 Infecções	24
	3.2.3 Microrganismos	25
	3.3 Curativos e coberturas.....	26
	3.4 Biomateriais	28
	3.4.1 Definição de Biomateriais	28
	3.4.3 Polímeros	28
	3.4.4 Nanocompósitos	29
	3.5 Sistemas de liberação de drogas	30
	3.6 Hidrogéis	31
	3.6.1 Definições de Hidrogel.....	31
	3.6.2 Sínteses de hidrogéis	32
	3.6.3 Aplicações	33
	3.6.4 Hidrogéis desenvolvidos no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares	34
	3.7 Modificações de polímeros por irradiação ionizante.....	36
	3.6 PVP.....	38
	3.7 Laponite.....	38
	3.7 Neomicina.....	39
	3.8 Nanopartículas de Prata (AgNPs).....	40
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	41
	4.1 Materiais	41
	4.2 Sínteses das AgNPs estabilizadas com LP (AgNPs/LP)	42

4.3 Caracterizações das nanopartículas.....	45
4.3.1 Espectroscopia no UV-Vis.....	45
4.3.2 Espalhamento Dinâmico de Luz.....	46
4.3.3 Potencial Zeta.....	47
4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	47
4.3.5 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).....	47
4.3.6 Avaliação da concentração mínima inibitória.....	47
4.3.7 Ensaios de Citotoxicidade por incorporação de vermelho neutro.....	48
4.4 Síntese do hidrogel.....	49
4.5 Caracterização do hidrogel.....	51
4.5.1 Grau de intumescimento.....	51
4.5.2 Ensaio de tração.....	52
4.5.3 Reometria de placas paralelas.....	52
4.5.4 Análise de termogravimetria (TG).....	52
4.5.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	53
4.5.6 Ensaio de liberação de fármaco.....	53
4.5.7 Ensaio de inibição microbiológica em meio sólido....	Erro! Indicador não definido.
4.5.8 Ensaios de Citotoxicidade.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5.1 Resultados nanopartícula de prata/laponite.....	57
5.1.1 Espectroscopia UV-Vis.....	57
5.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta.....	58
5.1.2 ICP-OES.....	59
5.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	61
5.1.4 Microbiologia.....	66
5.1.5 Citotoxicidade.....	68
5.2 Resultados dos Hidrogéis.....	69
5.2.1 Intumescimento.....	70
5.2.2 Tensão máxima e deformação máxima.....	73
5.2.3 Comportamento Viscoelástico.....	75
5.2.4 Termogravimetria.....	80
5.2.5 Calorimetria exploratória Diferencial.....	82
5.2.5 Ensaio de Liberação de Fármaco.....	85

5.2.6	Ensaio de inibição microbiológica em meio sólido.....	86
5.2.7	Citotoxicidade	90
6	CONCLUSÃO	91
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que após uma lesão tecidual de qualquer natureza, naturalmente o organismo desencadeia o processo de cicatrização. Conforme a intensidade do trauma a ferida pode ser superficial ou profunda (mais grave). Independente da forma da ferida a cicatrização segue em curso contínuo devido a três fases: fase inflamatória, fase de proliferação e fase de maturação. O cuidado com feridas traumáticas é determinado pela forma como elas são tratadas e comumente o são por via tópica de curativos.

O objetivo dos curativos é a proteção da ferida, a prevenção de infecção e a facilitação do processo de cicatrização. É continua a preocupação de apresentar para o mercado produtos de tecnologias avançadas em formas de curativos cada vez mais eficazes.

É o caso dos hidrogéis em forma de membranas reticuladas a partir de composições poliméricas em água. Constituem tipos de curativos para tratamento de feridas, que surgem como proposta para solucionar um grande problema na saúde pública que é a infecção hospitalar. Esse problema tem se agravado nas últimas décadas devido ao grande número de procedimentos invasivos que intensificam o risco e a susceptibilidade ao ataque por microrganismos. Esses microrganismos podem influenciar o processo de recuperação e cicatrização que é um mecanismo natural do organismo. (OLIVEIRA e DAMASCENO, 2010)

Nesse contexto a adição de agentes antimicrobianos tais como antibióticos, antifúngicos e/ou nanopartículas em curativos se torna fundamental, para promover uma melhor cicatrização de feridas. Nanopartículas metálicas, em geral, têm registrado atividade biocida em bactérias Gram-positivos, Gram-negativos. (SCHACHT et al., 2012).

Hidrogéis são materiais que se assemelham a elastômeros devido a sua flexibilidade na estrutura reticulada, porém são diferentes quanto à afinidade com água. São substancialmente compostos por água e essa característica os faz similares a tecidos biológicos (GONG, 2014). Sendo redes poliméricas hidrofílicas, podem absorver de 10 a milhares de vezes o seu peso seco em água. São

sintetizados por diversas técnicas de reticulação física como ciclos de aquecimento/congelamento de soluções poliméricas, interações iônicas; formação de ligação de hidrogênio; maturação por aquecimento induzindo a agregação. Também podem ser reticulados quimicamente por agentes de reticulação, catalisadores, luz UV, ou radiação ionizante através de fontes de alta energia como raios gama (AHMED, 2015). A radiação ionizante é uma técnica que proporciona maior praticidade justamente por reticular e esterilizar as membranas em uma única etapa (WOJNÁROVITS, 2003).

Hidrogéis possuem propriedades tais como: absorção de grandes quantidades de fluido, maciez, flexibilidade e biocompatibilidade. Assemelham-se a tecidos biológicos, abrindo muitas oportunidades para aplicações biomédicas. Atualmente tem sido aplicado como lentes de contato, produtos de higiene pessoal, *scaffolds* para engenharia de tecidos, sistemas de liberação de fármaco e curativos (CALÓ e KHUTORYANSKIY, 2015).

Nas formulações de hidrogel a concentração de água pode variar de 70 a 90%, isso os faz em sua maioria biocompatíveis. No entanto, o alto volume de água reduz as propriedades mecânicas do material em relação a outros materiais, por exemplo, termoplásticos, o que os limita a aplicações específicas (OYEN, 2014; JOHNSON 2010). Uma estratégia para melhorar as propriedades dos hidrogéis é a incorporação de componentes inorgânicos nanométricos tais como argilas. A adição de argilas em compostos orgânicos tem sido objeto de numerosas pesquisas, devido a um tipo de interação em que o espaço interlamelar pode ser ocupado por materiais poliméricos ou compostos orgânicos (HARAGUCHI, 2008).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral do projeto foi sintetizar uma membrana de hidrogel reticulado por irradiação, a base de Poli (*N*-vinil-2-pirrolidona) contendo argila Laponite RD como reforço e contendo sulfato de neomicina e nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. Também se objetivaram as melhores características físico-químicas e biológicas para tratamento de feridas infeccionadas. Para tanto buscou-se atender a quatro propriedades fundamentais dos curativos: intumescimento, resistência mecânica, atividade biocida e citotoxicidade.

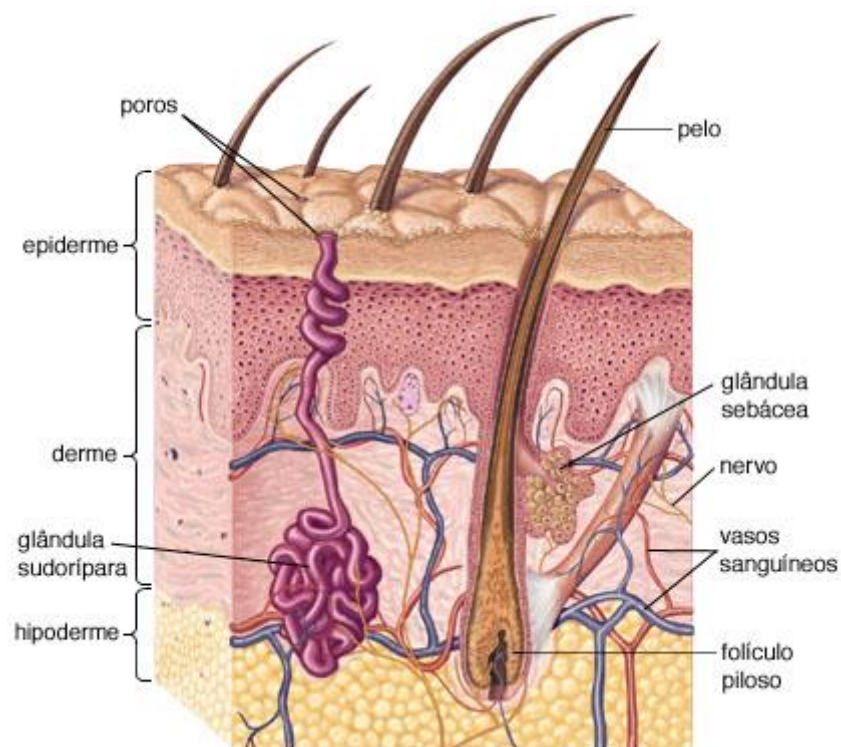
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pele e processo de cicatrização

3.1.1 Pele

A pele (figura 1) ou tegumento é um dos maiores órgãos dos seres humanos, composto por tecidos funcionais que atuam em conjunto. Estruturalmente é composta por duas camadas: epiderme e derme.

Figura 1 Estrutura da pele e suas subdivisões: derme e epiderme



Fonte: Enciclopedia Britannica, 2010

De acordo com Venus et al. (2010) a epiderme é a camada mais externa e não vascularizada, ou seja, não contém vasos sanguíneos possui um ciclo de renovação celular de aproximadamente 27 dias. É composta por diferentes linhagens celulares: queratinócitos, melanócitos e as células de Langerhans. A

epiderme é dividida em cinco subcamadas: basal, espinhosa, granulosa, córnea e lúcida.

Segundo Blanes (2004) as camadas que a constituem a epiderme proporcionam proteção contra traumas físicos e químicos, também contra os efeitos danosos da luz UV, exercendo adicionalmente função de proteção contra a permeação de microrganismos e da água. A derme é a camada mais interna da pele e é subdividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais profunda. A derme é constituída principalmente por colágeno e fibras elásticas e tem como função abrigar terminações nervosas, vasos sanguíneos e células como fibroblastos e fibrócitos, macrófagos, mastócitos, leucócitos sanguíneos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, e monócitos. Também é a região responsável pela regulação e manutenção térmica e da pressão arterial.

3.1.2 Feridas

Smaniotto et al. (2012) define feridas como cisão ou interrupção da continuidade tecidual, e representam não apenas a ruptura do tecido subcutâneo, mas também, em alguns casos, músculos, tendões e ossos. Esse processo é geralmente desencadeado por uma lesão tissular que pode ser de caráter físico, químico ou biológico (injurias acidentais, queimaduras, cirurgia entre outras).

Campos et al. (2007) destaca que durante essa fase o organismo responde a diversos estímulos bioquímicos que produzem substâncias responsáveis pelos mecanismos de defesa e regeneração dos traumas, as quais também controlam a coagulação, vasoconstrição e crescimento celular.

Ferreira et al. (2006) definiram como critérios para considerar uma ferida como complexa:

- Extensa perda de tegumento;
- Presença de infecção local;
- Comprometimento da viabilidade dos tecidos superficiais;
- Associação à doença sistêmica que dificulta o processo fisiológico de reparação tecidual. (Ferreira et al., 2006).

As feridas podem ser classificadas quanto à etiologia, complexidade e tempo de existência. Além dessas, outras características estão listadas na tabela 1, de acordo com Cortes (2013).

Tabela 1 Classificação das feridas

Classificação das Feridas	
Profundidade	<ul style="list-style-type: none"> a. Superficial ou Epidérmica b. Espessura parcial c. Espessura total
Tempo de evolução	<ul style="list-style-type: none"> a. Aguda b. Crônica
Conteúdo Microbiano	<ul style="list-style-type: none"> a. Limpas ou assépticas b. Limpas contaminadas c. Contaminadas d. Infectadas (ou Sépticas)
Etiologia	<ul style="list-style-type: none"> a. Acidental ou traumática b. Intencional ou cirúrgica c. Patológica d. Iatrogênicas e. Fatores externos
Exsudato	<ul style="list-style-type: none"> a. Seroso b. Sanguinolento c. Purulento d. Sero-sanguinolento e. Puru-sanguinolento
Aparência do leito da ferida	<ul style="list-style-type: none"> a. Tecido necrótico b. Esfacelo c. Tecido de granulação d. Tecido Eptelial

Fonte: CORTEZ, 2013

3.1.3 Processo de Recuperação e Cicatrização

Os processos de regeneração e cicatrização são fenômenos bioquímicos que estão ligados à capacidade auto regenerativa dos seres vivos (unicelulares e ou organismos superiores). (BALBINO et al., 2005)

O processo de regeneração geralmente ocorre em feridas menores, por isso seu processo de recuperação celular é mais simples. Basicamente ocorre quando o trauma ou lesão desencadeia uma reposta inflamatória aguda seguida da migração de células epidérmicas que proliferam e migram causando o fechamento da superfície. (BLANES 2004)

Entretanto, o processo de cicatrização é mais complexo, sendo composto por três fases independentes, consecutivas e sobrepostas: inflamação, proliferativa e maturação.

A fase inflamatória é a primeira etapa do processo de cicatrização. Essa fase é induzida por uma lesão tecidual, que causa danos vasculares com hemorragia local. A partir dessa etapa, fenômenos vasculares como homeostases e coagulação são ativados, e subsequentemente mecanismos celulares. Durante essa etapa o colágeno da matriz extracelular é exposto, permitindo a ativação de plaquetas que são responsáveis pela secreção de quimosinas e pela infiltração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos 3), facilitadores de coagulação e a hemóstase. A resposta inflamatória é representada pelos sinais cardiais de inflamação e pode durar de 24 a 48 horas podendo persistir até 2 semanas. (LAUREANO e RODRIGUES, 2011)

Na fase proliferativa ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio, ou seja, são mecanismos celulares que promovem a produção de uma nova barreira permeável, novos vasos e reestruturação da integridade da derme. Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação que é clinicamente apresentado com aspecto granuloso e avermelhado. Nessa etapa há uma intensa proliferação endotelial, vascular e de fibroblastos (que se sustentam na fibrina). A atividade mitótica do fibroblasto desaparece por volta do 15º dia, e em seguida passa a secretar as proteínas presentes no tecido de granulação, e a produzir componentes como água, eletrólitos, glicosaminoglicanos e colágeno. A formação do epitélio, ocorre também na fibroplasia, e é evidenciada pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme por

sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. (LAUREANO e RODRIGUES, 2011)

Na fase de maturação ou remodelamento ocorrem dois eventos importantes, sendo um deles a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e o outro a regressão endotelial. A remodelação do colágeno tem seu início na formação do tecido de granulação e pode durar meses após a reepitelização. A regressão endotelial ocorre por meio da diminuição progressiva de vasos neoformados, e caracteriza-se pela mudança de coloração rosada para esbranquiçada. (BLANES 2004)

3.1.4 Fatores que afetam a cicatrização

O processo de cicatrização pode ser afetado adversamente por fatores sistêmicos ou locais. Os fatores sistêmicos podem ser a idade, estado nutricional, vascularização, condições sistêmicas como diabete mellitus, insuficiência renal, doença reumatológica, hepática, neurológica, intestinal e hematológica. Dentre os fatores locais que se destacam há o cisalhamento, presença de corpo estranho como resíduos dentro da ferida, tecido necrosado, hipóxia tecidual e contaminação de microrganismos. (OLIVEIRA e DIAS, 2012; CORTEZ, 2013)

A existência de corpos estranhos no ferimento pode aumentar a ocorrência de infecção e irritação, prolongando a fase inflamatória e inibindo os processos de controle da infecção. O debridamento e lavagem são processos fundamentais para garantir limpeza e umidade da mesma.

A infecção por contaminação de microrganismos é a maior causa de retardo da cicatrização. É considerado que toda ferida é colonizada, uma vez que as bactérias existentes na pele podem colonizar o ferimento. (BLANES, 2004)

3.2 Infecções e microrganismos

3.2.1 Contaminação microbiológica ambiental

Um dos grandes problemas da saúde pública é a existência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), que são frequentemente associadas às contaminações superficiais em ambientes hospitalares, com maior frequência em unidades de tratamento intensivo (UTI). Esse problema começou a se intensificar

nas últimas décadas devido ao desenvolvimento da medicina que depende de procedimentos invasivos e, por conseguinte, permite que pacientes fiquem mais expostos e mais susceptíveis a microrganismos.

Estudos revelam que as IRAS geram um impacto muito severo para pacientes em UTIs, dessa forma verifica-se que ela é responsável pelo aumento significativo da mortalidade, morbidade, tempo de internação e utilização de recursos. (VOSYLIUS et al., 2003)

As IRAS são consideradas um importante problema de saúde pública, pois além de impactarem na morbidade também são um fator importantíssimo no tempo de internação e gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Acrescenta-se a isso as repercussões para o paciente, família e comunidade, tal como o afastamento da vida social e do trabalho, como consequente comprometimento social, psicológico e econômico. (CHEN et al., 2005)

Segundo estudos realizados por Andrade et al. (2000) fica evidente que pacientes hospitalares estão sujeitos à exposição por grande quantidade de microrganismos severos à saúde (potenciais causadores de infecções). Através de estudos realizados em ambientes e objetos hospitalares verificou-se a presença de bacilos gram-positivos, bacilos gram-negativos, cocos gram-positivos, inclusive de fungos. Esses microrganismos foram encontrados antes e depois do processo da limpeza de colchões hospitalares que é um procedimento operacional padrão. Tais evidências surgem para confirmar a importância que se deve ter em relação a pacientes com ferimentos expostos.

Revisões realizadas por Oliveira e Damasceno (2010), apontam que a disseminação de IRAS é complexa e multifatorial. Foi observado que havia frequência de contaminação ambiental por microrganismos em locais como torneira, monitores, teclados e camas. Esse tipo de microbiologia pode influenciar o processo de recuperação e cicatrização do paciente.

3.2.2 Infecções

A infecção é geralmente iniciada com uma lesão tecidual proveniente de injúrias de acidentes, queimaduras, cirurgias entre outras, e durante o processo de

cicatrização o ferimento é invadido por microrganismos, podendo ser desse modo prejudicado. (CAMPOS et al., 2007)

Geralmente a contaminação por microrganismos em pacientes ocorre por meio da transmissão, que é feita pelo contato das mãos dos profissionais com os pacientes e pelo contato direto dos pacientes com materiais ou ambientes contaminados. A propagação da contaminação de microrganismos nos ambientes e objetos pode favorecer o aumento de infecções e colonização dos pacientes.

Esta disseminação microbiológica ocorre, em sua maioria, como consequência da falta de conscientização dos colaboradores, pois não são difundidas e praticadas recomendações de controle de infecção. Apesar de haver lugares que possuam programas de conscientização dos colaboradores da área da saúde quanto às infecções cruzadas, as medidas são em teoria eficazes, porém na prática se torna inexecutável com sucesso (OLIVEIRA e DAMASCENO, 2010).

3.2.2 Microrganismos

Em 2017 foi formulado um Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde (ANVISA, 2017), esse documento que visa uma regulamentação estatal é resultado de ações estratégicas para a redução da incidência de infecções relacionadas à assistência à saúde. Essa ação foi estabelecida pelo PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTENCIA À SAÚDE (PNPCIRAS 2016-2020), e nesse levantamento utilizou-se como fonte de informação 2212 hospitais no ano de 2016, sendo que 71,3% eram vinculados ao SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS). (ANVISA, 2016)

O estudo notificou os principais microrganismos causadores de infecção em hospitais.

- *Staphylococcus* Coagulase Negativa
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Acinetobacter spp*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida spp* (*Candida albicans* (268) e *Candida* não-albicans (379))
- *Enterococcus spp* (*E. faecalis* (145), *E. faecium* (11) e *Enterococcus spp.* (75))
- *Escherichia coli*

- *Enterobacter spp* (*Citrobacter spp.*, *Proteus spp.* ou *Morganella spp*)
- Outras Enterobactérias
- *Serratia spp*

3.3 Curativos e coberturas

A terapia tópica de feridas possui três princípios básicos que são limpeza, debridamento e a oclusão com coberturas. Frequentemente, o termo curativo é associado às coberturas, porém de uma maneira inadequada. Segundo Smaniotto et al. (2012) curativos são definidos pelo procedimento completo de remoção da cobertura anterior, limpeza, debridamento e colocação da nova cobertura. Curativo também é definido como um procedimento terapêutico que inclui métodos clínicos e cirúrgicos, atualmente é um dos procedimentos mais utilizados em pacientes. Para tanto é de responsabilidade do profissional da saúde definir qual o biomaterial de cobertura mais adequado para a oclusão da ferida, e a decisão é tomada baseada no conhecimento fisiopatológico e bioquímico de reparação tecidual.

Outra característica específica de algumas coberturas é a capacidade de absorção e drenagem de exsudatos, com intuito de melhorar as condições do leito dessa ferida. Algumas coberturas podem ser o próprio tratamento definitivo, em outras, apenas uma etapa intermediária para o tratamento cirúrgico.

As coberturas ou curativos são materiais biocompatíveis e estéreis ou seja biomateriais, que são geralmente fabricados a partir de polímeros. No mercado estão disponíveis diversas opções de coberturas, que podem ser selecionadas para diferentes estágios ou tipos de feridas. A tabela 2, descrita por Fan et al. (2011), classificou os curativos/coberturas em: curativos passivos, curativos com princípios ativos, curativos inteligentes e curativos biológicos.

Tabela 2 Tipos de coberturas disponíveis para utilização em pacientes

Tipo	Material	Finalidade	Aplicação	Restrições
Curativo não-aderente	Tela de acetato de celulose e/ou tela de raiom com emulsão de petrolato	Promover meio úmido	Queimaduras parciais, áreas doadoras e receptoras de enxertos e lacerações	Não deve ser usado na presença de infecção e exsudato; necessita de trocas frequentes
Curativo não-aderente com silicone	Tela de poliamida com silicone	Livre fluxo de exsudato e remoção atraumática; proporciona meio úmido; possibilita menor número de trocas de curativo	Queimaduras parciais, áreas doadoras e receptoras de enxertos e lacerações	Não deve ser usado na presença de infecção e de grande quantidade de exsudato
Filme transparente	Polímero de poliuretano, com uma das faces de adesivo de acrílico	Cobertura impermeável à água e microorganismos; manutenção do leito úmido; possibilita menor número de trocas de curativo	Visibilização do leito, feridas superficiais sem exsudato; áreas doadoras de enxertos	Não deve ser usado na presença de infecção e de grande quantidade de exsudato
Espuma polimérica com ou sem prata	Matriz de poliuretano e silicone com ou sem prata	Absorção com isolamento térmico; ação bacteriostática da prata; possibilita trocas menos frequentes	Feridas exsudativas, profundas, úlceras residuais com colonização bacteriana crônica pós-enxertia de pele	Não deve ser usada em feridas simples e secas
Hidrocoloide	Polímero de poliuretano semipermeável (face externa) e carboximetilcelulose, gelatina e pectina (face interna)	Absorve pequeno volume de exsudato; mantém o meio úmido	Proteção de proeminência óssea e feridas com lesão parcial de pele	Não deve ser usado na presença de infecção e de grande quantidade de exsudato; necessita de trocas frequentes
Hidrogel	Polímero de álcool de polivinil, poliacrilamidas e polivinil	Mantém ambiente úmido, possibilitando, liquificação de materiais necróticos (desbridamento autolítico)	Queimaduras e feridas com tecidos desvitalizados (esfacelos e necrose úmida)	Não deve ser usado na presença de infecção e de exsudato
Alginato de cálcio	Fibras de algas marinhas impregnadas com cálcio	O cálcio induz hemostasia; capacidade de absorver exsudatos; desbridamento autolítico	Feridas abertas exsudativas, cavitárias e sangrantes	Não deve ser usado em feridas simples e secas
Carvão ativado com prata	Fibras de carvão ativado impregnado com prata 0,15%	O carvão ativado adsorve o exsudato e diminui o odor; a prata exerce função bacteriostática	Feridas fétidas, exsudativas e infectadas	Não deve ser usado em feridas simples e secas
Malha com prata	Malha com sais de prata	Prata iônica causa precipitação de proteínas, agindo na membrana citoplasmática da bactéria (bacteriostática)	Feridas com infecção; queimaduras profundas e extensas	Não deve ser usada em pacientes com hipersensibilidade à prata

Fonte: FAN et al., 2011 (adaptado)

3.4 Biomateriais

3.4.1 Definição de Biomateriais

De acordo com Williams (2009), Biomateriais podem ser definidos como qualquer substância (que não seja uma droga) ou a combinação de substâncias sintéticas ou de origem natural, que podem ser utilizados em qualquer período de tempo, como um todo ou uma parte de um sistema que melhora, aumenta ou substitui o tecido, órgão ou função do corpo, como também podem ser definidos como qualquer material usado em um dispositivo médico destinado a interagir com sistemas biológicos.

A característica que diferencia os biomateriais dos materiais convencionais é a biocompatibilidade, que é a habilidade de permanecer em contato com tecido vivo sem causar rejeição. Os biomateriais são usados em diversas aplicações como sensores invasivos, implantes médicos e engenharia de tecidos. (WILLIAMS 2008). Os biomateriais são utilizados na medicina desde tempos remotos, porém a maior parte das suas aplicações têm ocorrido ao longo dos últimos 2000 anos. Exemplos desses materiais foram dentes de madeira, olhos de vidro, e implantes metálicos de dente.

A era moderna da ciência dos biomateriais começou no final de século XIX com inovações importantes relacionadas à implementação de técnicas de assepsia reduzindo o potencial de infecção relacionada a complicações e incompatibilidade de materiais (BINYAMIN, et al., 2006). Os biomateriais fazem parte de uma das áreas da ciência dos materiais que promove a interação entre a medicina, ciências farmacêuticas, engenharia, física e química. Essa espécie de multidisciplinaridade de áreas está ligada diretamente à complexidade de aplicação desses materiais. (PEPPAS, 2013)

3.4.3 Polímeros

Polímeros são materiais sintéticos e/ou naturais compostos por moléculas orgânicas, conhecidos e utilizados há muitos anos devido sua grande facilidade de extração, síntese e manufatura. Exemplos desses materiais encontrados na natureza são madeira, borracha, algodão, lã, couro e seda. Existe também materiais poliméricos que são de extrema importância para processos biológicos e fisiológicos dos seres vivos, tais como proteínas, enzimas, amidos e celulose.

Nos últimos séculos, foram desenvolvidos através de processos sintéticos, polímeros com propriedades superiores aos naturais. Os polímeros são caracterizados por densidade baixa quando comparados com os metais e cerâmicas e também possuem resistência térmica inferior aos metais e cerâmicas, embora recentemente essa distância tenha sido reduzida com o avanço de tecnologias. São basicamente compostos por Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio, Oxigênio, Cloro, Flúor, Bromo entre outros. As propriedades dos polímeros são vastamente influenciadas pela estrutura molecular. Polímeros podem possuir estrutura molecular linear, ramificada, em redes ou com ligações cruzadas. (CALLISTER 1991).

3.4.4 Nanocompósitos

Os Nanocompósitos são materiais híbridos que carregam as características de dois ou mais materiais sendo que um desses materiais deve possuir dimensões nanométricas (1 – 100 nm), devido à grande área superficial das nanopartículas, a interação entre matriz e carga (nanopartícula) é muito maior do que em compósitos tradicionais (ALEXANDRE e DUBOIS, 2000).

Existem três tipos de nanocompósitos, classificados de acordo com formatos das cargas:

1. Nanopartículas isodimensionais, todas dimensões menores que 100 nm.
2. Nanopartículas com duas dimensões menores que 100 nm, tubos, fios e fibras.
3. Nanopartículas com apenas uma dimensão menor que 100 nm. Neste caso, na forma de lamelas.

Entre todos os potenciais precursores de nanocompósitos, aqueles baseados em argila e silicatos lamelares foram mais amplamente investigados, provavelmente porque as argilas de partida estão facilmente disponíveis e sua química de intercalação tem sido esclarecida no decorrer de longo tempo (ALEXANDRE e DUBOIS, 2000).

Devido às nanopartículas estarem dispersas na matriz polimérica, estes nanocompósitos exibem propriedades mecânicas, térmicas, ópticas e físico-

químicas superiores aos polímeros puros ou compósitos convencionais de microescala. As melhorias podem incluir, por exemplo, aumento de módulo de elasticidade, resistência ao calor, diminuição da permeabilidade a gás e de inflamabilidade. Isso acontece quando há interação com grupos orgânicos no espaço interlamelar das argilas. (WU et al., 2016; SHIKINAKA et al., 2012).

Esse sistema (polímero+argila) pode ser aplicado em biomateriais, polímeros de engenharia, embalagens, materiais agrícolas, polímeros odontológicos e curativos para tratamentos de feridas. (CAMPOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2014; CHUI e LIN, 2012; PEROTTI, 2011)

As argilas podem ser definidas como material natural ou sintético, terroso, de granulação fina que quando umedecido com água apresenta plasticidade. São constituídas por argilominerais que possuem estrutura em camadas lamelares formadas por tetraedros de silício (ou alumínio) e oxigênio, e lamelas formadas por octaedros de alumínio (magnésio, ferro ou lítio), oxigênio e hidroxilas.

A sobreposição de camadas (ou lamelas) formam partículas chamadas de tactóides. A distância entre as lamelas é chamada de distância interlamelar ou distância interplanar basal e também é utilizada para classificar as diferentes argilas. As argilas também são classificadas pelo tipo de cátion presente na lamela octaédrica. (KROON et al., 1997)

3.5 Sistemas de liberação de drogas

O objetivo do sistema de liberação controlada de fármacos é manter uma concentração de fármaco constante e em dose terapêutica por um tempo prolongado (SINKO, 2008). Sistema de liberação de drogas é uma tecnologia que surgiu em meados da década de 60, Takeru Higuchi foi um dos primeiros cientistas farmacêuticos a aplicar princípios físico-químicos no projeto de dispositivos de liberação controlada. (PEPPAS, 2013)

Esse sistema utiliza revestimentos diferentes dos utilizados nas formas farmacêuticas convencionais. Esses revestimentos, podem ser de origem natural ou sintética e são as novas estratégias de desenvolvimento de polímeros para veiculação de princípio ativo.

Atualmente são classificadas quatro classes de sistemas, de acordo com seus mecanismos de controle de liberação de drogas;

- Sistemas de difusão controlada (matrizes e membranas com reservatórios),
- Sistemas quimicamente ativos (biodegradáveis),
- Sistemas ativados por solventes (controle por intumescimento ou osmótico)
- Sistemas de liberação por pulsos (ativados por pulsos externos; pH, temperatura). (PEPPAS, 2013)

Em alguns sistemas esse perfil de liberação pode ser modelado por meio de equações matemáticas de difusão que são calculadas teórica e experimentalmente. Em alguns casos, as equações demonstram que a quantidade de drogas liberada tem relação com o tempo, a concentração de drogas contidas na matriz e a constante de difusão do material. (HIGUCHI, 1961; HIGUCHI, 1963)

3.6 Hidrogéis

3.6.1 Definições de Hidrogel

Os hidrogéis são definidos como sistemas de dois ou vários componentes que consiste de uma rede tridimensional das cadeias de polímero hidrofílicos e água que preenche o espaço entre as macromoléculas. Existem dois tipos de interação molecular nas redes poliméricas dos hidrogéis: físicas ou reversíveis e químicas ou permanentes. As redes reversíveis ou físicas são mantidas juntas por emaranhamentos moleculares, e/ou forças secundárias incluindo forças iônicas e ligação de hidrogênio. Hidrogéis com redes de ligação polimérica permanentes ou química, possuem redes de ligação cruzada ligadas covalentemente. (HOFFMAN 2012; AHMED 2015)

Os hidrogéis possuem alto grau de flexibilidade que é muito similar aos tecidos vivos, sua estrutura é composta por polímeros que possuem grupos hidrofílicos como $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-SO_3H$, aminas e R_4N^+ , que proporcionam a capacidade de intumescer na presença de água ou fluidos biológicos, armazenando-os entre os espaços das macromoléculas, sem perder sua integridade física. (PEPPAS et al., 2000)

No estado de equilíbrio de intumescimento, a fração de água contida no material é muito maior que a fração polimérica que proporciona uma baixa energia

de interface quando em contato com fluidos corporais. Essas características promovem uma excelente biocompatibilidade aos hidrogéis. (GULREZ et al., 2011)

Na tabela 3 são demonstradas algumas características que classificam os hidrogéis. Uma das mais importantes é o tipo de ligação presente entre as macromoléculas dividindo-se em dois grupos:

- a. Pseudo-géis ou géis físicos em que as cadeias são interligadas por forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e ou emaranhamento podendo ser revertidos novamente em solução mediante o aquecimento.
- b. Géis permanentes que possuem suas cadeias interligadas por ligações covalentes. (ROSIK e ULAŃSKI, 1999)

Tabela 3 Classificação dos Hidrogéis

Classificação dos hidrogéis	
Características	Tipo
Origem	<ul style="list-style-type: none"> • Natural • Sintética
Composição polimérica	<ul style="list-style-type: none"> • Homopolímeros (apenas uma espécie de monômero) • Copolímeros (dois ou mais espécies de monômeros) • Multipolimérico (dois ou mais espécie de polímeros)
Estrutura física	<ul style="list-style-type: none"> • Amorfo • Semicristalino
Tipo de ligação cruzada	<ul style="list-style-type: none"> • Ligações físicas (não permanentes) • Ligações químicas (permanentes)
Aparência física	<ul style="list-style-type: none"> • Matriz • Filmes • Microesferas

Fonte: GULREZ et al., 2011

3.6.2 Sínteses de hidrogéis

Hidrogéis podem ser sintetizados por diversas técnicas de reticulação física como ciclos de aquecimento/congelamento de soluções poliméricas, interações

iônicas, formação de ligação de hidrogênio e maturação por aquecimento induzindo a agregação; e por reticulação química induzidas por catalisadores, luz UV e radiação ionizante de fonte de raios gama. (GULREZ et al., 2011; AHMED, 2015)

3.6.3 Aplicações

Uma das mais promissoras categorias de polímeros aplicados à biomedicina e às ciências farmacêuticas são os hidrogéis. Esses materiais poliméricos têm sido desenvolvidos com a finalidade de atuar como lentes de contato, membranas, base de matrizes extracelulares para engenharia de tecidos, reconstrução de cordas vocais e curativos transdérmicos. Em estudos mais recentes vêm sendo aplicados como sistemas de liberação de drogas. (BINYAMIN, 2006) Hidrogéis apresentam diversas características que são essenciais para um curativo utilizado em tratamento de feridas:

- Alívio da dor
- Absorção de exsudato
- Barreira contra microrganismos
- Acesso de oxigênio para a ferida
- Adere a pele sem grudar
- Transparência
- Aplicação de fármacos sem retirar a cobertura
- Evaporação da água que diminui a temperatura local e por conseguinte ajuda no controle da inflamação. (LUGÃO, 2001)

Em um sistema de liberação controlada o hidrogel é intumescido em uma solução aquosa com um fármaco de interesse ou é produzido com o fármaco incorporado. Com a absorção e ligação da água às cadeias dos polímeros por ligações polares ou hidrofóbicas formam-se canais por onde os solutos podem difundir-se para dentro ou para fora do hidrogel. As propriedades físico-químicas do gel, bem como as características do fármaco influenciam na liberação do fármaco.

Atualmente, os hidrogéis estão sendo utilizados em curativos como um sistema transdérmico de liberação de droga em substituição aos curativos tradicionais, que incluem gaze de algodão, absorventes e ataduras, provenientes

de materiais que podem aderir ao ferimento causando ressecamento da ferida, trauma e dor durante as trocas.

O emprego de hidrogéis em curativos atende as características essenciais de um curativo ideal que propicia um ambiente úmido à ferida promovendo um debridamento autolítico e também a aceleração da cicatrização. Regimes terapêuticos ideais, eficazes e seguros requerem a administração e liberação de fármacos.

3.6.4 Hidrogéis desenvolvidos no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Lugão (2001) relata que a metodologia de produção de hidrogéis via radiação gama foi inventada por Janusz M. Rosiak em 1989. Tal procedimento foi patenteado como "*Method of Manufacturing of the hydrogel dressing*". Esse avanço tecnológico desenvolvido por Rosiak juntou dois processos fundamentais para a produção de curativos que são a reticulação polimérica e a esterilização em uma única etapa.

A metodologia de síntese dos hidrogéis foi trazida para o Brasil pelo próprio Dr. Rosiak no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares na década de 90, como parte de um programa da Agência Internacional de Energia Nuclear - IAEA. Sendo assim pesquisadores e alunos de pós-graduação continuaram os estudos em hidrogéis sintetizados por radiação.

Dentro do instituto, Miranda e colaboradores (1999) estudaram a influência da concentração de Poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP), e da dose de irradiação em parâmetros como o intumescimento, fração gel e tamanho de retículo formado. Concluíram que quanto maior a concentração de PVP e dose de irradiação, menor é o tamanho da rede polimérica formada e menor é a absorção de água, entretanto, a influência da dose de irradiação é maior do que a concentração de PVP.

Estudos realizados por Higa et al (1999) avaliaram a citotoxicidade e hemotoxicidade dos hidrogéis produzidos via irradiação. Os ensaios apontaram que nenhuma das membranas de hidrogel foi considerada citotóxica, mostrando IC50 (%) maior que 100. Já para o ensaio de hemotoxicidade, o sangue em contato com membranas de PVP testadas não foi considerado hemolítico, apresentando valor médio de hemólise menor ou igual 1,9% no ensaio de contato direto e menor ou igual 1% no ensaio de contato indireto.

Posteriormente, Machado et al. (2004) iniciaram estudos de produção de hidrogéis com Álcool polivinílico (PVAI), via radiação gama, e observou que hidrogéis de PVAI produzidos por irradiação apresentam menor capacidade de absorção de água, melhores propriedades mecânicas e maior estabilidade térmica quando comparados aos hidrogéis obtidos através de um processo de reticulação química com ácido cítrico.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2013) também investigaram algumas propriedades de hidrogéis de PVAI, porém, neste estudo avaliou-se a influência da concentração de argila nas propriedades de intumescimento, fração gel e degradação dos mesmos. Foi evidenciado por meio desse estudo que, com o aumento da concentração de argila nos hidrogéis, a fração gel foi diminuída, no entanto, o estudo revelou que para hidrogéis com concentrações maiores de argila o intumescimento e a estabilidade térmica eram aumentados.

Estudo mais recentes de Oliveira et al (2014), utilizaram a tecnologia desenvolvida por Rosiak para criação de sistemas de liberação de fármaco que se mostrou eficiente quando aplicados em feridas de lesões cutâneas geradas por *Leishmania amazonenses*. Camundongos BALB-C foram tratados pela aplicação de membranas de hidrogel na forma de curativos tópicos. Os hidrogéis contribuíram evidentemente para a redução da ferida e para a obtenção da cura clínica do modelo animal. Este estudo indica que esse tratamento poderia ser uma terapia alternativa para humanos com o objetivo de aumentar a qualidade de vida do paciente que não pode usar a medicação de maneira convencional devido aos efeitos colaterais da ingestão do fármaco. Além disso, há o benefício de custos menores para a saúde pública.

Em tese defendida por Alcântara (2013) foi estudada uma metodologia de produção de hidrogéis contendo nanopartículas de prata (AgNPs) formadas *in situ* por irradiação. Resultados da pesquisa apontaram que os hidrogéis sintetizados não liberaram AgNP, porém os hidrogéis de PVP apresentaram atividade bactericida para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto o hidrogel de PVAI apresentou atividade bactericida para *P. aeruginosa* e atividade bacteriostática para *S. aureus*, sendo essa atividade identificada pelo teste de contato direto.

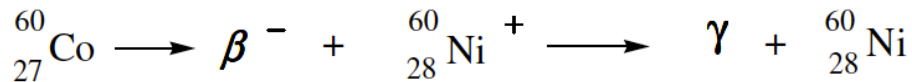
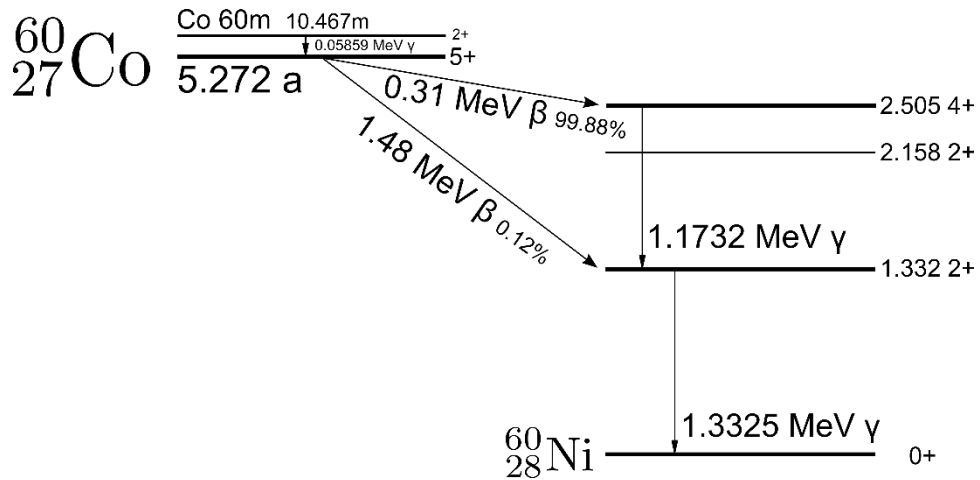
Estudo *in vivo* mais recentemente realizado por Lima et al (2018) apontou que os hidrogéis contendo AgNPs (sintetizados de acordo com Alcântara (2013) resultaram na formação de crosta menor na ferida tratada com a membrana de hidrogel, e também apresentou aumento da cicatrização. A análise da proliferação celular na ferida identificou diferentes células inflamatórias, que foram suprimidas ou aumentadas devido às AgNPs. Além disso, grande quantidade de fibroblastos foi detectada com pouca formação de colágeno, o que foi atribuído à diferenciação em miofibroblastos. Finalmente, foi observada intensa formação de reepitelização e neovascularização. Além disso, a membrana desenvolvida apresentou uma regeneração de ferida muito rápida associada às AgNPs, mas ao mesmo tempo, foi possível identificar os mecanismos de AgNPs na regeneração celular, que também foi correlacionado aos resultados *in vitro*.

Estudos realizados por Zafalon (2018), testaram a incorporação direta de sulfato de neomicina em hidrogéis de PVP, produzidos de acordo com a Metodologia de Rosiak. Os resultados apontaram que apesar do antibiótico ser irradiado junto com o hidrogel não houve significativa degradação do mesmo em razão da presença de Poliglicoletilenico (PEG) como radioprotetor. Esse sistema desempenhou uma liberação característica da neomicina além de apresentar atividade bactericida frente a *Pseudomona aeruginosa*.

3.7 Modificações de polímeros por irradiação ionizante

O uso da radiação ionizante é uma técnica que proporciona maior praticidade justamente por reticular e esterilizar as membranas em uma única etapa. As fontes de radiação ionizante mais utilizadas são as de ^{60}Co e ^{137}Cs que emitem radiação gama. A radiação gama (γ) é uma onda eletromagnética de alta energia e de origem nuclear. O radioisótopo ^{60}Co é industrialmente mais utilizado por ter uma meia vida de 5,27 anos e alta intensidade energética comparado ao ^{137}Cs . A figura 2 demonstra o decaimento do ^{60}Co , o qual ocorre por emissão de raio γ originando o isótopo ^{60}Ni . (WOJNÁROVITS, 2003)

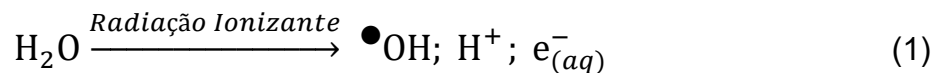
Figura 2 Decaimento do radioisótopo ^{60}Co



Fonte: TABLE OF RADIOACTIVE ISOTOPES, 1999.

A indução da reticulação de polímero via raios gama pode ocorrer em estado sólido, solução aquosa polimérica e monômero. Entretanto em estado sólido existem algumas dificuldades como a falta de homogeneidade macroscópica dos hidrogéis, e requer doses maiores de radiação comparada com a síntese em solução aquosa dos polímeros, além de apresentar dificuldades para a remoção do oxigênio presente, que pode promover reações indesejadas. (GULREZ et al., 2011)

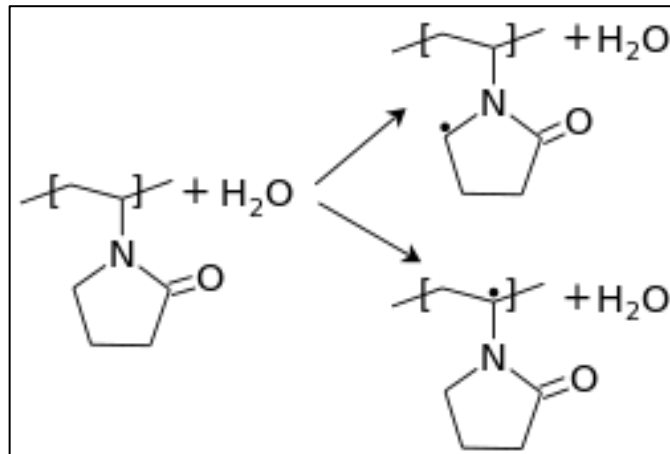
Irradiação de polímeros em solução aquosa promove mudanças químicas principalmente pela ação indireta da radiação. Esse processo é iniciado por meio da radiólise da água que, quando exposta à radiação ionizante de alta energia, gera espécies reativas que interagem com o polímero em solução conforme a equação 1. (ROSIK et al., 1995)



O polímero PVP em solução aquosa, sob radiação ionizante, sofre influência principalmente da ação dos radicais hidroxílicos $\bullet\text{OH}$, sendo desprezível a influência dos $\text{e}^{-}_{(\text{aq})}$ (elétrons aquosos) e dos H^{+} -átomos (espécies produzidas na radiólise da água). As estruturas prováveis dos radicais de PVP obtidos pela

abstração de hidrogênio pelos radicais hidroxílicos ($\cdot\text{OH}$) são mostradas na figura 3. (KADLUBOWSKI, 2014)

Figura 3 Macrorradicais gerados durante a irradiação do PVP em solução aquosa



Fonte: KADLUBOWSKI, 2014 (Adaptado)

3.6 PVP

O PVP é um polímero muito utilizado como biomaterial. Esse polímero foi desenvolvido 70 anos atrás pelo Prof. Dr. Walter Reppe na BASF, onde o patenteou. Na indústria estão disponíveis PVPs de massas molares de cerca de 2 KDa a 2.500 KDa dependendo do grau de polimerização. (FISCHER e BAUER, 2009)

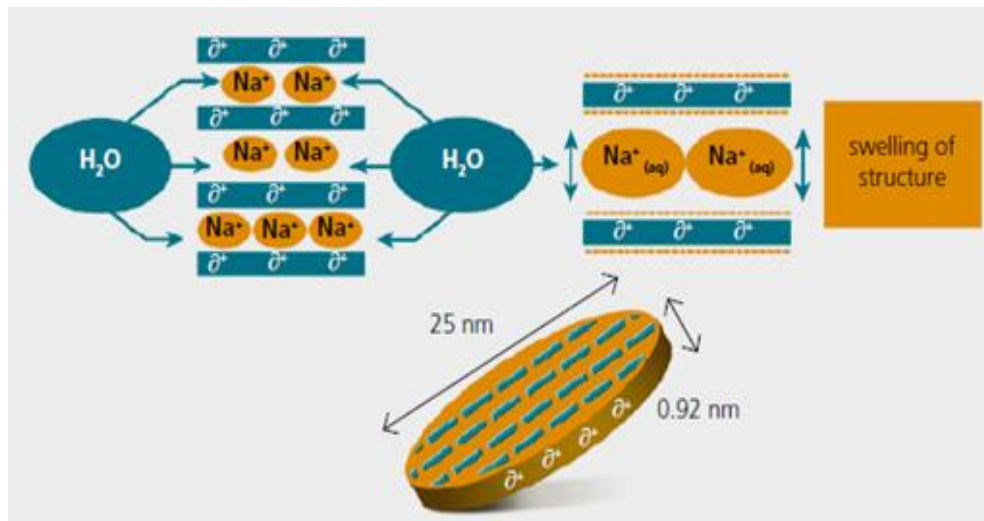
O PVP é capaz de formar ligações de hidrogênio, e apresenta solubilidade em água e em solventes polares, tais como metanol, etanol, glicol, glicerol, N-metilpirrolidona, dimetilformamida e dimetilacetamida. O PVP também pode ser associado e complexado a superfícies polares.

3.7 Laponite

A Laponite RD[®] (LP) é uma nano argila sintética de aproximadamente 25 nm de diâmetro e 0,92 nm de espessura, classificada como uma argila hectorita. É altamente hidrofílica e forma gel quando em solução aquosa. O mecanismo de intumescimento e as dimensões da LP são ilustrados na figura 4. É composta por uma folha octaédrica de óxido de magnésio e lítio entre duas folhas tetraédricas de

óxido de silício, possui um íon de Na^+ entre as suas lamelas. Essa argila é frequentemente utilizada como modificador de reologia em polímeros, cosméticos e produtos farmacêuticos e é representada quimicamente segundo a fórmula: $\text{Na}^{+0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0,7}$ (SHIKINAKA et al., 2012).

Figura 4 Ilustração do mecanismo de intumescimento da argila Laponite RD

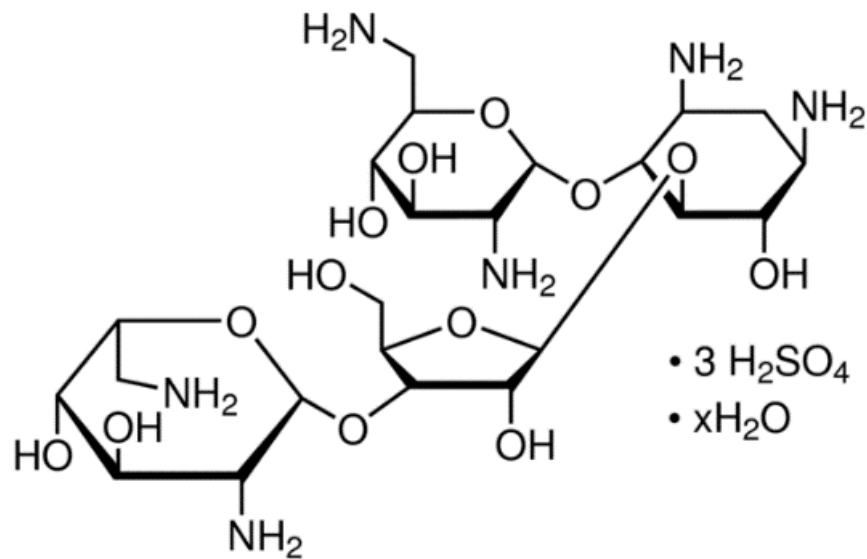


Fonte: BYK additives and instruments, 2015

3.7 Neomicina

A neomicina (NEO) é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, produzido pelo microrganismo *Streptomyces fradiae* e consiste em 2 componentes principais, a Neomicina B e a Neomicina C. Sua estrutura molecular pode ser observada na figura 5. A NEO possui alta polaridade, baixa volatilidade e solubilidade em água. Muito utilizado topicamente para o tratamento e profilaxia das infecções da pele, inclusive feridas traumáticas ou cirúrgicas, furúnculos, abscessos e úlceras cutâneas. Este antibiótico não é absorvido pela pele íntegra, porém é facilmente absorvido na pele lesionada. Como o caso de queimaduras de grande extensão ou feridas profundas. A neomicina por via sistêmica é ototóxica e nefrotóxica. (ZAFALON, 2018)

Figura 5 Estrutura molecular do sulfato de neomicina



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2019.

De acordo com a RDC 20/2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o sulfato de neomicina de uso tópico é um medicamento isento de prescrição. Dessa forma, hidrogel com neomicina não necessitaria de prescrição médica para ser comercializado.

3.8 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

A prata é um metal nobre que há anos é conhecido como um material que possui propriedades bactericida e fungicida. A resistência de bactérias a antibióticos convencionais recentemente tem atraído o interesse para utilização de materiais metálicos na escala nanométrica como agente bactericida. Nanopartículas (NPs) metálicas em geral têm registrado atividade biocida em bactérias gram-positivos, gram-negativos incluindo bactérias resistentes a antibióticos. (SCHACHT et al., 2012)

São registrados três mecanismos conhecidos da atividade bactericida da AgNPs. No primeiro, descreve-se que AgNPs atacam a superfície das células, alterando propriedades físico-químicas da membrana celular e perturbando funções fundamentais como respiração, permeabilidade, osmorregulação e transporte de elétrons. No segundo mecanismo, as AgNPs penetram nas células

das bactérias interagindo com o DNA, proteínas, componentes de fósforo e enxofre contidos nas células podendo causar danos maiores. No terceiro presume-se que as AgNPs podendo liberar íons de Ag^+ geram uma atividade biocida amplificada dependendo da concentração e tamanho da nanopartícula. (SHEEHY et al., 2015)

4 MATERIAS E MÉTODOS

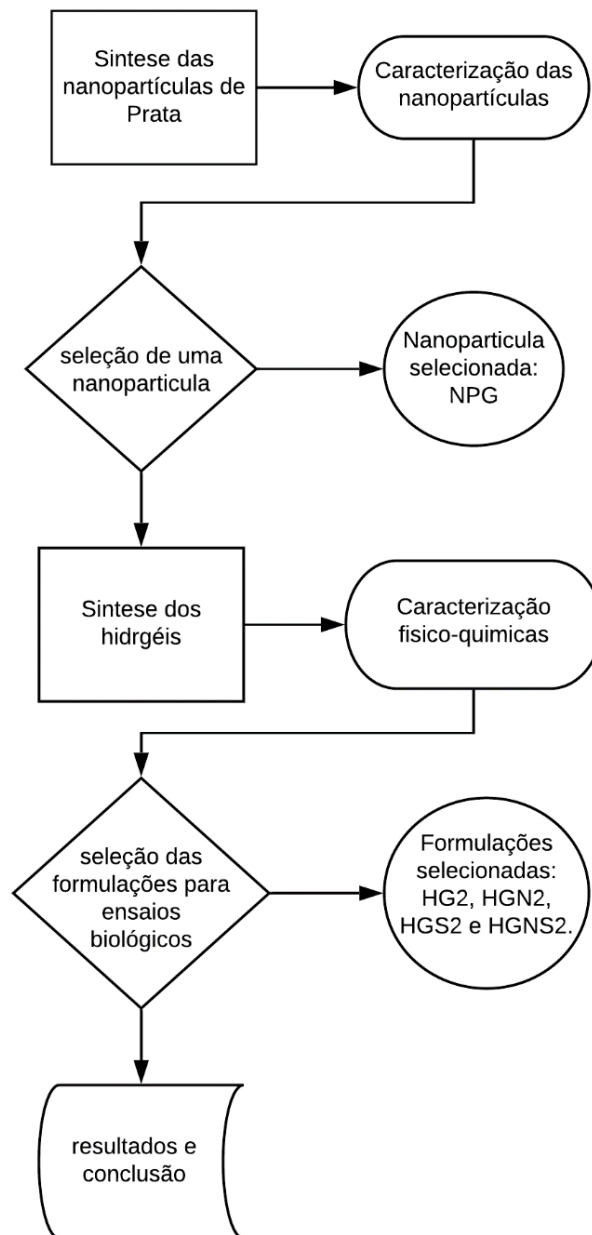
4.1 Materiais

Foram utilizados os materiais listados na tabela 4 para síntese dos hidrogéis e das NPs.

Tabela 4 Tabela de materiais utilizados para a síntese dos hidrogéis e das NPs

Material	Especificação	Origem
Nitrato de Prata	99,1%	Prolab
Laponite RD®	---	Colormix (representante BYK Aditives & Instruments)
Poli(<i>N</i>-vinil-2-pyrrolidona)	K90	Êxodo Científica
Poliglicoletilenico	300	BRENNT AG
Ágar	Técnico	OXOID
Sulfato de Neomicina	----	Sigma
Boro Hidreto de Sódio	----	Sigma

A figura 6 demonstra a sequência de processos e decisões envolvidas no desenvolvimento do trabalho em forma de fluxograma. O fluxograma é constituído por 2 etapas principais sendo a primeira a síntese das nanopartículas de prata por meio de irradiação gama juntamente com as caracterizações e segunda etapa é a produção de hidrogéis PVP/laponite com ou sem nanopartículas de prata e ou neomicina seguido das caracterizações descritas e realizadas ao longo do trabalho.

Figura 6 Fluxograma da sequência experimental do projeto

4.2 Sínteses das AgNPs estabilizadas com LP (AgNPs/LP)

As AgNPs/LP foram preparadas em solução aquosa. Os materiais utilizados para a síntese foram a argila LP, que teve como função ser agente de acoplamento e revestimento das nanopartículas e AgNO_3 (nitrato de prata) que foi o precursor metálico utilizado para doação dos cátions de Ag^+ . O procedimento de síntese está ilustrado na figura 6.

Foram preparadas 8 formulações com dose de irradiação e concentração de nitrato de prata fixas, respectivamente 25 kGy e 20mM, e foi variada a concentração de LP de acordo com a tabela 5. Para a produção de 100 mL das NPs foram preparados 50 mL de uma solução de 40 mM de AgNO₃ (nitrato de prata) e 50 mL de uma dispersão de argila LP.

Tabela 5 Concentração de LP e AgNO₃ utilizada na síntese das nanopartículas obtidas por irradiação gama

Formulação	Concentração de AgNO ₃	Concentração de LP (g L ⁻¹)
NPA	20 mM	0,2
NPB		0,5
NPC		1,0
NPD		2,0
NPE		4,0
NPF		8,0
NPG		16,0
NPH		32,0

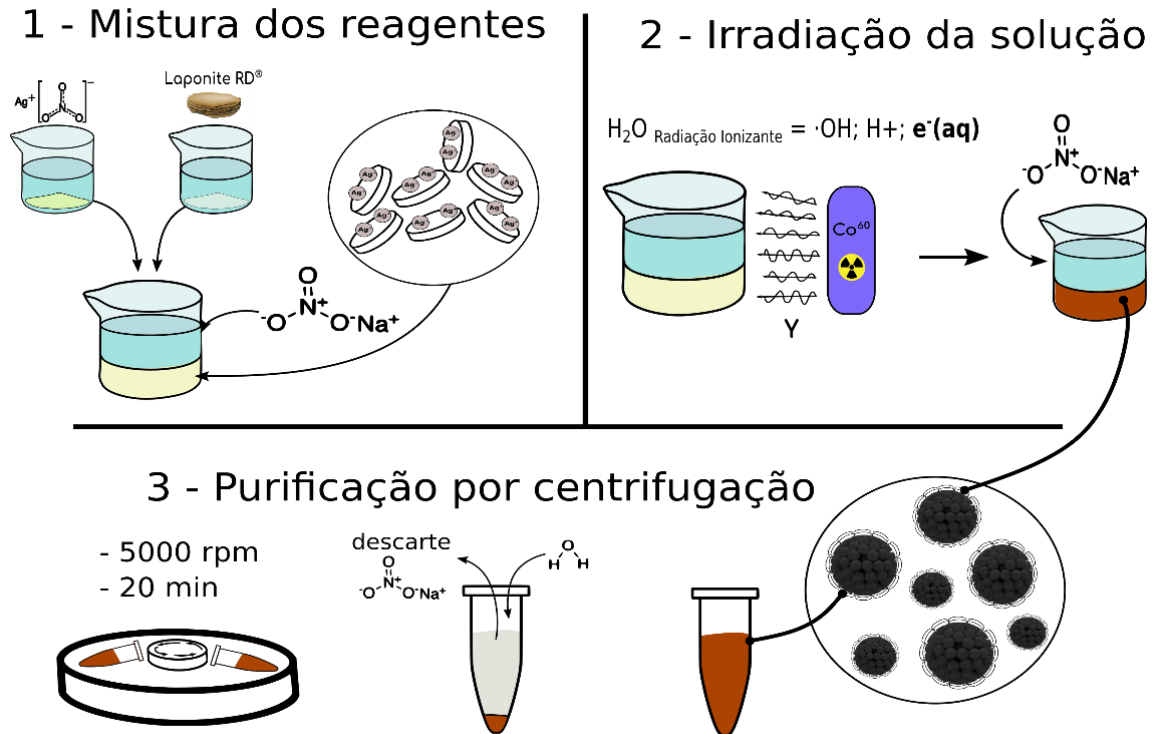
No momento em que os dois líquidos mostraram se translúcidos, a solução de AgNO₃ foi adicionada vagarosamente à suspensão de LP. Presume-se que durante esse processo de mistura os íons de Na⁺ contidos na superfície das argilas tenham sido trocados por íons de Ag⁺ provenientes do precursor nitrato de prata. Sendo assim, como produto intermediário havia íons de prata aderidos à superfície das argilas e NaNO₃ em solução.

Essas soluções foram irradiadas a 25 kGy a uma taxa 5,4 kGy h⁻¹. Segundo dados da literatura, quando uma solução aquosa é irradiada há formação de radicais livres que podem interagir quimicamente com moléculas presentes na solução, e segundo Hada et al. (1976) dentre esses radicais livres estão os elétrons aquosos que têm potencial redutor como mostra equação 2.



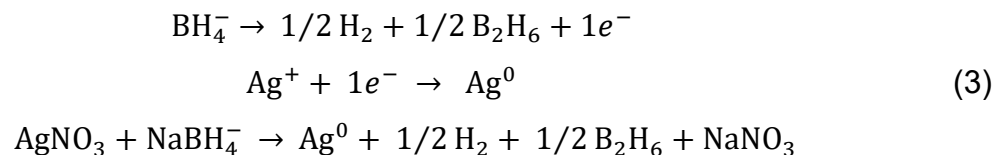
Depois do processo de irradiação as soluções de AgNPs/LP foram centrifugadas uma vez a 5000 rpm por 20 minutos, e o volume de líquido do sobrenadante foi trocado por água ultrapura.

Figura 7 Esquema contendo as etapas da preparação e síntese das nanopartículas obtidas pelo método de irradiação gama



Fonte: O Autor.

Como nanopartícula controle (NpP) foram utilizadas AgNPs por meio do método químico de redução de íons de Ag^+ , método esse é amplamente conhecido na literatura (MELO et al., 2012; TOMA, 2016). O agente redutor utilizado na solução foi o boro hidreto de sódio (NaBH_4) e o estabilizante foi o PVP K30. A equação 3 representa o mecanismo de formação.



As soluções de AgNPs foram analisadas por meio das seguintes técnicas:

Tabela 6 Técnicas utilizadas para caracterizar as nanopartículas

Caracterização	Objetivo/propriedade
Espectroscopia UV-Vis	Observar a absorção plasmônica característica da AgNPs no comprimento de onda 400-425 nm.
DLS	Obter informação do diâmetro hidrodinâmico médio das NPs
Potencial Zeta	Obter informação da carga superficial da NPs que indica a estabilidade da mesma.
Espectrometria ICP-OES	Quantificar o rendimento de NPs formada em relação à quantidade de íons percursores iniciais.
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	Obter informação do tamanho e formato das NPs
Ensaio de concentração mínima inibitória	Avaliar a concentração mínima que demonstra atividade microbiológica contra <i>S.a.</i> , <i>P.a.</i> <i>E.c.</i> e <i>C.a.</i>
Ensaio de citotoxicidade	Avaliar a citotoxicidade das NPs frente a células de tecido conjuntivo de camundongos.

4.3 Caracterizações das nanopartículas

4.3.1 Espectroscopia no UV-Vis

Segundo Toma (2016) elementos metálicos como prata cobre e ouro apresentam um elétron no nível externo fracamente ligado, esse elétron faz parte de uma banda de condução metálica ao nível de superfície. Os elétrons que participam dessa banda podem ser excitados pela luz e provocar sua emissão no comprimento de onda em que mais absorvem originando cores metálicas características. Quando esses elementos se encontram na escala nanométrica, que para o autor se estende além da definição clássica (1 -100 nm), os elétrons mais externos podem oscilar em ressonância com a radiação eletromagnética, comportando-se como planos de superfície, e isso ocorre porque o tamanho das partícula é muito menor do que o comprimento de onda da luz visível.

Ainda de acordo com Toma (2016) um campo elétrico quando aplicado à superfícies desse materiais pode induzir movimentação dos plásmons e gerar um dipolo, e sendo a luz um campo elétrico oscilante pode excitar os plásmons em função da frequência. Assim a excitação dos plásmons pela luz pode ser seguido

pela dissipação da energia por decaimento radiativo (espalhamento) ou não radiativo (absorção). Esse fenômeno pode ser facilmente observado na figura 8 pelo efeito Tyndall, descoberto pelo pesquisador John Tyndall em 1871.

Figura 8 Foto de um frasco contendo nanopartículas de AgNPs/LP sobre o efeito Tyndall de um laser verde



A espectroscopia UV-Vis é uma técnica mais precisa utilizada para constatar a formação de AgNPs, já que por meio dela pode-se extrair informações quantitativas de absorção plasmônica. Após a síntese, 200 μL de cada amostra foram depositados em uma placa de 96 poços e feito um registro do espectro de absorção de luz UV-Vis, de 320 a 700 nm, para cada leitura é descontado o controle sem prata. O espectro foi realizado em passos de 5 nm em um espectrofotômetro SpectraMax® I3, a uma temperatura de 25°C.

4.3.2 Espalhamento Dinâmico de Luz

Segundo Toma (2016) o espalhamento de luz dinâmico é uma técnica que pode ser utilizada na nanotecnologia para medir o raio hidrodinâmico de partículas em suspensão coloidal. Isso é possível pois essas partículas espalham a luz de modo não uniforme previsto pelo movimento browniano, ou seja, quando uma onda eletromagnética incide na amostra ela chega ao detector com frequências diferentes do incidente, devido ao efeito Doppler. As partículas que se movimentam mais rapidamente são detectadas com uma frequência mais elevada. A intensidade da luz espalhada depende da frequência e da magnitude do vetor de espalhamento acoplado da partícula em movimento. A velocidade da partícula, por sua vez, é dada por uma constante de difusão que é objeto da medida, relacionado com o raio da partícula. Isso é obtido pela equação de Stokes-Einstein.

Após a síntese, a análise de DLS ocorreu em um equipamento Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical), situado no Instituto de Química da USP. Foram depositados 1000 µL de cada amostra em cubetas de poliestireno e foi feita uma leitura do espalhamento de luz. A leitura foi realizada a 25°C e foram adicionados os seguintes dados ao 'software' do equipamento: Índice de refração da prata 1,390 e coeficiente de absorção da partícula 3.990.

4.3.3 Potencial Zeta

De acordo com Toma (2016) a estabilidade de nanopartícula em suspensão coloidal está fortemente ligada à distribuição de cargas e as forças que atuam na superfície da nanopartícula. O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas. Através dos resultados de Potencial Zeta investiga-se a estabilidade de suspensões e emulsões coloidais. Valores acima de 30 mV e menores que -30 mV são associados a soluções estáveis. Com essa técnica pode-se verificar se as AgNPs sintetizadas aglomeram ou não. A análise ocorreu em um equipamento Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical), situado no Instituto de Química da USP.

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar a morfologia e dispersão das AgNPs. As análises foram realizadas no equipamento Microscópio eletrônico de transmissão (TEM), modelo JEM-2100, marca Jeol, com detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) acoplado no Centro de ciências dos materiais do IPEN.

4.3.5 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

Após a síntese e lavagem das AgNPs, a concentração de prata convertida em foi determinada por meio de ICP-OES. Foi adicionado 1 mL de HNO₃ a 9 mL de suspensão de AgNPs por 24 horas para que ocorresse a digestão.

4.3.6 Avaliação da concentração mínima inibitória

Ensaio de concentração mínima de inibição (MIC) foi realizado na AgNPs e na neomicina, para se verificar a concentração mínima de inibição microbiológica. Foram utilizados 4 micro-organismos todos fornecidos pela Fiocruz e ATCC:

- *Staphylococcus aureus* (bactéria gram positiva) ATCC 6538 (Sa);
- *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria gram negativa não fermentadora) ATCC 9027 (Pa);
- *Escherichia coli* (bactéria gram negativa fermentadora) ATCC 8739 (Ec);
- *Candida albicans* (Levedura) ATCC 10231 (Ca);

Utilizou-se uma placa de 96 poços para cada micro-organismo, com controle positivo e negativo. As NPG foram diluídas em série em 9 concentrações e a NEO diluída em 10 concentrações diferentes. Adicionou-se micro-organismo em cada poço até atingir a concentração de 10^6 UFC ml⁻¹, as placas com bactéria foram incubadas a 37,0°C e as de levedura a 24,0 °C por 18 horas. Em seguida utilizou-se uma solução de 0,01% TTC (cloreto de 2,3,5–trifeniltetrazólio) em solução de NaCl 0,9%. Acrescentaram-se 10 µL dessa solução em cada poço e as placas foram incubadas por 1 hora. Cada placa foi colocada em um espectrofotômetro leitor de placa ELISA para leitura de densidade óptica em 540 nm.

4.3.7 Ensaio de Citotoxicidade por incorporação de vermelho neutro

Esse ensaio foi realizado com base no estudo realizado por Rogero (2003), foram utilizadas células de tecido conectivo de camundongo (ATCC CCL 1), da linhagem celular NCTC Clone 929. As células utilizadas estavam aderidas em microplacas de 96 poços. Todas as células foram fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz.

Como controle negativo foi utilizado polietileno de alta densidade por não ser citotóxico e como controle positivo foi utilizado Látex de borracha natural pois apresenta citotoxicidade, também foram realizados extratos dos controles negativos e positivos.

As soluções de nanopartícula foram esterilizadas em filtros de 220 nm e diluídas em meio de cultura Eagle suplementadas com piruvato de sódio + aminoácidos não essenciais + 5% de soro fetal bovino nas seguintes concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25 %. O meio de cultura contido na placa foi descartado e foram colocados 200 µL de cada diluição em triplicata nos poços. As células ficaram expostas ao extrato durante 24 horas permanecendo em estufa incubadora de CO₂ (5%) em 37 °C.

Após esse período o extrato contido nos recipientes da placa foi descartado e em seguida foram adicionados 200 μL de solução vermelho neutro/meio de cultura sem soro ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) e a microplaca mantida em estufa incubadora durante 3 horas para a incorporação do vermelho neutro nos ribossomos das células saudáveis.

Em seguida a placa foi retirada da estufa e a solução do corante foi descartada. Em uma próxima etapa o tapete de células foi lavado com solução tampão fosfato salina pH 7,4 por duas vezes e uma vez com solução de lavagem.

Por fim a solução de lavagem foi descartada e foram adicionados 200 μL de solução reveladora (1% de CaCl_2 em 0,5% de formaldeído) em cada poço. A placa foi colocada em um suporte do espectrofotômetro leitor de placa ELISA, agitada durante 10 minutos, e por fim foi feita a leitura de densidade óptica em 540 nm. Os valores de densidade óptica foram utilizados para calcular a viabilidade celular porcentual em relação ao controle de células que corresponde a 100% de viabilidade celular.

4.4 Síntese do hidrogel

As formulações de hidrogel foram divididas em 4 grupos: HG, HGN, HGS e HGNS.

Tabela 7 Materiais utilizados para a produção dos hidrogéis de cada grupo (HG, HGN, HGS e HGNS) e a concentração de argila LP das variações de acordo com a numeração

Formulação	Polímeros	Laponite*	Água	Neomicina	AgNPs
HG	X	X*	X		
HGN	X	X*	X	X	
HGS	X	X*	X		X
HGNS	X	X*	X	X	X

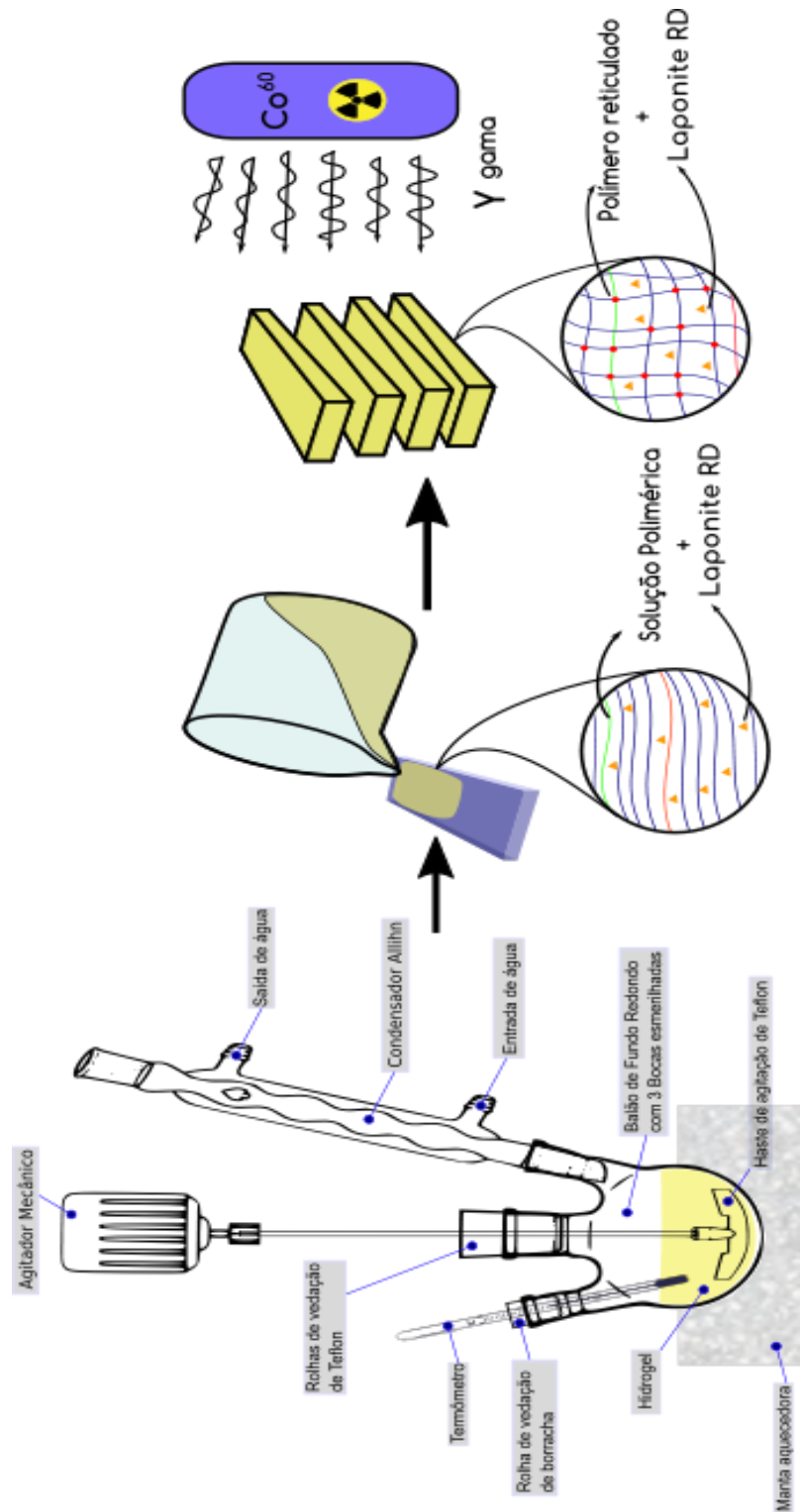
HG□ HGN□ HGS□ HGNS□

* Numeração	1	2	3	4	5
Concentração de Laponite (%)	0	0,1	0,2	1,0	2,0

Para a produção dos hidrogéis foram utilizados um balão de fundo redondo, reator com três saídas. O reator foi utilizado à pressão atmosférica, porém com um condensador Allihn acoplado em uma das saídas para evitar evaporação de água. Na saída central foi acoplado um agitador mecânico com haste de teflon e na outra

saída lateral um controlador de temperatura. O aquecimento do sistema foi feito por manta, esse sistema é ilustrado na figura 9.

Figura 9 Esquema de preparo e síntese dos hidrogéis em reator



Fonte: O Autor.

O processo de síntese de 100 mL hidrogel seguiu as etapas descritas abaixo:

1. Adicionaram-se 10 g de PVP e 50 mL de água destilada no reator e esperou-se 18 horas até a total solubilização sem agitação e sem aquecimento;
2. Para as formulações de HGS e HGNS, adicionou-se 10 mL de suspensão de AgNPs (NPG) ao reator correspondendo a 50 ppm ou $\mu\text{g mL}^{-1}$ na formulação final;
3. Em um béquer com 20 mL de água destilada foi adicionado 1 mL de PEG, e LP de acordo com a tabela 7, essa mistura foi mantida em repouso por 4 horas até a total suspensão das argilas.
4. Em seguida a solução PEG+Laponite e 1,5 g de ágar foram adicionados ao reator;
5. Os materiais adicionados no reator foram misturados por agitação e aquecidos até 92 °C;
6. Para as formulações HGN e HGNS a solução foi resfriada até 50°C e adicionou-se 0,5 g de Neomicina, correspondendo a 0,5% em concentração na formulação final;
7. Foi adicionado água até completar o volume de 100 mL e a solução foi agitada por mais por mais 5 min sem aquecimento;
8. A soluções de hidrogel foram despejadas em formas de polietileno tereftalato;
9. Os hidrogéis foram submetidos/expostos à irradiação gama para reticulação e esterilização, segundo o esquema da figura 7, sendo processadas por irradiação gama de fonte ^{60}Co em dose de 25 kGy a uma taxa dose de $5,4 \text{ kGy h}^{-1}$, parâmetros que foram utilizados com base em trabalhos realizados por Oliveira (2013) e Zafalon (2018).

4.5 Caracterização do hidrogel

4.5.1 Grau de intumescimento

O intumescimento máximo dos hidrogéis foi avaliado imergindo as membranas de hidrogel numa solução salina tamponada (NaCl 0,9%) pH 7,0. A massa foi inicialmente medida na amostra como tal (M_i) e após a imersão das membranas na solução por 72 horas (M_r), conforme a equação 4.

$$\text{Intumescimento\%} = \frac{M_r - M_i}{M_i} * 100 \quad (4)$$

Os resultados de intumescimento foram analisados estatisticamente por ANOVA (one-way) e teste de Tukey como procedimento de comparação (as análises estatísticas foram feitas dentro dos grupos HG, HGN HGS e HGNS). Para todos os testes, o nível global de significância foi de 5%.

4.5.2 Ensaio de tração

Para avaliar as propriedades mecânicas dos hidrogéis como resistência mecânica e deformação máxima foi utilizado ensaio de tração. Os ensaios de tração foram realizados de acordo com a norma ASTM D 638-03 utilizando o corpo de prova tipo IV^b e velocidade de teste 50 mm min⁻¹.

Os resultados de resistência mecânica e deformação máxima foram analisados estatisticamente por ANOVA (one-way) e teste de Tukey como procedimento de comparação (as análises estatísticas foram feitas dentro dos grupos HG, HGN HGS e HGNS). Para todos os testes, o nível global de significância foi de 5%.

4.5.3 Reometria de placas paralelas

O comportamento viscoelástico dos hidrogéis foi investigado por meio de reometria de placas paralelas. As placas possuíam 20 mm de diâmetro com distância (*gap*) de 2 a 3 mm, e amplitude de deformação de (1%). Os testes dinâmicos de varredura de frequência foram realizados na temperatura de 37,5°C para observar o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') em função da frequência angular (ω : 0,1-100 rad s⁻¹).

4.5.4 Análise de termogravimetria (TG)

Foram analisadas amostras de hidrogéis em suas variações de concentração de LP para o grupo HG. As membranas foram liofilizadas e submetidas ao ensaio de TG/DTG em aparelho Mettler-Toledo SDTA/851e, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, variando a temperatura de 25 a 600 °C, sob atmosfera de N₂ a fluxo de 50 mL min⁻¹. As variações de temperatura foram registradas no início e no final da decomposição.

4.5.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

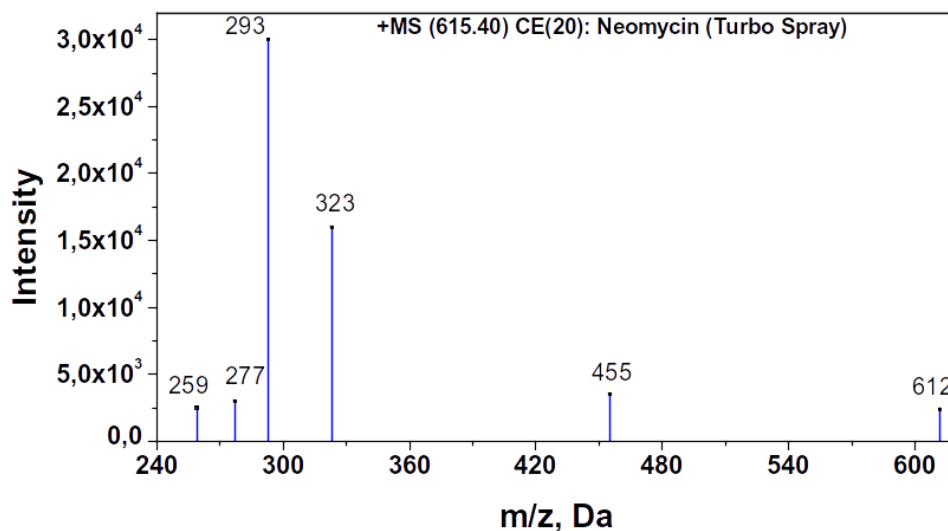
Foram analisadas amostras de hidrogéis nas diferentes concentrações de LP. As membranas foram submetidas ao ensaio de DSC em aparelho Mettler-Toledo SDTA/851e, a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, variando-se a temperatura de -50 a 10°C , sob o fluxo de N_2 a 50 mL min^{-1} .

4.5.6 Ensaio de liberação de fármaco

O método analítico utilizado para quantificar a concentração de fármaco liberada dos hidrogéis foi HPLC-MS/MS. (ZAFALON, 2018)

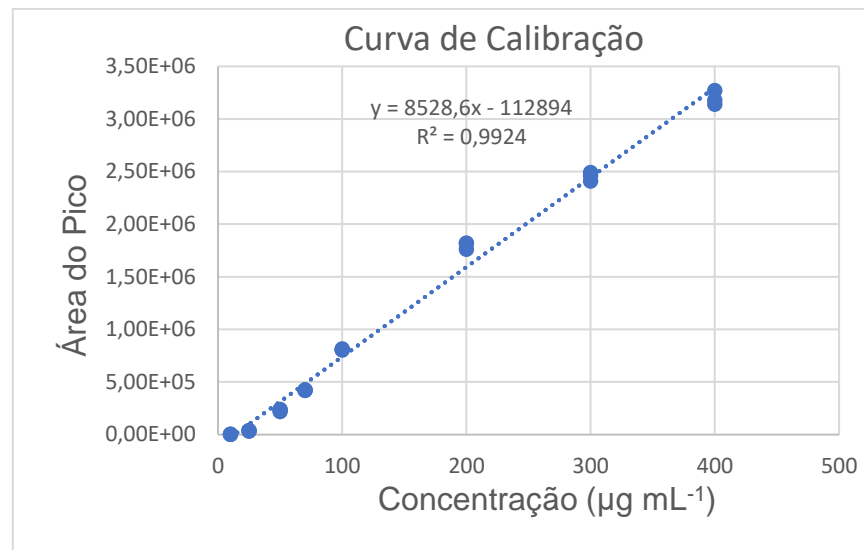
Para determinação do padrão de fragmentação da neomicina uma solução de $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de neomicina foi introduzida no sistema MS-MS no modo full scan. O pico de $612,3\ \text{m/z}$ foi atribuído como sendo o íon precursor protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ e como íon fragmento foram obtidos 5 picos: 259, 277, 293, 323 e $455\ \text{m/z}$. Os resultados estão registrados na figura 10.

Figura 10 Espectrograma (HPLC–MS) modo full scan positive para obtenção dos fragmentos de neomicina



Foram preparadas soluções de concentração conhecida para a obtenção de uma curva de calibração apresentada na figura 11.

Figura 11 Curva de calibração de detecção de neomicina (HPLC-MS)



O ensaio de liberação foi realizado em todas as amostras do grupo HGN e HGNS. As amostras de hidrogel foram cortadas em formas de retângulos de 25x25 mm e aproximadamente 3 mm de espessura. Cada amostra foi colocada em um recipiente contendo 100 mL de água ultra pura. Os recipientes com as amostras foram acondicionados à uma temperatura de 37,5 °C e agitação rotativa de 100 rpm.

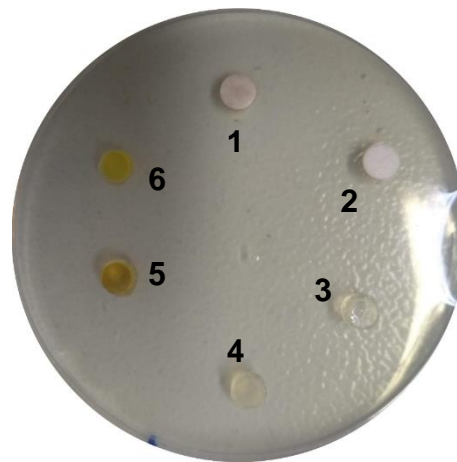
Foram colhidas alíquotas de 5 mL nos respectivos tempos (min) de ensaio: 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480, 1440, 2880 e 4320. Depois de retirar o volume de 5 mL das alíquotas, esse volume foi repostado com 5 mL de água ultra pura.

4.5.7 Ensaio atividade antibacteriana

O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado de acordo com o método estabelecido por Ponce et al (2003), a zona de inibição foi em meio sólido foi usada para determinar os efeitos das formulações de hidrogel contra três bactérias e uma levedura (Sa, Pa, Ec e Ca). As formulações selecionadas para o ensaio foram HG 2, HGN 2, HGS 2, HGNS 2. Essas membranas foram cortadas com diâmetro de 6 mm para a realização do ensaio. Também foi realizado o ensaio em uma solução de nanopartícula (NPG) e uma solução de neomicina (na concentração equivalente à dos hidrogeis ensaiados), que foram depositada sobre um papel de diâmetro de 6 mm.

O ensaio foi realizado em camadas duplas ou bicamada, onde se depositou uma camada (15 mL) de ágar nutriente estéril em uma placa de Petri, uma segunda camada com leite de microrganismos foi preparada em caldo nutriente encubado a 37,0°C por 18 h. A concentração foi ajustada para 10^6 UFC em 5 mL (unidades formadoras de colônia) e adicionada ao Agar nutriente para formação da dupla camada. Os hidrogéis e as soluções foram dispostas de acordo com a figura 12. Por último foi adicionado 5 mL de ágar nutriente fundido com 0,1% de TTC para a coloração das placas.

Figura 12 Disposição dos materiais na Placa de petri, 1-Solução de nanopartícula NPG, 2-Solução de Neomicina, 3-HG 2, 4-HGN 2, 5- HGS 2, 6- HGNS 2.



Os halos de inibição foram classificados de acordo com Ponce et al. (2008), onde os halos com diâmetro menor do que 8 mm não são sensíveis, de 9 a 14 mm são sensíveis, de 15 a 19 mm são muito sensíveis e maiores do que 20 são extremamente sensíveis.

4.5.8 Ensaio de Citotoxicidade

Esse ensaio foi realizado com base no estudo de Rogero (2003), com células de tecido conectivo de camundongo (ATCC CCL 1), da linhagem celular NCTC Clone 929. As células, fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, utilizadas estavam aderidas em microplacas de 96 poços. As membranas de hidrogel foram cortadas em quadrados de 2X2cm formando assim duas superfícies de 4 cm² e totalizando uma superfície efetiva de 8 cm².

Após o corte as amostras foram colocadas para extração em meio de cultura Eagle suplementadas com piruvato de sódio + aminoácidos não essenciais + 5%

de soro fetal bovino, a relação de área de material por quantidade de meio de cultura foi de 1 cm² / 1 mL, então foram adicionados 8 mL de meio de cultura Eagle para a extração.

Os recipientes com as amostras submersas no meio de cultura foram colocados em uma estufa incubadora com atmosfera contendo CO₂ 5% e temperatura de 37 °C durante 24 horas. Como controle negativo foi utilizado PEAD (polietileno de alta densidade) por não ser citotóxico e como controle positivo foi utilizado Látex de borracha natural, pois apresenta citotoxicidade e também foram realizados extratos dos controles negativos e positivos.

Foram preparadas diluições dos extratos nas seguintes concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25 % em meio de cultura de Eagle com soro. O meio de cultura contido na placa foi descartado e foram colocados 200 µL de cada diluição em triplicata nas microplacas. As células ficaram expostas ao extrato durante 24 horas permanecendo em estufa incubadora de CO₂ em 37 °C.

Após esse período o extrato contido nos recipientes da placa foi descartado e em seguida foram adicionados 200 µL de solução vermelho neutro/meio de cultura sem soro (50 µg mL⁻¹) e a microplaca mantida em estufa incubadora durante 3 horas para a incorporação do vermelho neutro nos ribossomos das células saudáveis.

Em seguida a placa foi retirada da estufa e a solução do corante foi descartada. Em uma próxima etapa o tapete de células foi lavado com solução tampão fosfato salina pH 7.4 por duas vezes e uma vez com solução de lavagem.

Por fim a solução de lavagem foi descartada e foram adicionados 200 µL de solução reveladora (1% de CaCl₂ em 0,5% de formaldeído) em cada poço. A placa foi colocada em um suporte do espectrofotômetro leitor de placa ELISA, agitada durante 10 minutos, e por fim foi feita a leitura de densidade óptica em 540 nm. Os valores de densidade óptica foram utilizados para calcular a viabilidade celular porcentual em relação ao controle 100% de viabilidade celular.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

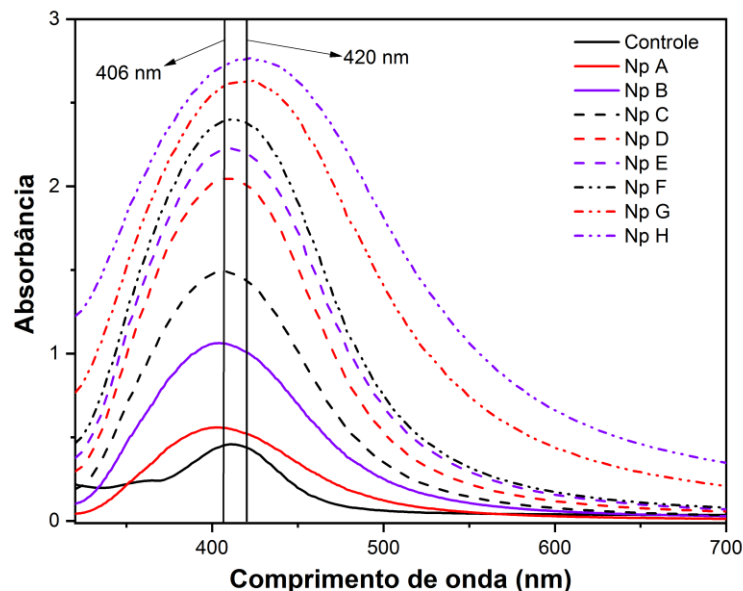
5.1 Resultados nanopartícula de prata/laponite

5.1.1 Espectroscopia UV-Vis

A figura 13 mostra a absorbância versus comprimento de onda das nanopartículas sintetizadas neste trabalho. Foi possível observar um pico de absorbância em comprimento de onda próximo de 406 nm para as nanopartículas NPA, NPB, NPC, NPD e NPE e próximo de 420 nm para as nanopartículas NPF, NPG e NPH.

Esses dados indicam, inicialmente, que a irradiação dos materiais (Nitrato de Prata e Laponite RD) em solução aquosa foi eficiente para formação de NPs com formato esférico, corroborando com os dados obtidos por Aihara et al.(1998), Liu et al. (2007), Huang e Yang (2008) que realizaram trabalhos muito similares, porém, com agentes redutores diferentes: hidrazina, Boro Hidreto de Sódio e irradiação UV (utilizando lâmpadas com intensidade e comprimento de onda de $0,362 \text{ mW cm}^{-2}$ e 368 nm) respectivamente.

Figura 13 Espectrograma de absorção plasmônica (UV-Vis) das AgNPs/LP e NPP (controle)



De acordo com Toma (2016) a intensidade de interação da radiação com os plásmos está relacionada com o dipolo oscilante dos plásmos. E a oscilação dos plásmos de superfície depende da forma e do tamanho da nanopartícula, ou seja,

é possível identificar o formato e tamanho de nanopartículas observando o espectro de absorção dos plásmons.

Segundo Silva et al. (2015) as propriedades ópticas da Ag são fortemente dependentes tanto do tamanho quanto da forma, os espectros de absorção UV-vis para os fios, esferas, cubos e prismas triangulares exibiram seus picos mais intensos atribuídos à excitação superfície de ressonância plasmônica em 379, 407, 438 e 794 nm, respectivamente.

5.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

Os resultados apresentados na tabela 8 (segunda e terceira coluna) mostram os valores de tamanho médio das nanopartículas (*Z-Average*) e de Potencial zeta, que indica a estabilidade das partículas. Observou-se que houve formação de partículas com tamanho de 74,35 até 140 nm para os sistemas de redução da NPs por irradiação gama. Segundo o que se pode observar nesse resultado há uma correlação entre o tamanho da partícula e a concentração de LP, ou seja quanto maior a concentração de LP maior foi o tamanho da partícula.

É relevante notar que partimos de uma NPs original que foi a LP que apresentou diâmetro hidrodinâmico de cerca de 59,71 nm e quando sintetizamos as AgNPs/LP em sua presença obteve-se NPs a partir desse tamanho. Esse dado corrobora os resultados de absorbância que evidenciam a formação de nanopartículas de prata, e podemos verificar por meio desses resultados de DLS que essas nanopartículas se formaram aderidas à argila.

Essa evidência pode indicar que as lamelas de LP estão potencialmente atuando como uma casca para as nanopartículas. Esse efeito já foi mostrado por Kim et al. (2013). Outros autores como Aihara et al. (1998) já dizem que as AgNPs para esse sistema são formadas entre as lamelas de LP.

Tabela 8 Resultados de DLS e Potencial Zeta

Nanopartícula	Z average (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Desvio padrão (ZETA)
LP	59,71	0,238	-42,4	0,25
Np P	25,62	0,32	-23,9	1,75
Np A	74,35	0,176	-25,0	5,54
Np B	85,09	0,202	-29,4	5,80
Np C	73,74	0,365	-28,8	8,04
Np D	100,3	0,380	-29,6	7,63
Np E	124,7	0,195	-31,8	9,30
Np F	140,0	0,199	-39,7	5,63
Np G	139,0	0,248	-44,3	4,85
Np H	124,4	0,208	-46,8	6,73

Os resultados registrados na quarta coluna da tabela 8 indicam que todas as NPs são estáveis. Além disso podemos observar que existe uma correlação entre a concentração de LP e potencial zeta em que quanto maior a concentração maior o potencial.

5.1.2 ICP-OES

Por meio dos resultados de concentração obtidos no ICP-OES, foi possível avaliar o rendimento de conversão dos íons Ag^+ , provenientes do nitrato de prata, em Ag^0 contidos na AgNPs/LP, e expressos na tabela 9. Os dados da coluna 2 representam a concentração de Ag na solução de AgNPs/LP. O rendimento foi calculado em relação à concentração de AgNO_3 utilizada na síntese (20 mM), que teoricamente fornece $2157,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de íons Ag^+ .

Tabela 9 Concentração de Ag final das Nanopartículas

Identificação	Concentração de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rendimento (%)
Np A	78,8	3,65
Np B	58,4	2,70
Np C	109,0	5,05
Np D	86,0	3,98
Np E	191,1	8,85
Np F	450,0	20,85
Np G	532,2	24,80
Np H	1580	73,23

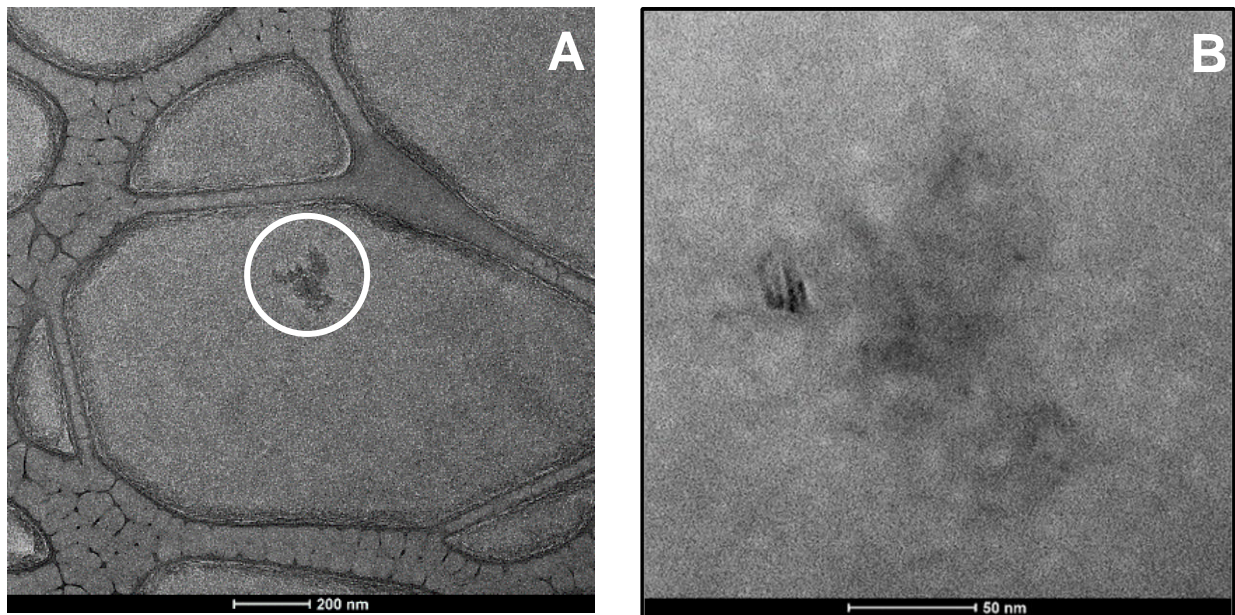
Os resultados apontam que o rendimento de nanopartículas é totalmente dependente da concentração de LP na solução. Não foram encontrados dados na literatura que corroborem esse resultado, porém Aihara et al. (1998) afirmam que NPs estáveis somente são obtidas quando a concentração de precursor catiônico está abaixo da capacidade de troca catiônica da LP, isso sugere que os locais carregados negativamente na superfície do plano basal da LP operem predominantemente. Essa afirmação se alinha totalmente com os dados de potencial Zeta e concentração (ICP-OES) que mostraram que em concentrações mais altas de LP o potencial Zeta indica maior estabilidade das partículas e o ICP-OES indica maior rendimento devido a maior disponibilidade de sítios negativos.

Também foi observado uma ligação entre os resultados de concentração obtidos por meio do ICP-OES e os resultados de Absorção plasmônica (UV-Vis), ambos apontam que a concentração de NPs formadas é totalmente dependente da concentração de LP. Foi selecionada a nanopartícula NPG para ser aplicada aos hidrogéis como agente antimicrobiano, os critérios de seleção foram: potencial zeta, espectroscopia UV-VIS e ICP-OES. As características da nanopartícula NPH foram superiores às da NPG, porém a nanopartícula NPH apresentava consistência pastosa e não líquida como a NPG.

5.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão

As figuras 14 A e B mostram as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão da LP pura. Não é possível visualizar o tipo de morfologia nem o tamanho das partículas, isso provavelmente ocorre porque a estrutura da LP é composta por elementos leves como Mg, Si, Li, O e H. Porém a micrografia apresenta algumas manchas que provavelmente são regiões com maior concentração de LP.

Figura 14 Micrografia de argila laponite com 200000 e 50000 vezes de magnificação (A e B)

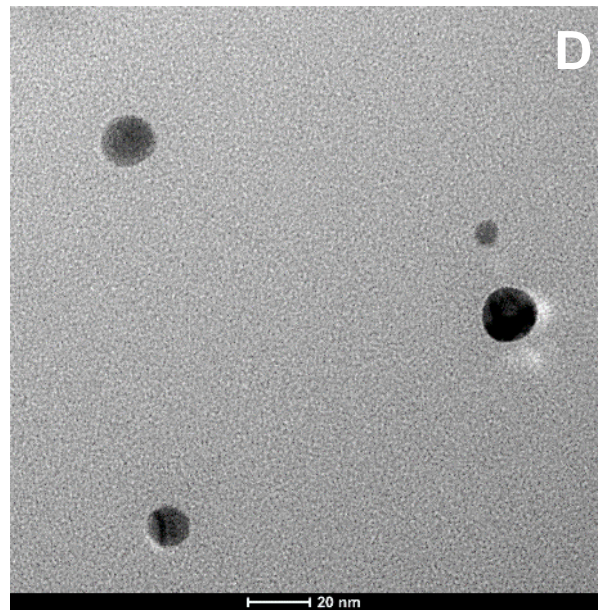
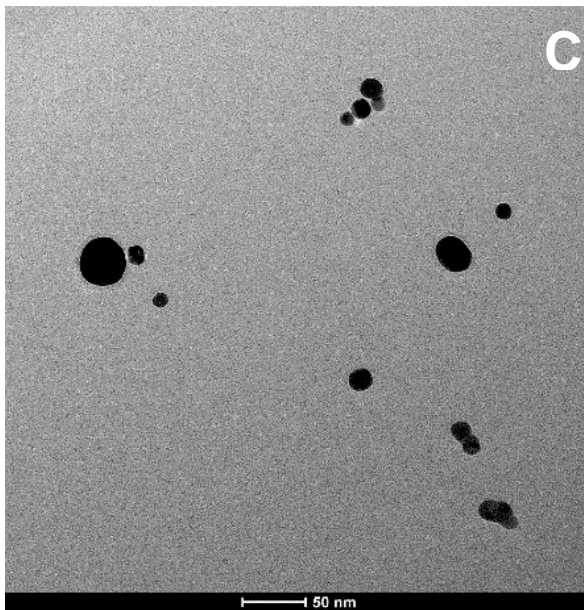
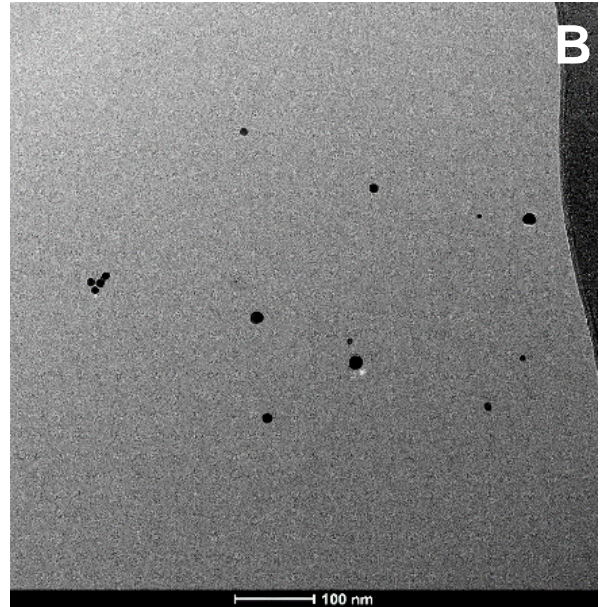
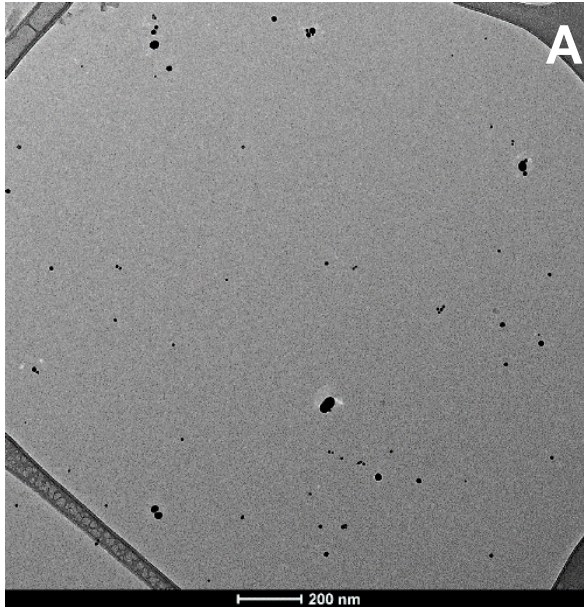


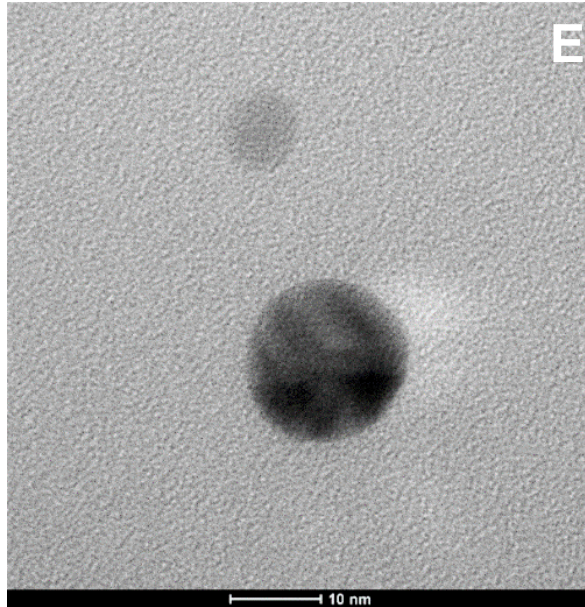
As figuras 15 A, B, C, D e E mostram micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por redução dos íons de Ag^+ com borohidreto de sódio.

Observa-se claramente a formação de AgNPs no formato esférico, Essas micrografias corroboram com os resultados de absorção plasmônica e DLS, que apresentaram resultados similares. Porém apesar de todas as NPs apresentarem tamanho abaixo de 100 nm não se observou uma regularidade de tamanho, isso indica que essa solução está polidispersa.

Também observou-se especificamente na figura 15C uma camada na superfície da NPs com densidade diferente da mesma, isso indica que houve uma proteção da NPs pelo polímero PVP como uma casca.

Figura 15 Micrografias de AgNPs sintetizadas por redução com borohidreto de sódio (NPP) com 5×10^4 , (A); 1×10^5 , (B); 2×10^5 , (C); 5×10^5 (D) e 1×10^6 vezes de magnificação (E)



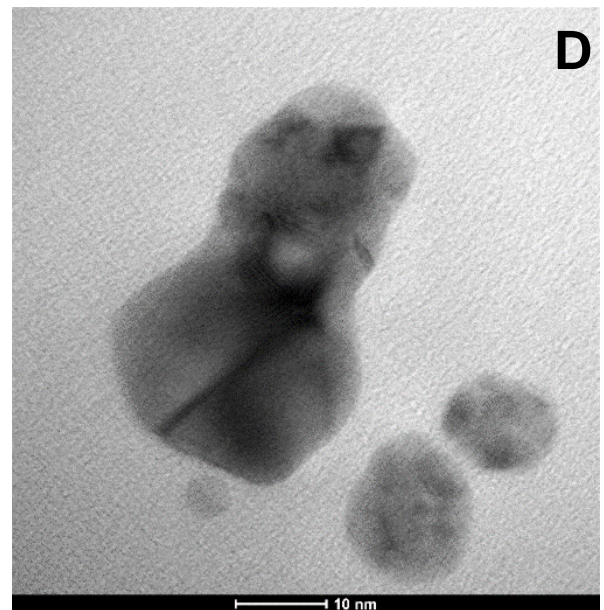
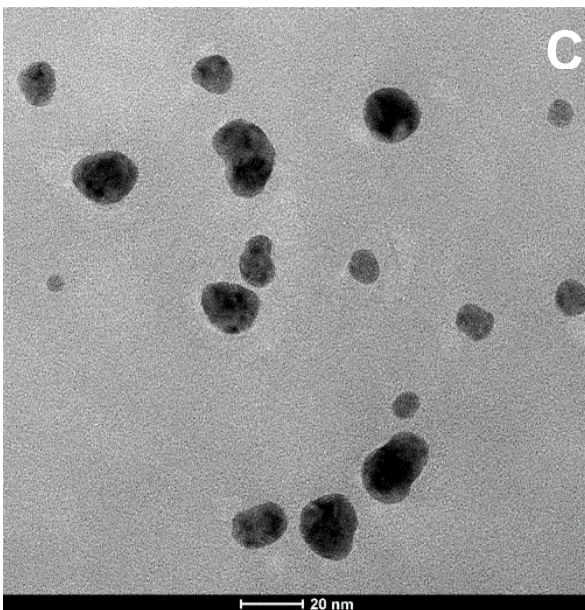
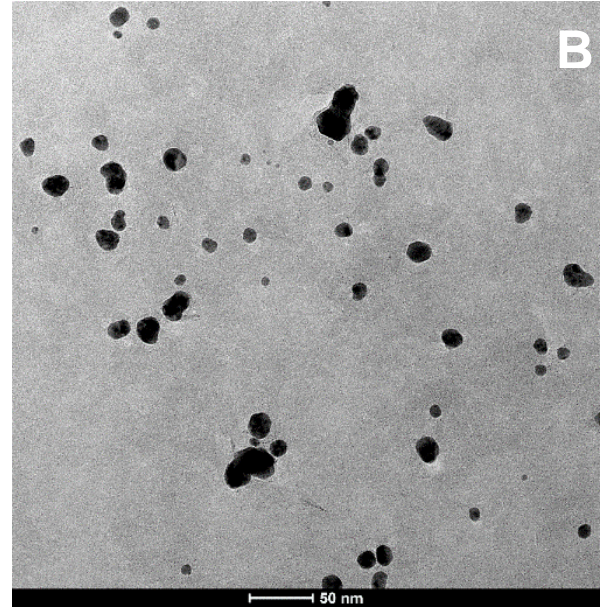
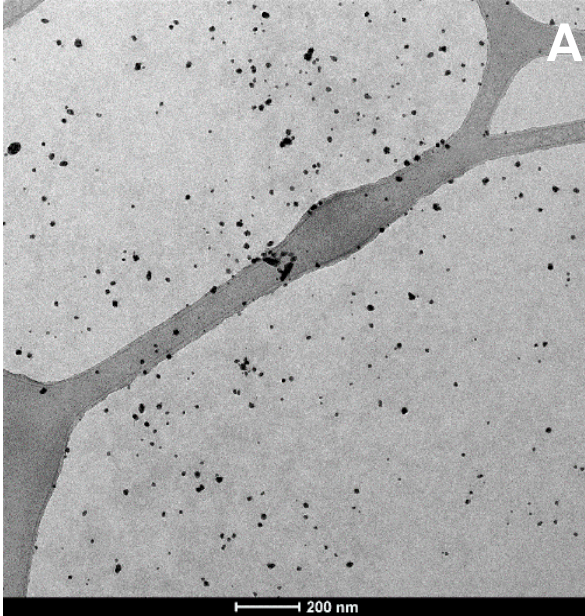


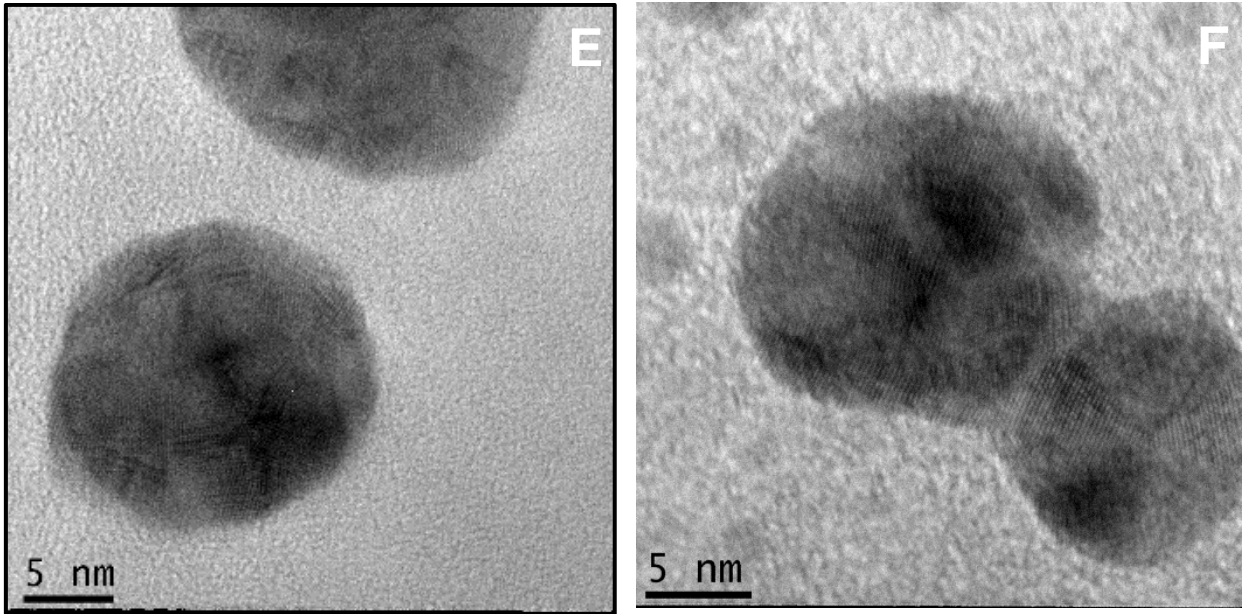
As figuras 16 A, B, C, D, E e F mostram micrografias das AgNPs/LP (NPG) sintetizadas por radiação gama e estabilizadas com LP.

Pode-se observar nas figuras 16A e B representadas, uma regularidade maior de tamanho das NPs, porém, nas figuras com o aumento maior observamos uma falta de regularidade no formato das NPs. Nas figuras 16 E e F é possível observar o arranjo cristalográfico dos átomos de Ag.

Os resultados apresentados nas micrografias não corroboram os resultados de diâmetro hidrodinâmico obtidos por DLS, pois como a NP é composta por prata e LP e não somente por prata, os parâmetros utilizados para AgNPs pura na análise DLS não são adequados para essa NPs híbrida. Dessa forma o que diferencia uma NPs da outra é apenas a concentração e o rendimento.

Figura 16 Micrografias de AgNPs/LP sintetizadas por radiação gama (NPG) com 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 vezes de magnificação (A, B, C, D, E e F)





As figuras 17 e 18 mostram gráficos de EDS obtidos durante as microscopias eletrônicas de transmissão das NPs de LP e AgNPs/LP sintetizadas por radiação gama. Observa-se qualitativamente a presença de Mg e Si na nanopartícula de Laponite RD® e Mg, Si e Ag na nanopartícula AgNPs/LP.

Figura 17 EDS da composição de LP pura

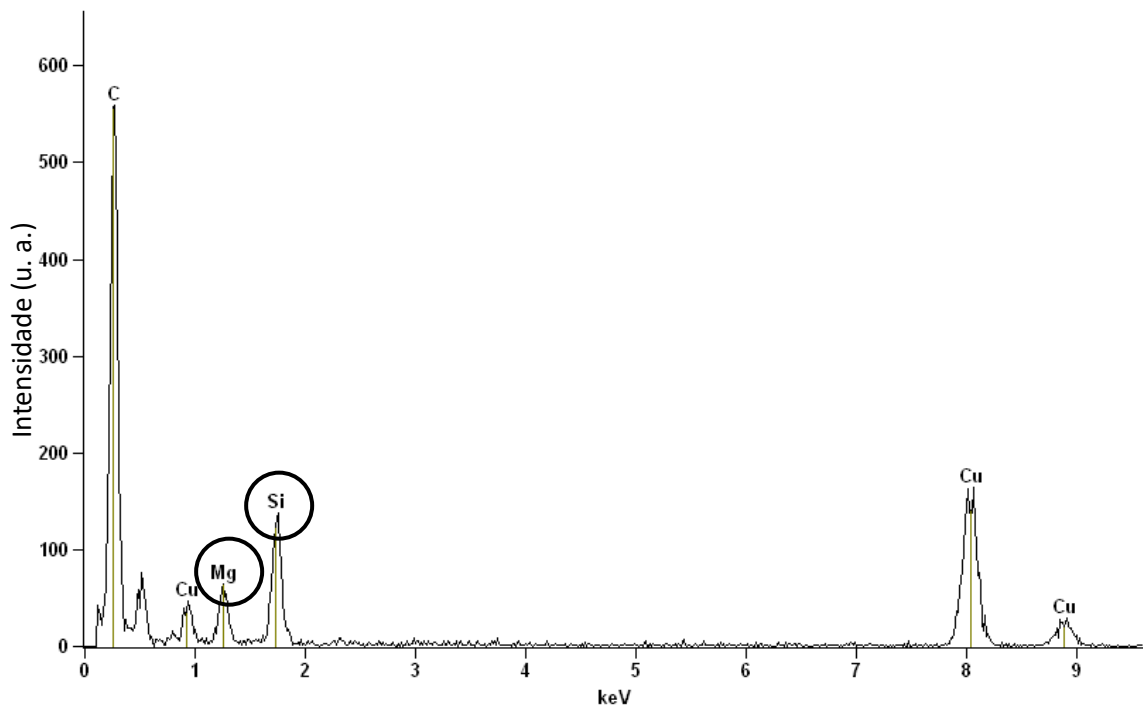
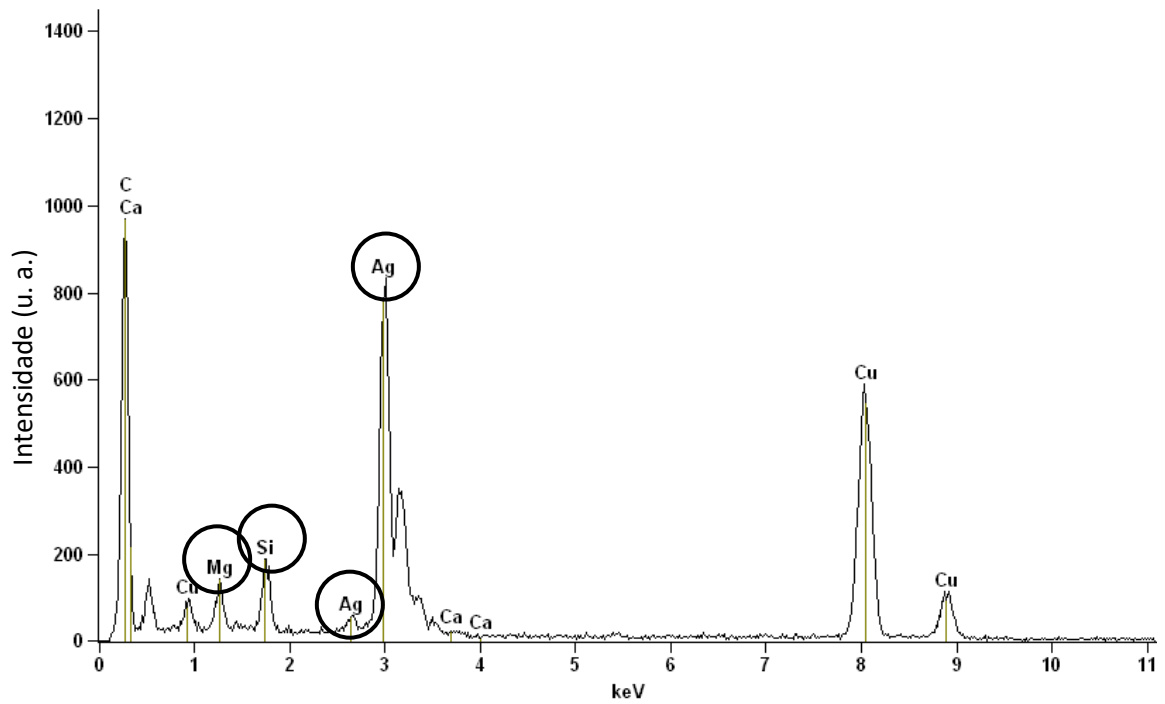


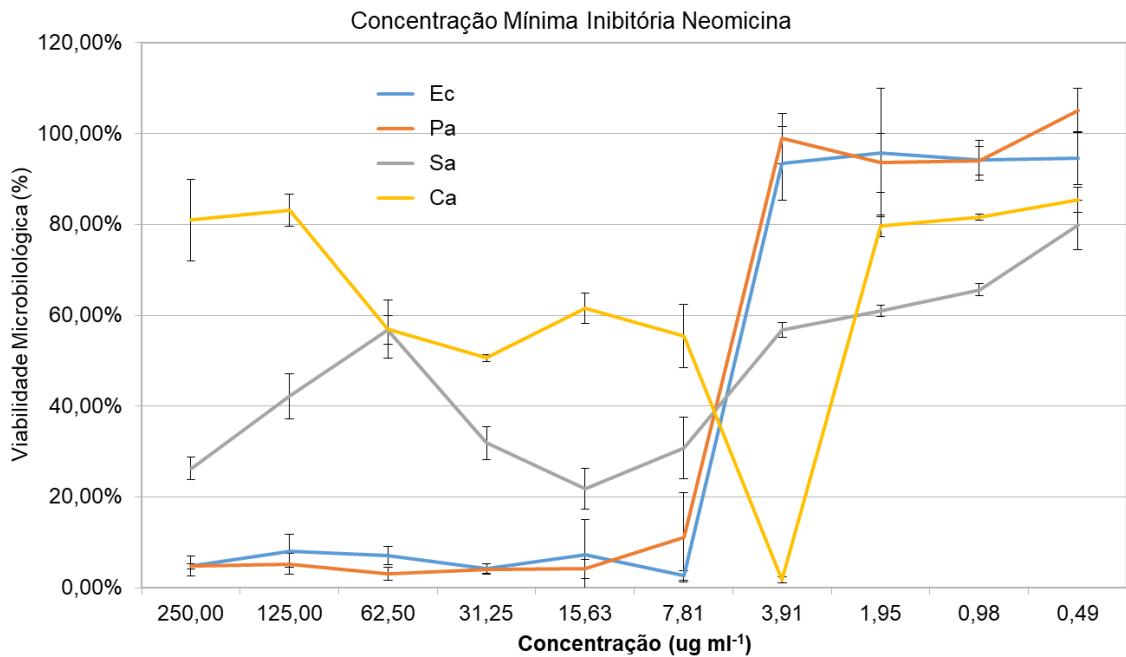
Figura 18 EDS das AgNPs sintetizadas por irradiação gama



5.1.4 Microbiologia

As Figuras 28 e 29 mostram os resultados de concentração mínima inibitória da NEO e da NPG respectivamente que foi selecionada para os ensaios biológicos. Os ensaios foram feitos em Pa, Ec, Sa e Ca. Os resultados foram expressos em viabilidade microbiológica versus concentração de agente antimicrobiano.

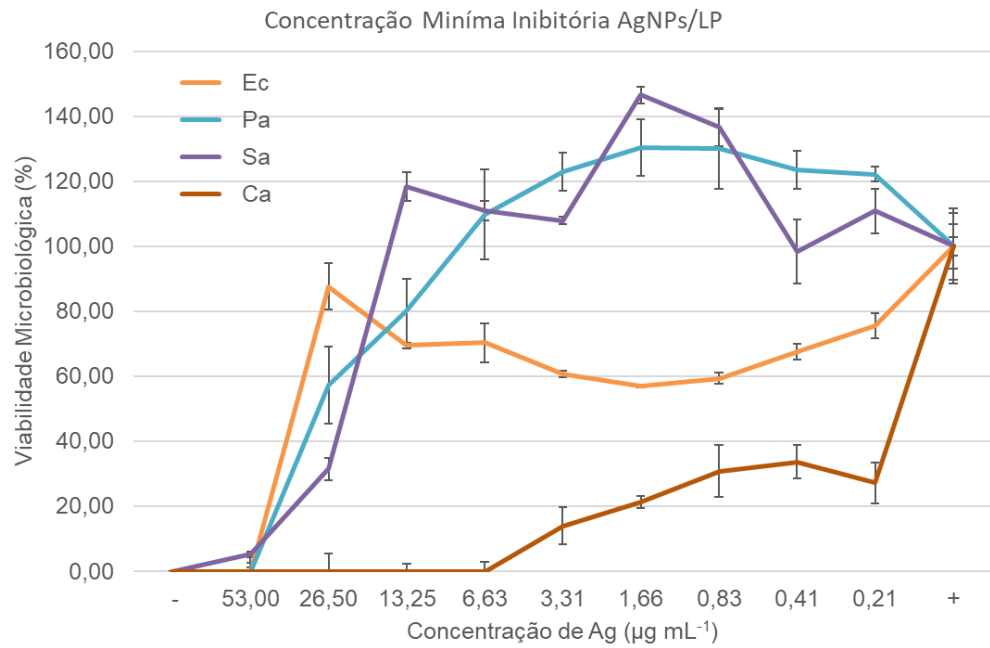
Figura 19 Avaliação da concentração mínima inibitória da neomicina



A Figura 19 demonstra que a NEO atua como antimicrobiano contra *Ec* e *Pa* acima de 7,81 µg mL⁻¹, no entanto não apresenta a mesma atuação contra *Sa* e *Ca*, pois em nenhuma das concentrações apresentou viabilidade microbiológica menor que 20% para *Sa* e 50% para *Ca*. Esses resultados evidenciam que a neomicina é muito eficiente contra *Ec* e *Pa*, porém não é eficiente contra *Sa* e *Ca*.

A Figura 20 demonstra que NPG atua como antimicrobiano contra *Ca* até 6,63 µg mL⁻¹. A NPG também demonstrou atividade bactericida contra *Pa*, *Ec* e *Sa* porém em concentração maior (53,00 µg mL⁻¹).

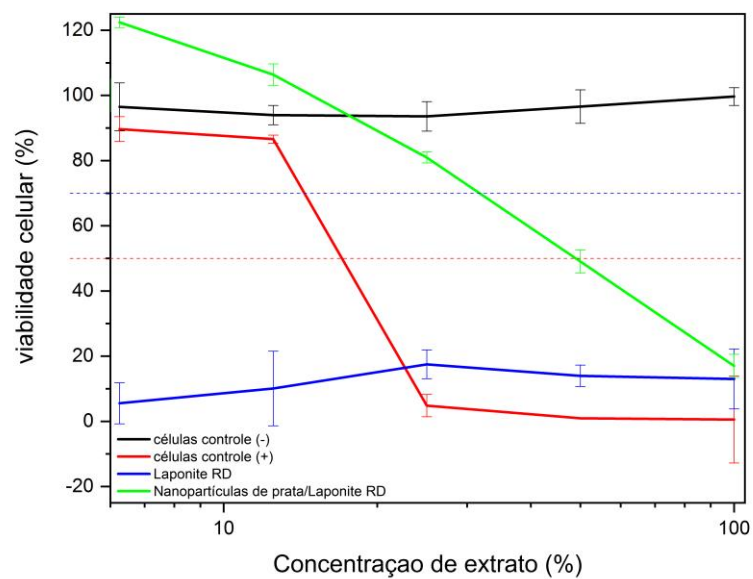
Figura 20 Avaliação da concentração mínima inibitória da NPG



5.1.5 Citotoxicidade

A Figura 21 mostra o resultado de viabilidade celular da LP pura e da AgNPs/LP sintetizada por irradiação.

Figura 21 Gráfico de viabilidade celular da nanopartícula de prata/Laponite (50 ppm) e Laponite pura (10%)



As respectivas concentrações de LP e NPG estão listadas na tabela 10. Os resultados apontam que a LP pura se mostra citotóxica em todas as concentrações. Foi observado também que a AgNPs apresentou citotoxicidade em concentrações acima de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 10 Relação entre concentração de extrato e LP; AgNPs/LP.

Concentração de extrato	NPG ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LP (g L^{-1})
100 %	50	50
50 %	25	25
25 %	12,5	12,5
12,5 %	6,25	6,25
6,25 %	3,125	3,125

Levando todas essas análises e ensaios em consideração, foi selecionado para o prosseguimento do projeto a nanopartícula NPG e para adição às formulações de Hidrogel HGS e HGNS.

5.2 Resultados dos Hidrogéis

Os hidrogéis são constituídos de redes poliméricas interligadas por ligações fracas ou covalentes. Segundo Haraguchi e Takehisa (2002) um dos principais objetivos no estudo de hidrogéis tem sido controlar a densidade de reticulação ν (número de cadeias reticuladas por unidade de volume) e o peso molecular entre ligações cruzadas M_c (o comprimento médio das cadeias entre pontos da ligação cruzada) independentemente. Sendo que o aumento de ν sempre é acompanhado por uma diminuição em M_c .

Oyen (2014), em revisão cita a equação 5 que expressa matematicamente a relação entre o tamanho médio das moléculas entre as ligações e o coeficiente de intumescimento (Q), onde β é uma constante relacionada ao volume específico do polímero e M_c é o peso molecular médio entre dois pontos de ligação cruzadas adjacentes.

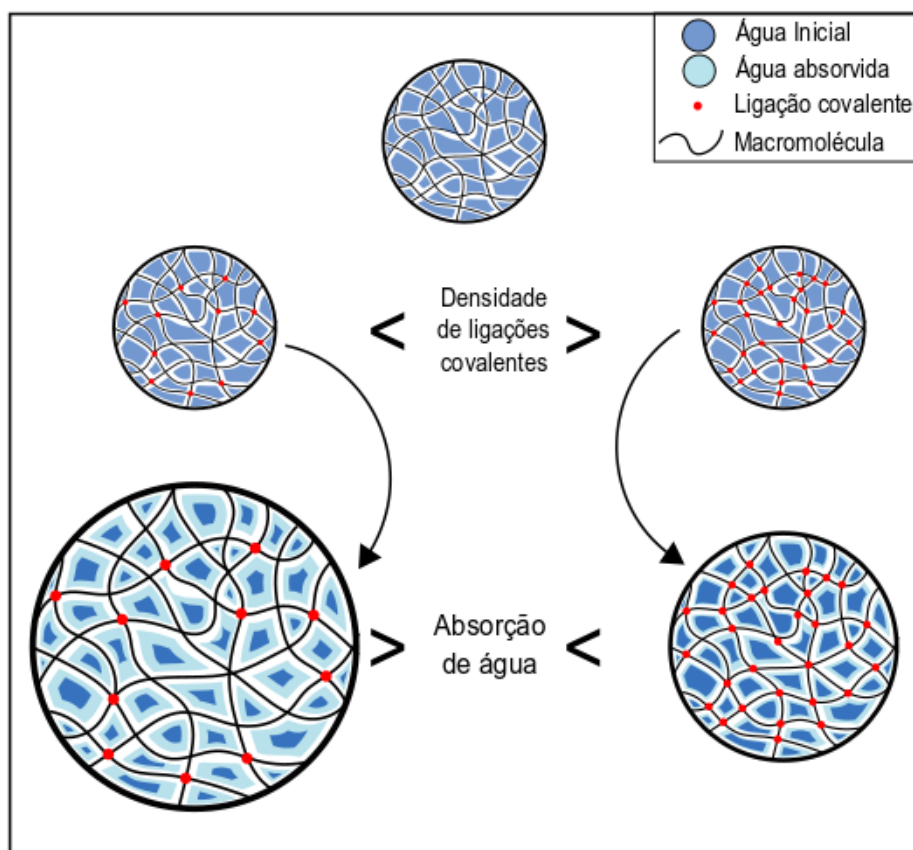
$$Q = \beta \bar{M}_c^{3/5} \quad (5)$$

5.2.1 Intumescimento

Os hidrogéis são compostos por polímeros que possuem grupos hidrofílicos e por isso absorvem grandes quantidades de água, porém o intumescimento gerado pela absorção da água pode ser regulado pela estrutura molecular dos hidrogéis.

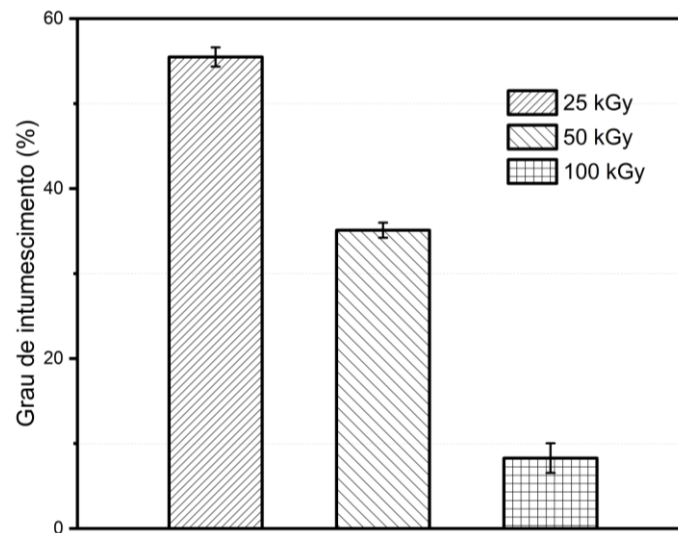
Isso significa que apesar dos hidrogéis possuírem grupos hidrofílicos, a quantidade de água que ele absorve é fortemente dependente da densidade do retículo. Então seguindo a lógica estabelecida pela equação 5, quanto mais densa for a rede polimérica menor será grau de intumescimento como está ilustrado na figura 22, essa contextualização teórica é fundamental para a elucidação e compreensão dos resultados seguintes.

Figura 22 Ilustração do intumescimento em função da densidade de retículo



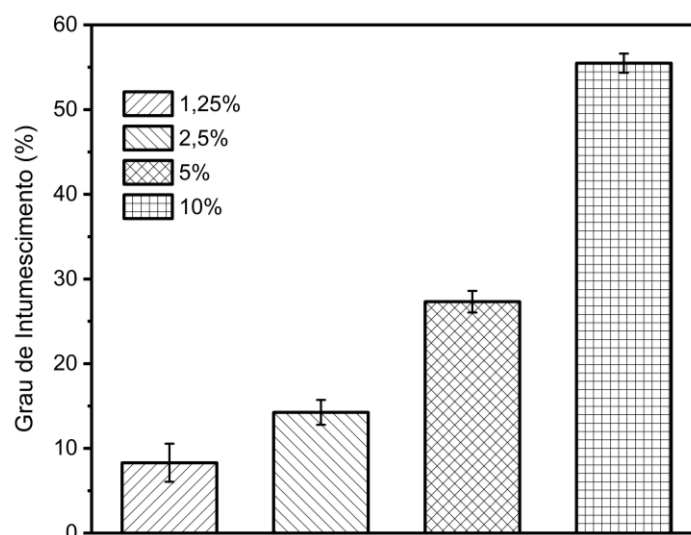
A figura 23 mostra os resultados de intumescimento dos hidrogéis em função da dose de radiação. Foi observado que o intumescimento dos hidrogéis diminuiu acima da dose 25 kGy. Isso indica que as doses de 50 e 100 kGy produzem um retículo muito denso nos hidrogéis.

Figura 23 Grau de Intumescimento dos hidrogéis em função da dose de irradiação



A figura 24 mostra o resultado de intumescimento máximo em função da concentração de PVP. Os resultados apontam que os hidrogéis com menor concentração de PVP podem intumescer menos do que hidrogéis com concentração mais alta de PVP. Isso ocorre pelo fato de, nos hidrogéis com maior concentração de polímeros, existem mais grupos funcionais hidrofílicos disponíveis para interagir com as moléculas de água.

Figura 24 Grau de Intumescimento hidrogéis em função da concentração de PVP

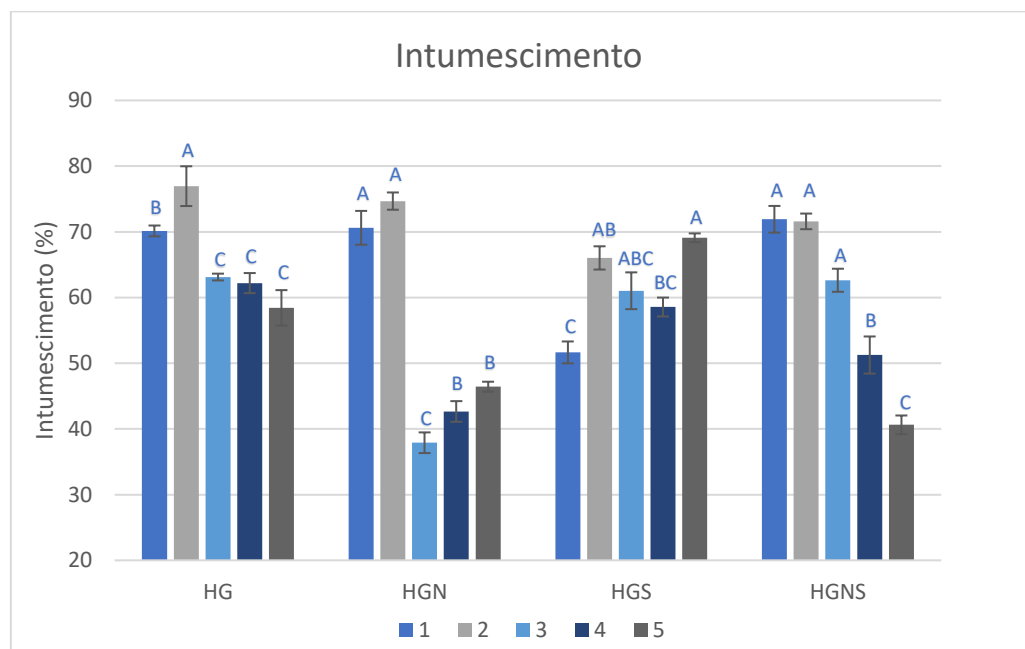


A partir desses dois resultados, foi definido que a formulação base e dose de irradiação utilizada para o prosseguimento projeto seriam de 10% de PVP, 1,5% de ágar, e 1% de PEG e dose de irradiação a 25 kGy. Esses parâmetros foram estabelecidos inicialmente pois um dos objetivos do trabalho foi avaliar a influência

da argila LP sobre as propriedades do hidrogel de PVP, para tanto foram fixadas essas condições.

A figura 25 apresenta grau de intumescimento máximo (%) dos hidrogéis das formulações HG, HGN, HGS e HGNS respectivamente que utilizaram a formulação base adicionada de suas variações de concentração de Laponite RD.

Figura 25 Grau de Intumescimento para os hidrogéis



Os resultados apontam que a adição de argila LP influenciou sistemicamente no intumescimento das formulações HG, HGN e HGNS, pois quando a concentração de argila LP aumenta (de acordo com as formulações 1: 0%; 2: 0,2%; 3: 0,5%; 4: 1%; 5: 2%) o intumescimento diminui. Essa correlação acontece com maior acentuação para as formulações HGN e HGNS. Já nas formulações HGS o efeito não se observa.

Segundo Oyen (2014), em sua revisão sobre caracterização mecânica de hidrogéis, o grau de intumescimento em hidrogéis é diretamente proporcional ao peso molecular médio entre dois pontos adjacentes de ligação cruzada. Supondo que a quantidade de moléculas é a mesma (para um hidrogel), se o intumescimento varia obrigatoriamente a quantidade de ligações cruzadas deve variar inversamente.

Segundo Haraguchi et al. (2002) a formação da estrutura dos hidrogéis nanocompósitos baseados em formulações polímero/argila, é diferente dos hidrogéis homogêneos (baseado somente em polímeros). Para Haraguchi nos hidrogéis nanocompósitos, as folhas de argila atuam como agentes de reticulação multifuncionais para o polímero ou seja a argila se torna uma espécie de estação de terminação de cadeia. E a distância entre ligação cruzada (DIC) é equivalente à distância entre as partículas de argila.

Então para Hidrogéis nanocompostos, DIC é equivalente a M_c e pode ser determinado/regulado pela concentração de argila, desde que a argila seja esfoliada e folhas de argila sejam fixadas em posições uniformemente dispersas.

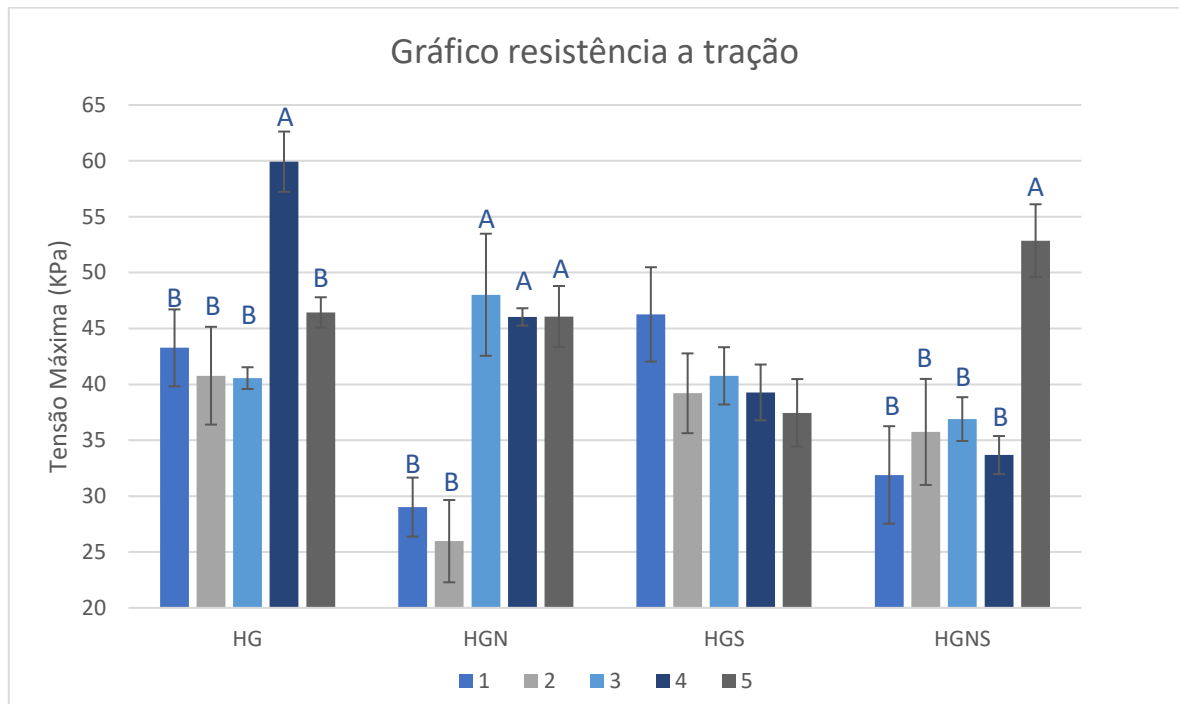
Segundo Haraguchi et al. (2003), o aumento da concentração de argila influencia na diminuição do intumescimento e aumento da resistência a tração e do módulo, isso é justificado pelo aumento na densidade de reticulação.

5.2.2 Tensão máxima e deformação máxima

O ensaio de tração é uma caracterização muito comum para materiais sólidos, pois resulta em propriedades como módulo de Young, tensão máxima, deformação máxima entre outras propriedades dos materiais, porém hidrogéis são naturalmente materiais multifásicos (polímero/água) e o entendimento completo da resposta mecânica extraída do ensaio de tração não resulta de tratamento simples como em outros materiais. Além disso, esse teste apresenta grandes desafios como o de prender corpos de prova nas garras da máquina de teste com risco de baixa reprodutibilidade.

A Figura 26 apresenta os resultados da resistência mecânica (KPa) dos hidrogéis nas formulações HG, HGN, HGS e HGNS respectivamente, obtidos por meio das curvas de tensão versus deformação do ensaio de tração.

Figura 26 Gráfico de tensão máxima dos hidrogéis para os hidrogéis da formulação HG

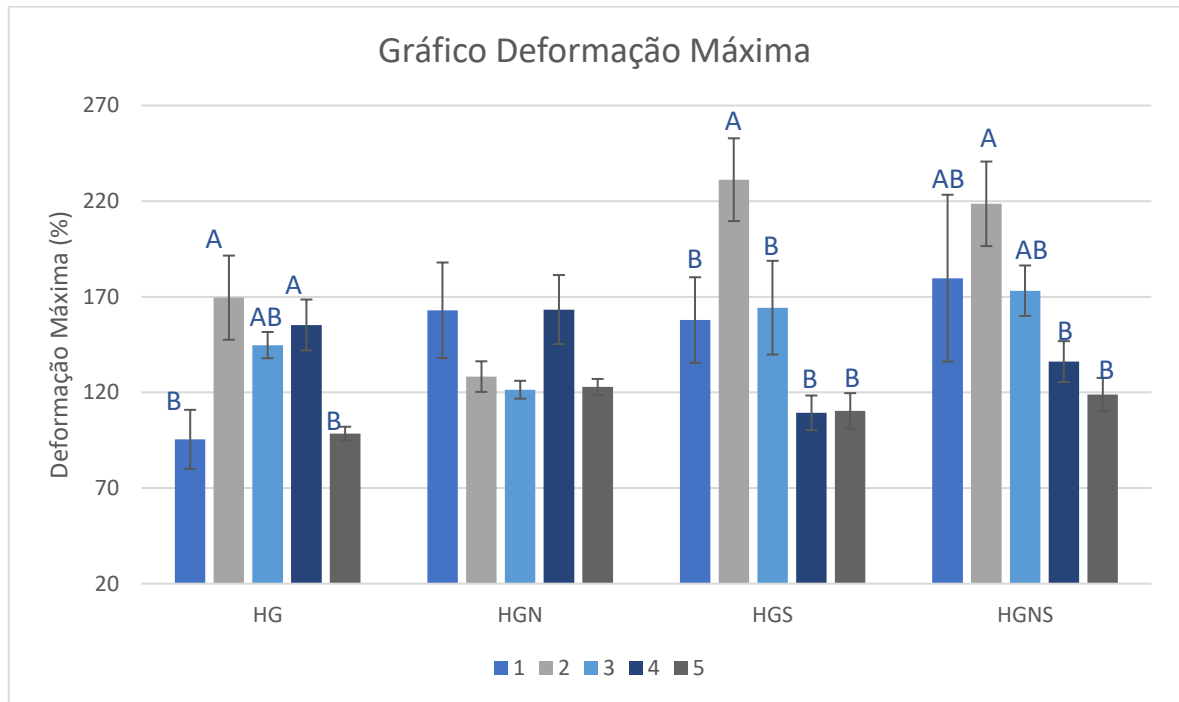


Quando se observam as formulações 1, que são as formulações sem Laponite, evidencia-se que a neomicina interage estruturalmente com a matriz polimérica afetando suas propriedades mecânicas, bem como a tensão máxima. Essa característica fica clara quando se compara os valores médios de tensão: HG e HGS (44 e 47 KPa), HGN e HGNS (29 e 32 KPa).

Não foram observadas alterações significativas nos resultados, que corroborem as informações prestabelecidas na literatura, que diz respeito ao módulo de tração e à resistência à tração aumentarem quase em proporção à concentração de argila. Isso pode estar ligado a grande dificuldade de realização desse ensaio devido à falta de reprodutibilidade, que também é citado na literatura por Oyen (2014).

A Figura 27 apresenta os resultados da deformação máxima (%) dos hidrogéis nas formulações HG, HGN, HGS e HGNS. Essas informações foram obtidas por meio das curvas de tensão versus deformação do ensaio de tração.

Figura 27 Gráfico de Deformação máxima para os hidrogéis da formulação HG



Os resultados de deformação expressos demonstram que os hidrogéis que continham 0,2% de Laponite na formulação apresentaram os maiores resultados de deformação máxima exceto para os hidrogéis das formulações HGN. Esse dado corrobora os resultados de intumescimento pois as formulações com 0,2% de Laponite também apresentaram maiores valores de absorção de água.

5.2.3 Comportamento Viscoelástico

Segundo Zuidema et al. (2014) no regime linear-viscoelástico, a dependência de frequência dos módulos dinâmicos $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ pode ser usada para deduzir aspectos importantes da estrutura do gel e do comportamento mecânico. Por exemplo, com varreduras de frequência, podemos detectar o caráter do gel (grau de reticulação), entrelaçamento e transição vítrea e alguns detalhes da arquitetura da cadeia. Oyen (2014) utiliza a equação 6 para expressar a relação do tamanho médio das moléculas (M_c) entre as ligações e o módulo de elasticidade (G), onde ρ é a densidade R é a constante de gás ideal e T é a temperatura.

$$G = \frac{\rho RT}{M_c} \quad (6)$$

As Figura 28, 29, 30 e 31 apresentam os resultados de módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') dos hidrogéis nas formulações HG,

HGN, HGS e HGNS respectivamente. O equipamento utilizado foi o reômetro de placas paralelas. O valor do módulo de armazenamento apresentou-se acima do valor do módulo de perda em todos os hidrogéis, evidenciando o comportamento elástico superior ao viscoso dos hidrogéis sintetizados.

O módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') são mostrados em função da frequência. Pode-se observar que G' e G'' são aproximadamente paralelos dentro da faixa estudada.

Foi observada uma predominância de G' sobre G'' para o intervalo de tensão de cisalhamento aplicado para cada hidrogel indicado armazenamento de energia dentro da estrutura de hidrogel. Segundo Alsarra (2011) esse é o comportamento esperado para hidrogéis, onde o comportamento elástico da amostra predomina sobre o seu comportamento viscoso devido a rede de cadeias poliméricas com ligações cruzadas altamente reticuladas, bem como sistemas fisicamente emaranhados.

Figura 28 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (G'') (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HG

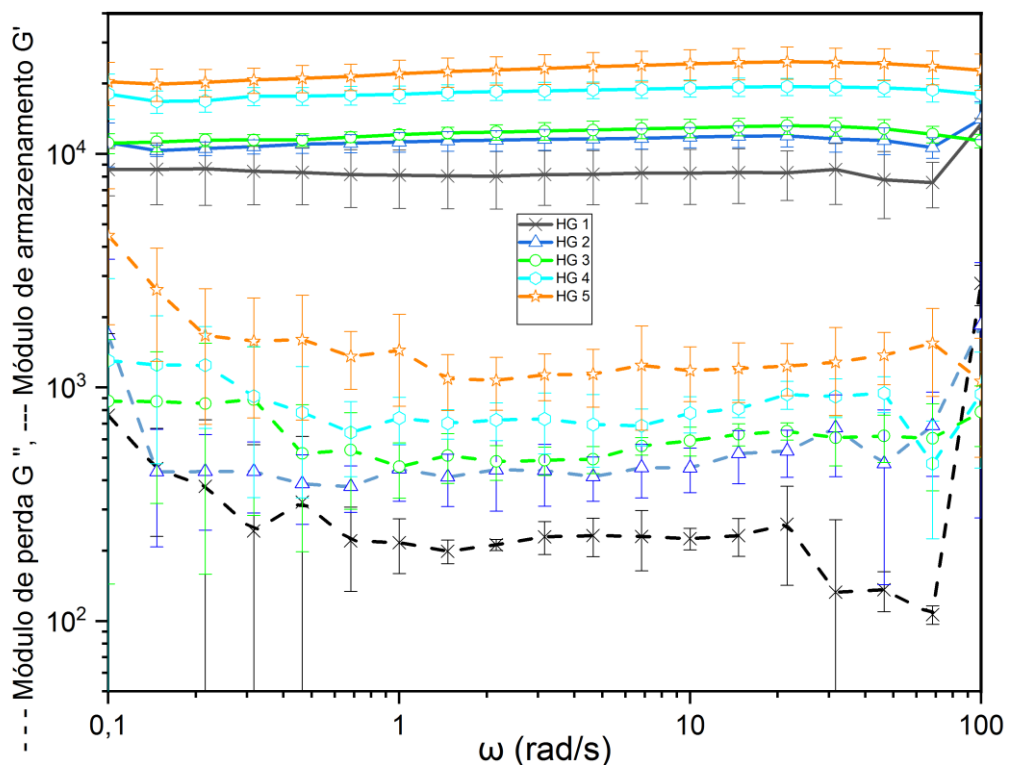


Figura 29 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (G'') (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HGN

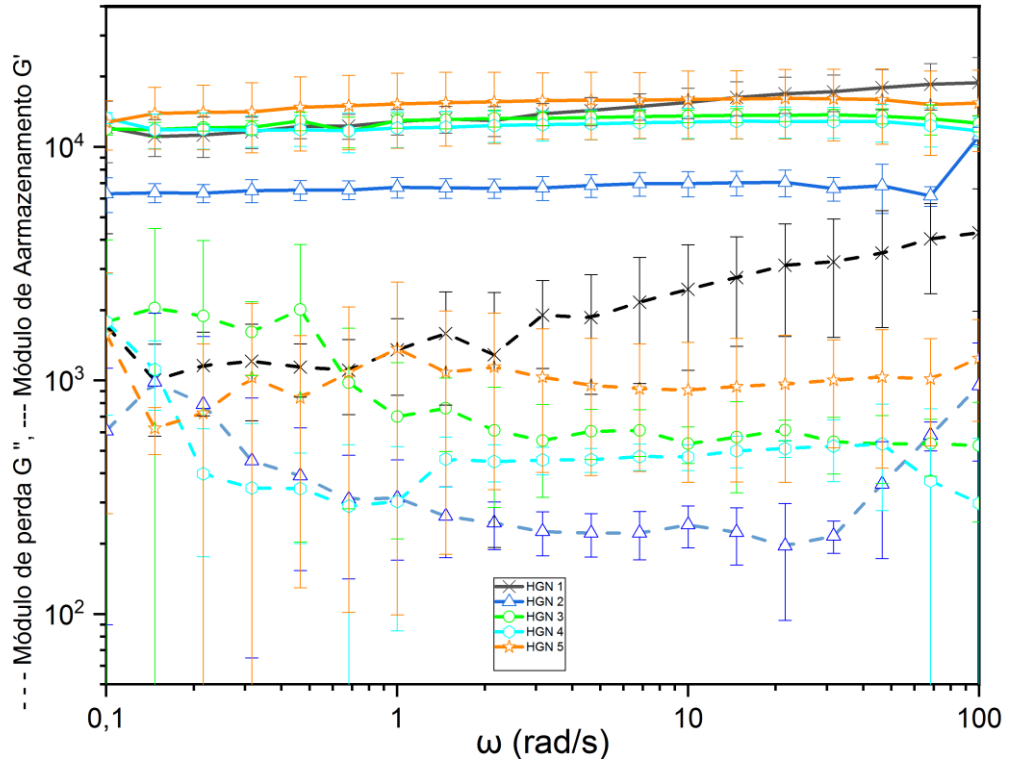


Figura 30 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (G'') (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HGS

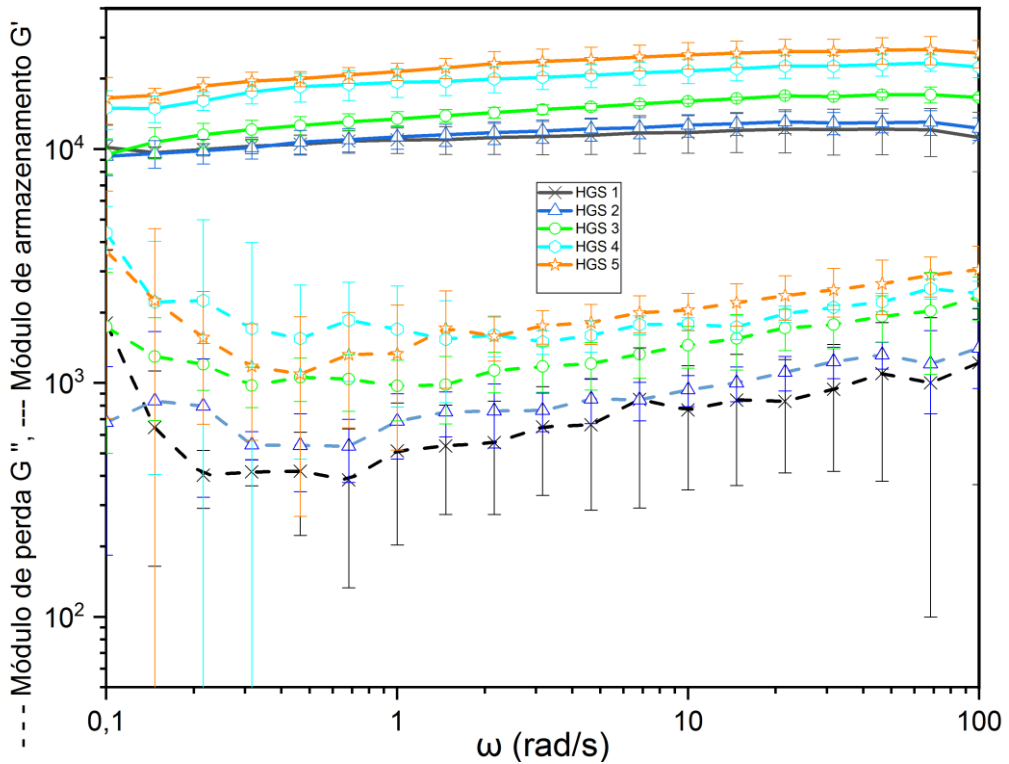
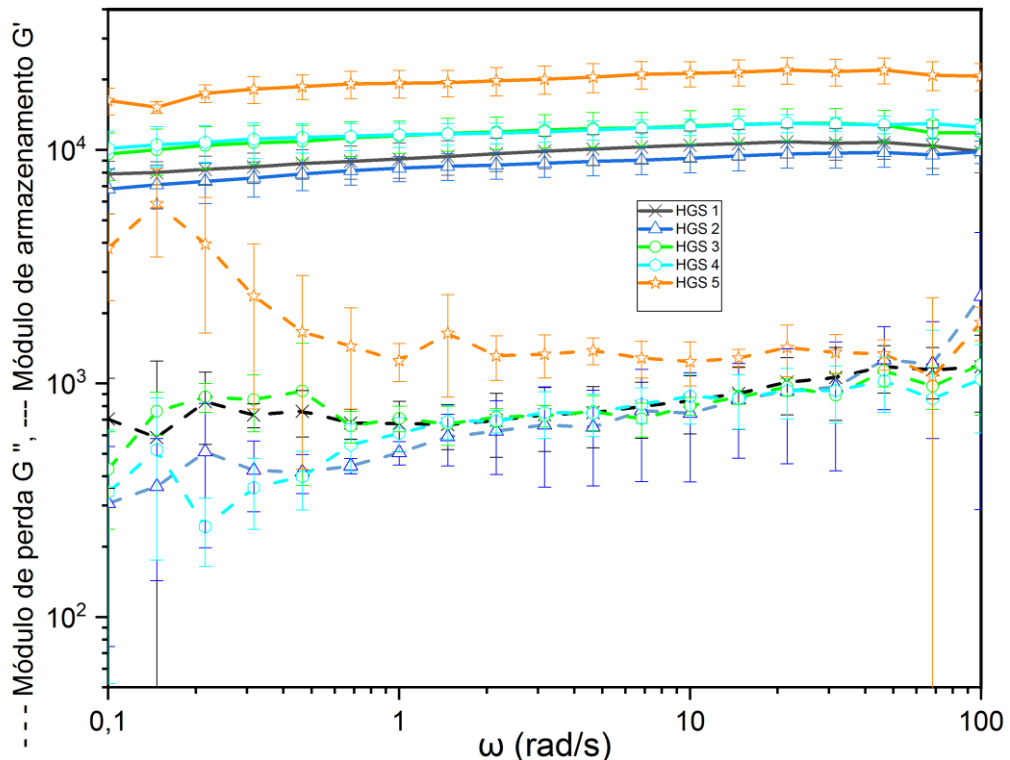


Figura 31 Gráfico de módulo de armazenamento (G') (linha contínua) e módulo de perda (G'') (linha tracejada) em função da frequência (ω) para os hidrogéis da formulação HGNS



A figura 32 mostra um gráfico de correlação entre a concentração de argila e o módulo de armazenamento (frequência de 10 rad s^{-1}). No módulo de armazenamento, que está relacionado à fase elástica do material, foi observado um aumento em função da concentração de Laponite RD. Esse resultado aponta que a argila atuou como um agente reticulante promovendo o aumento da densidade de reticulação. A figura 33 que mostra a correlação entre módulo de perda e concentração de Laponite, também aponta um aumento.

Quando comparadas as formulações HG e HGS (nas figuras 32 e 33) é observado um aumento tanto no G' quanto no G'' das formulações de HGS em detrimento de HG, evidenciando que as AgNPs/LP também atuaram como reforço mecânico.

Figura 32 Correlação entre módulo de armazenamento e concentração de argila

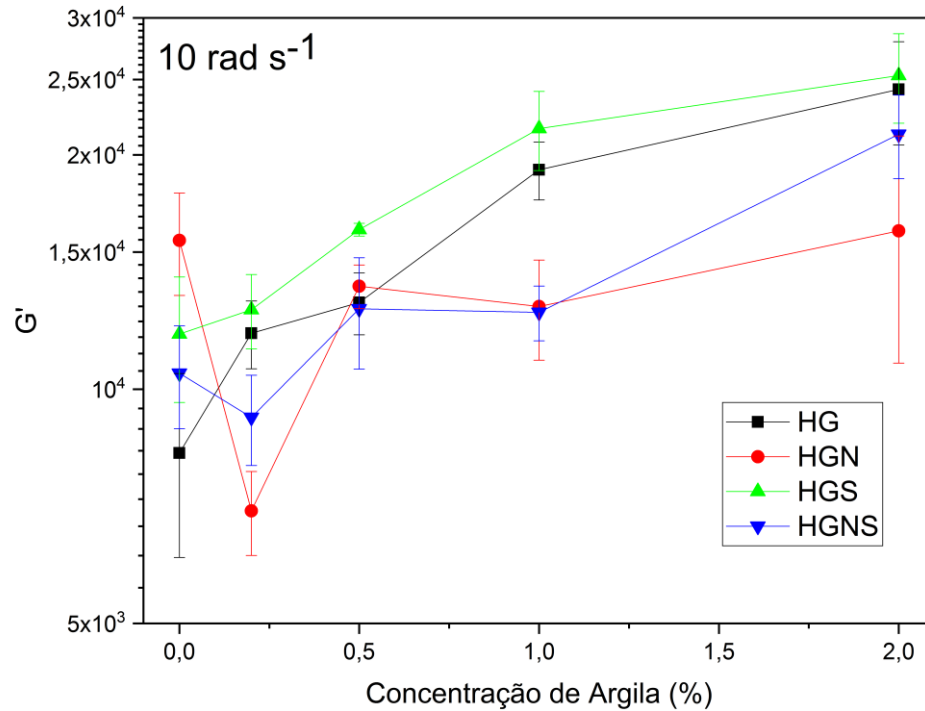
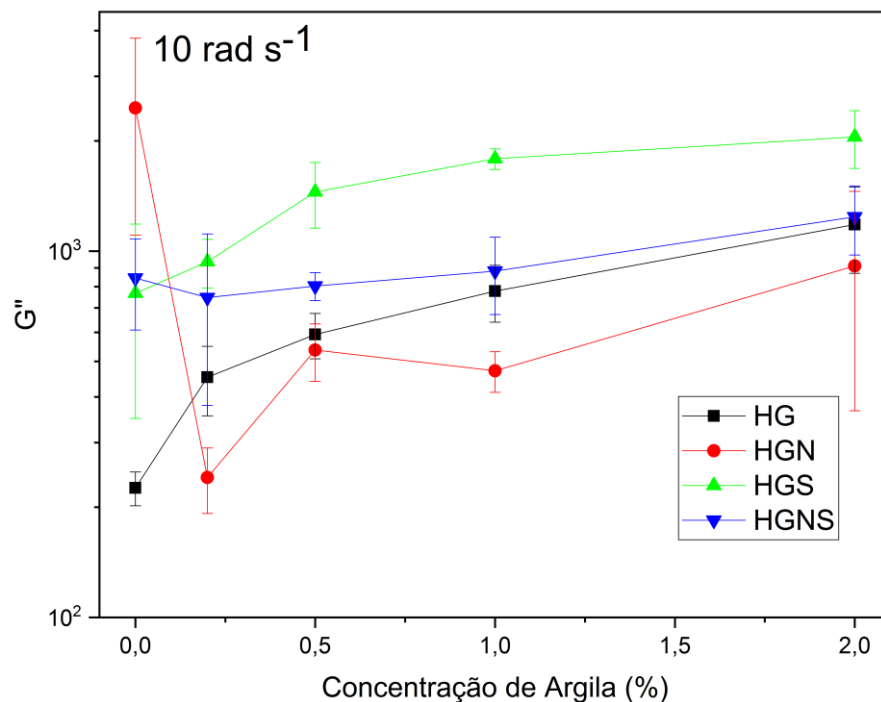


Figura 33 Correlação entre módulo de perda e concentração de argila



Segundo Zuidema et al. (2014) o aumento de G' em hidrogéis geralmente está relacionado ao aumento da densidade de reticulação. Quando essa propriedade é utilizada para avaliação de hidrogéis nanocompósitos, pode-se considerar as avaliações de Haraguchi et al. (2002, 2003), que dizem que a

quantidade de partículas de argila delimita as terminações das cadeias, e proporcionam melhores resultados pois homogeneízam essas distâncias. Acontece que se há uma concentração de argila muito alta as distâncias acabam ficando menores e mais pontos de reticulação são gerados e com isso o intumescimento diminui e a resistência à tensão e o módulo de elasticidade aumentam.

Segundo Haraguchi et al. (2002) existe interações de coordenação entre N(H)CO nucleofílico em cadeias de PNIPA e Si na superfície da argila. Outros estudos apontam que existe três possibilidades de interações entre as moléculas orgânicas com grupos $-C=O$ e partículas de argila:

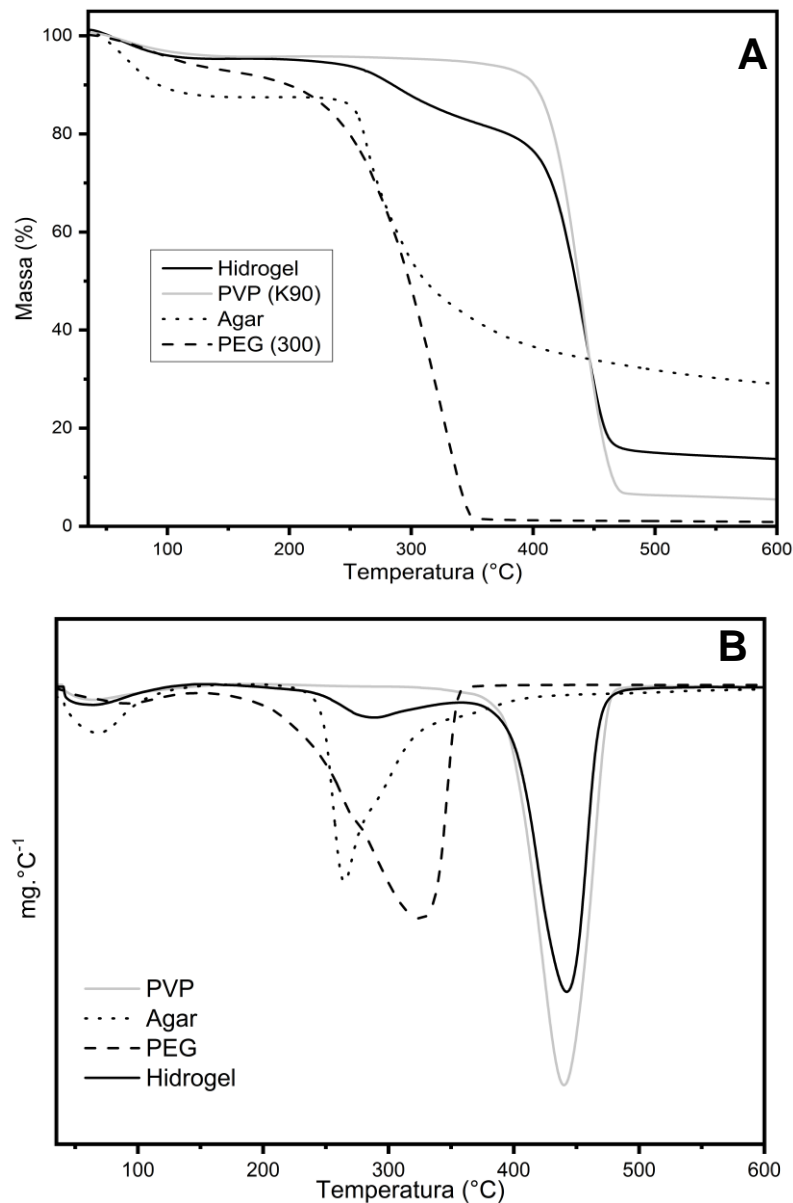
- Troca aniônica entre as hidroxilas da superfície do mineral e os ânions $-C=O$ do polímero;
- Formação de ligação de hidrogênio entre as hidroxilas da superfície e os $C=O$ do polímero;
- Estabilização das ligações entre íons divalentes, originados através de forças eletrostáticas.

Essas interações aumentam a reticulação do gel, o que proporciona o aumento nas suas propriedades mecânicas. (GÜNGÖR et al. 2011)

5.2.4 Termogravimetria

Inicialmente foram realizadas análises de TG/DTG em amostras de polímero de PVP, PEG e de ágar e o hidrogel para se observar a estabilidade térmica de cada material e do hidrogel grupo controle. Os resultados são mostrados na figura 34 em forma de termogramas, ou seja, curvas de perda de massa em função da temperatura.

Figura 34 Termograma das perdas de massa (A) e derivadas (B) dos polímeros utilizados para sintetizar o hidrogel e o hidrogel HG



Foi observado em todos os materiais, que entre 25 e 200 °C houve eventos característicos de evaporação da água. Esta água pode ser estrutural ou estar adsorvida à matéria-prima, principalmente compostos hidrofílicos tais como PVP, PEG e ágar.

Os resultados mostram que o início de degradação dos polímeros PEG e o ágar ocorrem em temperaturas (140°C e 171°C) diferentemente do PVP (364°C). Já o hidrogel mostrou três eventos de perda de massa:

- Primeiro de perda de água; (Brant, 2008)

- Segundo por decomposição de PEG e Agar;
- Terceiro relacionado à degradação do PVP como cadeia principal.

Também foram analisados os hidrogéis que continham LP. Os resultados estão expressos por meio da tabela 10, onde constam os resultados de T_{onset} dos 2º e 3º evento de decomposição relacionados ao PEG/ágar e PVP respectivamente.

Tabela 11 Resultados de Tonset do segundo e terceiro evento de degradação dos hidrogéis.

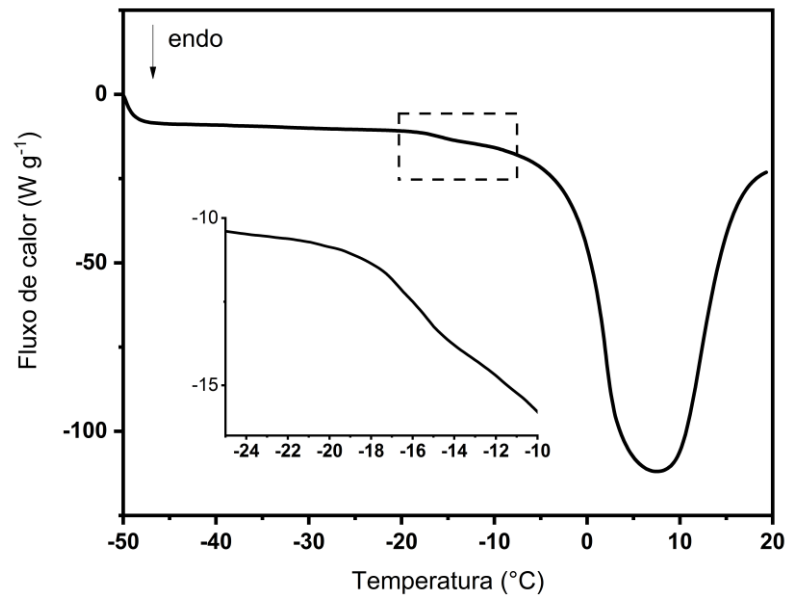
Concentração de LP	2º T_{onset} (°C)	3º T_{onset} (°C)
HG 1	245	392
HG 2	244	388
HG 3	238	391
HG 4	237	388
HG 5	235	389

A tabela 11 demonstra que a T_{onset} de degradação dos polímeros PEG e ágar foi retardada em função da adição de argila. Também se observou que a argila não influenciou significativamente a T_{onset} de degradação do PVP.

5.2.5 Calorimetria exploratória Diferencial

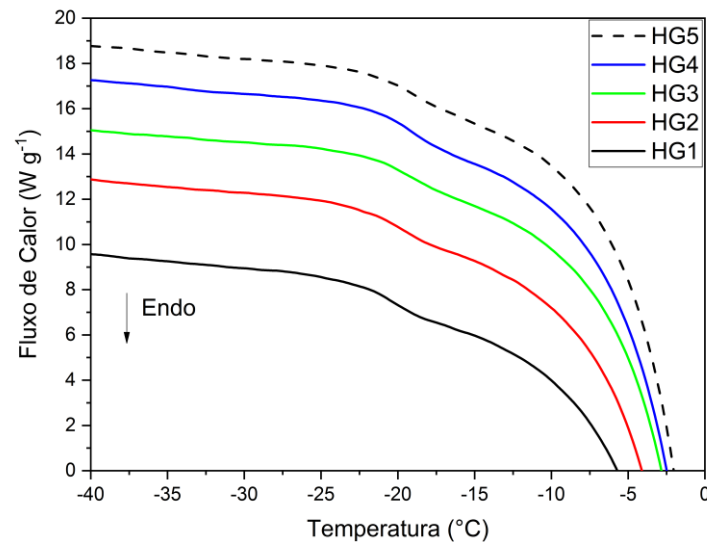
A figura 35 mostra um termograma produzido por calorimetria exploratória diferencial, podemos observar uma região destacada em linhas pontilhadas que representa a temperatura de transição vítrea (T_g) de um hidrogel. Foram destacados nas figuras 36, 37, 38 e 39 a região de T_g das respectivas formulações HG, HGN, HGS e HGNS. A T_g está relacionada a mobilidade das cadeias e nos hidrogéis (no estado intumescido) se apresenta em temperaturas abaixo de 0°C.

Figura 35 Termograma que indica a Tg do hidrogel



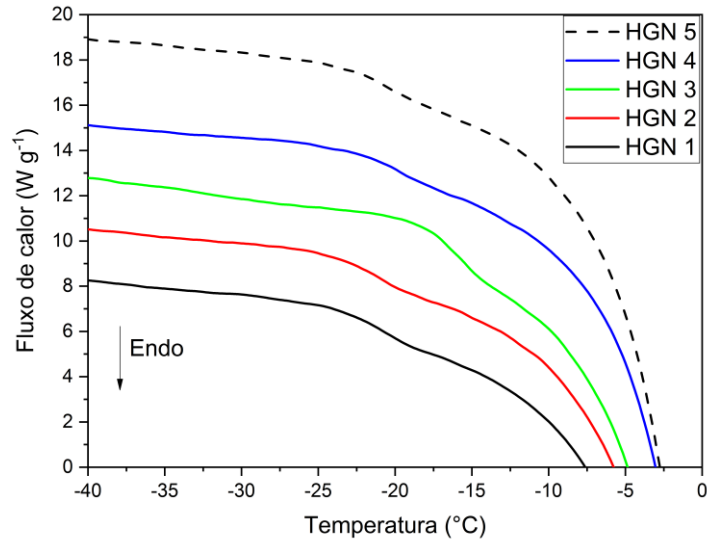
A figura 36 mostra a temperatura de transição vítrea (T_g) das formulações HG, observa-se por meio do termograma que as diferentes concentrações de argila não influenciaram na transição vítrea do material pois todas as amostras apresentaram a T_g em $-18^{\circ}C$.

Figura 36 Termograma que indica a T_g do hidrogel (formulação HG)



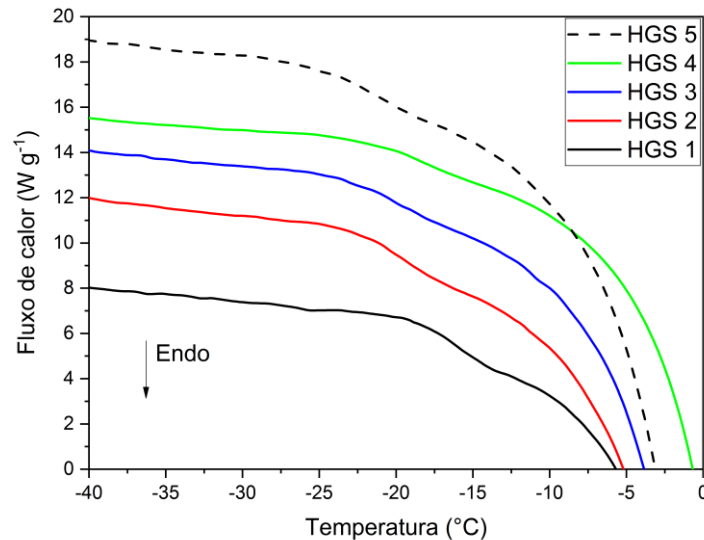
A figura 37 mostra a transição vítrea das formulações HGN, observa-se por meio do termograma que as diferentes concentrações de argila não influenciaram na transição vítrea todas as amostras apresentaram a T_g em aproximadamente $-18^{\circ}C$ do material exceto para a formulação HGN3 que apresentou um atraso na temperatura de T_g ($-15^{\circ}C$).

Figura 37 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HGN)



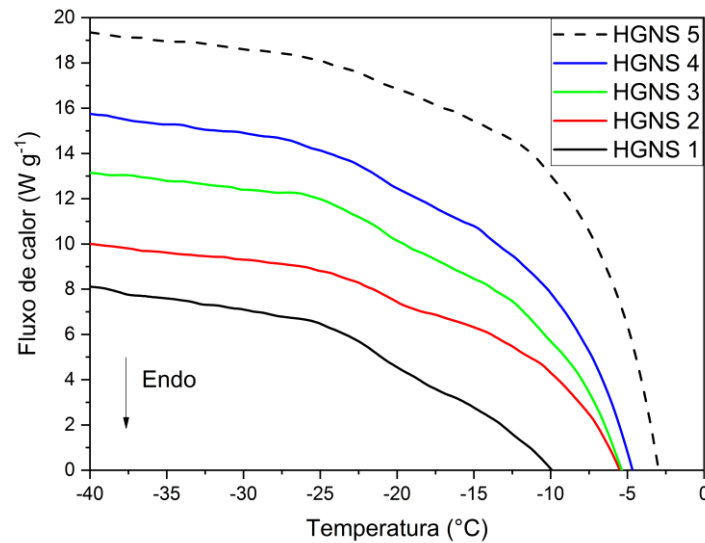
A figura 38 mostra a Tg das formulações HGS, observa-se por meio do termograma que as diferentes concentrações de argila influenciaram na transição vítrea do material houve um aumento progressivo em relação a concentração de argila, HGS 1: -20°C, HGS 2,3 e 4: -17 e HGS 5: -15,5.

Figura 38 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HGS)



A figura 39 mostra a Tg das formulações HGNS, observa-se por meio do termograma que as diferentes concentrações de argila influenciaram pouco na transição vítrea do material sendo que todas as amostras apresentaram a temperatura de Tg igual a -21° C exceto HGNS1 que foi -23°C.

Figura 39 Termograma que indica a Tg do hidrogel (formulação HGNS)



5.2.5 Ensaio de Liberação de Fármaco

As figuras 40 e 41 apresentam os gráficos de liberação dos hidrogéis das formulações HGN e HGNS. Pode se observar que há uma correlação entre a concentração de argila e a concentração de fármaco liberada para as duas formulações HGN e HGNS.

Esse resultado demonstra que a NEO interage com a argila que funciona como um freio de liberação. Essa correlação pode estar ligada a duas propriedades: a primeira é a interação eletrostática da argila (cargas negativas na superfície) e a NEO (fármaco com cargas positivas - catiônico) e a segunda é que o aumento da concentração de argila aumenta a densidade do retículo que dificulta a difusão do fármaco que no entanto é pouco provável devido à grande diferença do tamanho do fármaco e do tamanho do poro.

Figura 40 Gráfico de concentração de neomicina detectada pela técnica de HPLC-MS/MS do ensaio de liberação de neomicina para as formulações de hidrogel: HGN

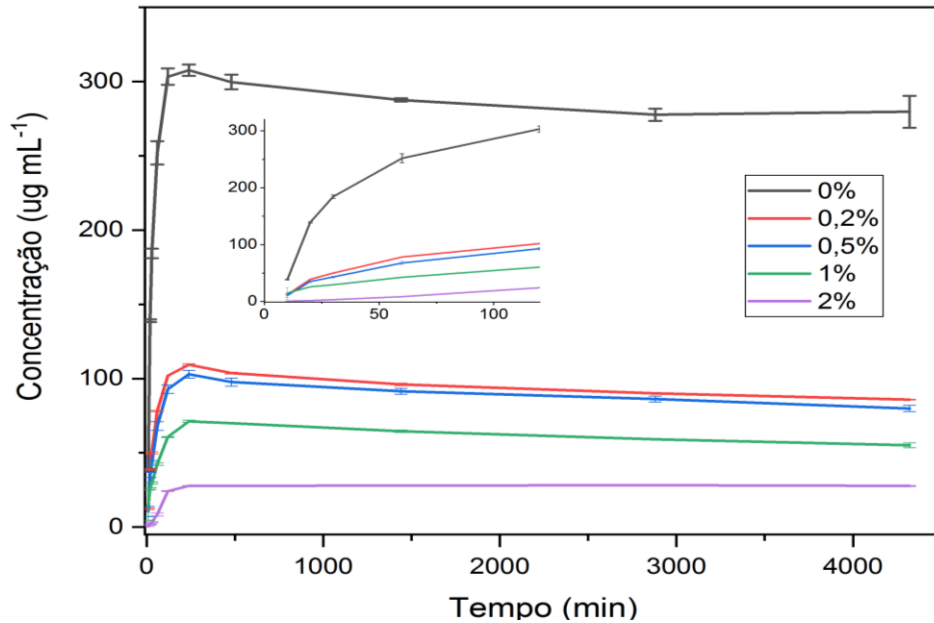
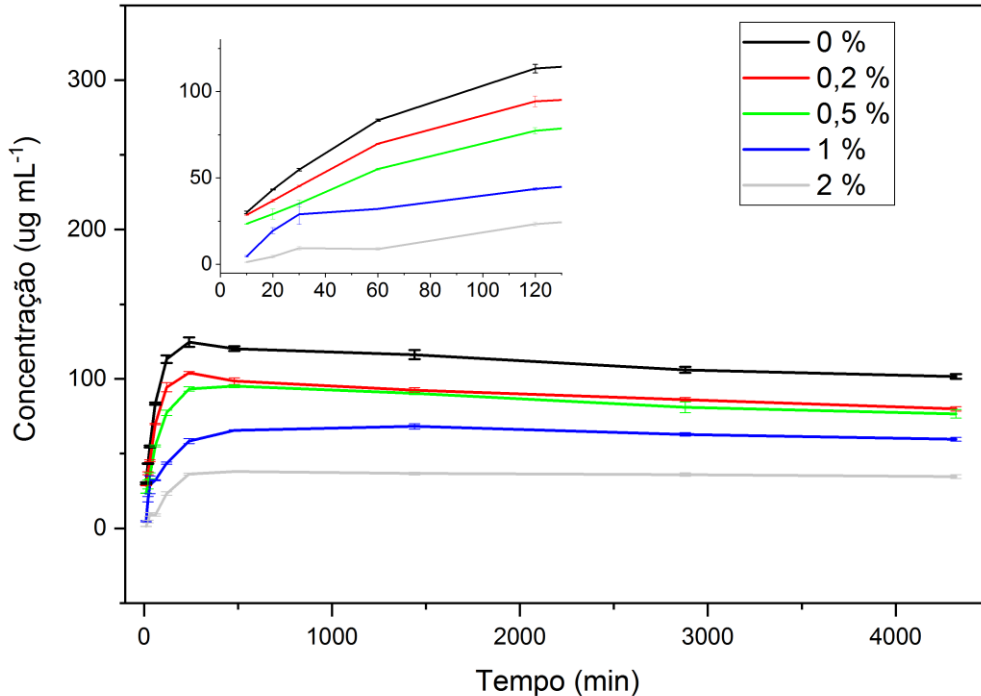


Figura 41 Gráfico de concentração de neomicina detectada pela técnica de HPLC-MS/MS do ensaio de liberação de neomicina para as formulações de hidrogel: HGNS



5.2.6 Ensaio de inibição microbiológica em meio sólido

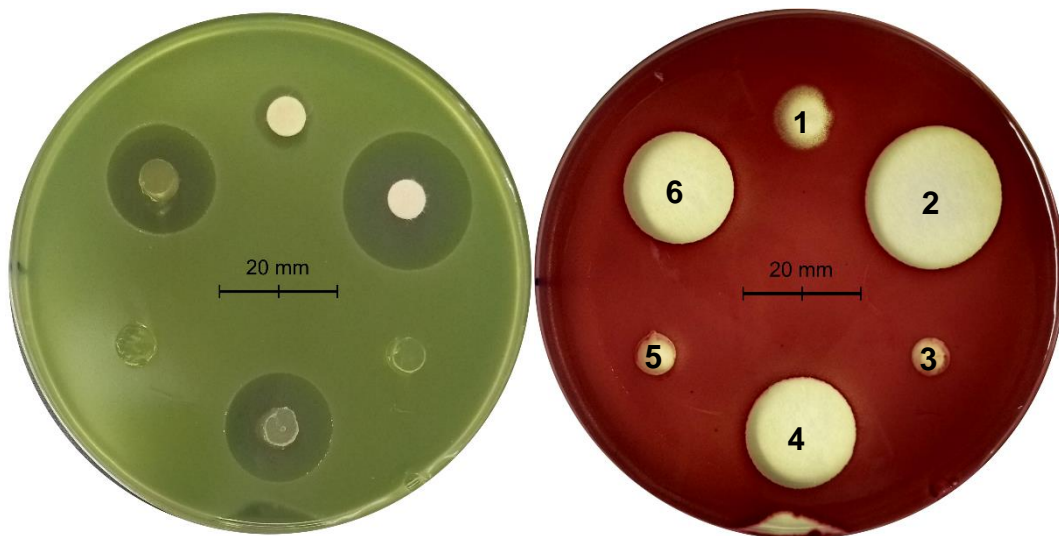
A figura 42, 43, 44 e 45 exibe as placas de Petri onde foram realizados os ensaios de inibição de halo. A esquerda de todas as figuras estão as placas com

os microrganismos sem corante TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) e a direita com o corante.

A figura 42 mostra os resultados de inibição de halo dos hidrogéis HG 2, HGN 2, HGS 2, HGNS 2, NPG e NEO expostos a PA. Observa-se como esperado que a NEO apresenta intensa atividade bactericida para esse microrganismo. Já a AgNPs/LP apresentou um halo extremamente inferior, porém com uma atividade bacteriostática.

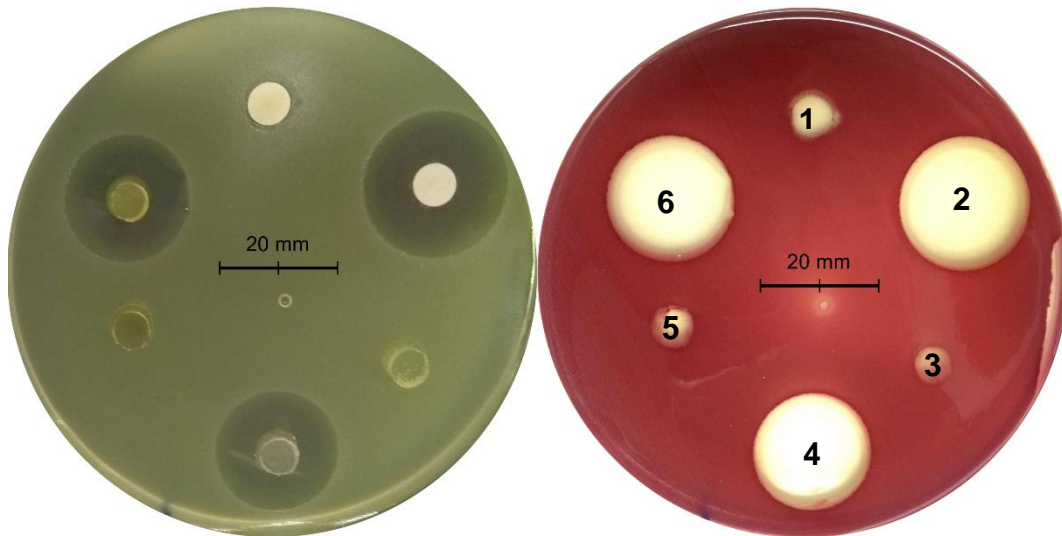
Os hidrogéis HGN2 e HGNS2 apresentaram atividade bactericida. Essa característica ocorreu devido à liberação da neomicina contida no hidrogel corroborando com a liberação de fármaco. Os hidrogéis HG2 e HGS2 apenas apresentaram atividade bacteriostática, pois não apresentam halo além de sua inibição.

Figura 42 Placas do ensaio de inibição de halo para PA onde: 1- NPG; 2- NEO; 3-HG 2; 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2.



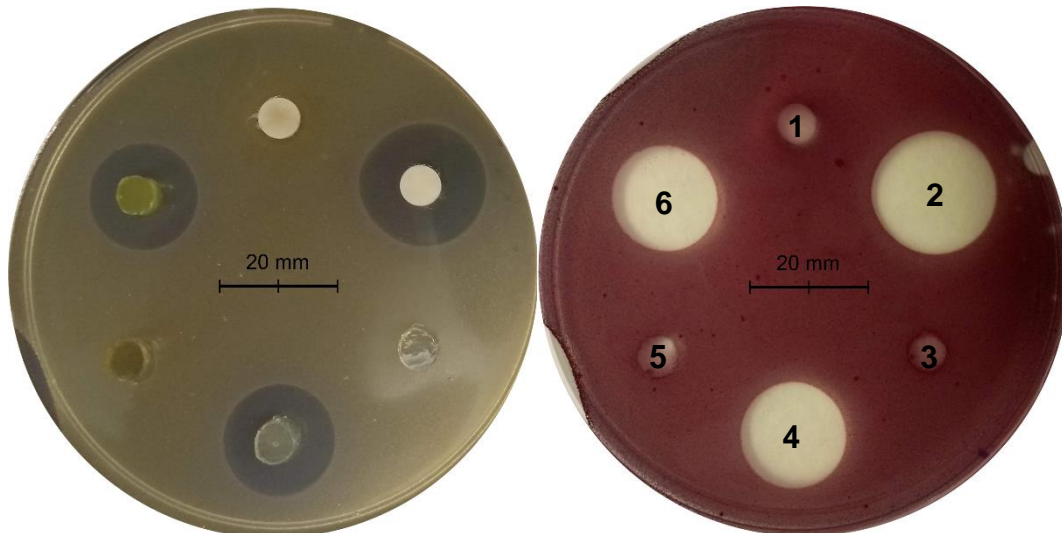
A figura 43 mostra os resultados de inibição de halo dos hidrogéis HG 2, HGN 2, HGS 2, HGNS 2, nanopartículas de prata e Neomicina expostos a *Escherichia coli*. Observamos nas figuras 43 um leve aumento no diâmetro dos halos de inibição do hidrogel HGNS2 em relação aos HGN2. Isso mostra que pode haver uma possível interação entre as atividades bactericidas da nanopartícula de prata e a Neomicina.

Figura 43 Placas do ensaio de inibição de halo para EC onde 1- NPG G; 2 -NEO; 3- HG 2, 4- HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2



A figura 44 mostra os resultados de inibição de halo dos hidrogéis HG 2, HGN 2, HGS 2, HGNS 2, NPG e NEO expostos a SA. Os resultados apresentados para essa bactéria foram similares aos da figura 43.

Figura 44 Placas do ensaio de inibição de halo para SA onde 1-NPG; 2- NEO; 3-HG 2; 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2



A figura 45 mostra os resultados de inibição de halo dos hidrogéis HG 2, HGN 2, HGS 2, HGNS 2, NPG e NEO expostos a CA. Observa-se que as AgNPs/LP apresentaram atividade fungicida frente a esse microrganismo, no entanto, como esperado a NEO não apresentou atividade, pois esse microrganismo não está no espectro de ação do mesmo.

Observa-se que os hidrogéis que continham AgNPs/LP (HGS2 e HGNS2) apresentaram atividade fungicida assim como as AgNPs/LP, esse resultado corrobora os de atividade microbiológica da AgNPs, pois, com apenas $6,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ já demonstraram atividade fungicida.

Figura 45 Placas do ensaio de inibição de halo para CA: 1- NPG; 2- NEO; 3-HG 2, 4-HGN 2; 5- HGS 2; 6- HGNS 2

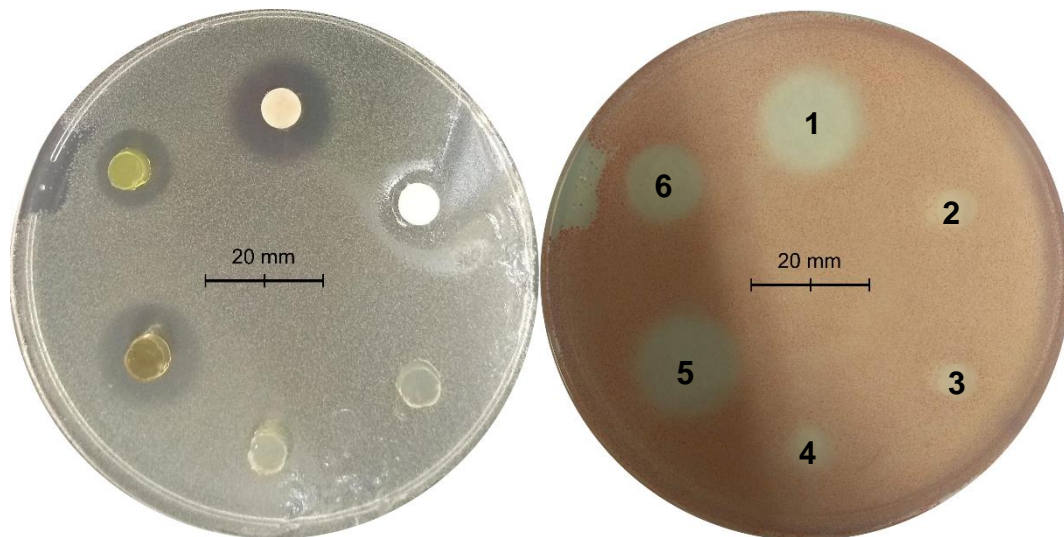


Tabela 12 Diâmetro dos halos de difusão (mm)

	<i>NpG</i>	<i>NEO</i>	<i>HG</i>	<i>HGN</i>	<i>HGS</i>	<i>HGNS</i>
<i>CA</i>	17,26	7,0	7,0	7,0	16,9	13,0
<i>EC</i>	8,5	25,0	7,0	20,2	7,0	21,1
<i>PA</i>	9,1	22,2	7,0	18,3	7,0	18,7
<i>SA</i>	7,0	21,0	7,0	19,17	7,0	18,2

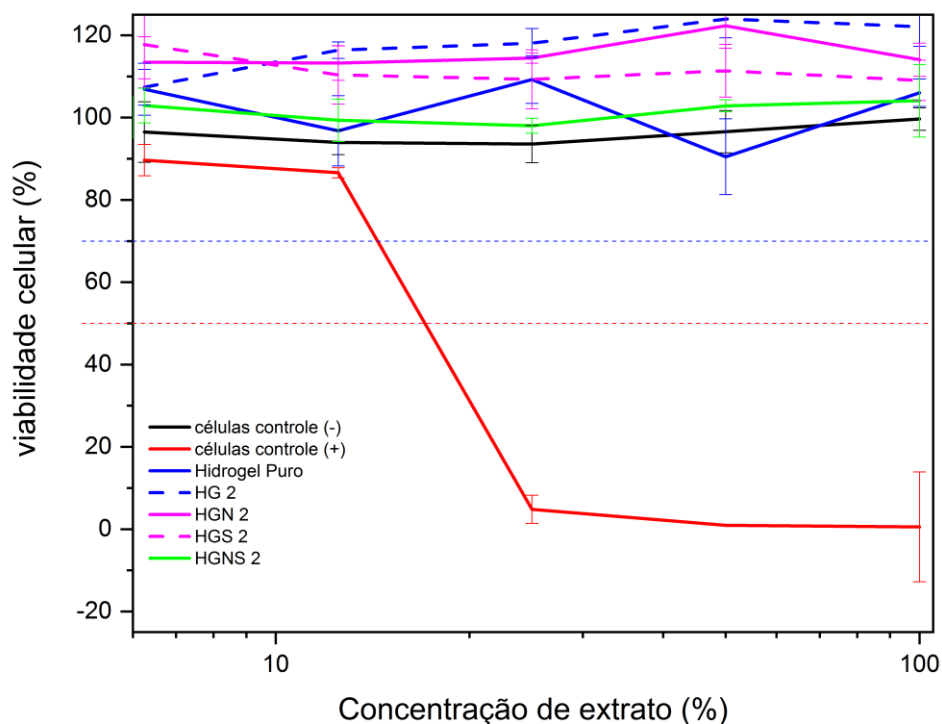
A tabela 12 mostra os diâmetros das zonas de inibição dos hidrogéis e das soluções. Os halos de inibição da formulação HG não mostraram sensibilidade, resultado já esperado uma vez que essas formulações não continham agente antimicrobiano. Os halos de inibição da formulação HGN nas 3 bactérias utilizadas apresentaram muita sensibilidade para *Pa* e *Sa* e extrema sensibilidade para *Ec*. Resultados semelhantes foram obtidos por Zafalon et al. (2018). O halo de inibição dessa formulação para *Ca* não apresentou sensibilidade pois essa levedura não está no espectro de ação da neomicina.

A formulação HGS somente apresentou halo de inibição nas leveduras, em que evidenciou muita sensibilidade das mesmas. A formulação HGNS apresentou halo de inibição em todos os microrganismos, sendo que para *Ec* o de extrema sensibilidade, para *Pa* e *Sa* com muita sensibilidade e para *Ca* apenas sensível. Esse último resultado evidencia a formulação HGNS possui um espectro de ação microbiológico maior do que as outras formulações do trabalho.

5.2.7 Citotoxicidade

A Figura 46 apresenta os resultados de citotoxicidade dos hidrogéis HG1, HG2, HGN2, HGS2 e HGNS2. Observa-se que nenhum dos hidrogéis apresentaram citotoxicidade.

Figura 46 Gráfico de viabilidade celular dos Hidrogéis (HG1, HG2, HGN2, HGS2 e HGNS2)



Esse resultado de citotoxicidade evidencia que nenhuma das formulações apresentou citotoxicidade frente as células testadas apesar de apresentarem considerável atividade antibacteriana, isso indica que os hidrogéis estão adequados para prosseguimento de um possível teste pré-clínico.

6 CONCLUSÃO

- 6.2 – Foi possível sintetizar AgNPs estabilizadas por argila Laponite RD e reduzidas pela ação indireta da radiação gama de fontes de ^{60}Co .
- 6.3 – Por meio desse método foram obtidas NPs com alta conversão de íons, alta concentração de NPs e alta estabilidade.
- 6.4 – As NPs sintetizadas apresentaram atividade bactericida frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e, atividade fungicida frente ao microrganismo *Candida albicans*.
- 6.5 – Foi evidenciado que a argila Laponite RD[®] Pura se mostra citotóxica, e a AgNPs/LP sintetizada nesse trabalho apresentou citotoxicidade apenas em concentrações acima de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.
- 6.6 - Constatou-se que a concentração de argila Laponite RD[®] influencia em parâmetros do hidrogel como Intumescimento, e módulo de elasticidade e isso pode estar ligado ao aumento da densidade de ligações cruzadas promovido pela argila.
- 6.7 - Evidenciou-se que o intumescimento dos hidrogéis dos grupos HG, HGN, e HGNS seguiu o modelo proposto por Haraguchi, porém esse mesmo modelo não foi observado para o grupo HGS.
- 6.8 – A adição de argila nos hidrogéis atuou como freio de liberação e essa correlação pode estar ligada a duas propriedades:
- A interação eletrostática da argila (cargas negativas na superfície) e a Neomicina (fármaco com cargas positivas - catiônico);
 - O aumento da concentração de argila aumentou a densidade do retículo o que dificultaria a difusão do fármaco. No entanto é pouco provável devido à grande diferença do tamanho do fármaco e do tamanho do poro.
- 7 – A ação bactericida e fungicida dos Hidrogéis HGNS indica um relevante avanço pois amplia o espectro de ação microbiológico do material, visto que em ambientes contaminados existe não só bactérias mas também fungos.
- 8 - O material não apresenta citotoxicidade e com isso está adequado para testes pré-clínicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of Advanced Research*, v.6, p. 105 - 121, 2015.
- AIHARA N.; TORIGOE K.; ESUM K., Preparation and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles in Layered Laponite Suspensions, *Langmuir*, v. 14, p. 4945-4949, 1998.
- ALCANTARA, Mara Tania Silva. **Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações médicas**. 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- ALSARRA I. A.; HAMED A. Y.; ALANAZI F. K.; NEAU S. H., Rheological and Mucoadhesive Characterization of Poly(vinylpyrrolidone) Hydrogels Designed for Nasal Mucosal Drug Delivery, *Arch Pharm Res*, v. 34(4), p. 573-582, 2011.
- ANDRADE, D.; ANGERAMI, E.L.S.; PADOVANI C.R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Rev. Saúde Pública*, v. 34 (2), p. 163-9, 2000.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16 (corrigido) GVIMS/GGTES/ANVISA**, 2017.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2016 – 2020**. 2016.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 44 – Dispõe sobre controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobiano, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e da outra providência**. Out. 26, 2010.
- BALBINO C. A.; PEREIRA L. M.; CURI R., Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 41:1, p. 27-51, 2005.
- BINYAMIN, G.; SHAFI, B.M.; MERY, C.M. Biomaterials: A primer for surgeons, *Seminars in Pediatric Surgery*, v.15, p. 276 - 283, 2006.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004.
- BRANT, A. J. C; Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli (N-vinil-2-pirrolidona). 2008, 107 (Tese Doutorado – Instituto de Química – USP).
- BRUTON, L.L.; LAZO, J. S.; PARKER, K.L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro, R.J.: McGraw-Hill, 2006.

BYK additives and instruments, Technical Information B-RI 21, LAPONITE – Performance Additives, 2015.

CALLISTER, W. D. Jr. Materials science and engineering An Introduction - John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991.

CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal*, v.65, p.252–267, 2015.

CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A. B.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas, *ABCD Arq Bras Cir Dig*, v. 20(1), p. 51-58, 2007.

CAMPOS, L.M.P.; BOARO, L.C.; FERREIRA, H.P.; SANTOS, L.K.G.; SANTOS, T. R.; PARRA, D.F. Evaluation of polymerization shrinkage in dental restorative experimental composites based: Bisgma/tegdma, filled with MMT. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 133, p. n/a-n/a, 2016.

CHEN Y.; CHOU Y.; CHOU P.; Impact of Nosocomial Infection on Cost of Illness and Length of Stay in Intensive Care Units. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 26(3), p. 281-287, 2005.

CHUI, C.W.; LIN, J.J. Self-assembly behavior of polymer-assisted clays, *Progress in Polymer Science*, v. 37, p. 406– 444, 2012.

CORTES S. M. S., O Tratamento de Ferida: Um Artigo de Revisão, *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, v.2:1, p. 54-64, 2013.

ENCICLOPÉDIA Mirador Internacional. São Paulo: Encyclopaedia Britannica do Brasil, 2010. 20 v.

FAN K.; TANG J.; ESCANDON J.; KIRSNER R.S.; State of the art in topical wound-healing products. *Plast Reconstr Surg*, v.127, p. 44S-59S, 2011.

FERREIRA M.C.; TUMA Jr. P.; CARVALHO V.F.; KAMAMOTO F.; Complex wounds. *Clinics*, v. 61(6), p. 571-578, 2006.

FISCHER, F.; BAUER, S. Ein Tausendsassa in der Chemie Polyvinylpyrrolidon, *Chemical Unserer Zeit*, v.43, p. 376 - 383, 2009.

GONG, J. P. Materials both Tough and Soft, *Science*, v.344 (6180), p.161-162, 2014.

GULREZ, S.K.H.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O. **Progress in molecular and environmental bioengineering - from analysis and modeling to technology application:** Hydrogels: Methods of preparation, characterization and application. 1 ed. Croacia: InTech, p.117-150, 2011

GUNGOR, N.; KARAOGLAN S. Interactions of polyacrylamide polymer with bentonite in aqueous systems *Mater. Lett*, v.48, p.168-175, 2011.

HADA H.; YONEZAWA Y.; YOSHIDA A.; KURAKAKE A., Photoreduction of Silver Ion in Aqueous and Alcoholic Solutions, **The Journal of Physical Chemistry**, v. 80, p.2728, 1976.

HARAGUCHI K.; FARNWORTH R.; OHBAYASH A.; TAKEHISA T., Compositional Effects on Mechanical Properties of Nanocomposite Hydrogels Composed of Poly(*N,N*-dimethylacrylamide) and Clay, **Macromolecules**, v. 36, p. 5732-5741, 2003.

HARAGUCHI K.; MATSUDA K., Spontaneous Formation of Characteristic Layered Morphologies in Porous Nanocomposites Prepared from Nanocomposite Hydrogels, **Chem. Mater.**, v.17, p. 931-934, 2005.

HARAGUCHI K.; TAKEHISA T., Nanocomposite Hydrogels: A Unique Organic/Inorganic Network Structure with Extraordinary Mechanical, Optical, and Swelling/De-swelling Properties, **Adv. Mater.**, v. 14, 2002.

HARAGUCHI K.; TAKEHISA T.; FAN S., Effects of Clay Content on the Properties of Nanocomposite Hydrogels Composed of Poly(*N*-isopropylacrylamide) and Clay, **Macromolecules**, v. 35, p. 10162-10171, 2002.

HARAGUCHI, K. Nanocomposite hydrogels, **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.11, p.47–54, 2008.

HIGA O.Z.; ROGERO S.O., MACHADO L.D.B., MATHOR M.B., LUGÃO A.B.; Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 705-707, 1999.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.53, p.1145 -1149, 1963.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, p. 874 - 875, 1961.

HOFFMAN, A.S.; Hydrogels for biomedical applications, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.18–23 , 2012.

HUANG H.; YANG Y., Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions, **Composites Science and Technology**, v. 68, p. 2948–2953, 2008.

JOHNSON, J.A.; TURRO, N.J.; KOBERSTEIN, J.T.; MARK, J.E.; Some hydrogels having novel molecular structures, **Progress in Polymer Science**, v.35, p.332–337, 2010.

KADLUBOWSKI, S. Radiation-induced synthesis of nanogels based on poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-A review, **Radiation Physics and Chemistry**, v.102, p.29-39, 2014.

KIM Y. J.; LIU Y. D.; CHOI H. J.; PARK S. J., Facile fabrication of Pickering emulsion polymerized polystyrene/laponite composite nanoparticles and their electrorheology, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 108–114, 2013.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro, R.J.: Guanabara Koogan, 2010.

KROON, M.; VOS, W.L.; WEGDAM, G.H. Structure and formation of a gel of colloidal disks, **Physical review e**, v.57, p.1962-1970, 1997.

LAUREANO A.; RODRIGUES A. M.; Cicatrização de feridas, **Revista da SPDV**, v.69(3), p. 355-367, 2011.

LIMA G. G.; LIMA D W. F.; OLIVEIRA M. J. A.; LUGÃO A. B.; ALCÂNTARA M. T. S.; DEVINE D. M.; SÁ M. J. C., Synthesis and in Vivo Behavior of PVP/CMC/Agar Hydrogel Membranes Impregnated with Silver Nanoparticles for Wound Healing Applications, **ACS Appl. Bio Mater**, v. 1, p. 1842–1852, 2018.

LIU J.; LEE J. B.; KIM D. H.; KIM Y., Preparation of high concentration of silver colloidal nanoparticles in layered laponite sol, **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 302, p. 276–279, 2007.

LUGÃO A.B.; MALMONGE S.M; Use of radiation in production of hidrogel, **Nuclear instruments and methods in physics research**, v. B185, p 37-42, 2001.

MACHADO L. D. B.; BAVARESCO V. P.; PINO E. S.; ZAVAGLIA C. A. C.; REIS M. C., TA of PVAL hydrogel cross-linked by chemical and EB irradiation process, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 75, p.445–451, 2004.

MELO, M.A.JR.; SANTOS, L.S.S.; GONCALVES, M.C.; NOGUEIRA, A.F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino, **Quim. Nova**, v.35, p.1872-1878, 2012.

MIRANDA L.F.; LUGAO A.B., MACHADO L.D.B., RAMANATHAN L.V.; Crosslinking and degradation of PVP hydrogels as a function of dose and PVP concentration, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 709-712, 1999.

OLIVEIRA I. V. P. M.; Dias R. V. C.; Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência, **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

OLIVEIRA, A.C.; DAMASCENO, Q.S. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão, **Rev Esc Enferm USP**, v. 44(4), p.1118- 1123, 2010.

OLIVEIRA, M.J.A.; ESTEFÂNIA, O.S.; LÚCIA, M.A.B.; REGINA, M.; AMATO, V.S.; LUGÃO, A.B.; PARRA, D.F. Influence of chitosan/clay in drug delivery of glucantime from PVP membranes. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 94, p. 194-198, 2014.

OLIVEIRA, M.J.A.; MAIA R.; BRAZ L. A., AMATO V.S.; LUGÃO, A.B.; PARRA, D.F.; Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniosis: Wound Reduction in Mice Using N-Methyl Glucantime from PVP and Nano Clay Membranes, **Journal of Dermatology Research and Therapy**, v.2, p. 4, 2016.

OLIVEIRA, M.J.A.; PARRA, D.F.; AMATO V.S.; LUGÃO, A.B.; Hydrogel membranes of PVAI/ clay by gamma radiation, **Radiation Physics and Chemistry** v. 84, p. 111–114, 2013.

OYEN, M.L.; Mechanical characterization of hydrogel materials, **International Materials Reviews**, v.59, p.44-59, 2014.

PEPPAS, N. A.; Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.5-9, 2013.

PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H.; Hydrogels in pharmaceutical formulations, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27- 46, 2000.

PEROTTI G.F.; BARUD, H.S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L.; CONSTANTINO, V.R.L.; Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites, **Polymer**, v. 52, p. 157-163, 2011.

POLITECHNIKA LODZAK. Janusz Rosiak; Anna Ruci ska-Rybus; Wladyslaw Pekala. **Method of manufacturing hydrogel dressings**. United States patent US 4871490, 3 out. 1989.

PONCE A.G.; FRITZ R.; VALLE C.; ROURA S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 36, p. 679–684, 2003.

PONCE A. G.; ROURA S. I.; VALLE C. E.; MOREIRA M. R. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies, **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 294–300, 2008.

ROGERO O. S.; LUGÃO A. B.; IKEDA I. T.; CRUZ Á. S; Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias, **Material Research**, v. 6, p. 317 – 320, 2003.

ROSIK, J.M.; ULAŃSKI, P. Synthesis of hydrogel by irradiation of polymers in aqueous solution, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 139- 151, 1999.

ROSIK, J.M.; ULAŃSKI, P.; PAJEWSKI, L.A.; YOSHII, F.; MAKUUCHI, K. Radiation formation or hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, p. 161- 168, 1995.

SCHACHT, V.J.; NEUMANN, L.V.; SANDHI, S.K.; CHEN, L.; HENNING, T.; KLAR, P.J.; THEOPHEL, K.; SCHNELL, S.; BUNGE, M. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics, **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 25-35, 2012.

SCHENNAILDER, P.; SCHMIDT, G. Nanocomposite polymer hydrogels, **Colloid Polym Sci**, v.287, p. 1–11, 2009.

SHEEHY, K.; CASEY, A.; MURPHY, A.; CHAMBERS, G.; Antimicrobial properties of nano-silver: A cautionary approach to ionic interference, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 443, p. 56–64, 2015.

SHIKINAKA, K.; AIZAWA, K.; MURAKAMI, Y.; OSADA, Y.; TOKITA, M.; WATANABE, J.; SHIGEHARA, K. Structural and mechanical properties of Laponite–PEG hybrid films, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 369, p.470-476, 2012.

SIGMA-ALDRICH, Neomycin trisulfate salt hydrate, Product Specification. Disponível:

<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n1876?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em 10 out. 2019.

SILVA, A. G. M.; RODRIGUES, T. S.; WANG, J.; YAMADA, L.K.; ALVES, T.V.; ORNELLAS, F. R.; ANDO, R A.; CAMARGO, P.H.C. The Fault in Their Shapes: Investigating the Surface-Plasmon-Resonance-Mediated Catalytic Activities of Silver Quasi-Spheres, Cubes, Triangular Prisms, and Wires, *Langmuir*, v. 31, 10272–10278, 2015.

SINKO, P.J. *Físico-farmácia e ciências farmacêuticas*. 5.ed. Porto Alegre, RS.: Artmed, 2008.

SMANIOTTO P. H. S.; FERREIRA M. C.; ISAAC C.; GALLI R., Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas, *Revista Brasileira Cirurgia Plástica*, v.27(4), p. 623-626, 2012.

TABLE OF RADIOACTIVE ISOTOPES: banco de dados preparado por CHU, S.Y.F; EKSTRÖM L. P.; FIRESTONE R. B. In: **The Lund/LBNL Nuclear Data Search**. 1999. Disponível em: <<http://nucleardata.nuclear.lu.se/toi/nuclide.asp?iZA=270360>>. Acesso em 10 out. 2019.

TOMA, H. E., **Nanotecnologia Molecular – Materiais e Dispositivos**, 1 ed.– Sao Paulo: Blucher, 2016, p.334.

VENUS M.; WATERMAN J.; MCNAB I., Basic physiology of the skin, **Surgery - Oxford International Edition**, v.28:10, p. 469 – 472, 2010.

VOSYLIUS, S.; SIPYLAITE, J.; IVASKEVICIUS, J., Intensive care unit acquired infection: a prevalence and impact on morbidity and mortality. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 47, p. 1132-1137, 2003.

WILLIAMS D. F. **On the mechanisms of biocompatibility**, *Biomaterials*, v. 29, p. 2941-2953, 2008.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials, *Biomaterials*, v.30, p. 5897 - 5909, 2009.

WOJNÁROVITS, L. **Handbook of Nuclear Chemistry**, *Kluwer Academic Publishers*, cap. 1, 2003.

WU, W.; DONG, Z.; HE, J.; YU, J.; ZHANG, J. Transparent cellulose/Laponite nanocomposite films, **Journal Material Sciences**, v. 51, p. 4125 - 4133, 2016.

ZAFALON A. T.; SANTOS V. J.; LUGÃO A. B.; RANGARI V.; TEMESGEN S.; PARRA D. F., Stability of the neomycin antibiotic in irradiated polymeric biomaterials, **European journal of biomedical and pharmaceutical sciences**, v. 5 (7), p. 49-57. 2018.

ROGERO O. S.; LUGÃO A. B.; IKEDA I. T.; CRUZ Á. S; Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias, **Material Research**, v. 6, p. 317 – 320, 2003.