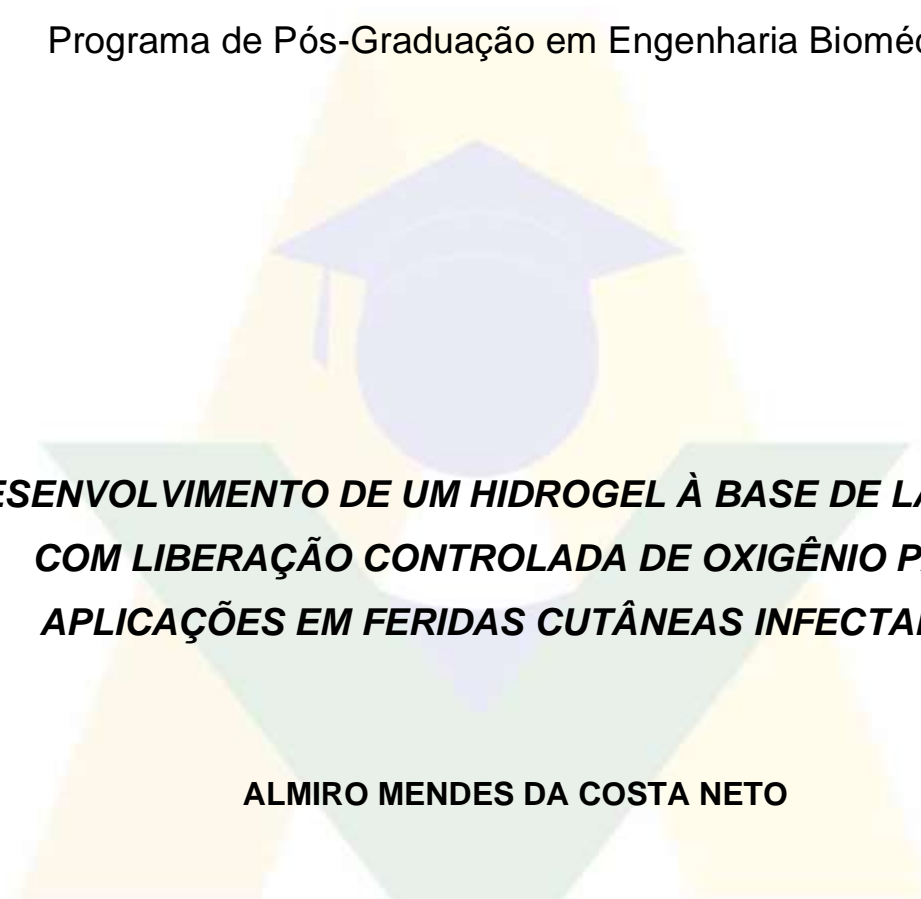


Universidade Brasil – Campus Itaquera

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

A large, faint watermark of a graduation cap (mortarboard) is centered on the page, overlaid on a large, light-colored letter 'A' that serves as a background element.

***DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL À BASE DE LAPONITA
COM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE OXIGÊNIO PARA
APLICAÇÕES EM FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS***

ALMIRO MENDES DA COSTA NETO

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo

São Paulo, SP.
2020

A decorative graphic element in the bottom-left corner consisting of a curved shape with a blue outer edge and a yellow inner edge.

***DEVELOPMENT OF A LAPONITE-BASED HYDROGEL WITH
OXYGEN CONTROLLED RELEASE FOR APPLICATIONS ON
INFECTED SKIN WOUNDS***

A faint, light blue graduation cap icon is centered in the background of the page.

ALMIRO MENDES DA COSTA NETO


Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de Concentração: Nanociências, plasmas e ozônio

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo

São Paulo, SP.
2020

A decorative graphic element in the bottom-left corner consisting of a curved shape with a blue outer edge and a yellow inner edge.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo
(a) autor (a).

C87d COSTA NETO, Almiro Mendes
Desenvolvimento de um hidrogel à base de laponita com liberação controlada de oxigênio para aplicações em feridas cutâneas infectadas / Almiro Mendes Costa Neto --São Paulo: Universidade Brasil, 2020.
60 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano.
Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo.
Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

1. Feridas cutâneas. 2. Hidrogel. 3. Laponita. 4. Atividade bactericida. 5. Liberação controlada de oxigênio. I. Marciano, Fernanda Roberta. II. Lobo, Anderson de Oliveira. III. Título.

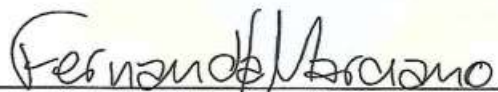
CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO

ALMIRO MENDES DA COSTA NETO

**“DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL À BASE DE LAPONITA COM
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE OXIGÊNIO PARA APLICAÇÕES EM FERIDAS
CUTÂNEAS INFECTADAS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof.(a). Dr.(a) Fernanda Roberto Marciano (presidente-orientador)



Prof.(a). Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Jancineide Oliveira de Carvalho (UNINOVAFAPÍ)

São Paulo, 29 de abril de 2020

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Fernanda Roberto Marciano

Houve alteração do Título: sim () não (X):

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL À BASE DE LAPONITA COM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE OXIGÊNIO PARA APLICAÇÕES EM FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS"**

Houve alteração do Título: sim () não (X)

Autor(es):

Discente: **Almiro Mendes da Costa Neto**

Assinatura: Almiro Mendes da Costa Neto

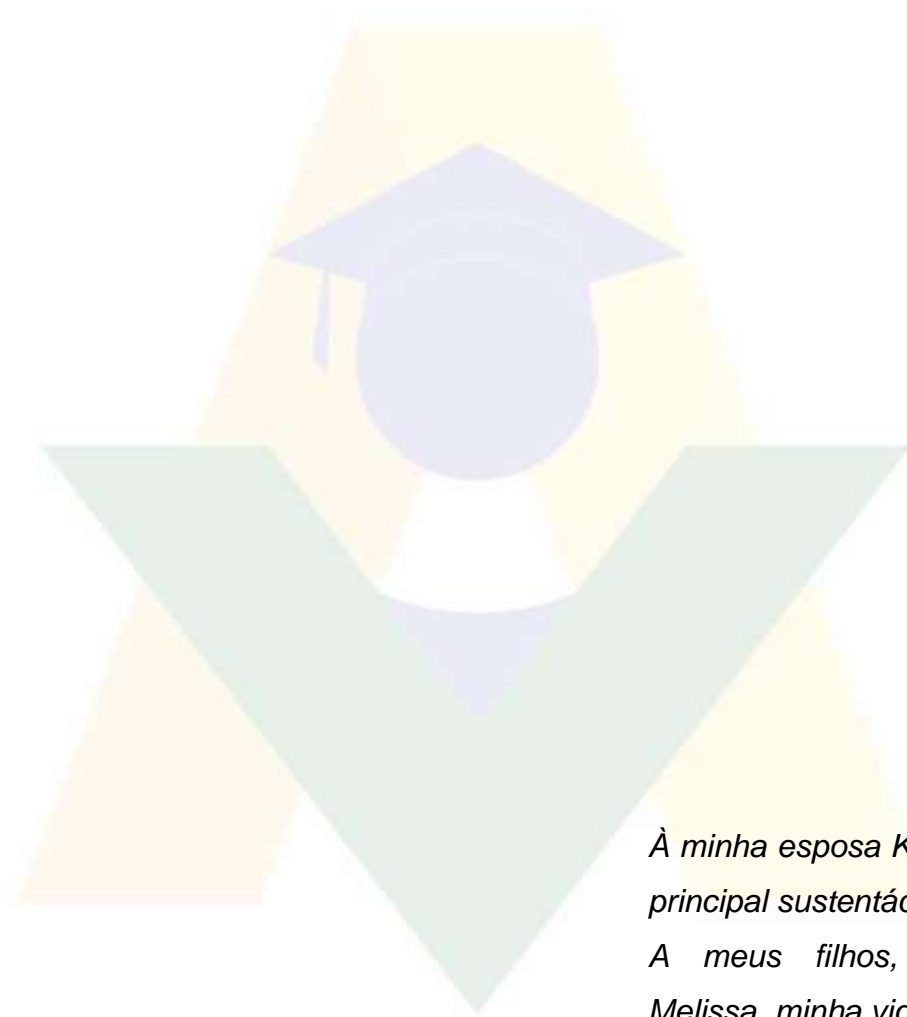
Orientador(a): **Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano**

Assinatura: Fernanda Marciano

Coorientador(a):

Assinatura: [Assinatura]

Data: 29/04/2020



À minha esposa Kalinny, meu principal sustentáculo.

A meus filhos, Miguel e Melissa, minha vida.

À minha mãe e irmão.

A meus familiares.

A todos os meus amigos

A todos os meus professores

Agradecer é preciso. Nesses anos de árdua luta é imperioso reconhecer aqueles que foram um importante pilar para essa construção.

Início agradecendo a Deus, por tudo.

Agradeço à minha família, minha esposa, Kalinny, meus filhos Miguel e Melissa, vocês são o combustível de tudo o que representa o meu viver.

Agradeço também à minha mãe, Iracema, Dona Toinha e Sr. José Uolton e meu irmão Francisco Amado, pelos quais agradeço a todos os meus familiares (de sangue e de afeto), vocês me ajudam a acreditar que dias melhores são possíveis.

À minha orientadora, professora Dra. Fernanda Marciano, agradeço por toda a calma e pela sempre gentil prontidão em ajudar, agradeço ainda, professora, pela paciência nos momentos em que eu parecia me afastar dessa construção.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Anderson Lobo, pela praticidade apresentada nos nossos encontros.

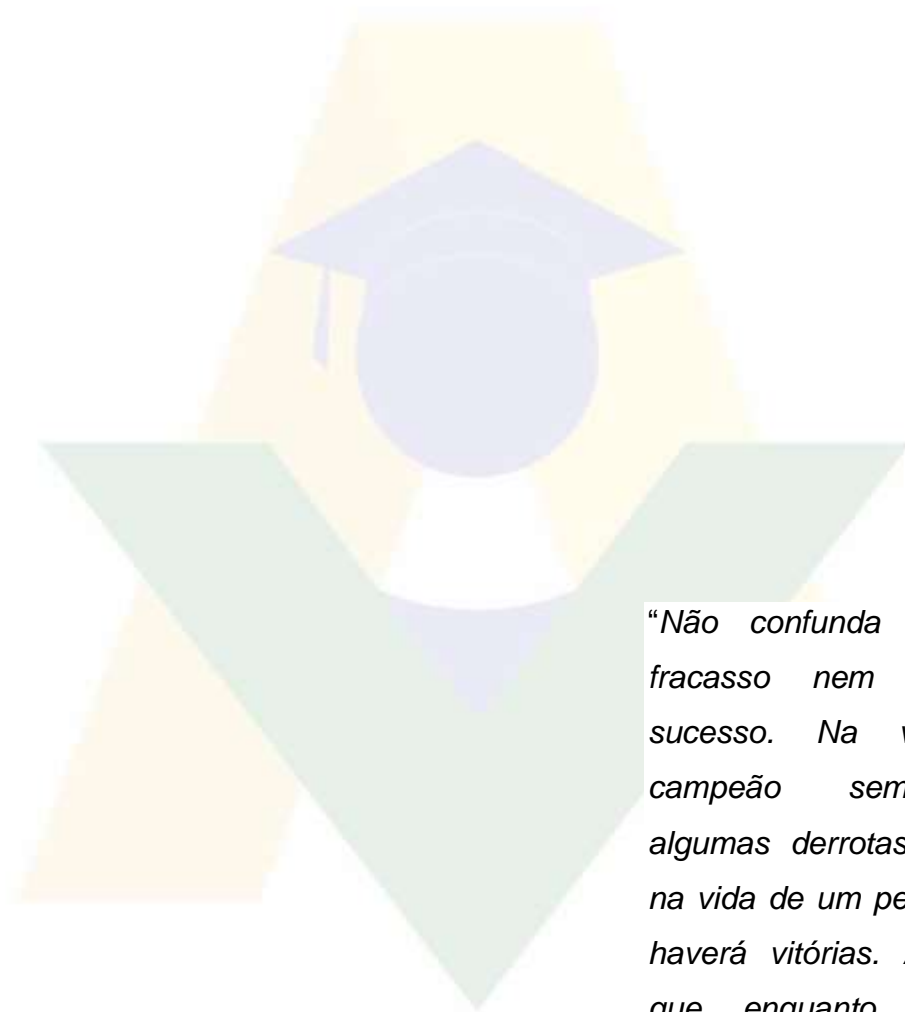
Aproveito para agradecer ao meu colega de magistério professor Guilherme Antônio e ao professor Antônio Linkoln por abrirem portas em momentos cruciais na produção dessa pesquisa.

À Cristo Faculdade do Piauí, CHRISFAPI, pelo fomento ao aperfeiçoamento acadêmico dos seus profissionais.

Colegas de curso, em especial Kerlon Andrade, Bruno Falcão, Kênia Mendes, Professor Jesus Torres, Dennys Frazão e Gilberto, pelos quais agradeço aos demais, saibam que esse caminhar, ao lado de vocês se tornou mais fácil durante esses anos.

A todos os professores que tive, é óbvio afirmar que sem vocês nada na minha vida teria sido possível, mas agradecer é sempre preciso.

Enfim, muito obrigado a todos que me ajudaram de forma direta e indireta.



“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Feridas cutâneas são um problema de abrangência mundial com morbimortalidade significativa, particularmente quando ocorre infecção. Os patógenos mais comuns são *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Na reparação tecidual é imprescindível o controle da colonização bacteriana. Biomateriais são utilizados nesse processo, dentre eles, hidrogéis com nanopartículas. Esse trabalho objetivou a produção de hidrogel à base de laponita com liberação controlada de oxigênio para aplicação em feridas cutâneas infectadas. Muitas argilas são adicionadas a polímeros para melhorar suas propriedades dentre elas, a laponita de fórmula $\text{Na}^{+}_{0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$. Substâncias vêm sendo associadas aos hidrogéis para serem liberadas nas feridas, inclusive os óxidos em meio aquoso. Trata-se de um estudo experimental, descritivo e quantitativo verificando *in vitro* a atividade bactericida do hidrogel de laponita com peróxido de cálcio (CPO) liberando oxigênio. Foram cultivadas *E. Coli* e *S. Aureus*. Formularam-se em hidrogéis de laponita a 9% com CPO a 5%, 10% e 20% em laponita. Verificou-se a atividade bactericida dos hidrogéis pelo tamanho do halo inibitório, em milímetros. A relação entre o tamanho dos halos inibitórios e as concentrações foi verificada por meio da Correlação de Pearson com nível de significância de 5%. Durante as primeiras 5h os hidrogéis de CPO em laponita apresentaram aumento da liberação de oxigênio. Considerando a liberação de oxigênio presente no hidrogel, dispersando-se pelo meio e inibindo o crescimento microbiano, foi possível observar a formação de halos de inibição em todas as concentrações testadas. Os resultados demonstraram que as três formulações de laponita a 9% contendo peróxido de cálcio foram capazes de inibir o crescimento microbiano em 100%, com halos superiores à 9mm contra ambas as cepas bacterianas. Contra *S. aureus*, verificou-se que a correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e a atividade dos hidrogéis nas diferentes concentrações demonstrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Contra *E. coli* percebe-se forte correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e as maiores concentrações de hidrogel, particularmente a 10% que apresentou diferença estatística significativa. A Laponita atuou como barreira eficiente ao oxigênio e apresentou atividades antimicrobianas sendo o hidrogel produzido, um potencial candidato para o tratamento das infecções e cicatrização das feridas cutâneas.

Palavras-chave: Feridas cutâneas, Hidrogel, Laponita, Atividade bactericida, Liberação Controlada de Oxigênio.

ABSTRACT

Skin wounds are a worldwide problem with significant morbidity and mortality, particularly when infection occurs. The most common pathogens are *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In tissue repair, control of bacterial colonization is essential. Biomaterials are used in this process, among them, hydrogels with nanoparticles. This work aims at the production of hydrogel based on laponite with controlled release of oxygen for application in infected skin wounds. Many clays are added to polymers to improve their properties, among them, Laponite of formula $\text{Na} + 0.7 [(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3}) \text{O}_{20} (\text{OH})_4]$. Substances have been associated with hydrogels to be released into wounds, including oxides in aqueous media. This is an experimental, descriptive and quantitative study verifying in vitro the bactericidal activity of laponite hydrogel with calcium peroxide (CPO) releasing oxygen. *E. Coli* and *S. Aureus* were grown. They were formulated in 9% laponite hydrogels with 5% CPO, 10% and 20% laponite. The bactericidal activity of the hydrogels was verified by the size of the inhibitory halo, in millimeters. The relationship between the size of the inhibitory halos and the concentrations was verified through Pearson's Correlation with a significance level of 5%. During the first 5h, the CPO hydrogels in laponite showed increased oxygen release. Considering the release of oxygen present in the hydrogel, dispersing through the medium and inhibiting microbial growth, it was possible to observe the formation of inhibition halos in all tested concentrations. The results showed that the three formulations of 9% laponite containing calcium peroxide were able to inhibit microbial growth by 100%, with halos greater than 9 mm against both bacterial strains. Against *S. aureus*, it was found that the correlation between the size of the inhibitory halos and the activity of the hydrogels at different concentrations showed a statistically significant difference ($p < 0.05$). Against *E. coli* there is a strong correlation between the size of the inhibitory halos and the highest concentrations of hydrogel, particularly at 10%, which showed a statistically significant difference. Laponite acted as an efficient barrier to oxygen and showed antimicrobial activities and the hydrogel produced was a potential candidate for the treatment of infections and healing of skin wounds.

Keywords: Skin wounds, Hydrogel, Laponite, Bactericidal activity, Controlled Oxygen Release

1.1.1 Divulgação e transferência de conhecimento

Os antibióticos atuam contra as infecções causadas por bactérias seu efeito é percebido pela inibição do crescimento bacteriano e, isso é avaliado pelo tamanho da área onde as bactérias morreram em um meio de cultura, esse espaço é chamado de halo de inibição de crescimento. Os resultados desse efeito são interpretados comparando-se o valor do halo com valores padronizados. As bactérias, após esses testes, são classificadas em sensíveis, resistentes ou intermediárias. Muitas substâncias matam as bactérias, inclusive alguns hidrogéis. A presença de halos maiores de 13mm e que 15mm contra as bactéria *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli* respectivamente, demonstram efetividade. Os hidrogéis produzidos nesse estudo inibiram, em todas as concentrações 100% das bactérias testadas. Possivelmente as bactérias sofreram ação das espécies reativas de oxigênio (ERO). O oxigênio liberado pelos hidrogéis provavelmente desencadeou reações na membrana bacteriana o que levou à desestabilização de sua integridade e sua consequente morte.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pele e suas camadas.....	20
Figura 2. Etapas de cicatrização de feridas por primeira e segunda intenções.....	22
Figura 3. Infecção da Ferida Cutânea.....	25
Figura 4. Escala Nanométrica.....	27
Figura 5. Laponita®.....	30
Figura 6. Diferentes formas de associação de fármacos à laponita.....	32
Figura 7. Oxygen release of Laponite:CPO hydrogels (5 %, 10 % and 20 % w/w), oxygen release with control temperature.....	42
Figura 8. Ação de Hidrogel em concentrações de laponita em cultura de <i>S. Aureus</i> ATCC 2592.....	43
Figura 9. Hidrogel de Laponita 9% controle.....	44
Figura 10. Hidrogel de Laponita 9% com Peróxido de Cálcio 5% em <i>S. aureus</i>	48
Figura 11. Hidrogel de Laponita 9% com Peróxido de Cálcio 20% em <i>S. aureus</i>	49
Figura 12. Hidrogel de Laponita 9% com Peróxido de Cálcio 20% em <i>E. Coli</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima.....	46
Tabela 2. Correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e as concentrações de LPN 9% + CPO 5%, 10% e 20% contra <i>S. aureus</i>	46
Tabela 3. Correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e as concentrações de LPN 9% + CPO 5%, 10% e 20% contra <i>E. Coli</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TIME	Tecido, Infecção, Moisture Imbalance (desequilíbrio de umidade) e Edge (borda)
Nm	Nanômetro
M	Metro
UV	Ultravioleta
Å	Angstrom
LPN	Laponita
Si	Silício
OH	Hidroxila
COOH	Carboxila
CONH	Amida
SO ₃ H	Sulfônico
ZnO	Óxido de Zinco
CaO	Óxido de Cálcio
pH	Potencial Hidrogeniônico
CaO ₂	Peróxido de Cálcio
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Centro Nacional de Informação Biotecnológica
pKa	Constante de Ionização Ácida
CPO	Peróxido de Cálcio
DI	Deionizada
Mm	Milímetros

ATCC	American Type Culture Collection, Coleção de Cultura Americana
LPM	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia
UFPI	Universidade Federal do Piauí
BHI	Brain Heart Infusion Broth, Meio de Infusão Cerebral do Coração
mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
L	Litro
µL	Microlitro
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
GG	Goma de gelatina
GelMA	Gelatina Metacrilada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NCCLS	Clinical and Laboratory Standards Institute, Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
Oxa	Oxacilina
Nor	Norfloxacina
Met	Meticiclina
β-lactâmicos	Beta-lactâmicos
Cef	Cefalexina
Amox + ac. Clav	Amoxicilina + Ácido Clavulânico
ERO	Espécies Reativas a Oxigênio
O ₂	Oxigênio
g/mol	Grama por mol
g/ml	Grama por mililitro
Si(OH ₄)	Ácido Ortossílico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3. PROPOSIÇÃO.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
SUBSTÂNCIAS –TESTE (PRODUÇÃO DOS HIDROGEIS).....	38
LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO.....	38
CULTIVO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS.....	38
PREPARO DOS INÓCULOS.....	39
CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	39
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. RESULTADOS.....	41
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

INTRODUÇÃO

As feridas cutâneas constituem um problema grave e de abrangência mundial responsável por índices de morbidade e mortalidade significativos; além de provocar considerável impacto econômico (ZAHO, 2010) com gastos em torno de 25 bilhões de dólares por ano (HAN et al., 2011b). Quando ocorre a presença de infecção na lesão, uma grande parte destes gastos está relacionada com o uso de agentes antimicrobianos (HAN *et al.*, 2011; BARRETO, 2015).

As infecções, em especial as de natureza bacteriana, são grandes desafios para a saúde pública e o ônus está crescendo rapidamente devido ao aumento do custo dos cuidados de saúde e da resistência a antibióticos, em particular no que concerne à cicatrização de feridas. Uma infecção microbiana no local da ferida pode prolongar ou mesmo impedir severamente a cicatrização processo, levando a necrose, sepse e até à morte (DE PAULA MMM et al., 2018).

Quando existem ferimentos graves e extensos, impõe-se a necessidade de estabelecimento de tratamento adequado que produza a cicatrização das lesões superficiais e profundas (FONTES, 2013). No entanto, o notório aumento da prevalência e o incremento no número de bactérias multirresistentes, trazem a necessidade de reduzir ou eliminar as infecções de feridas usando artifícios que limitem a capacidade das bactérias de evoluir para cepas resistentes a drogas (MOHITI-ASLI, POURDEYHIMI, LOBOA 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência a antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global, portanto, a concepção de materiais com a capacidade de reduzir significativamente a administração de antibióticos e evitar infecções de alta resistência por parte das bactérias é o desejável. Assim, o desenvolvimento de polímeros com propriedades mecânicas, biológicas e químicas ajustáveis e de fácil fabricação pode ser atraente (DE PAULA MMM et al., 2018).

O desenvolvimento de coberturas funcionalmente ativas, que interagem com as feridas, criando e mantendo a umidade no campo lesado, pode promover, na maioria das vezes, melhor meio de cicatrização e isso tudo demonstra a relevância do estudo e justifica o contínuo desenvolvimento de novos materiais e o aperfeiçoamento de suas propriedades. Nesse contexto os biomateriais surgem como alternativa eficaz para o tratamento das feridas. Dentre estes se destacam os hidrogéis. O acréscimo de nanopartículas a polímeros convencionais como os hidrogéis podem representar uma alternativa racional (FONSECA, 2003). De acordo com Oliveira (2013), empregando-se pequena porcentagem de argila ao hidrogel é possível garantir melhores propriedades mecânicas, boa transparência, maior estabilidade térmica e baixa permeabilidade a gases.

Esse trabalho tem como objetivo principal a produção de um hidrogel à base de laponita com liberação controlada de oxigênio para aplicação em feridas cutâneas infectadas e como objetivos específicos, produzir um hidrogel à base de laponita contendo diferentes concentrações de peróxido de cálcio e avaliar a liberação de oxigênio do hidrogel produzido.

REVISÃO DA LITERATURA

As feridas cutâneas como anteriormente exposto, configuram um relevante problema de saúde pública. Elas podem sofrer alterações provocadas por fatores endógenos/orgânicos e por fatores externos, como as infecções bacterianas. O tratamento dessas infecções muitas vezes é baseado no uso de drogas de efeito sistêmico associadas a curativos locais que também, muitas vezes, utilizam fármacos ou enzimas capazes de alterar o microambiente da lesão. Muitas vezes esse processo pode resultar em cicatrização lenta, não cicatrização; muitas tentativas de encontrar um curativo adequado; em piora das lesões ou o surgimento de resistência bacteriana a antibióticos.

O desafio ao desenvolver um curativo para feridas é adequar o mesmo de acordo com o tipo de lesão, podendo ser aguda, crônica, exsudativa ou seca. Com isso, não existe apenas um tipo de curativo que seja apropriado ao tratamento de todos os tipos de feridas. Portanto, ao estudar diferentes tipos de materiais para este propósito, busca-se utilizar os biopolímeros, por possuir uma denominação mais aceita na literatura relacionada à saúde devido suas características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade de absorção de secreções (IMMICH et al., 2017).

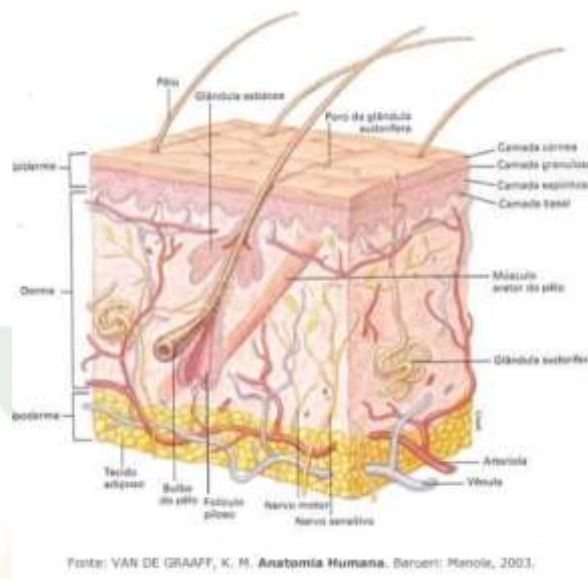
Muitos desses biomateriais precisarão da capacidade de promover não apenas a integração saudável dos tecidos, mas também de resistir simultaneamente à colonização bacteriana e às infecções associadas (YU X. et al., 2019).

1.1 Pele e lesões Cutâneas: características e natureza

A pele é uma membrana com duas camadas principais (epiderme e derme) que reveste a superfície exterior do corpo e que se continua com as membranas das cavidades, as mucosas (Figura 1). Tem inúmeras funções como:

manter a integridade do corpo e protegê-lo contra agressões externas, regular a temperatura, absorver e excretar líquidos, absorver luz ultravioleta, metabolizar vitamina D, detectar estímulos sensoriais, servir de barreira contra microrganismos e exercer papel estético (ARAÚJO, 2017).

Figura 1. Pele e suas camadas



Fonte: VAN DE GRAAF, K.M 2003.

No decorrer da vida, a pele sofre inúmeras injúrias que podem ser classificadas como traumáticas (escoriações, perfurações, cortes, queimaduras), cirúrgicas (incisões realizadas por material cortante hospitalar) e patológicas (infecções, doenças crônicas). Essas lesões são conhecidas como feridas (DOMENEGUETTI, R. R 2018).

De acordo com Fontes (2013), ferida é a expressão da interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma enfermidade clínica que aciona de imediato as frentes da defesa orgânica para o reparo. Seu manejo tradicional envolve desinfecção, retirada de tecido desvitalizado

e provisão de ambiente que forneça o melhor ambiente para que ocorra o processo natural de cura.

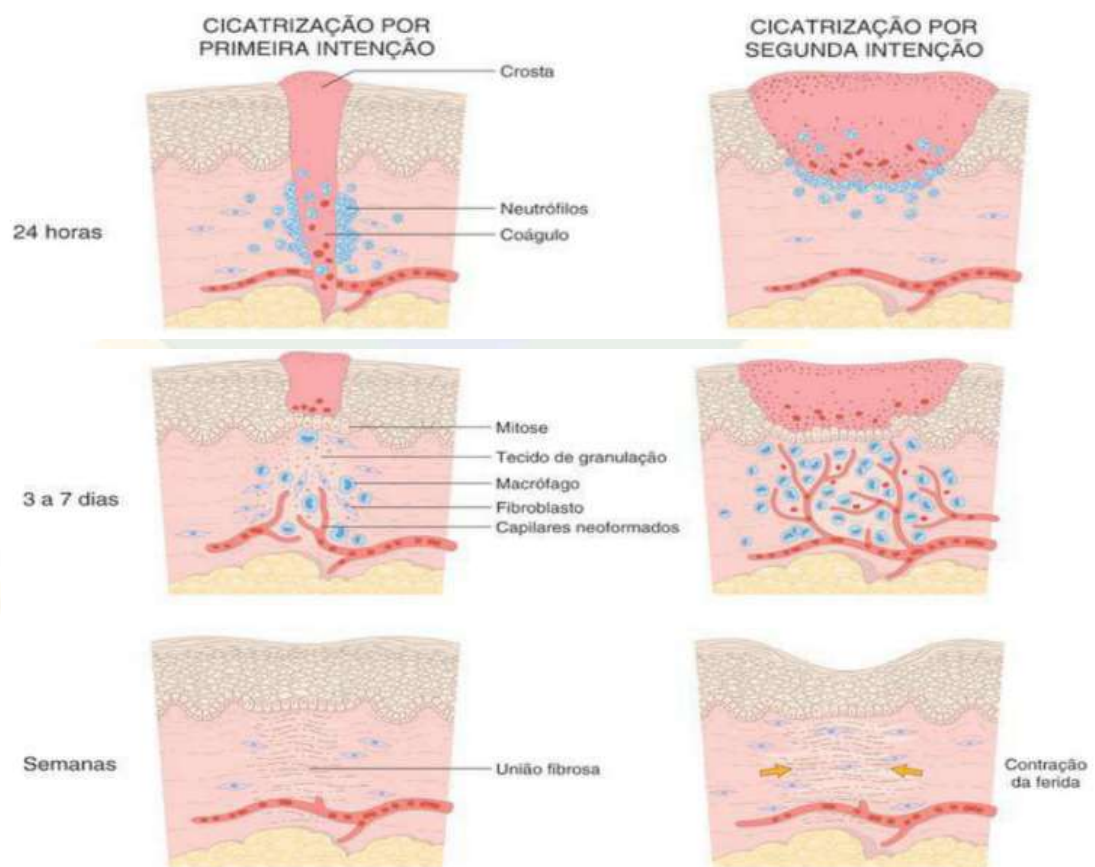
Segundo Barreto (2015), muitas vezes o aparecimento da ferida tem como fator de relevo a troca inadequada de oxigênio e outros nutrientes no tecido. As causas são variadas e muitas vezes multifatoriais (traumas, infecções – primoinfecções ou infecções oportunistas) ou a associação de mais de um desses fatores. Pode surgir ainda como consequência do aprisionamento sanguíneo (nas úlceras venosas, por exemplo) ou da diminuição do aporte sanguíneo, como nas úlceras arteriais. Um aspecto que sempre está em evidência quando se fala de feridas, é o risco elevado de essas lesões serem alvo de complicações, sendo as infecciosas, de origem bacteriana, o principal foco de atenção dos prestadores de cuidado a esse tipo de agravo.

Em relação à complexidade, as feridas agudas cutâneas podem ser simples ou complexas. As primeiras ocorrem nas incisões cirúrgicas que são suturadas para promover cicatrização por primeira intenção e não apresentam complicações durante a reparação tecidual. Já as últimas, ocorrem quando há complicações sistêmicas ou locais relacionadas às condições gerais do paciente e ao mecanismo causador da lesão. As principais complicações que tornam uma ferida complexa são: hematoma, seroma, infecções de partes moles e deiscência (BORGES, 2012).

Quanto ao tempo de cicatrização, as feridas são classificadas como agudas e crônicas. As feridas agudas são aquelas ocasionadas em cirurgias ou traumas, em que o reparo ocorre geralmente dentro do tempo previsto, sem dificuldades e intercorrências. Já as feridas crônicas, são aquelas que não cicatrizam em tempo previsto e são suscetíveis a complicações. São exemplos destas últimas, as úlceras venosas, arteriais, neuropáticas e úlcera por pressão (ABBADÉ e LASTORIA 2009).

O modo de cicatrização da ferida cutânea pode ser por primeira, segunda ou terceira intenção (Figura 2). A primeira ocorre quando uma ferida aguda é deixada cicatrizar após aproximação de suas bordas (sutura direta nas bordas, enxerto ou retalho). Cicatrização por segunda intenção ocorre quando uma ferida é deixada cicatrizar por ela mesma. Já a de terceira, ocorre quando uma ferida é corrigida cirurgicamente após a formação de tecido de granulação, a fim de que apresente melhores resultados funcionais e estéticos (MANDELBAUM et al., 2003).

Figura 2. Etapas de cicatrização por primeira e segunda intenção



Fonte: Ungulino Neto, 2009.

O processo de cicatrização pode ser didaticamente subdividido em três fases, porém muitas vezes, estas fases se sobrepõem e ocorrem simultaneamente (JORGE e DANTAS, 2005):

Fase inflamatória (exsudativa): caracterizada pelos sinais típicos do processo inflamatório localizado como dor, rubor, calor e tumor (edema), além de perda da função local. Começa no momento que ocorre a lesão com duração entre três e seis dias (a depender da extensão da área a ser cicatrizada e da natureza da lesão), caracterizada por dois processos que buscam limitar a lesão tecidual: a hemostasia e a resposta inflamatória aguda. Corresponde à ativação do sistema de coagulação sanguínea e à liberação de mediadores químicos como fator de ativação de plaquetas, fator de crescimento, serotonina, adrenalina e fatores de complemento.

Fase proliferativa (regenerativa ou fibroblástica): fase regenerativa que pode durar entre cinco e vinte dias. É caracterizada pela proliferação de fibroblastos, sob a ação de citocinas que dão origem a um processo denominado fibroplasia. Ao mesmo tempo, ocorre a proliferação de células endoteliais, com formação de rica vascularização (angiogênese) e infiltração densa de macrófagos, formando o tecido de granulação.

Fase reparadora (maturação): fase de maturação que inicia no 21º dia e pode durar meses. É a última fase do processo de cicatrização. A densidade celular e a vascularização da ferida diminuem, enquanto há a maturação das fibras colágenas, ocorre uma remodelação do tecido cicatricial formado na fase anterior. O alinhamento das fibras é reorganizado a fim de aumentar a resistência do tecido e diminuir a espessura da cicatriz, reduzindo a deformidade. Durante esse período a cicatriz vai progressivamente alterando sua tonalidade passando do vermelho escuro ao rosa claro.

Segundo Araújo (2017), a infecção da ferida prolonga a fase inflamatória do processo cicatricial e interfere na epitelização, contração e deposição de

colágeno. Muitas vezes, havendo grande contaminação bacteriana o processo de cicatrização não ocorre, mesmo com o uso de enxertos ou retalhos. Clinicamente há sinais inflamatórios, geralmente acompanhados de exsudato purulento. Nesses casos, devem-se realizar cuidados locais associados à antibioticoterapia.

Os indicadores locais (não-sistêmicos) do processo infeccioso são: aumento da dor na ferida, eritema, edema, aquecimento da área ao redor, odor desagradável e drenagem purulenta (FIERHELLER; SIBBALD, 2010). Entretanto, a identificação do agente etiológico apenas por sinais e sintomas clínicos é difícil devido a grande variedade de microrganismos que podem ser isolados em culturas de lesões (MARTINS et al., 2010).

Em relação à carga bacteriana, para as feridas agudas traumáticas há a seguinte classificação (SAAR et al., 2008):

- Limpa: ausência de microrganismos;
- Limpa-contaminadas: ferida inferior a 6 h entre o trauma e o atendimento, sem contaminação significativa;
- Contaminadas: são aquelas com tempo maior que 6 h até atendimento, sem sinal de infecção;

Infectedas: apresentam agente infeccioso no local, com evidência de intensa reação inflamatória e destruição de tecidos, podendo haver presença de secreção purulenta.

1.2 Infecções das lesões cutâneas e suas modalidades de tratamento

Nas lesões cutâneas (agudas ou crônicas) as bactérias podem formar estruturas complexas chamadas biofilmes que são comunidades de microrganismos envoltos por matriz de polissacarídeos extracelular. Bactérias com biofilmes são melhores protegidas e mais resistentes às defesas do organismo, antissépticos e antibióticos tanto tópicos quanto sistêmicos (SIBBALD et al., 2003).

As bactérias patogênicas mais comuns encontradas nas feridas no ambiente hospitalar são *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermis* (*S. epidermis*), e vários fungos filamentosos, bem como leveduras (*Candida spp.*). O uso de antibióticos pode resultar em uma crescente resistência a medicamentos nos microrganismos patogênicos, que está associada com maior morbimortalidade e, portanto, deve ser evitado sempre que possível (DE PAULA et al., 2018).

Figura 3. Infecção da Ferida Cutânea



Fonte: Daniela Kroshinsk, MD, MPH, Harvard Medical School, 2017

No processo de reparação tecidual nas lesões cutâneas é imprescindível o controle da colonização bacteriana. Nesse sentido, muitas vezes são necessários os desbridamentos cirúrgico ou enzimático das úlceras com colonização crítica para acelerar esse processo. O desbridamento cirúrgico é uma forma rápida de promover a redução da carga bacteriana; contudo, é um método não seletivo e pode causar dor (SIBBALD et al., 2003). É importante ressaltar que os antibióticos sistêmicos muitas vezes têm atuação limitada, que seja por não conseguirem agir nestas

bactérias formadoras de biofilme, seja pelo surgimento da resistência bacteriana (ARAÚJO, 2017).

A resistência das bactérias aos antibióticos representa uma preocupação crescente (TODAR, K; NEVES et al., 2011) nas infecções de feridas e a utilização de nanopartículas e biomateriais como a prata coloidal, por exemplo, é defendida no tratamento de queimaduras nas quais as infecções são conhecidas pela sua intolerância e resistência a antibióticos. Além da excelente propriedade bactericida, as nanopartículas (incluindo-se as de prata) também se mostraram favoráveis na minimização da resposta inflamatória local facilitando a cicatrização das feridas (NAIR & LAURENQN, 2007; TIAN et al., 2007).

De acordo com Araújo (2017), a necessidade ou escolha de um tratamento para ferida depende do seu grau de contaminação, da maneira como foi produzida, dos fatores locais e sistêmicos relacionados com o processo de cicatrização e do tipo de exsudato. A abordagem sobre a preparação do leito da ferida está relacionada à retirada de todos os fatores que possam dificultar o processo de cicatrização das feridas crônicas, a fim de identificar a causa do problema e elaborar um processo de trabalho para otimizar a reparação tecidual (ARAÚJO, 2017).

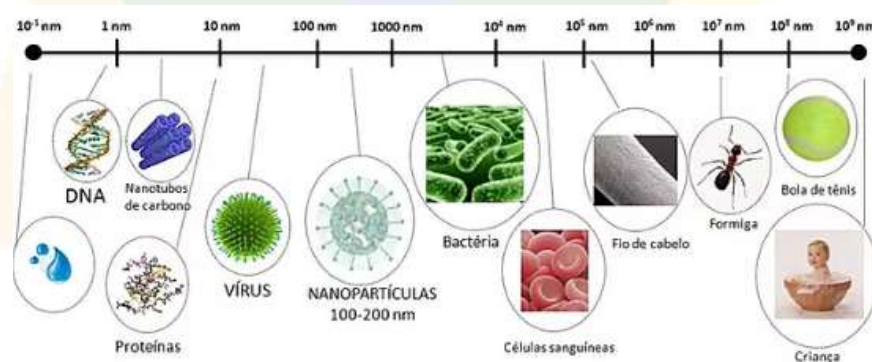
Nesse sentido, a fim de potencializar a implementação do conceito de preparo do leito da ferida, alguns especialistas em tratamento de feridas criaram uma regra mnemônica utilizando o acrônimo TIME (FALABELLA, 2006), onde a letra T refere-se a tecido, ou seja, avaliação quanto à presença de tecidos desvitalizados ou não viáveis no leito da úlcera. A letra I refere-se à presença de infecção ou colonização. A letra M refere-se a “moisture imbalance”, ou seja, desequilíbrios da umidade; e a letra E refere-se a “edge”, isto é, avaliação da borda da ferida.

1.3 Nanotecnologia e Nanopartículas: aplicações na área biomédica

Por mais de trinta anos, intensas pesquisas vem sendo conduzidas no campo da nanotecnologia em todo o mundo, em particular, na área de nanomateriais. Na última década, produtos contendo nanomateriais, como têxteis e cosméticos, por exemplo, têm sido desenvolvidos e recentemente produtos para aplicação biomédica têm entrado no mercado em ritmo acelerado.

Nanopartículas constituem o objeto de estudo da nanotecnologia que é a ciência que diz respeito ao entendimento, controle e exploração de materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e biológicos significativamente novos e/ou modificados devido à sua escala nanométrica. A nanoescala (Figura 4) é definida pela existência de pelo menos uma dimensão física característica na faixa entre 1 e 100 nm (1 nm = 10^{-9} m, ou 1 bilionésimo de metro). Nanopartículas, portanto, são definidas como pequenos objetos que se comportam como uma unidade inteira em termos de seu transporte e propriedades e cujo tamanho situa-se entre 1 e 100 nm (REZENDE, 2018).

Figura 4. Escala Nanométrica



Fonte: Candice Felippi, 2015.

De acordo com Hofmann (2012), no final da década de 1970, Granqvist e Buhrman descobriram as nanopartículas e identificaram suas propriedades específicas, chamando-as de partículas ultrafinas. As primeiras publicações lidando com a engenharia de nanopartículas sugeriu o uso de nanopartículas para a liberação de drogas. É importante ressaltar que apenas partículas inorgânicas ou

orgânicas de tamanho de nanômetros são consideradas nanopartículas; moléculas e entidades biológicas (como vírus) mesmo que também estejam na faixa de tamanho de nanômetros, não o são.

A aplicação de nanotecnologia para medicina, conhecida como nanomedicina, envolve o uso de materiais de engenharia nesta gama de tamanhos para desenvolver novas terapias e modalidades de diagnóstico. As propriedades físicas e químicas únicas das nanopartículas, em particular seu pequeno tamanho e alta relação superfície-volume, podem superar barreiras e permitir que eles proporcionem acesso a moléculas e sistemas (WESTERNDORF, 2013).

A nanotecnologia tem trabalhado com sistemas funcionais baseados no uso de subunidades com propriedades específico-dependentes do tamanho dessas subunidades individuais ou de um sistema das mesmas. Um exemplo de sistema funcional poderia ser o do óxido de titânio na forma anatase. Com o tamanho do cristalito, os comprimentos de onda da luz absorvida mudam. Partículas menores, com menos de 10 nm de tamanho, mostram uma lacuna de banda maior e absorvem a luz de uma energia maior, como a luz ultravioleta (UV). Tais partículas são usadas hoje em produtos como cremes solares por conta de sua grande capacidade de absorção de luz UV (HOFMANN, 2012).

As estruturas nanométricas juntamente com suas novas propriedades químicas e físicas frequentemente resultam em alta reatividade de suas superfícies para seus homólogos em massa. Muitas vezes a alta relação volume-superfície pode levar a mudanças nas estruturas de cristal, subsequentemente as propriedades químicas e ópticas do material são influenciadas. Os materiais de nanopartículas mais frequentemente utilizados para aplicações médicas, diagnóstico e liberação de medicamentos podem ser divididos nos seguintes subgrupos: lipossomas, micelas poliméricas; conjugados drogas-polímero; dendrímeros, óleos de nano-emulsões, partículas mesoporosas de sílica e nanopartículas de óxido de ferro.

1.3.1 Laponita: uma nanopartícula especial

As nanopartículas de sílica, estruturas de escala submicrométrica, são nanonestruturas com alta quantidade de poros que podem carregar várias moléculas dentro delas. Além disso, o corpo de sílica fornece uma superfície externa entre aberturas de poros e moléculas aniônicas ligadas à sua superfície externa. Esses elos aniônicos garantem hidrofiliçidade à estrutura submicrômica (SABOURY et al., 2019).

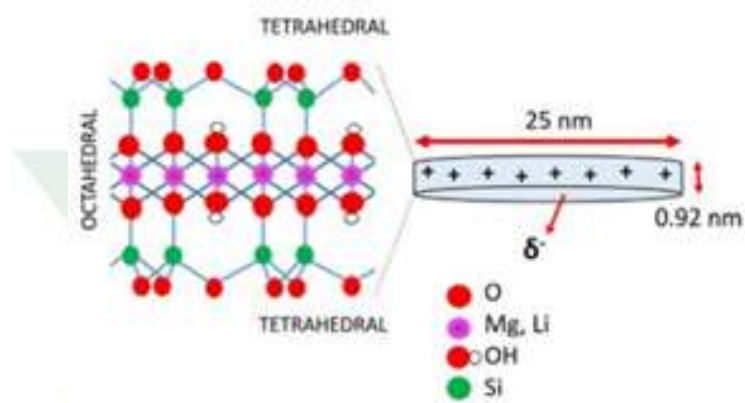
Essas estruturas têm uma melhor relação superfície/volume em relação às partículas nuas, o que as torna um bom agente para fins de carregamento de carga e assim por diante (SLATER, COOPER, 2015; BAO et al., 2016). Além das propriedades de superfície apropriadas, esses materiais mesoporosos possuem boa biocompatibilidade, tamanho controlável, fácil modificação da superfície entre outros aspectos, o que os torna excelentes candidatos para várias aplicações biomédicas (SABOURY et al., 2019).

Em aplicações biomédicas, minerais argilosos inorgânicos são adicionados a polímeros biocompatíveis para melhorar as propriedades mecânicas e reológicas e auxiliam na degradação da base polimérica (LOBO et al. 2019). Uma das argilas que tem sido objeto de estudo é a laponita (Figura 5) que é uma argila sintética, que pertence a uma família de filossilicatos, com uma fórmula empírica de $\text{Na}^{+0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$, tendo 0,7 Å a 300 Å de diâmetro e altura de cerca de 10 Å (OLIVEIRA et al., 2010).

De acordo com Tomás, Alves e Rodrigues (2017), a laponita é uma argila esmectita que possui muitas aplicações tecnológicas importantes, que vão além dos usos convencionais de argilas na indústria farmacêutica e cosmética. Em aplicações biomédicas, particularmente na nanomedicina, esse material possui um grande potencial.

É um nanomaterial bidimensional (2D) composto de cristais em nanoescala em forma de disco que têm uma alta proporção e que podem interagir fortemente com muitos tipos de elementos químicos (de pequenas moléculas ou íons, a polímeros naturais ou sintéticos, a diferentes nanopartículas inorgânicas) e também são facilmente funcionalizados e prontamente degradados no ambiente fisiológico, dando origem a substâncias não tóxicas e até bioativas. (TOMÁS, ALVES E RODRIGUES 2017).

Figura 5. Laponita



Fonte: TOMÁS, ALVES E RODRIGUES 2017.

Segundo Lobo et al., (2019), a laponita, é particularmente notável por causa do pequeno diâmetro (25-30 nm) e espessura (± 1 nm) de suas partículas. Esses recursos resultam em uma área superficial específica alta e anisotropia, com heterogeneidade de sua carga, sendo negativa permanentemente na superfície e positiva nas bordas. Seu uso nas aplicações biomédicas é amplo e pode ser explorado em várias frentes.

O estudo de Tomás, Alves e Rodrigues (2017), afirma que, por sua excelente capacidade para interagir com outras moléculas faz com que a laponita seja um veículo ideal para o transporte e a liberação sustentada de uma ampla gama de moléculas sendo utilizada para formar sistemas de liberação controlada de drogas. Nesses casos a laponita pode ser conformada como gel ou associada a

polímeros. No campo da bioimagem, a laponita pode ser utilizada para estudos *in vitro* (para visualizar materiais e processos biológicos) e *in vivo* e nesse escopo muitos estudos focam na interação da laponita com corantes conhecidos como fluoróforos. Pode também ser considerada, um material bioativo, pois sua degradação em ambiente fisiológico leva à liberação de produtos que sabidamente tem papel biológico como o ácido ortossílico, $\text{Si}(\text{OH})_4$, encontrado no plasma sanguíneo.

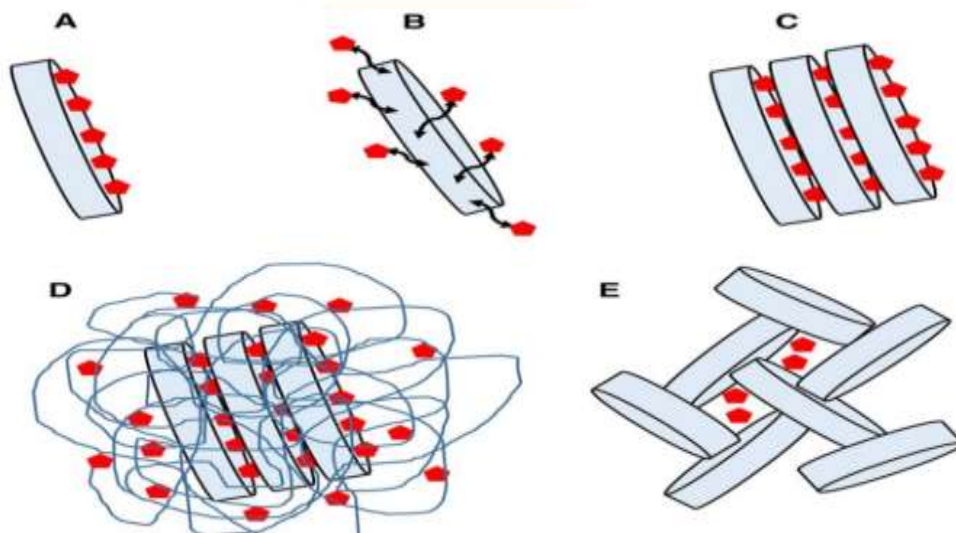
A laponita também é muito utilizada na medicina regenerativa e na engenharia tecidual, aqui ela demonstra três importantes níveis de atuação: primeiramente pode, por si só, provocar respostas biológicas; segundo, pode carrear fatores bioquímicos (fatores de diferenciação, mitógenos, por exemplo) e finalmente pode ser usada para melhorar as propriedades mecânicas de géis e sistemas que são usados para o crescimento tecidual (TOMÁS, ALVES E RODRIGUES, 2017).

É sabido também que a laponita a uma concentração superior a 2% em peso, forma facilmente hidrogel exibindo comportamentos tixotrópicos (fenômeno no qual um coloide muda sua viscosidade) na água. Além disso, nanopartículas de laponita podem atuar como reticuladores físicos de hidrogéis (Figura 6) que ligam as propriedades dinâmicas dos géis físicos, fornecendo resistência ao sistema polimérico. Interações podem ocorrer entre as moléculas polares ou íons moleculares negativos presentes no ambiente e as cargas positivas nas bordas da argila (LOBO et al., 2019).

Por conseguinte Oliveira et al., (2010) afirmam que biomateriais como os hidrogéis com argila dispersa são uma nova classe de compostos que combinam a elasticidade e a permeabilidade dos géis com a alta capacidade das argilas de adsorver diferentes substâncias. O estudo de Tomás, Alves e Rodrigues (2017) traz que uma importante aplicação da laponita tem sido o tratamento de doenças de pele bem como de feridas nesse órgão. Ghadri et al., (2014) elaboraram géis à base de laponita com diferentes aminoácidos para serem aplicados como curativos em

feridas cutâneas e conseguiram demonstrar que eles foram essenciais no processo de reparação tecidual.

Figura 6. Diferentes formas de associação de fármacos à laponita



A: adsorção nas superfícies da laponita quando a argila é o estado esfoliado. B: fixação covalente nas bordas da argila; C: por intercalação dentro das pilhas de cristais de argila; D: interação ou encapsulamento pelo polímero, além de interações com a argila; E: encapsulamento dentro dos espaços inter-cristais definidos pelos cristais auto-montados.

Fonte: TOMÁS, ALVES E RODRIGUES, 2017.

1.4 Os hidrogéis como cobertura das lesões cutâneas

Os hidrogéis são biomateriais importantes devido às suas propriedades, tais como elevado teor de água que contribui para sua superior biocompatibilidade (HOFFMAN, 2012); baixa tensão interfacial entre a superfície do hidrogel e uma solução aquosa, possibilitando baixa tendência à adesão celular e adsorção de proteínas dos fluidos corpóreos; propriedades físicas similares às do tecido humano, como consistência macia e elástica exibida por alguns hidrogéis, minimizando a irritação mecânica por atrito; além da prevenção da perda de fluidos corporais,

barreira contra bactérias e permeabilidade ao oxigênio (ALCÂNTARA, 2013; BENAMER et al., 2006; PEPPAS, 2000; OLIVEIRA, 2013).

Sabe-se que os hidrogéis atendem a muitos dos requisitos que favorecem a cicatrização de lesões: podem liberar substâncias ativas para estimular o processo de cicatrização, evitar ou combater infecções. Sabendo-se que a infecção é o fator mais prejudicial da cura de uma ferida, pois determina uma maior destruição de tecidos e prolonga a fase inflamatória, retardando a reparação tecidual, essa propriedade dos hidrogéis, os torna uma alternativa cada vez mais atraente (ARAÚJO, 2017; BLANES, 2004).

Hidrogéis são materiais poliméricos modificados por reticulação, formados por redes tridimensionais. São caracterizados por sua hidrofiliçidade e insolubilidade em água. Em meio aquoso, esses hidrogéis intumescem (ou incham) até um volume de equilíbrio, mas preservam sua integridade. A hidrofiliçidade se deve à presença de grupos $-OH$, $-COOH$, $-CONH$, $-SO_3H$ entre outros presentes na cadeia polimérica (BAVARESCO, 2002). Eles têm sido usados como suportes na investigação de sistemas inteligentes para liberação de drogas. A utilização de polímeros sintéticos e naturais modificados tem estimulado a aplicação da nanotecnologia em sistemas poliméricos formados por novas estruturas (PEPPAS, 2006).

Existem várias técnicas para a modificação de polímeros, entre elas a radiação ionizante que tem demonstrado grande eficiência nessas modificações no decorrer dos anos (JAGUR-GRODZINSKI, 2010). Além do processo da radiação ionizante para a modificação de polímeros, recentemente têm sido usadas nanopartículas inorgânicas, para a formação de nanocompósitos poliméricos. Especialmente os nanocompósitos de polímeros com argilas naturais e sintéticas têm despertado o interesse de vários pesquisadores para a possibilidade da obtenção de novos materiais, dentre esses os hidrogéis (LEE, 2009). Estas nanopartículas inorgânicas representam uma alternativa racional para polímeros

convencionais, pois empregando uma pequena porcentagem de argila é possível formar polímeros com melhores propriedades mecânicas, boa transparência e maior estabilidade térmica (FONSECA, 2003).

As importantes propriedades apresentadas pelos hidrogéis os tornam ideais para várias aplicações como na engenharia de tecidos (DRURY e MOONEY, 2003; SLAUGHTER et al., 2009), sistemas de liberação controlada de princípios ativos (BENAMER et al., 2006; ROMAN et al., 2010), curativos e tratamento de queimaduras e ferimentos (PAWDE E DESHMUKH, 2008 e VARSHREY 2007).

1.5 Liberação de substâncias para o tratamento das feridas infectadas

Os hidrogéis são biomateriais. Esses biomateriais compõem uma área da ciência em que materiais sintéticos são desenvolvidos para funções biologicamente pertinentes, proporcionando grande diversidade de novos produtos. Estima-se que o mercado mundial para biomateriais movimente aproximadamente 35 bilhões de dólares todo ano. Além disso, este mercado apresenta crescimento de 11% ao ano, o que demonstra a grande necessidade deste tipo de produtos (OLIVEIRA, 2013).

Embora estejam sendo largamente empregados, os biomateriais ainda precisam ser aperfeiçoados para fins terapêuticos. Entretanto, os biomateriais melhoram significativamente a qualidade de vida de milhões de pessoas, que provavelmente estariam condenadas às limitações no desempenho de atividades ou até mesmo, em última análise, à morte (Conferência Nacional de Ciência, 2004; ONUKI, 2008; CGEE, 2010). Entre esses biomateriais destacam-se os nanogéis, microgéis e macrogéis poliméricos, que são utilizados como carregadores de fármacos.

Observa-se que nas últimas décadas têm sido realizadas várias mudanças na investigação para o desenvolvimento do sistema de liberação de substâncias (MOHAMAD AL-SHEIKHLY, 2008; ULANSKI, 2002). Este campo é

conhecido como "terapia inteligente" e envolve dispositivos que administram, por exemplo, medicamentos com sistemas que detectam, isolam e tratam o local afetado pela doença, sem interferir no sistema biológico, melhorando a qualidade de vida do paciente (PEPPAS, 2006).

Muitos fármacos estão sendo associados aos biomateriais para serem liberados, de forma controlada, nos leitos das feridas ou em locais específicos do organismo, com ossos, células tumorais, etc. Nesse tipo de sistema (de liberação controlada), a velocidade de liberação do fármaco ou da substância é mais precisamente controlada de acordo com a necessidade do tratamento (ANSEL, 2007).

As drogas mais comumente utilizadas são os antibióticos e os antineoplásicos. Nesse ínterim ressalta-se que muitos estudos têm se voltado para o controle bacteriano por meio do estresse oxidativo, campo no qual se verifica as propriedades antibacterianas da liberação controlada de oxigênio, por meio de associação de óxidos em meio aquoso.

Dentre os óxidos utilizados destacam-se o óxido de zinco (ZnO) e os óxidos de cálcio (CaO), estes últimos geralmente se dissociam em íons de cálcio e íons de hidroxila, sendo que a ação desta sobre os tecidos e as bactérias explicam muitas de suas propriedades biológicas e antimicrobianas. De acordo com Estrela e Pécora (1997), a difusão dos íons hidroxila confere atividade antibacteriana, pois esta substância altera o metabolismo enzimático das bactérias, a partir da influência de um gradiente de pH existente na membrana citoplasmática.

O peróxido de cálcio, também conhecido como dióxido de cálcio tem fórmula (CaO_2) se decompõe para liberar oxigênio quando em contato com o material hidratado, é um dos peróxidos inorgânicos mais estáveis à temperatura e se decompõe lentamente no ar úmido. (NCBI, 2017).

Ainda segundo o NCBI (2017), o peróxido de cálcio é um pó branco ou amarelado, sem aroma ou sabor característico, tem um peso molecular de 72,0768

g/mol e uma densidade de 2,91 g/mL. O composto tem um ponto de fusão de 200 °C e decompõe-se acima de 355 °C. É ligeiramente solúvel em água formando peróxido de hidrogênio. Tem um pKa de 12,5.

Como os óxidos formam bases fortes que na presença de hidratação, liberando grupos hidroxila que promovem citotoxicidade e esse efeito é percebido nas células microbianas, bacterianas e fúngicas, isso faz com que esses compostos sejam bastante utilizados na antissepsia de tecidos e superfícies.

Portanto, a utilização de polímeros inteligentes moldados em escala molecular, com capacidade de liberar fármacos ou enzimas, tem sido reconhecida como um grande avanço na área biomédica (ULASNK, 2004; ROSIAK, 2004; VITALIY, 2007). A capacidade de transportar moléculas terapêuticas para o local específico, sem qualquer perda de suas funções, bem como sua estrutura é um requisito significativo para um transportador eficiente (JAFARI, et al., 2017).

PROPOSIÇÃO

A situação enfrentada hoje em dia, com as feridas cutâneas, as limitações trazidas aos pacientes, os custos impostos ao sistema de saúde e a tecnologia disponível se apresenta como um desafio multifacetado trazendo diversas formas de interpretação para os profissionais, principalmente os enfermeiros e outros profissionais estomaterapeutas (MORAIS et al., 2008).

É importante ressaltar que uma série de agentes tópicos, como antissépticos, degermantes, antibióticos e coberturas sempre exercem algum efeito na ferida, podendo constituir, em alguns casos, agentes adversos que podem inclusive prejudicar a cicatrização (MANDELBAUM et al. 2003).

A existência de uma grande variedade de feridas, com suas diversas fases e modos de cicatrização, levou à evolução de diferentes tipos de coberturas. Com a expansão dos conhecimentos acerca das feridas percebeu-se a importância da promoção de ambiente ótimo para a cicatrização das feridas e do ativo envolvimento das coberturas para a estabilização e manutenção desse ambiente. (FONTES, 2013).

A cicatrização, como já largamente descrito, representa uma série de eventos celulares, bioquímicos e fisiológicos complexos, integrados e altamente dinâmicos e o desenvolvimento de biomateriais inteligentes deve visar a promoção da harmonia desses eventos. Esta consciência resultou no desenvolvimento de coberturas funcionalmente ativas adicionadas de componentes como, por exemplo, as nanopartículas, que interagem com as feridas que recobrem, criando e mantendo a umidade no campo lesado promovendo, na maioria das vezes um melhor meio de cicatrização (MORAIS et al., 2008). Todos esses fatores demonstram a relevância do estudo e justificam o contínuo desenvolvimento de novos materiais bem como o aperfeiçoamento das suas propriedades.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se um estudo experimental do tipo descritivo, com abordagem quantitativa que verificou *in vitro* a atividade bactericida do hidrogel à base de argila laponita com liberação controlada de oxigênio.

Substâncias testes (Produção dos Hidrogeis)

Foram formulados quatro tipos de hidrogeis com água deionizada como meio dispersor, sendo um hidrogel de laponita a 9% e três hidrogeis de laponita a 9% contendo peróxido de cálcio (CaO_2) em concentrações de 5%, 10% e 20%.

A laponita a 9% em peso foi carregada com (5, 10 e 20% em peso) de CPO em 4 mL de água deionizada (DI) e agitada em um vórtice por 30 minutos.

Liberação de Oxigênio

A concentração de oxigênio foi medida usando um sensor óptico PRESENS (modelo OXY-1 ST) por 6 h e a medida analisada usando o software PreSens Measurement (Studio 2, Alemanha).

Amostras de laponita em hidrogeis de CPO (5%, 10% e 20%) de 5 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram colocados em água DI em ambientes hipóxicos por 6 horas e, usando sensor óptico, para a medida da concentração de oxigênio a cada hora.

Cultivo das espécies bacterianas

Foram utilizadas cepas do Gram-positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram-negativo *Escherichia coli* ATCC 25922 obtidos pela (Sigma). Os

ensaios antibacterianos foram executados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Preparo dos Inóculos

As culturas de bactérias foram reativadas em meio de cultura Brain Heart Infusion Broth (Caldo Cérebro-coração) BHI-3% e colocadas em estufa a 37°C para crescimento por 24 horas. Posteriormente foi realizada a retirada de uma alíquota da cultura microbiana e diluída em tubos de ensaio contendo 03 mL de solução salina 0,9% levados à turbidez da solução até se igualar ao controle de McFarland 0,5%.

Concentração inibitória mínima

Inicialmente foram feitos ensaios piloto para verificar se seria possível observar a formação de halos de inibição ou dispersão lenta levando a diminuição de crescimento seguindo metodologia descrita em por Ferreira et al. (2016). Posteriormente foi feita determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por difusão em disco nas concentrações 5%, 10% e 20%.

As culturas bacterianas foram preparadas transferindo o inóculo do meio nutriente para o meio de infusão cerebral do coração (BHI), após incubação a 37 °C/24 h. As suspensões de bactérias foram padronizadas usando um padrão de 0,5 McFarland.

Em seguida para primeiro teste após ser semeado com auxílio do Swab suspensão de bactérias padrão de 0,5 McFarland em placa contendo meio de cultura Mueller-Hinton medium. Na superfície de cada placa foi adicionada uma lâmina de vidro com solução de teste de 100L espalhada por cima (laponita 9%; laponita 9% + 5% (CPO), laponita 9% + 10% (CPO), laponita 9% + 20% (CPO).

Após os resultados, confirmando formação de halo nas proximidades da lâmina, foi feito ensaio de difusão em disco. Seguindo metodologia descrita por Bauer e Kirby (1966) e revisada por Leal et al. (2019), com o auxílio de swab estéril, os microrganismos foram replicados do inóculo para a placa de Petri esterilizada previamente preparada com Mueller Hinton, em seguida 10 μ L da substância teste foi impregnada no disco de 5% e 20 μ L nos demais devido densidade, em seguida cada disco foi colocado na placa para ser incubada.

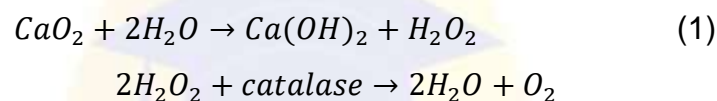
ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis de desfechos foram analisadas quanto à normalidade de distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e as concentrações foi realizada utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson. Para essa análise, foi utilizado o tamanho dos halos inibitórios e das concentrações dos hidrogéis. O nível de significância adotado foi de 5%. O programa estatístico utilizado para a análise dos dados foi o GraphPad Prism.

RESULTADOS

Teste 1 Concentração de oxigênio

O CPO incorporado no interior da laponita se converte em peróxido em contato com a água, seguindo a equação (1)



A liberação de oxigênio foi medida em condições hipóxicas com controle de temperatura para laponita carregada com 5%, 10% e 20% de CPO, respectivamente. Após 5h, a concentração de oxigênio diminuiu para 28,99% para 20% de CPO em Laponita, no entanto, durante as primeiras 5h de hidrogéis de CPO em laponita apresentaram aumento da liberação de oxigênio controlada. De acordo com a Figura 7 a liberação de oxigênio parou após 3 horas.

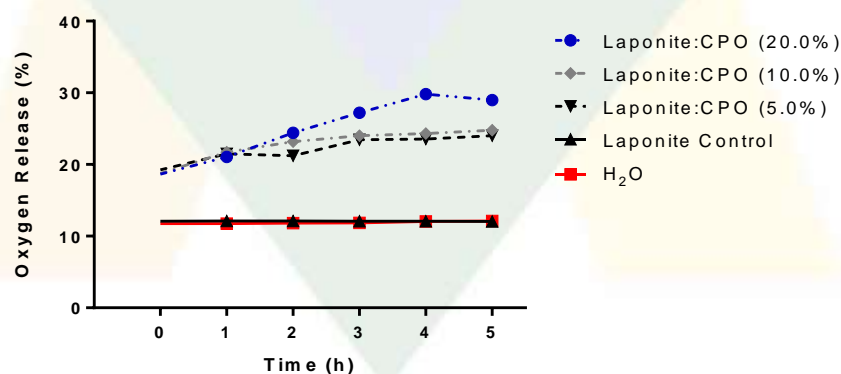
Esses resultados confirmam que o aumento de CPO no interior da laponita permite a liberação controlada de oxigênio. Em comparação com outras pesquisas, por exemplo, Adrover, et al. (2019), com goma de gelatina sintetizada (GG) em laponita como sistemas de administração sustentada de drogas, nos seus resultados mostraram que a presença de laponita permitiu uma desaceleração significativa da cinética de liberação de drogas hidrofílicas, portanto, confirmando que a laponita pode ser um aditivo eficaz para a fabricação de sistemas sustentados de administração de medicamentos (Adrover, et al., 2019).

Porion et al. usaram essa argila para determinar as moléculas de água da mobilidade e a difusão da água, os resultados confirmam que há difusão da água porque existe a presença de porosidade, no entanto, a ação da laponita como matriz para partículas carregadas limita a porosidade interpartícula (Porion, et al., 2018).

Além disso, a adição de CPO, ajuda na porosidade dos hidrogéis e o aumento de CPO no interior dos hidrogéis permite maior liberação de oxigênio (Alemdar, et al., 2016).

Carrasco et al. sintetizaram hidrogéis de GelMA carregados com CPO a 0,5%, 1% e 3% p/p. Seus resultados demonstraram que uma concentração de 3% permite uma maior liberação de oxigênio por até 6 dias. Finalmente, o uso da laponita como matriz de hidrogéis forma uma rede híbrida de interpenetração. Tritschler et al., que usaram a laponita como polímero para a barreira ao oxigênio e como resultado mostraram que a laponita atua como uma barreira eficiente (Tritschler, et al., 2016). O tempo de liberação depende diretamente do conteúdo do LPN na formulação (concentração) (Saya, et al., 2019).

Figura 7. Oxygen release of Laponite:CPO hydrogels (5 %, 10 % and 20 % w/w), oxygen release with control temperature

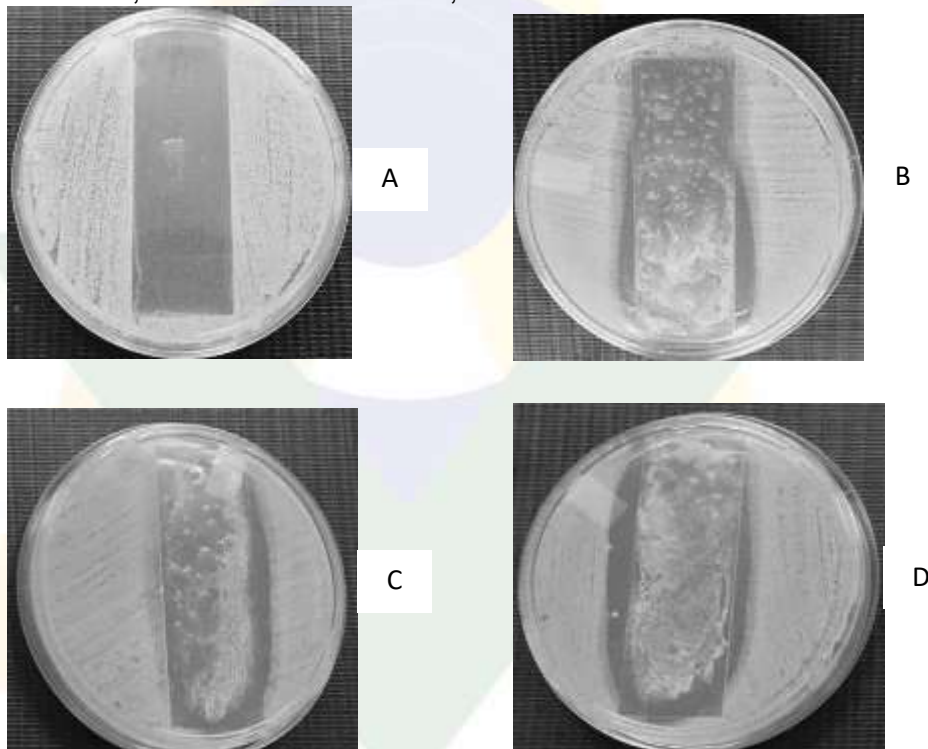


Teste 2. Contato direto com lâmina

Considerando a real liberação de oxigênio presente no hidrogel, e que possivelmente pudesse agir de forma positiva sendo liberado do interior da laponita, dispersando-se pelo meio e inibindo o crescimento microbiano, foi possível observar a formação de halos de inibição em todas as concentrações testadas, dessa forma

procedeu-se em continuidade com os ensaios de difusão em disco. No estudo de Vishnuvarthanan e Rajeswari (2019), a atividade antimicrobiana melhorou significativamente com a adição de laponita para microrganismos gram-positivos e gram-negativos melhorando também as propriedades de barreira antibacteriana.

Figura 8. Ação de hidrogel em concentrações de laponita em cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.: A – 9% LPN (controle); B – LPN +CPO 5%; C – LPN + CPO 10%; D – LPN + CPO 20%.



Fonte: LPM/ UFPI

Isso ocorre porque curativo de hidrogel possui isoladores térmicos, proporcionando assim um ambiente antimicrobiano potente e impermeável aos patógenos da ferida, além de proteger a ferida da contaminação externa (YAH; SIMATE, 2015). Esses resultados revelam que os hidrogéis carregados com laponita

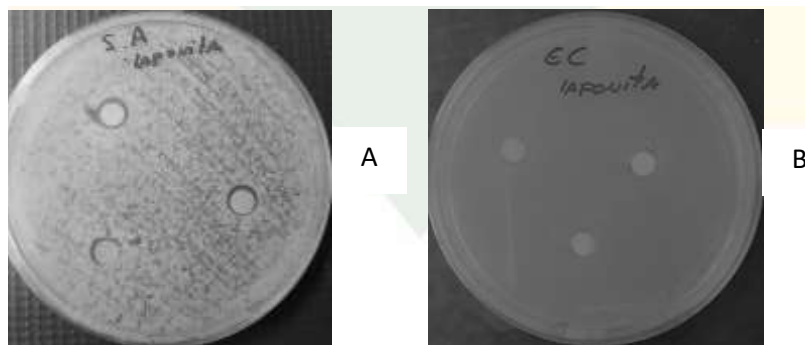
com liberação controlada têm grandes perspectivas de curativos antibacterianos (HUANG et al., 2019).

Teste 3. Sensibilidade do hidrogel à base de laponita

Os microrganismos escolhidos para esse teste são responsáveis por causar inúmeras infecções no corpo humano o Gram-positivo *S. aureus* ATCC 25923 e Gram negativo *E. coli* ATCC 25922. Apesar de comumente encontrado na pele, colôn esses microrganismos são capazes de levar a morte. Além disso, a resistência a vários medicamentos tem sido um desafio para a indústria farmacêutica e, portanto, as formas de superar esses mecanismos de resistência têm sido frequentemente estudadas (RATTI; SOUSA, 2009).

O teste de difusão representado na (Figura 9) utilizando laponita como controle foi realizado para garantir que a atividade antibacteriana do hidrogel não fosse influenciada pelo nanoargila laponita.

Figura 9. Hidrogel LPN 9% controle: A – *Staphylococcus aureus*; B – *Escherichia coli*.



Fonte: LPM-UFPI

Os resultados demonstraram que as três soluções de laponita a 9% contendo peróxido de cálcio (CaO_2) em concentrações de 5%, 10% e 20% (teste)

foram capazes de inibir o crescimento microbiano em 100%, com halos superiores à 9 mm contra ambas as cepas bacterianas. Esses resultados corroboram com RAWAT et al., 2014 onde foi estudada a eficácia antimicrobiana da laponita e esta exibiu atividade antibacteriana aumentada contra o patógeno *E. coli*.

Ghadiri; Chrzanowski; Rohanizadeh (2014) estudaram a atividade antimicrobiana da laponita combinada com a mafenida formulados para tratar e curar feridas de queimaduras. Estas foram testadas em cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* demonstrando que o seu complexo mostrou características adequadas para serem potencialmente aplicadas como um gel ou filme curativo demonstrando que evidências científicas apoiam o mecanismo ação antimicrobiano de argilas utilizados para promover cura em feridas (GASKELL; HAMILTON, 2014)

O teste de disco-difusão em ágar é realizado dispensando os discos de antimicrobianos sobre a placa de ágar após a aplicação do inóculo bacteriano com aproximadamente McFarland 0,5. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco são mensurados em milímetros (mm). Estes são relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e à velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da concentração inibitória mínima (CIM), conforme apresentado na tabela 4 pela análise de regressão linear, encontra-se uma relação linear consistente demonstrando que o halo de inibição é inversamente proporcional à CIM daquele antimicrobiano. (Tabela 4)

Tabela 4. Mostra os valores de Concentração Inibitória Mínima para laponita a 9% contendo peróxido de cálcio (CaO₂) em concentrações de 5%, 10% e 20%. Contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Concentrações (µg/mL)	Linhagens			
	Média dos halos de inibição			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
Laponita a 9% + 5 % CPO	11,73/12,27 16,30/13,53 16,32/17,39	12 14,91 16,81	9,82/9,04 8,88/9,47 8,88/9,28	9,43 9,17 9,08
Laponita a 9% + 10 % CPO	17,75/17,74 18,35/17,89 19,00/19,20	17,75 18,12 19,10	13,55/12,57 10,12/12,19 15,09/13,96	13,06 11,15 14,52
Laponita a 9% + 20 % CPO	14,01//13,09 10,56/10,72 10,10//10,11	13,55 10,64 10,10	12,93/11,73 14,13/13,53 11,10/12,33	12,33 13,83 11,71

Os resultados foram em triplicatas sendo feitas medidas vertical e horizontal dos halos de cada disco correspondente a sua concentração. Logo temos a média da triplicada e média por disco dado em (mm) **negrito**.

Na prática, os resultados do teste de disco-difusão são interpretados comparando o valor do halo de inibição com os critérios publicados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2008). Desta maneira, as amostras bacterianas são categorizadas em sensíveis, resistentes ou intermediárias.

Contra *S. aureus*, verifica-se conforme na tabela 5 que a correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e a atividade de todos os hidrogéis de laponita nas diferentes concentrações de peróxido de cálcio, demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nas suas ações bactericidas.

Tabela 5. Correlação entre o tamanho do halo inibitório e as concentrações de Hidrogel de LPN 9% + CPO 5%, 10% e 20% contra *Staphylococcus aureus*.

P VALUES	HIDROGEL LPN 9%+ 5%CPO	HIDROGEL LPN 9%+ 10%CPO	HIDROGEL LPN 9%+ 20%CPO
HALOS LPN 9%+ 5%CPO		0,005	0,016
HALOS LPN 9% + 10%CPO	0,005		0,008
HALOS LPN 9% + 20%CPO	0,016	0,008	

Fonte: GraphPad Prism

Contra o microrganismo, *E. coli* percebe-se forte correlação entre o tamanho dos halos inibitórios e as maiores concentrações de hidrogel de laponita com peróxido de cálcio (10% e 20%) conforme exposto na tabela 6, particularmente no hidrogel de laponita 9% + CPO 10% que apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais, isso é corroborado pela média do tamanho dos halos inibitórios (12,91mm) que foi maior no grupo que recebeu o hidrogel nessa concentração.

Tabela 6. Correlação entre o tamanho do halo inibitório e as concentrações de Hidrogel de LPN 9% + CPO 5%, 10% e 20% contra *Escherichia coli*.

P VALUES	HIDROGEL LPN 9%+ 5%CPO	HIDROGEL LPN 9%+ 10%CPO	HIDROGEL LPN 9%+ 20%CPO
HALOS LPN 9%+ 5%CPO		0,749921168	0,609637382
HALOS LPN 9% + 10%CPO	0,749921168		0,043566822
HALOS LPN 9% + 20%CPO	0,609637382	0,043566822	

Fonte: GraphPad Prism

DISCUSSÃO

Segundo a tabela de referência NCCLS, (2008) para teste de sensibilidade contra *S. aureus* ATCC 25923, antibióticos como Oxacilina (Oxa), Norfloxacin (Nor), Metilicina (Met) com halos de inibição superiores á 16 mm para Nor, ≥ 13 mm para Oxa e ≥ 14 Met são considerados sensíveis.

As maiores médias no tamanho dos halos inibitórios produzidos pelos hidrogéis foram obtidas nas concentrações de 5% e 10% (14,5 e 21,2 respectivamente), com isso pode-se dizer que o hidrogel em concentrações de 5% e 10% apresentaram ótima eficácia em relação a este patógeno inibindo completamente o crescimento bacteriano.

Figura 10 Hidrogel LPN + CPO 5% *S. aureus*



Fonte: LPM-UFPI

No entanto, foi possível observar redução do halo, na maior concentração do CaO_2 , isso possivelmente acontece devido à maior quantidade de CaO_2 , (figura 11) e os discos adsorveram dificultando sua liberação para o meio, fato este que se justifica por não ter sido observado quando se utilizou a lâmina para observar se haveria difusão (BAUER et al., 1996, NCCLS, 2008). LI et al., 2012). Mesmo assim é importante ressaltar que o tamanho do halo, nessa concentração, embora menor,

também proporcionou inibição do crescimento bacteriano apresentando com forte correlação (r de Pearson = -0,894) e diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 11 Hidrogel LPN + CPO 20% *S.aureus*



Fonte: LPM-UFPI

Contra cepa de *E. coli* ATCC 25922 antibióticos β -lactâmicos como Cefalexina (Cef) e Amoxicilina-ác. Clavulânico (Amox+ác.Clav) apresentam sensíveis com halos ≥ 15 mm (EUCAST, 2018).

Nesse caso as concentrações do hidrogel que foram sensíveis são as superiores 5%, conforme a figura 4.

Figura 12. Hidrogel LPN + CPO 20% *E.coli*



Fonte: LPM-UFPI.

Isso mostra que neste caso possivelmente a membrana externa foi atingida pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) aonde vieram a provocar danos capazes de lizar o microrganismo. O radical mais potente na indução de dano celular é o O_2 , presente em aproximadamente em todas as células aeróbicas apresentando reações de agente redutor (GARCEZ et al. 2004; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010; ZHAO; HONG; DRLICA, 2015).

Além disso, a laponita pode ter a capacidade de adsorção e fixação de microrganismos, portanto aprimorado a atividade antimicrobiana (WU et al., 2018) sendo essa atividade atribuída à sua estrutura e ao modo de ação antimicrobiana, bem como à diferença na estrutura da parede celular dos microrganismos indicadores (VISHNUVARTHANAN, RAJESWARI, 2019)

O resultado final da atividade antibacteriana de forma resumida, acontece possivelmente devido a danos na membrana bacteriana causado por ERO's, levando a uma desestabilização de sua integridade ocasionando influxo de íons e a morte bacteriana (VATANSEVER et al., 2013; DA SILVA et al., 2019). O aumento da acumulação de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma resulta na ativação da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons e na geração de ERO. Durante a produção mitocondrial de trifosfato de adenosina (ATP) e água, pequenas concentrações de oxigênio são produzidas, resultando nos estágios iniciais da produção de ERO (VATANSEVER et al., 2013; ABDAL-DAYEM et al., 2017; DA SILVA et al., 2019)

CONCLUSÃO

A Laponita atuou como uma barreira eficiente ao oxigênio e apresentou atividades antimicrobianas principalmente nas concentrações de 5% e 10% de CPO em relação ao patógeno *S. aureus*, e nas concentrações de 10% e 20% para a bactéria *E. coli*, sendo o hidrogel produzido um potencial candidato para o tratamento das infecções e consequente cicatrização das feridas cutâneas.

Para futuras aplicações clínicas, é essencial testar o hidrogel contra microrganismos isolados clinicamente, especialmente cepas multirresistentes e avaliar sua biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* além de analisar suas características químicas como o perfil de intumescimento, para verificar sua capacidade absorviva, por exemplo.

Os resultados da atividade antibacteriana apresentados, os agentes envolvidos, dentre eles o oxigênio, associados à facilidade de obtenção do hidrogel e o baixo custo em sua produção, aumentam substancialmente as perspectivas de sua utilização no futuro.

Ao fim conclui-se que o estudo sugere a criação de uma potente formulação farmacêutica que pode ser muito útil para cicatrização de feridas cutâneas, entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para a obtenção de mais informações acerca de biocompatibilidade, toxicidade e mecanismos de morte celular.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L.; LASTORIA, S. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. **International Journal of Dermatology**. v. 44, p. 449-456, 2009. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-4632.2004.02456.x/pdf>> Acesso em 02 de janeiro de 2019.

ABDAL-DAYEM, A.; HOSSAIN, M. K.; LEE, S. B.; KIM, K.; SAHA, S. K.; YANG, G. M.; CHO, S. G. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 120, 2017.

ADROVER, A., PAOLICELLI, P., PETRALITO, S., DI MUZIO, L., TRILLI, J., CESA, S., CASADEI, M.. Gellan Gum/Laponite Beads for the Modified Release of Drugs: Experimental and Modeling Study of Gastrointestinal Release. **Pharmaceutics**., 11, 187. (2019)

ALCÂNTARA, M.T.S. **Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações médicas**. Tese de Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

ALEMDAR, N., LEIJTEN, J., CAMCI-UNAL, G., HJORTNAES, J., RIBAS, J., ARGHYA, P., KHADEMHOSEINI, A.. Oxygen-Generating Photo-Cross-Linkable Hydrogels Support Cardiac Progenitor Cell Survival by Reducing Hypoxia-Induced Necrosis. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, 3, 1964-1971(2017)

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Editora Artmed. p. 283-298, 2007.

BAO, Z. CUI X. CHEN, K. XING, H. YANG, Q. KRISHNA, R. *et al.*, Pore chemistry and size control in hybrid porous materials for acetylene capture from ethylene. **Science** 353 (6295) (2016) 141–144.

BARRETO, B.M.F. **Monitoramento e caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* em lesões cutâneas crônicas tratadas com hidrogel e placa de poliuretano**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências do Cuidado em Saúde) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ: 2015.

BAUER, A. W.; KIRBRY, W. M. M.; SHERRIS J. C.; TURCK, M. AntibioSTatic

size control in hybrid porous materials for acetylene capture from ethylene. **Science** 353 (6295) (2016) 141–144.

BAVARESCO, V. P.; MACHADO, L. D. B.; ZAVAGLIA, C. A. C.; REIS, M. C. Caracterização mecânica de hidrogéis de PVAI para serem utilizados como cartilagem artificial reticulados por irradiação. **Rev. Bras. Pesq. Desenvol.** v. 4 n 3, p. 1679-1681, 2002.

BENAMER, S.; MAHLOUS, M.; BOUKRIF, A.; MANSOUURI, B.; LYOUCE, F. S. Synthesis and Characterizations of Hydrogels Based on Poly(vinyl pyrrolidone), **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.** v. 248, p. 284-290, 2006.

BLANES, L. **Tratamento de feridas**. Baptista-Silva JCC. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>> Acesso em 17 outubro de 2018.

BORGES, E. L. **Feridas: úlceras dos membros inferiores**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2012. v. 1. 203 p.

CGEE. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Materiais Avançados para Saúde Médica- odontológica, **Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 15, p. 297-331, 2010.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne,PA: CLSI; 2019.

Comitê Europeu de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Controle de Qualidade de Rotina e Controle de Qualidade Interno para Determinação da CIM e Disco-Difusão Conforme Recomendação do Br-CAST-EUCAST: <http://www.brkast.org> conceitos atuais e recursos auxiliares: parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

DA SILVA, B. L.; ABUÇAFY, M. P.; MANAIA, E. B.; FWD423 JUNIOR, J. A. O., CHIARI-ANDRÉO, B. G., PIETRO, R. C. R., CHIAVACCI, L. A. Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9395, 2019.

DE PAULA MMM, BASSOUS NJ, AFEWERKI S, Harb SV, GHANNADIAN P, DOMENEGUETTI, R.R. **Desenvolvimento "in situ" de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo laponita**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, SP: 2018.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, Nov 2003. **Ecolog. Chem. Eng.**, v. 17- 2, 2010.

ESTRELA, C. PÉCOR, J.D. **Características químicas do hidróxido de cálcio**. Programa Incentivo à Produção de Material Didático do SIAE – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP). Pró-Reitorias de Graduação e Pós-Graduação da USP. Disponível em <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcao/quimica.htm> acessado em 06 de outubro de 2019

FERREIRA, M. O. G.; LEITE, L. L. R.; DE LIMA, I. S.; BARRETO, H. M.; NUNES, L. C. C.; RIBEIRO, A. B.; DA SILVA FILHO, E. C.. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. **Carbohydrate polymers**, v. 152, p. 409-418, 2016.

FIERHELLER, M.; SIBBALD, R.G. A Clinical Investigation into the Relationship between Increased Periwound Skin Temperature and Local Wound Infection in Patients with Chronic Leg Ulcers. **Wound Care Journal**. v. 23, n.8, p. 369-379, 2010.

FONSECA, M. G.; AIROLDI, C. Híbridos inorgânicos-Orgânicos derivados da reação de filossilicatos com organossilanos, **Quím. Nova**, v. 26, n 5, 2003.

FONTES, M.P.R.S. **Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo. São Carlos: SP, 2013.

GASKELL, E.E.; HAMILTON, A. R. Antimicrobial clay-based materials for wound care. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 6, p. 641-655, 2014.

GHADIRI, M. CHRZANOWSKI, Wb. ROHANIZADEH, R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an *in vitro* study. **J Mater Sci Mater Med**. 2014, **25**: 2513-26

GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. Antonio Carlos Gil. - 6. ed. - São Paulo: Atlas, 2008. p. 26. Disponível em: <<https://ayanrafael.files.wordpress.com/2011/08/gil-a-c-mc3a9todos-e-tc3a9cnicas-de-pesquisa-social.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2018.

HAN, A. et al. The importance of a multi-faceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**. v. 19, n. 5, p. 532-541, 2011. Disponível em: <http://www.dental.umaryland.edu/dentaldepts/micropath/images/shirliff_lab_image/2011-wrr720.pdf> Acesso em 10 de outubro de 2018

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

HUANG, L.; ZHU, Z.; WU, D.; GAN, W.; ZHU, S.; LI, W.; LU, L. Antibacterial poly (ethylene glycol) diacrylate/chitosan hydrogels enhance mechanical adhesiveness and promote skin regeneration. **Carbohydrate polymers**, v. 225, p. 115110, 2019.

IMMICH, A.P.S. CELESTINO, V.P. MAESTRI, G. BIERHALZ, A.C.K. **Produção e caracterização de hidrogel de carboximetilcelulose para aplicação na área de curativos biomédicos**. 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO. Maresias: SP, 2017.

JAFARI, S. AHMADIAN, E. FARD, J.K. KHOSROUSHAHI, A.Y. Biomacromolecule based nanoscaffolds for cell therapy, **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** 37 (2017) 61–66.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications, **Polym. Adv. Technol.** v. 21, p. 27-47, 2010.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. Ed. Atheneu, 2005. p. 3-41.

LEAL, A. L. A. B. Comparative Review of Main Methods for Antimicrobial Tests. **Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, 2019.

LEE, J. H.; SIDDARAMAIAH, LI, P.; KIM, N. H.; YOO, G-H. Poly(acrylamide/laponite) nanocomposite hydrogels: Swelling and cationic dye adsorption properties, **J. Applied Polym. Sci.** v. 111, p. 1786-1798, 2009

LI, Y.; ZHANG, W.; NIU, J.; CHEN, Y. . Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. **ACS nano**, v. 6, n. 6, p. 5164-5173, 2012.

LOBO A.O., SAMSON A., MAGALHÃES L.S.S.M., SILVA A.D.R., STOCCO T.D., FILHO E.C.S., MARCIANO F.R. Bioprinting Laponite for Orthopedic Applications

Adv. Healthcare Mater. 2019, DOI: 1900158. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201900158>> Acesso em 11 de setembro de 2019.

MANDELBAUM, S. H; Di SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: MARCIANO FR, et al. (2018) Understanding the impact of crosslinked PCL/PEG/GelMA electrospun nanofibers on bactericidal activity. **PLoS ONE** 13(12): 0209386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209386> Acesso em 03 de setembro de 2019

MARTINS, M.A. et al. Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. **Ciência Cuidado e Saúde**, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2010. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/CiencCuidSaude/article/viewFile/8178/6635>> Acesso em 06 de outubro de 2018

MELIN, G. **Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica**, 39-40. 2013

MOHAMAD AL-SHEIKHLY. Oral presentation. **International Nuclear Atlantic Conference**, 2008.

MOHITI-ASLI, Mahsa. POURDEYHIMI, Behnam. LOBOA, Elizabeth G. Skin Tissue Engineering for the Infected Wound Site: Biodegradable PLA Nanofibers and a Novel Approach for Silver Ion Release Evaluated in a 3D Coculture System of Keratinocytes and *Staphylococcus aureus*. **Tissue Engineering Part C: Methods** Vol. 20, No. 10 Published Online: 17 Mar 2014 disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tec.2013.0458>> acesso em: 18 de setembro de 2019.

NAIR, S. H. et al., Swelling and Mechanical Behavior of Modified Poly(vinyl alcohol)/Laponite Nanocomposite Membranes, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 103, 2896–2903, 2007.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. *Banco de Dados Composto. PubChem*; CID = 14779. Retirado do PubChem. Acesso em 11 de março de 2019.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIC DISC SUSCEPTIBILITY TESTS. M 100-S18, 2008.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLIVEIRA, M.J.A, D.F PARRA, V.S AMADO e A.B. LUGÃO. **Modificações no comportamento de hidrogel de PVAL com a presença de argila** 19^o Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, 21 a 25 de novembro de 2010, Campos do Jordão, SP, Brasil.

OLIVEIRA, M.J.A. **Obtenção de Membranas de Hidrogéis para Tratamento Alternativo da Leishmaniose Tegumentar**. Tese de Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – PEN/Universidade de São Paulo – USP: São Paulo, SP: 2013.

ONUKEI, Y.; BHARDWAJ, U.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J. A. Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response, **J. Diabet. Sci. Technol.** v. 2, n 6, 1003–1015, 2008.

PAWDE, S. M.; DESHMUKH, K. Characterization of polyvinyl alcohol/gelatin blend hidrogel films for biomedical applications. **J. of Appl. Polym. Sci.**, v. 109, n. 5, 3431-3437, 2008.

PEPPAS, N. A.; HILT, J. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology, **Advanced Mater.** v. 18, p. 1345-1360, 2006.

PORION, P., FERRAGE, E., HUBERT, F., TERTRE, E., DABAT, T., FAUGÈRE, A. M., DELVILLE, A. **ACS Omega**, 3, 7399-7406. (2018)

RAWAT, K.; AGARWAL, S.; TYAGI, A.; VERMA, A. K.; BOHIDAR, H. B. Aspect ratio dependent cytotoxicity and antimicrobial properties of nanoclay. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 3, p. 936-944, 2014.

REZENDE, T. C. **Preparação e caracterização de hidrogel com nanopartícula de cério, *Calendula officinalis* ou *Bixa orellana L.*, como potenciais curativos de feridas crônicas**. Disponível em:
http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_10989_Disserta%E7%E3o%20Final%20de%20Mestrado%20-%20Talita%20C.omibi%20Rezende%20-%20P%F3s%20Eng.%20Quimica%20-%20PDF.pdf Acesso em: 10 jan. 2019

ROMAN, Z.; ZOFIA, M.; NAWROTEK, K.; LEK, U. Drug release from hydrogel matrices. **Ecolog. Chem. Eng.**, v. 17- 2, 2010.

ROSIK, J. M.; NURKEEVA, Z. S.; KHUTORYANSKIY, V.; MUN, G. A.; ITEKENOVA, A. B.; KADLUBOWSKI, S.; SHILINA, Y. A.; ULANSKI, P. Interpolymer complexes of poly(acrylic acid) nanogels with some non-ionic polymeres in aqueous solutions, **Colloids Surf. A**. v. 236, p. 141-146, 2004.

SABOURY, Ali Akbar, VARNAMKHAHASTI Behrang Shiri, JAFARI Samira, DERAKHSHANKHAH Hossein, ALAEI Loghman, FATTAHI Ali, Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 109 (2019) 1100–1111. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/biopharm>. Acesso em: 17 de janeiro de 2019.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Editora da ULBRA, 2004.

SAYA, S., NEELAM, KASHIF, H., SIMA, S., AFZAL, H., ABDUL, F., & TEBYETEKERWA, M. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, 25, 1-20. (2019)

SHEEHAN P, *et al.*, Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial. **Diabetes Care**. 2003 Jun;26(6):1879-82.

SLATER A.G., COOPER, A.I. Function-led design of new porous materials. **Science** 348 (6238) (2015) aaa8075.

SLAUGHTER, B.; SHAHANA, V.; KHURSHID, S.; FISHER, O.Z.; KHADEMOSSEINI, A. and PEPPAS, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. **Adv. Mater.**, v. 21, p. 3307- 329,2009.

SOUSA, C. P.; RATTI, R. P.. Staphylococcus aureus metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.

TIAN, J.; KENNETH, K. Y.; CHI-MING HO, W.; LOK, C.; YU, W.; CHE, CHI; CHIU, J.; TAM, P.K.H. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. **Chem. Med. Chem.**v. 2, p.129 -136, 2007.

TODAR, K.. **Bacterial Resistance to Antibiotics em Todar's Online Textbook of bacteriology**. [s.d.] Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>> Acesso em 17 de outubro de 2018

TOMÁS, ALVES e RODRIGUES. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? **Nanomedicine**. 2018 Oct;14(7):2407-2420.doi:10.1016/j.nano.2017.04.016. Epub 2017 May 26. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28552649> Acesso em: 10 jan.19

TRITSCHLER, U., ZLOTNIKOV, I., FRATZL, P., SCHLAAD, H., GRÜNER, S., & CÖLFEN, H.. Gas barrier properties of bio-inspired Laponite–LC polymer hybrid films. **Bioinspiration & Biomimetics**, 11, 035005 -035017. (2016)

ULANSKI, P. Polymeric Biomaterials Synthesized by radiating techniques – corrent study at IARC, **Polym. Adv. Techonol.** v.13, p. 951-959, 2002.

VARSHNEY, L. Role of natural polysaccharides in radiation formation of PVA–hydrogel wound dressing. **Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res.**, B 255, 343-349, 2007.

VATANSEVER, F.; DE MELO, W. C.; AVCI, P.; VECCHIO, D.; SADASIVAM, M.; GUPTA, A.; TEGOS, G. PAntimicrobial strategies centered around reactive oxygen species–bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 6, p. 955-989, 2013.

VISHNUVARTHANAN, M.; RAJESWARI, N. Food packaging: pectin–laponite–Ag nanoparticle bionanocomposite coated on polypropylene shows low O₂ transmission, low Ag migration and high antimicrobial activity. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 439-445, 2019.

VISHNUVARTHANAN, M.; RAJESWARI, N. Preparation and characterization of carrageenan/silver nanoparticles/Laponite nanocomposite coating on oxygen plasma surface modified polypropylene for food packaging. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 5, p. 2545-2552, 2019.

VITALIY, V. K. Hydrogen-bonded interpolymer complexes as materials for harmaceutical applications, **Int. J. Pharm.** v. 334 p. 15–26, 2007.

WESTENDORF, Astrid M. Applications of Nanoparticles for Treating Cutaneous Infection. **Journal of Investigative Dermatology** (2013) 133, 1133–1135. doi:10.1038/jid.2012.412 Disponível em: < www.jidonline.org acesso em 07 de setembro de 2019.

WU, Z.; HUANG, X.; LI, Y. C.; XIAO, H.; WANG, X. Novel chitosan films with laponite immobilized Ag nanoparticles for active food packaging. **Carbohydrate polymers**, v. 199, p. 210-218, 2018.

YAH, C. S.; SIMATE, G. S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 43, 2015.

YU, X. WANG J, ZHU Y, BAWA HK, NG G, WU Y, LIBERA M, VAN DER MEI HC, BUSSCHER HJ, et al., 2019 Oxygen-generating nanofiber cell scaffolds with antimicrobial properties. **Appl Mater Interfaces**. Jan. 3(1): 67-73. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155527> DOI: 10.1021/am100862h acessado em 30/09/19

ZAHO, G. Delayed Wound Healing in Diabetic (db/db) Mice with *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Challenge – A Model for the Study of Chronic Wounds. **Wound Repair Regen**. v. 18, n. 5, p. 467-477, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2939909/pdf/nihms-211808.pdf>> Acesso em 06 de outubro de 2018

ZHAO, X.; HONG, Y.; DRLICA, K. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 639-642, 2015.