

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Síntese e caracterização de hidrogéis com micropartículas de
alginato carregados com neomicina e própolis**

Juliana Dumard Carracena Candido

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS COM
MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO CARREGADOS COM
NEOMICINA E PRÓPOLIS**

JULIANA DUMARD CARRACENA CANDIDO

Sob a Orientação da Professora
Renata Nunes Oliveira

e Co-orientação do Professor
Garrett Brian McGuinness

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ
Abril de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C217s Candido, Juliana Dumard Carracena, 1993 Síntese e
caracterização de hidrogéis com micropartículas de
alginato carregados com neomicina e própolis /
Juliana Dumard Carracena Candido. - 2019. 92 f.:
il.

Orientadora: Renata Nunes Oliveira.
Coorientador: Garrett Brian McGuinness.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2019.

1. alginato. 2. própolis. 3. neomicina. 4.
curativos. I. Oliveira, Renata Nunes, 1984-, orient.
II. McGuinness, Garrett Brian, -, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

JULIANA DUMARD CARRACENA CANDIDO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 17/04/2019.

Renata Nunes Oliveira, D. Sc., UFRRJ
(Orientadora)

Paulo Jansen de Oliveira, D. Sc., UFRRJ

Ana Paula Duarte Moreira, D. Sc., UFRJ

Dedico este trabalho à minha tia Olindina: espero que a senhora nunca mais precise desse tipo de curativo e que esse trabalho ajude a diminuir o sofrimento de outras pessoas; à minha vovó Áurea (*in memoriam*) e minha tia Cecília (*in memoriam*): obrigada pelo exemplo e incentivo que sempre me deram. Espero que estejam orgulhosas, de onde estiverem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, pelas oportunidades para chegar até aqui e pelas pessoas que colocou no meu caminho e que tanto me ajudaram.

Agradeço aos meus pais, Ledenir e Solange, por todo o esforço e todas as renúncias que fizeram para que eu pudesse estar aqui. Eu me orgulho muito de vocês e devo tudo o que já conquistei a vocês. Muito obrigada!

Agradeço ao meu irmão, Marcelo, por ser o meu exemplo. Obrigada também por, apesar das saudades, incentivar que eu continue longe e estudando. Seu incentivo é essencial.

Agradeço à minha irmã, Mariana, por sempre acreditar em mim, por me incentivar e não me deixar desistir. Espero que você tenha por mim uma fração do orgulho que eu tenho de você.

Agradeço à minha sobrinha e afilhada, Laura, por todos os sorrisos e abraços. Você é minha razão pra não desistir e tentar fazer do mundo um lugar um pouquinho melhor.

Agradeço à professora Renata pela orientação, pela oportunidade de aprender um assunto novo e por todo o incentivo e confiança.

Agradeço ao professor Garrett pela co-orientação e toda a ajuda para desenvolver este trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório pela companhia e por tudo o que me ensinaram.

Agradeço à professora Rosane Castro pela doação do alginato e da própolis utilizados neste trabalho.

Agradeço aos professores Mario Geraldo e Paulo Jansen pelas oportunidades na graduação e por despertar em mim o interesse pela pesquisa e docência.

Agradeço à Ana Paula, Antonieta, Beatriz, Edlene e Robson pela ajuda com a caracterização.

Agradeço à Eliana, Gabriel, Pedro, Talita e Vinícius pela companhia e ajuda durante as disciplinas do mestrado. Vocês tornaram meus dias de estudo (e de descanso) muito mais fáceis, leves e divertidos. Amo vocês.

Agradeço ao grupo de amigos mais especial que poderia existir, com seus novos e antigos integrantes, por serem minha segunda família.

Agradeço à Universidade Rural e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pela oportunidade e aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

RESUMO

CANDIDO, Juliana Dumard Carracena. **Síntese e caracterização de hidrogéis com micropartículas de alginato carregados com neomicina e própolis**. 2019. 92p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A diabetes é uma das doenças crônicas mais conhecidas, causadora de diversas complicações, incluindo a neuropatia, que está presente em cerca de metade dos pacientes diabéticos. A neuropatia diabética, por sua vez, afeta diversos nervos e pode levar ao desenvolvimento de úlceras, especialmente nos pés. O tratamento dessas úlceras é longo e doloroso, sendo necessário o uso de agentes antimicrobianos e curativos, que devem ser trocados frequentemente. Hidrogéis são alternativas aos curativos convencionais. Em especial, hidrogéis de alginato possuem diversas características necessárias a um curativo ideal, como sua habilidade de absorver fluidos, que pode contribuir para a diminuição da infecção bacteriana. Além disso, esses hidrogéis podem ser deixados em contato com as úlceras por um maior período de tempo, diminuindo a frequência de trocas e, consequentemente o sofrimento dos pacientes. Hidrogéis de alginato podem, ainda, ser carregados com fármacos para liberação controlada e para combate da infecção. O objetivo deste trabalho foi desenvolver hidrogéis de alginato com micropartículas, também de alginato, carregados com sulfato de neomicina ou própolis. Para isso, foi utilizado o método de *casting* para o preparo dos filmes e o método de extrusão para preparo das micropartículas. Nos dois métodos, foi utilizado cloreto de cálcio como agente reticulante. Ambos os filmes e micropartículas foram carregados com fármacos e diferentes quantidades de micropartículas (0, 25 e 50% em massa de polímero) foram adicionadas aos filmes, que foram posteriormente caracterizados. As partículas obtidas possuem diâmetro entre 13 e 1900 μm , tamanho ideal para a utilização em sistemas de liberação controlada e para carregar os filmes. Os filmes foram reticulados com Ca^{2+} e carregados com micropartículas, como observado nos resultados do MEV, DRX, TGA e FTIR. Além disso, a presença de neomicina ou própolis pôde ser observada nos espectros de FTIR das amostras. Todas as amostras apresentaram grau de intumescimento no equilíbrio superior a 100%, o que as torna boas candidatas para a fabricação de curativos absorventes. Todas as mostras são termicamente estáveis a temperatura corporal, característica apropriada para o uso como curativos. Entretanto, amostras carregadas com 50% de micropartículas possuem tensões de ruptura inferiores, que podem causar rupturas durante a aplicação ou retirada dos curativos. Todas as amostras agiram como barreira para penetração de microrganismos e podem contribuir para que não haja uma contaminação externa. Ambos os filmes carregados com neomicina ou própolis possuem propriedades que os tornam bons candidatos para o uso como curativos. Entretanto, o uso de antibióticos pode gerar reações indesejadas, que podem ser evitadas com o uso de produtos naturais, como a própolis, que possui propriedades anti-inflamatórias e bacteriostáticas. Foi realizada uma estimativa de parâmetros, que pôde prever o comportamento da fração gel e perda de massa das amostras frente a variações na quantidade de micropartículas, o que permitiu confirmar os resultados obtidos pela análise ANOVA para comparação das formulações produzidas.

Palavras-chave: alginato, própolis, neomicina, curativos.

ABSTRACT

CANDIDO, Juliana Dumard Carracena. **Synthesis and characterization of alginate hydrogels with alginate microparticles loaded with neomycin or propolis.** 2019. 92p. Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Diabetes is one of the most prevalent chronic diseases, which lead to some complications, e.g. neuropathy, which is present in half of the diabetic patients. Diabetic neuropathy affects several nerves and causes ulcers, especially foot ulcers. This ulcers' treatment is long and painful. It is required the use of antimicrobial agents and dressings, which may be changed frequently. Hydrogels are alternative materials to conventional dressings. In particular, alginate hydrogels have some characteristics of the ideal wound dressing, such as its ability to absorb fluids, that can contribute to decrease bacterial infection. Moreover, these hydrogels need less changings, reducing the patient's suffering. Alginate hydrogels can also act as drug delivery systems. The goal of this work was to develop alginate hydrogels with alginate microparticles, both loaded with neomycin sulphate or propolis. To do so, films were manufactured by the casting method and microparticles were prepared by the extrusion dripping method, using calcium chloride as the crosslinking agent. Both films and microparticles were loaded with drugs and different amounts of microparticles (0, 25 and 50% measured in alginate mass) were added to the films, which were then microstructural, mechanical, thermal and morphologically characterized, besides in-vitro analysis. The microparticles had diameters between 13 and 1900 μm , ideal size to drug delivery systems and to load the films. Films were crosslinked with Ca^{2+} and loaded with microparticles, as evaluated by in-vitro, SEM, XRD, TGA and FTIR analysis. Furthermore, the presence of neomycin or propolis in the films was observed at FTIR spectra. All samples presented equilibrium swelling degree of at least 100%, which makes them suitable candidates to be used as absorbent dressings. All samples are thermally stable at body temperature, important characteristic to be used as dressings. However, samples loaded with 50% of microparticles have inferior fracture strength values, which can cause ruptures while the dressing is applied or removed from the wound. All samples acted as barriers to microbial penetration and can prevent external contamination. Samples loaded with both neomycin or propolis present properties that allow them to be potential materials for wound dressings. Nevertheless, antibiotics can cause undesired reactions which can be avoided by the use of natural products, such as propolis that has anti-inflammatory and bacteriostatic properties. A parameter estimation was also made, where the behaviour of the gel fraction and weight loss of the samples was evaluated according to the quantity of microparticles and the type of drug loaded to the films. Moreover, the estimation also confirmed the ANOVA results, used to compare the properties of the formulations.

Keywords: alginate, propolis, neomycin, wound dressings.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diabetes melito tipo 1 e tipo 2.....	4
Tabela 2 - Resumo dos principais tipos de curativos.	14
Tabela 3 - Patógenos associados a diversos tipos de úlceras infectadas.	28
Tabela 4 - Planejamento experimental 2 ²	33
Tabela 5 - Variáveis padronizadas para a estimação de parâmetros.....	42
Tabela 6 - Diâmetros médios da distribuição de tamanho de partículas.	43
Tabela 7 - Espessuras das amostras.	55
Tabela 8 - Bandas (cm ⁻¹) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de alginato de sódio e FA0B.	59
Tabela 9 - Bandas (cm ⁻¹) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de sulfato de neomicina, FA0N, FA25N e FA50N.	61
Tabela 10 - Bandas (cm ⁻¹) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de própolis, FA0P, FA25P e FA50P (continua).	63
Tabela 11 - Temperaturas e perdas de massa referentes à degradação térmica das amostras.	73
Tabela 12 - Tensão na ruptura e módulo de Young para as amostras.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de curativos aplicáveis a cada tipo de ferida (MOURA <i>et al.</i> , 2013).	16
Figura 2 - Estrutura química do bloco G, bloco M e bloco alternado (TØNNESSEN; KARLSEN, 2002).	17
Figura 3 - Representação dos blocos do alginato e sua reação de reticulação (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).	18
Figura 4 - Representação da estrutura "egg-box" do alginato de cálcio (LEICK <i>et al.</i> , 2010).	19
Figura 5 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por liberação controlada (A) e por terapia convencional (B) (BIZERRA; SILVA, 2016).	22
Figura 6 - Diferentes categorias de micropartículas (CAMPOS <i>et al.</i> , 2013).	23
Figura 7 - Esquema de liberação da droga por uma membrana de hidrogel em um reservatório (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).	23
Figura 8 - Esquema de liberação da droga por uma matriz de hidrogel (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).	24
Figura 9 - Esquema de produção de micropartículas por extrusão (SACCHETIN, 2009).	25
Figura 10 - Representação esquemática do movimento do exsudato para interior do hidrogel e da droga para seu exterior durante a aplicação sobre uma úlcera (BOATENG; CATANZANO, 2015).	26
Figura 11 - Fluxograma de atividades realizadas.	31
Figura 12 - Correlação entre a quantidade de micropartículas e o tipo de fármaco.	32
Figura 13 - Representação esquemática da etapa de extrusão das micropartículas.	34
Figura 14 - Distribuição de tamanho das partículas.	43
Figura 15 - Tamanho e morfologia de partículas vistas por um microscópio on-line. ..	44
Figura 16 - Aspecto visual dos filmes: (a) Branco (FA0B), (b) FA0N, (c) FA25N1, (d) FA25N2, (e) FA25N3, (f) FA50N.	45
Figura 17 - Aspecto visual dos filmes: (a) branco, (b) FA0P, (c) FA25P1, (d) FA25P2, (e) FA25P3, (f) FA50P.	46
Figura 18 - Aspecto visual dos filmes: (a) FA0N, (b) FA25N, (c) FA50N, (d) FA0P, (e) FA25P, (f) FA50P.	47

Figura 19 - Micrografia da amostra FA0B: (a) imagem topográfica com ampliação de 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (b) 300x, (c) 1000x e (d) 2000x.....	48
Figura 20 - Micrografia da amostra FA0N: (a) imagem topográfica com ampliação de 500x; e imagens da fratura com ampliação de (b) 300x, (c) 1000x e (d) 2000x.....	49
Figura 21 - Micrografia da amostra FA0P: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 1000x e (d) 3000x.	50
Figura 22 - Micrografia das micropartículas com ampliação de (a) 100x, (b) 250x, (c) 500x e (d) 2000x.....	51
Figura 23 - Micrografia da amostra FA25N: (a) imagem topográfica com ampliação de 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (b) 1000x, (c) 2000x e (d) 3000x.....	52
Figura 24 - Micrografia da amostra FA50N: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 300x, (d) 1000x, (e) 5000x e (f) 5000x.	52
Figura 25 - Micrografia da amostra FA25P: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 1000x e (d) 3000x.....	53
Figura 26 - Micrografia da amostra FA50P: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 100x, (d) 1000x, (e) 3000x e (f) 5000x.	54
Figura 27 - Difratoograma das amostras e do pó de alginato de sódio.....	56
Figura 28 - Espetro de FTIR para o alginato de sódio e a amostra FA0B.....	57
Figura 29 - Espetro de FTIR para o sulfato de neomicina e para as amostras FA0N, FA25N e FA50N.	57
Figura 30 - Espetro de FTIR para a própolis e para as amostras FA0P, FA25P e FA50P.....	58
Figura 31 - Comparação entre os espectros de FTIR do alginato de sódio, do sulfato de neomicina e da amostra FA0N.	60
Figura 32 - Comparação entre os espectros de FTIR do alginato de sódio, da própolis e da amostra FA0P.	62
Figura 33 - Grau de intumescimento das amostras.....	64
Figura 34 - Grau de intumescimento das amostras carregadas com sulfato de neomicina.	66
Figura 35 - Grau de intumescimento das amostras carregadas com própolis.....	67
Figura 36 - Fração gel e perda de massa das amostras.	68
Figura 37 - Montagem do experimento de permeação microbiana.	70

Figura 38 - Resultados do crescimento microbiológico, após exposição de 28 dias, (a) das amostras e (b) do controle negativo.	71
Figura 39 - Resultados do crescimento microbiano da amostra controle positivo após exposição de (a) 7 dias, (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 28 dias.	71
Figura 40 - Curvas da análise termogravimétrica para as amostras FA0B, FA0N, FA25N, FA50N, FA0P, FA25P e FA50P.	72
Figura 41 - Curva de tensão versus deformação para as amostras FA0B, FA0N, FA25N e FA50N.	74
Figura 42 - Curva de tensão versus deformação para as amostras FA0B, FA0P, FA25P e FA50P.	75
Figura 43 - Resíduos entre os valores experimentais e preditos pela estimação de parâmetros.	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Diabetes	3
1.2 Neuropatia Diabética	5
1.3 Úlceras Diabéticas	8
1.4 Curativos	11
1.5 Hidrogéis de Alginato	16
1.5.1 Produção de filmes de alginato de cálcio	21
1.6 Carreadores de Fármaco	21
1.6.1 Produção de micropartículas de alginato	24
1.7 Fármacos Para o Tratamento de Úlcera Diabética	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1 Planejamento Experimental.....	32
2.2 Micropartículas.....	33
2.2.1 Preparo das micropartículas sem fármaco	33
2.2.2 Preparo das micropartículas contendo própolis	34
2.2.3 Preparo das micropartículas contendo neomicina	34
2.3 Filmes	35
2.3.1 Preparo dos filmes sem micropartículas e sem fármaco.....	35
2.3.2 Preparo dos filmes sem micropartículas e com fármaco	36
2.3.3 Preparo dos filmes com micropartículas.....	36
2.4 Caracterização	36
2.4.1 Distribuição de tamanho das micropartículas	37
2.4.2 Aspecto visual dos filmes	37
2.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
2.4.4 Espessura dos filmes	38

2.4.5	Difração de Raios X (DRX)	38
2.4.6	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)...	38
2.4.7	Grau de intumescimento, fração gel e perda de massa	39
2.4.8	Permeação microbiana	40
2.4.9	Análise Termogravimétrica (TGA)	40
2.4.10	Ensaio de Resistência à Tração (Tensão e deformação na ruptura)	40
2.4.11	Estimação de parâmetros	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1	Distribuição do tamanho de partículas	43
3.2	Aspecto visual dos filmes.....	45
3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
3.4	Espessura dos filmes	54
3.5	Difração de Raios X (DRX)	55
3.6	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	56
3.7	Grau de intumescimento, fração gel e perda de massa.....	64
3.8	Permeação microbiana.....	69
3.9	Análise Termogravimétrica (TGA)	72
3.10	Ensaio de Tração (Tensão e deformação na ruptura).....	74
3.11	Estimação de parâmetros.....	77
3.11.1	Grau de intumescimento no equilíbrio	77
3.11.2	Fração gel.....	78
3.11.3	Perda de massa.....	78
3.11.4	Tensão na ruptura	78
3.11.5	Módulo de Young	79
4	CONCLUSÕES	81
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

INTRODUÇÃO

A diabetes é uma das doenças crônicas mais prevalentes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016), o número de pessoas com diabetes foi quadruplicado desde 1980. Em 2014, eram estimados em 422 milhões o número de pessoas com a doença, o que corresponde a 8,5% da população mundial. Em 2012, 1,5 milhão de pessoas morreram devido a diabetes, e ocorreram outras 2,2 milhões de mortes devido às complicações da doença, como doenças cardiovasculares. Dentre estas mortes, 43% ocorreram antes dos 70 anos de idade. No Brasil, estima-se que existiam, em 2014, cerca de 11,9 milhões de pessoas com diabetes e que este número poderia alcançar 19,2 milhões em 2035 (OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

Dentre as complicações da diabetes, destacam-se as vasculares, que são causadoras de retinopatia, nefropatia, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e neuropatias (SACCO *et al.*, 2007). A neuropatia diabética é uma lesão de um grupo de nervos, causada pela diabetes. Alguns pacientes da doença não apresentam sintomas, enquanto outros podem apresentar dor, dormência ou perda de sensibilidade em suas mãos, braços, pés e pernas (NIDDK, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010). Cerca de metade dos pacientes diabéticos apresentam úlceras neuropáticas e aproximadamente 15% desenvolvem úlceras nos pés em alguma fase da doença. Essas úlceras são a causa mais comum de internação de pacientes diabéticos. Estima-se que apenas dois terços das úlceras dos pés em pacientes diabéticos cicatrizarão completamente e que até 28% delas resultarão em amputação. Além disso, há uma grande probabilidade de ocorrer uma segunda amputação nos 5 anos seguintes à primeira cirurgia. Portanto, a neuropatia diabética é uma das mais impactantes complicações da diabetes, e pode diminuir drasticamente a qualidade de vida dos pacientes com a doença (CASTRO; KNACKFUSS, 2006; OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

As úlceras diabéticas são classificadas como feridas crônicas e são colonizadas por diversos microrganismos, especialmente *Staphylococcus aureus* (CAVANAGH *et al.*, 2005; LIPSKY *et al.*, 2006; PAPANAS; MALTEZOS, 2007; FONDER *et al.*, 2008). O tratamento dessas úlceras requer o controle da infecção, que é realizado por meio do uso de antibióticos e agentes antimicrobianos, além do uso de curativos. Para facilitar o controle e a aplicação dessas drogas, curativos podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada. A aplicação local de antibióticos em pacientes com úlceras neuropáticas é preferível por causa do risco de ineficiência que a aplicação oral apresenta, causado por problemas de circulação

que são frequentes nesses pacientes. Outra vantagem do uso de curativos como sistemas de liberação controlada é que esse tipo de curativo necessita de trocas menos frequentes, quando comparados aos curativos geralmente utilizados, como gazes (BOATENG et al., 2008; LABOVITIADI; LAMB; MATTHEWS, 2012; ALAVI et al., 2014b; POWERS et al., 2016).

Hidrogéis são um dos tipos de curativos mais utilizados para o tratamento de úlceras diabéticas e para liberação controlada de fármacos. Eles são redes tridimensionais capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Possuem uma grande porosidade, que pode ser ajustada de acordo com a densidade de reticulações do polímero e, por isso, podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015). Em especial, hidrogéis de alginato possuem uma grande capacidade de absorção de fluidos, o que diminui as chances de infecções bacterianas, tornando-os excelentes candidatos para a fabricação de curativos utilizados como sistemas de liberação controlada (BOATENG; CATANZANO, 2015).

O alginato é um polímero aniônico natural, obtido, principalmente, a partir de algas marinhas marrons. É conhecido como uma família de polímeros colineares contendo duas unidades monoméricas em sua estrutura: β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G) (TØNNESEN; KARLSEN, 2002). Geralmente é empregado na forma de hidrogéis e vem sendo amplamente utilizado na biomedicina na forma de curativos, sistemas de liberação controlada e na engenharia de tecidos (LEE; MOONEY, 2012). Uma importante característica de hidrogéis de alginato é a formação de uma estrutura tridimensional chamada “*egg-box*”, que é capaz de aprisionar pequenas moléculas, incluindo fármacos (FANG et al., 2007; LEICK et al., 2010).

O objetivo desse trabalho é preparar e caracterizar filmes de alginato contendo micropartículas, também de alginato, ambos carregados com fármaco, para aplicação no tratamento de úlceras diabéticas. Os fármacos utilizados foram o sulfato de neomicina, um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de úlceras crônicas e a própolis verde, um produto natural conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e bacteriostáticas. Os filmes produzidos foram caracterizados utilizando métodos de análise microestrutural, mecânica, térmica e antimicrobiana.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Diabetes

A diabetes mellitus é definida como o grupo de doenças metabólicas caracterizadas por níveis elevados de glicemia associados a uma secreção pancreática de insulina inadequada ou ausente, com ou sem comprometimento da ação da insulina no organismo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Certos pacientes diabéticos possuem sede insaciável e micção excessiva. Por isto, esta doença foi chamada de *diabetes*, que, em grego, significa “sifão” ou “que passa através de”. Além disto, o termo *mellitus*, que, em latim, significa “melado”, “doce”, foi adicionado a nomenclatura, após ser observado que a urina produzida por estes pacientes contém açúcar (SHU; MYERS JR; SHOELSON, 2009).

No organismo saudável, a captação, o armazenamento e a liberação de nutrientes na corrente sanguínea são controlados, principalmente, pelos hormônios insulina e glucagon. A insulina promove a captação e o armazenamento da glicose e outras pequenas moléculas que contém energia. Os hormônios contra-reguladores, como o glucagon, antagonizam a ação da insulina e promovem a liberação de nutrientes. Para verificar o equilíbrio entre estes hormônios reguladores, é possível medir o nível de glicemia. Em um organismo saudável, os níveis de glicose se encontram entre 70 e 120 mg/dL. Quando o nível de glicose se encontra abaixo desta faixa, caracteriza-se a hipoglicemia, que é perigosa, pois os órgãos do corpo necessitam de um suprimento constante de glicose para seu funcionamento. Por outro lado, quando o nível de glicose se encontra acima desta faixa, caracteriza-se a hiperglicemia, que é tóxica para numerosas células e tecidos (SHU; MYERS JR; SHOELSON, 2009).

A diabetes mellitus resulta de um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia. As duas principais formas da doença (tipos 1 e 2) e suas características são mostradas na Tabela 1. Na diabetes tipo 1 há uma ausência absoluta de insulina, e no tipo 2 há uma insuficiência relativa de produção de insulina, na presença de resistência à insulina. Em ambos os casos, a origem da diabetes é genética. Há, ainda, a diabetes do tipo 3 e a diabetes do tipo 4, ou diabetes gestacional (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; OLIVEIRA, 2006).

Tabela 1 - Diabetes melito tipo 1 e tipo 2.

	Tipo 1	Tipo 2
Etiologia	Destruição auto-imune das células β do pâncreas	Resistência à insulina, com função inadequada das células β para compensação
Níveis de insulina	Ausentes ou insignificantes	Tipicamente mais altos do que o normal
Ação da insulina	Ausente ou insignificante	Diminuída
Resistência à insulina	Não como parte da síndrome, embora possa estar presente (por exemplo, em pacientes obesos)	Sim
Idade de início	Tipicamente < 30 anos de idade	Tipicamente > 40 anos de idade
Complicações agudas	Cetoacidose Consumção	Hiperglicemia (podendo resultar em convulsões e coma hiperosmóticos)
Complicações crônicas	Neuropatia	Neuropatia
	Retinopatia	Retinopatia
	Nefropatia	Nefropatia
	Doença vascular periférica	Doença vascular periférica
Intervenções farmacológicas	Insulina	Coronariopatia
		Dispõe-se de várias classes de fármacos, incluindo insulina se outras formas de terapia não tiverem sucesso

Fonte: Adaptado de SHU; MYERS JR; SHOELSON, 2009.

A diabetes mellitus leva a diversas complicações crônicas que podem aumentar a morbidade e morbimortalidade dos pacientes. A complicação mais frequente é o prejuízo do sistema nervoso periférico e autônomo. As complicações a longo prazo da diabetes tipo 1 e tipo 2 incluem patologias vasculares. Dentre estas complicações crônicas se encontram a aterosclerose prematura, a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia. Os mecanismos que originam estas complicações podem resultar de uma combinação de hiperglicemia,

hiperlipidemia e aumento da sinalização inflamatória no decorrer dos anos. Para a prevenção e diminuição da ocorrência destas complicações, é necessário manter controlados os níveis de glicose, através de uma terapia intensiva (SACCO *et al.*, 2007; CORRALES; MENESES, 2012).

1.2 Neuropatia Diabética

A neuropatia diabética é definida como uma lesão do nervo periférico, somático ou autônomo causada pela diabetes (CARVALHO *et al.*, 2010). Alguns pacientes não apresentam sintomas da patologia, enquanto outros podem apresentar diversos sintomas, como dor, formigamentos e perda de sensibilidade nas mãos, braços, pés e pernas. Além disto, os danos nos nervos podem ocorrer em qualquer sistema ou órgão do corpo, incluindo o sistema digestivo, o coração e órgãos sexuais (NIDDK, 2009).

A prevalência da neuropatia diabética pode ser estimada entre 5% e 100% dos pacientes diabéticos. Essa discrepância dos resultados acontece, provavelmente, devido à pequena amostra de pacientes utilizada e aos diferentes critérios e métodos utilizados para diagnosticar a patologia (DIAS; CARNEIRO, 2000). Geralmente, metade dos pacientes diabéticos possuem lesões neuropáticas. Este valor pode aumentar para até 100%, quando utilizados métodos de diagnóstico de maior sensibilidade, como os eletrofisiológicos (OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

A prevalência da neuropatia diabética aumenta com a evolução da diabetes. Pode-se detectar distúrbios neurológicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 desde o diagnóstico da doença, enquanto que em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 os sintomas normalmente surgem após cinco anos do diagnóstico da doença. As maiores taxas de ocorrência de neuropatia são entre pacientes que possuem diabetes por pelo menos 25 anos. A incidência de neuropatia é significativamente maior após 20 anos de evolução da diabetes, se comparado com pacientes diagnosticados por 10 anos ou menos. Além disto, menos da metade dos casos de neuropatia são sintomáticos, o que dificulta seu diagnóstico (DIAS; CARNEIRO, 2000; NIDDK, 2009; OLIVEIRA; VENCIO, 2016). Os pacientes diabéticos que possuem maior risco de apresentar neuropatias incluem aqueles que têm dificuldades em controlar seus níveis de glicose, possuem colesterol alto, pressão alta e sobrepeso (NIDDK, 2009).

Existem alguns fatores que podem causar a neuropatia diabética. Estes fatores não são conhecidos com exatidão, porém existem algumas teorias a este respeito. De acordo com elas,

as causas da neuropatia diabética podem ser metabólicas, vasculares, autoimunes e outras. Os fatores metabólicos estão relacionados com altos níveis de glicose no sangue, longo tempo de duração da diabetes, colesterol alto e baixos níveis de insulina. Estes fatores alteram o funcionamento de vias metabólicas, como o metabolismo do poliol e o metabolismo do mioinositol, desencadeando o processo neuropático. No caso dos fatores vasculares, há o comprometimento da microcirculação, o que diminui o fluxo sanguíneo nos vasos, aumentando a resistência vascular e redução da tensão de oxigênio a nível endoneural. Isto é, há uma deficiência de oxigênio e nutrientes que chegam aos nervos, causando danos nervosos. Fatores autoimunes causam inflamações nos nervos, gerando a neuropatia. A neuropatia pode ser causada, ainda, devido ao fato de que, em pacientes diabéticos, os mecanismos de reparação e manutenção das fibras nervosas se encontram alteradas. Outra possível causa é a lesão mecânica dos nervos, causada pela síndrome do túnel do carpo, por exemplo. Além disto, o uso de cigarro e álcool também pode contribuir para o aparecimento dos danos nervosos (DIAS; CARNEIRO, 2000; NASCIMENTO, 2006; CORRALES; MENESES, 2012).

O funcionamento anormal dos nervos, causado pela neuropatia, causa uma variedade de sintomas, que são diferentes de acordo com o tipo de nervo afetado. Alguns pacientes podem apresentar vários destes sintomas, enquanto outros podem ser assintomáticos. Os primeiros sintomas são, geralmente, dormência, formigamento ou dor nas pernas, pés, braços, mãos e dedos. Como os danos nos nervos ocorrem ao longo de vários anos, os sintomas podem não ser observados nos primeiros momentos. Além dos sintomas iniciais, outros sintomas de danos nervosos são: enfraquecimento dos músculos dos pés ou mãos; indigestão, náusea ou vômito; diarreia ou constipação; queda de pressão após levantar-se ou sentar-se, que causa tonturas ou desmaios; problemas urinários; disfunção sexual; e fraqueza (NIDDK, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

O diagnóstico da neuropatia diabética deve ser realizado por meio de uma avaliação clínica cuidadosa, pois a ausência de sintomas não pode ser definida como ausência de neuropatia (BOULTON; PEDROSA, 2013). A avaliação necessária para este diagnóstico se baseia na caracterização do quadro clínico, de acordo com os sinais clínicos típicos e na realização de testes neurológicos. Nos testes neurológicos básicos, são aferidas a pressão e a frequência cardíaca, a força muscular, reflexos tendinosos e sensibilidade a mudanças de posição, vibração, temperatura ou luz. Outros testes também podem ser necessários para o complemento do diagnóstico, como a eletroneuromiografia, que mostra como os músculos

respondem a sinais elétricos transmitidos perto dos nervos, ou estudos de condução nervosa, que avaliam a transmissão de corrente elétrica por um nervo. Estes testes ajudam a determinar o tipo e a extensão do dano nervoso. Além deste, outros testes podem ser utilizados, como testes da regulação autonômica cardiovascular, cintilografias ou tomografia (NIDDK, 2009; OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

Outro teste importante a ser realizado é o exame dos pés. Este exame inclui a avaliação da pele, músculos, ossos, circulação e sensibilidade dos pés. O exame dos pés deve ser realizado anualmente em pacientes diabéticos para verificar se há sinais de neuropatia periférica (NIDDK, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010).

O tratamento e fator preventivo principal da neuropatia diabética consiste no controle dos níveis glicêmicos. Além disto, é extremamente recomendado uma mudança no estilo de vida, pois hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade constituem fatores de risco cardiovascular. É recomendada a cessação do tabagismo e da ingestão de bebidas alcólicas, bem como a prática de atividades físicas (BOULTON; PEDROSA, 2013).

Tratamentos adicionais devem ser realizados de acordo com o tipo de nervo afetado e com os sintomas exibidos pelo paciente. Para o alívio de dores, podem ser utilizados medicamentos, como antidepressivos e anticonvulsionantes, acupuntura e cremes tópicos, como capsaicina e lidocaína. Além das dores, outros sintomas apresentados devem ser tratados individualmente, por meio de terapia medicamentosa, fisioterapia, entre outros. Há, ainda, medicamentos que tratam a patogenia da neuropatia diabética, como antioxidantes (BOULTON; PEDROSA, 2013; OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

A classificação da neuropatia diabética pode se dar de acordo com o tipo de nervo atingido, e cada tipo afeta diferentes partes do corpo. Pode ser: periférica, autonômica, proximal ou focal. O tipo mais comum de neuropatia diabética, a periférica, atinge cerca de dois terços dos pacientes com diabetes (NASCIMENTO, 2006). A neuropatia periférica é classificada em diferentes tipos. Dentre eles, o mais comum é a polineuropatia simétrica distal, que também é chamada de polineuropatia sensitivo-motora, ou apenas polineuropatia diabética periférica. Esse tipo de neuropatia normalmente tem início lento, onde os sintomas incluem dormência, formigamento ou queimação nos tornozelos. Posteriormente, são afetados os pés e as pernas e, mais tarde, as mãos (sensação de luvas e botas). Além disso, pode haver, ainda, perda da sensibilidade na linha média abdominal, geralmente nos casos mais graves. Esse tipo de neuropatia pode ser estabilizado e pode até ser percebida uma melhora do

quadro, com o controle rigoroso da glicemia (DIAS; CARNEIRO, 2000; TESFAYE *et al.*, 2010).

A perda da sensibilidade nos pés, decorrente desse tipo de neuropatia, torna o diabético mais vulnerável ao trauma físico e térmico e pode resultar em ressecamento, fissuras na pele e úlceras penetrantes, dolorosas ou indolores (CARVALHO *et al.*, 2010). Pode haver, também, a atrofia da musculatura do pé, levando a um desbalanceamento entre a musculatura flexora e extensora, gerando um aumento na pressão sobre as cabeças dos metatarsos. Há, ainda, a possibilidade de sobrecargas articulares, gerando deformidades, luxações e subluxações (artropatia de Charcot) (REBOLLEDO, 2005; CORRALES; MENESES, 2012). Isso pode levar a condição conhecida como “pé diabético”, que envolve a infecção, destruição de tecidos, ulceração, deformidades e possíveis amputações parciais ou totais do membro envolvido (REIBER *et al.*, 1999).

1.3 Úlceras Diabéticas

O pé diabético é uma das complicações mais frequentes da diabetes e pode ser definido como “infecção, ulceração e/ou destruição de tecidos moles associados a alterações neurológicas e vários graus de doença arterial periférica nos membros inferiores” (LIPSKY *et al.*, 2015).

Assim como na prevenção de outras complicações da diabetes mellitus, é extremamente necessário que se faça um controle rígido dos níveis de glicose. Além disso, a cessação do tabagismo e a prática regular de atividades físicas, como caminhadas, que promovem uma melhor circulação periférica, também são medidas de prevenção importante. Programas educacionais, que incluem o exame regular dos pés, classificação de risco e educação terapêutica, podem reduzir a ocorrência de lesões em até 50% (GROSSI, 1998; SINGH; ARMSTRONG; LIPSKY, 2005; CUBAS *et al.*, 2013).

Os pacientes diabéticos devem ter vários cuidados diários com os pés. Estes cuidados incluem: examinar os pés, inclusive entre os dedos, observando se há calosidades, calos, bolhas, fissuras, pontos de pressão ou trauma, encravamento das unhas, cor diferenciada da pele e qualquer outra anormalidade; lavar os pés com água morna corrente e sabonete neutro; secar cuidadosamente os pés com tecido macio, especialmente entre os dedos; usar creme hidratante nas pernas e pés, mas nunca entre os dedos; não aplicar álcool ou outras substâncias que causam ressecamento da pele; cortar as unhas em linha reta, sem deixar pontas, e lixá-las, se necessário; nunca retirar as cutículas; utilizar meias de algodão sem

costura e sem elástico, de preferência de cores claras, que auxiliam na visualização de possíveis lesões; não andar descalço; utilizar calçados apropriados, que suportam e protegem os pés contra traumas mecânicos; não utilizar calçados que sejam apertados, de bico fino, e sandálias abertas de borracha ou plástico; verificar a parte interna dos calçados, para certificar-se de que não há nenhum objeto ou saliência que possa causar lesão; não utilizar compressas quentes (GROSSI, 1998; CUBAS *et al.*, 2013).

As úlceras diabéticas podem ser causadas por diferentes fatores, como a neuropatia, a doença vascular periférica, traumas e suscetibilidade a infecções. A neuropatia é o fator mais importante e causa perda de sensibilidade, o que aumenta o risco de traumas físicos ou térmicos, levando a ulceração. Além disso, pode ocorrer um aumento da pressão plantar, também diminuindo a sensibilidade e aumentando o risco de lesões. A úlcera, neste caso, é chamada de úlcera neuropática. A doença vascular periférica é cerca de duas vezes mais comum em pacientes diabéticos e atinge principalmente os vasos abaixo dos joelhos. O decréscimo de fornecimento de sangue aos tecidos, juntamente com a neuropatia, leva a mudanças atroficas da pele, deixando-a fina e com ausência de pelos. Essas características tornam o paciente predisposto às ulcerações, infecções e à formação de pequenas áreas de gangrena. Cerca de 80 a 90% das lesões dos pés em diabéticos possuem isquemia, causada pela doença vascular periférica. As úlceras causadas pela doença vascular periférica são chamadas de isquêmicas e as causadas pela doença vascular periférica concomitantemente a neuropatia são chamadas de neuroisquêmicas. Além disso, a hiperglicemia compromete a atuação leucocitária na destruição bacteriana. Desse modo, os pacientes diabéticos têm uma diminuição da resistência às infecções, agravando ainda mais as lesões na pele (GROSSI, 1998; SINGH; ARMSTRONG; LIPSKY, 2005; LIPSKY *et al.*, 2006; ALAVI *et al.*, 2014a; LIPSKY *et al.*, 2015).

Pacientes diabéticos podem desenvolver diversos tipos de úlceras, que podem estar infectadas ou não. Além disso, úlceras em estágio mais grave podem estar acompanhadas de osteomielite, que é um problema mais complexo e deve ser tratado separadamente. A cura de uma infecção contribui para o processo de cicatrização da úlcera, mas não é o único fator a ser considerado (LIPSKY *et al.*, 2006). A cicatrização de uma ferida não-diabética ocorre em quatro etapas: coagulação, inflamação, migração/proliferação e remodelamento. Entretanto, feridas diabéticas podem ser crônicas e sua cicatrização pode não respeitar essa ordem de acontecimentos. Algumas áreas de uma ferida crônica podem estar em fases diferentes do processo de cicatrização, fazendo com que a progressão a próxima fase não ocorra ao mesmo

tempo, prejudicando o processo de cicatrização. Além disso, a cicatrização de úlceras diabéticas pode ficar estacionada na etapa de inflamação. O processo de cicatrização de uma úlcera diabética pode ser prejudicado, também, por fatores intrínsecos, como a neuropatia e problemas vasculares, e por fatores extrínsecos, como a infecção, que pode aumentar rapidamente em feridas diabéticas, a formação de calosidades e pressão excessiva nos membros inferiores. Podem ocorrer, ainda, alterações moleculares e celulares no processo de cicatrização, que dificultam ainda mais a cura das úlceras diabéticas (FALANGA, 2005; LADEIRA *et al.*, 2011).

Ademais, é importante levar em conta que o processo de cicatrização em pacientes diabéticos é influenciado pelo tipo de medicação utilizada no controle da diabetes. Pacientes com diabetes do tipo 1 fazem uso de insulina, e pacientes com diabetes do tipo 2 fazem uso de medicamentos orais, como metformina, sulfoniluréias e outros. Estudos sugerem que estes medicamentos possuem propriedades anti-inflamatórias, que tem potencial para ajudar a diminuir a fase inflamatória e auxiliar no processo de cicatrização (SALAZAR; ENNIS; KOH, 2016).

Para realizar o tratamento das úlceras, é necessário primeiro classifica-las, para que possam ser tratadas de forma adequada. Existem vários tipos de classificações para úlceras diabéticas, porém nenhuma delas é unânime. As mais utilizadas são a de Wagner-Meggitt e a da Universidade do Texas. A classificação de Wagner-Meggitt classifica as úlceras em seis graus, de acordo com a profundidade da ulceração (graus 0 – 2), com a presença e localização de infecção e extensão da gangrena (graus 3 – 5). A Universidade do Texas classifica as úlceras em quatro graus (0 – III), de acordo com a profundidade da lesão e, após isso, classifica-as novamente de acordo com a presença ou ausência de infecção e isquemia (A, B, C e D). Esse sistema não leva em consideração o tamanho da ferida (CAVANAGH *et al.*, 2005; ALAVI *et al.*, 2014a). A classificação das úlceras é importante pois o tipo de lesão influencia diretamente no tratamento e chance de cura. Por exemplo, feridas na parte frontal do pé têm mais chances de cicatrizar do que feridas na parte proximal do pé. Úlceras localizadas no calcanhar estão associadas a uma maior chance de amputação e maior dificuldade de cura (ALAVI *et al.*, 2014a).

O tratamento das úlceras deve iniciar com o controle da diabetes. Os níveis de glicose devem estar controlados, pois altos níveis de glicose estão associados a uma menor resistência à infecção (ALAVI *et al.*, 2014b). Deve-se, também, avaliar a presença de neuropatia e de doença vascular periférica, e tratar essas doenças, a fim de melhorar a vascularização, a

oxigenação e a pressão plantar, o que pode requerer intervenção cirúrgica (FALANGA, 2005; DUARTE; GONÇALVES, 2011; OBOLENSKIY *et al.*, 2014).

O tratamento da infecção das úlceras deve ser feito por meio de antibióticos, indicados de acordo com a classificação da ferida. Em conjunto com a administração de antibióticos, deve ser feito o tratamento local da úlcera. A primeira etapa deste tratamento consiste no desbridamento dos tecidos necróticos e calosidades e a drenagem do pus. O desbridamento cirúrgico é realizado na maioria dos casos, mas os desbridamentos autolíticos, enzimáticos, mecânicos e biológicos também podem ser utilizados. A limpeza da ferida deve ser feita com agentes com baixa citotoxicidade, como água e solução salina (DUARTE; GONÇALVES, 2011; ALAVI *et al.*, 2014b).

O tratamento local das úlceras inclui, além do desbridamento e da limpeza, o uso de curativos. O objetivo dos curativos é promover uma barreira física de proteção à ferida e, também, criar um ambiente adequado para a cicatrização. Por exemplo, feridas que contém exsudato requerem o uso de curativos que possuam poder de absorção, como curativos de alginato de cálcio, hidrofibras e espumas. Por outro lado, feridas sem a presença de exsudato e que se encontram secas requerem o uso de curativos que mantêm a umidade, como hidrogéis, ou que impedem a saída de água, como curativos acrílicos, hidrocolóides e filmes. A escolha do curativo depende do tipo de ferida e do estágio de cicatrização em que a mesma se encontra, da presença ou não de exsudato, dor, odor e infecção. Os curativos devem ser trocados periodicamente, para que o curativo esteja sempre limpo e para que o progresso da cicatrização possa seja acompanhado cuidadosamente (ALAVI *et al.*, 2014b; OBOLENSKIY *et al.*, 2014; LIPSKY *et al.*, 2015).

Outros tipos de tratamento podem ser realizados. Terapias avançadas incluem fatores de crescimento, terapia por pressão negativa, oxigenoterapia hiperbárica, terapia de desbridamento com larvas (terapia Maggot) e peles artificiais (LIPSKY *et al.*, 2006; LIPSKY *et al.*, 2015).

1.4 Curativos

Desde a antiguidade já se sabe que as feridas precisam de um ambiente adequado para a cicatrização. O documento egípcio Ebers Papyrus (1.550 a.C) descreve uma “receita” para o tratamento de feridas, que consistia na aplicação de curativos feitos com fibras vegetais, que promoviam absorção de fluidos, gordura animal, que protegia a ferida contra contaminação externa, e mel, que provavelmente era usado por suas propriedades antibacterianas. Na

Grécia, Galen de Pergamum (120 – 201 d.C.) observou empiricamente que feridas cicatrizavam mais rapidamente em um ambiente úmido (OVINGTON, 2002; MOUËS *et al.*, 2009).

No século XIX houve uma evolução do tratamento de feridas, com a descoberta dos antibióticos por Louis Pasteur (1822 – 1895). Com base nos estudos de Pasteur, o cirurgião inglês Joseph Lister (1827 – 1912) começou a mergulhar seus instrumentos cirúrgicos e bandagens em fenol. Com isso, a mortalidade nos hospitais onde trabalhava diminuíram de 50% para apenas 15%. Em 1876, Lister abordou, em uma conferência médica, a importância de se usar curativos antissépticos no tratamento de feridas. Com isso, 10 anos mais tarde, começaram a surgir, nos Estados Unidos, tratamentos de feridas utilizando gaze de algodão impregnada com uma solução de iodo ou outros agentes antissépticos, como metais e antibióticos (OVINGTON, 2002).

No início do século XX, pesquisadores “redescobriram” o fato observado por Galen séculos antes, de que as feridas cicatrizam mais rápido em ambientes úmidos. Em 1948, Oscar Gilje percebeu que feridas tratadas com adesivos que promoviam a oclusão exibiam taxas de cicatrização muito mais altas do que feridas não oclusas. Entretanto, os adesivos utilizados não possuíam poder de absorção, o que não os tornavam curativos práticos. Esse problema foi resolvido após a década de 1950, quando as indústrias têxteis começaram a produzir fibras sintéticas a partir de polímeros, como nylon, polietileno, polipropileno, poliésteres, polivinil, acrílicos e olefinas, que possuem maior poder de absorção. Na década de 1960, George Winter pôde demonstrar que feridas agudas cobertas com curativos oclusivos que retiam umidade cicatrizavam duas vezes mais rápido do que feridas expostas ao ar (OVINGTON, 2002; FONDER *et al.*, 2008).

A partir das décadas de 1970 e 1980 foram desenvolvidos curativos poliméricos que são utilizados até os dias de hoje. Curativos feitos a partir desses materiais podem ser fabricados de modo a apresentar as características necessárias a cada etapa da cicatrização (OVINGTON, 2002).

O curativo ideal deve mimetizar as propriedades da pele, favorecendo ao máximo a cicatrização. Para isso, é importante que os curativos apresentem certas características: mantenham ambiente com umidade; removam o excesso de exsudato; permitam isolamento térmico; permitam a troca gasosa; se adaptem à superfície da ferida; facilitem o desbridamento, quando necessário; minimizem a formação de cicatrizes; protejam a ferida da

entrada de bactérias; sejam atóxicos e biocompatíveis; e sejam não aderentes à pele adjacente à ferida (MOURA *et al.*, 2013; VOWDEN; VOWDEN, 2017).

Um ambiente com umidade ajuda a reduzir o risco de formação de cicatriz, facilita a epitelização e a migração celular para a ferida. Além disso, muitos pacientes têm diminuição da dor local quando são utilizados curativos que promovem um ambiente úmido. Entretanto, um ambiente excessivamente úmido pode causar a maceração da pele neoformada ao redor da ferida. Esse tecido se torna mole, branco e frágil, com uma tendência a se desmembrar, o que pode aumentar o tempo de cicatrização ou até mesmo fazer com que haja maior deterioração da ferida. Portanto, um curativo ideal deve manter a umidade, porém deve também absorver o excesso de exsudato, promovendo um ambiente ideal para a cicatrização (FONDER *et al.*, 2008; KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

É necessário que o curativo ideal possua estabilidade mecânica frente à pressão e tensão, para que durante a sua aplicação, uso e remoção, aja como uma barreira contra a entrada de microrganismos ou corpos estranhos e seja removido sem danificar ainda mais o tecido. É importante, também, que o curativo possua características elásticas, para que se adapte à superfície da ferida e seja flexível, permitindo a movimentação do paciente. Além disso, curativos devem ter pouca aderência a superfície da ferida e suas adjacências, para que haja a proteção de tecidos novos durante as suas repetidas trocas (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

Devido às diferentes características e necessidades de cada estágio de cicatrização e tipo de ferida, não existe um único tipo de curativo que possa ser aplicado em todas as situações. Uma solução para esse problema foi o desenvolvimento de diferentes tipos de curativos, feitos de diferentes materiais, para que suas características químicas e físicas sejam otimizadas a fim de serem aplicados em tipos particulares de feridas (MOURA *et al.*, 2013).

Atualmente, os tipos de curativos mais utilizados em feridas diabéticas são: gases, hidrocolóides, hidrogéis, espumas, filmes e alginatos (FONDER *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2013). A Tabela 2 mostra um resumo desses tipos de curativos, com suas vantagens, desvantagens e indicações.

Tabela 2 - Resumo dos principais tipos de curativos.

Curativo	Vantagens	Desvantagens	Indicações	Observações
Gazes	Baixo custo Acessível	Causa ressecamento Baixa barreira	Feridas profundas	Troca a cada 12-24 horas
Hidrocolóides	Longo tempo de uso Absorvente Oclusivo Protege a ferida contra contaminação	Opaco Armazena fluido Causa descascamento da pele Causa mal odor	Feridas com pouco ou moderado exsudato	Pode ser deixado sobre a ferida por até 7 dias ou até que ocorra vazamento de fluido
Hidrogéis	Retêm umidade Fácil remoção Alivia a dor	Pode causar super-hidratação	Feridas secas Feridas dolorosas	Troca a cada 1-3 dias
Espumas	Absorvente Oclusivo Isolante térmico	Opaco Causa mal odor	Feridas com pouco ou moderado exsudato	Troca a cada 3 dias
Filmes	Retêm umidade Transparente Semi-oclusivo Protege a ferida contra contaminação	Não absorvente Armazena fluido Causa descascamento da pele	Feridas com pouco exsudato Curativo secundário	Pode ser deixado sobre a ferida por até 7 dias ou até que ocorra vazamento de fluido
Alginatos	Super absorvente Hemostático	Prejudicial a pele ao redor da ferida	Feridas com moderado ou muito exsudato Hemostasia leve	Pode ser deixado sobre a ferida até a saturação com exsudato

Fonte: FONDER *et al.*, 2008.

As gazes são, historicamente, o tipo de curativo mais utilizado. Promovem barreira contra entrada de bactérias e possuem capacidade de absorção, porém causam ressecamento da ferida, o que pode ser prejudicial à cicatrização. Os hidrocolóides são curativos que

absorvem umidade e normalmente compreendem um material suporte, como filmes semi-permeáveis ou espumas, e uma camada com partículas hidrofílicas/hidrocoloidais que contém géis biocompatíveis feitos de proteínas ou polissacarídeos. Quando entra em contato com o exsudato, esse tipo de curativo absorve os fluidos da ferida, criando um ambiente úmido propício à cicatrização. Os hidrogéis são sistemas geralmente utilizados para manter um ambiente com alta umidade e são compostos de um ou de mistura de polímeros hidratados, na forma de gel. Esses polímeros apresentam reticulações iônicas ou covalentes, que determinam a sua capacidade de intumescer e suas propriedades conformacionais. Esses curativos podem ser aplicados e removidos da ferida sem causar grande interferência no processo de cicatrização ao redor da ferida. São flexíveis, permeáveis a água, oxigênio e metabólitos. Além disso, muitos pacientes apresentam diminuição da dor local ao utilizar hidrogéis, devido à diminuição de temperatura local. As espumas são alternativa aos hidrocolóides, para aplicação em feridas com fluxo de exsudato alto ou moderado. Esses curativos são altamente absorventes, e sua capacidade de absorção depende, geralmente, do material polimérico e da espessura da espuma. Além disso, são confortáveis e protegem a superfície da ferida. Os filmes geralmente são transparentes, o que facilita a visualização da ferida, são duráveis, confortáveis, de fácil manipulação, adesivos, semi-permeáveis ao vapor de água e ao oxigênio e impermeáveis a líquidos e a contaminação bacteriana. Esses curativos podem ser utilizados apenas em feridas com pouco exsudato ou como uma barreira complementar, utilizada juntamente a outro tipo de curativo. Os alginatos são curativos altamente absorventes, que podem absorver até 20 vezes o seu peso em fluido. Por isso, são utilizados em feridas com altos ou moderados níveis de exsudato. Quando em contato com o exsudato, formam um gel, que mantém um ambiente úmido favorável a cicatrização (BOATENG *et al.*, 2008; FONDER *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2013; VOWDEN; VOWDEN, 2017).

A Figura 1 resume em que etapas de cicatrização das feridas cada tipo de curativo pode ser aplicado. Durante as diferentes fases de cicatrização, são observadas diferentes características das feridas, que podem apresentar tecidos viáveis e inviáveis. Os tecidos inviáveis são tecidos desvitalizados, prejudiciais para o desenvolvimento da ferida. Esse tipo de tecido inclui a necrose, que é um tecido morto, e a escara, que é um tecido seco, de coloração preta ou marrom, aderido ao leito da ferida. Durante a evolução da cicatrização, a ferida pode apresentar exsudato, que é um líquido rico em proteínas e células, o que requer o uso de curativos absorventes. As modificações que ocorrem no leito da ferida durante o processo de cicatrização contribuem para que haja o desenvolvimento de tecidos viáveis: o

tecido de granulação, que é um tecido úmido e rosado, composto por novos vasos sanguíneos; tecido conjuntivo, composto de fibroblastos e células inflamatórias; e o tecido epitelial, que compreende a epiderme regenerada sobre a superfície da ferida (NIX, 2012).

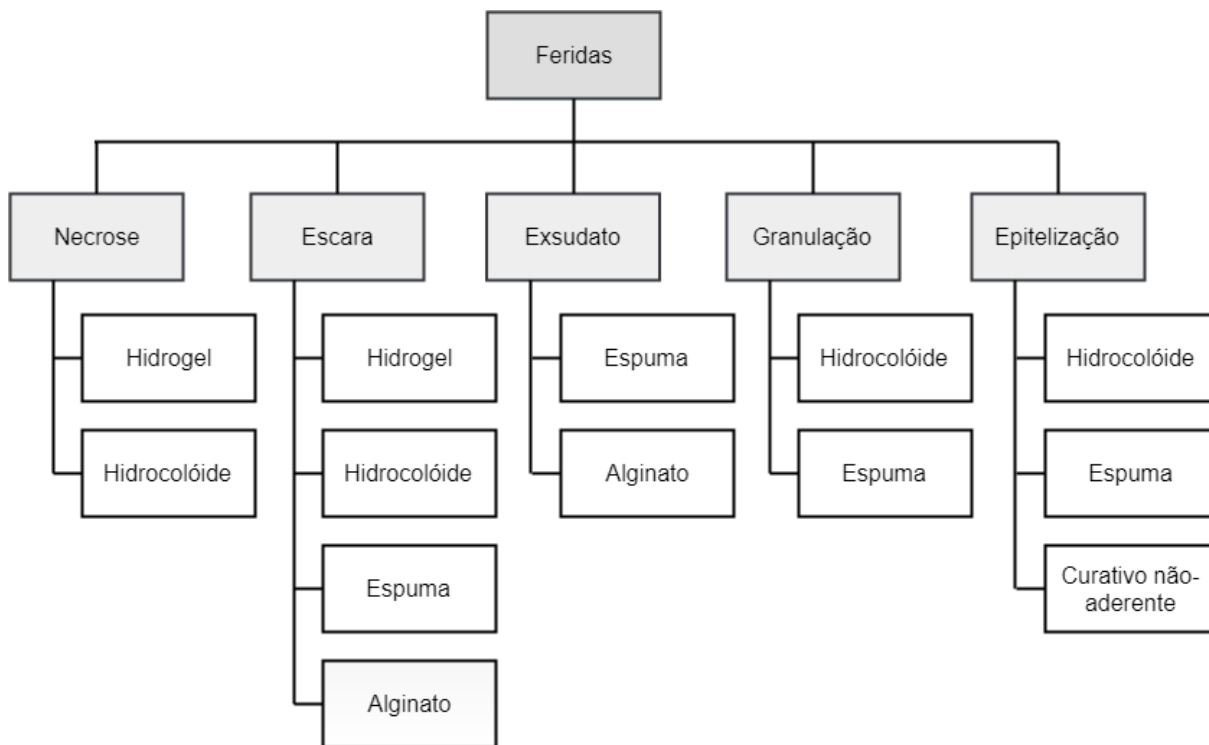


Figura 1 - Tipos de curativos aplicáveis a cada tipo de ferida (MOURA *et al.*, 2013).

1.5 Hidrogéis de Alginato

Alginato é um polímero aniônico natural, que pode ser obtido a partir de algas marinhas ou de bactérias. Geralmente, o alginato comercial é extraído de algas castanhas, *Phaeophyceae*, incluindo: *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, através de tratamento com soluções básicas diluídas, como NaOH, que solubilizam o ácido algínico presente nas algas. Para obtenção do ácido algínico livre, a solução obtida é tratada com ácidos minerais, como HCl. Após isso, o ácido algínico pode ser convertido ao seu sal de sódio, que é a sua forma mais utilizada (TØNNESSEN; KARLSEN, 2002). Entretanto, o alginato produzido desta forma pode ter uma grande variabilidade de sua composição, por conta de mudanças climáticas e ambientais (REMMINGHORST; REHM, 2006).

A obtenção do alginato por meio de biossíntese bacteriana é capaz de gerar um produto com estruturas químicas e propriedades físicas mais bem definidas do que por meio de algas. O alginato bacteriano é produzido a partir das bactérias *Azotobacter* e *Pseudomonas*.

Sua biossíntese geralmente ocorre nas seguintes etapas: síntese do substrato precursor; polimerização e transferência da membrana plasmática; transferência periplásmica e modificação; exportação para fora da membrana (REMMINGHORST; REHM, 2006; LEE; MOONEY, 2012).

O alginato é conhecido como uma família de copolímeros lineares contendo β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G). Sua estrutura pode ser de blocos consecutivos de β -D-manuronato (MMMMM), blocos consecutivos de α -L-guluronato (GGGGG) ou blocos alternados de β -D-manuronato e α -L-guluronato (MGMGM), como mostra a Figura 2. Ao ser extraído de diferentes fontes, o alginato pode ter diferentes quantidades de blocos M e G e diferentes tamanhos de cada bloco, dando origem a mais de 200 tipos de estruturas, que já são produzidas industrialmente. Suas propriedades, como transmitância, intumescimento e viscoelasticidade são afetadas pela razão M/G e pela sua massa molar. Quanto maior a quantidade de blocos M presentes em sua estrutura, mais elástico é o polímero. Por outro lado, quanto maior a quantidade de blocos G, maior a rigidez do material e as chances de o mesmo ser quebradiço (TØNNESEN; KARLSEN, 2002; LEE; MOONEY, 2012; SILVA, 2014).

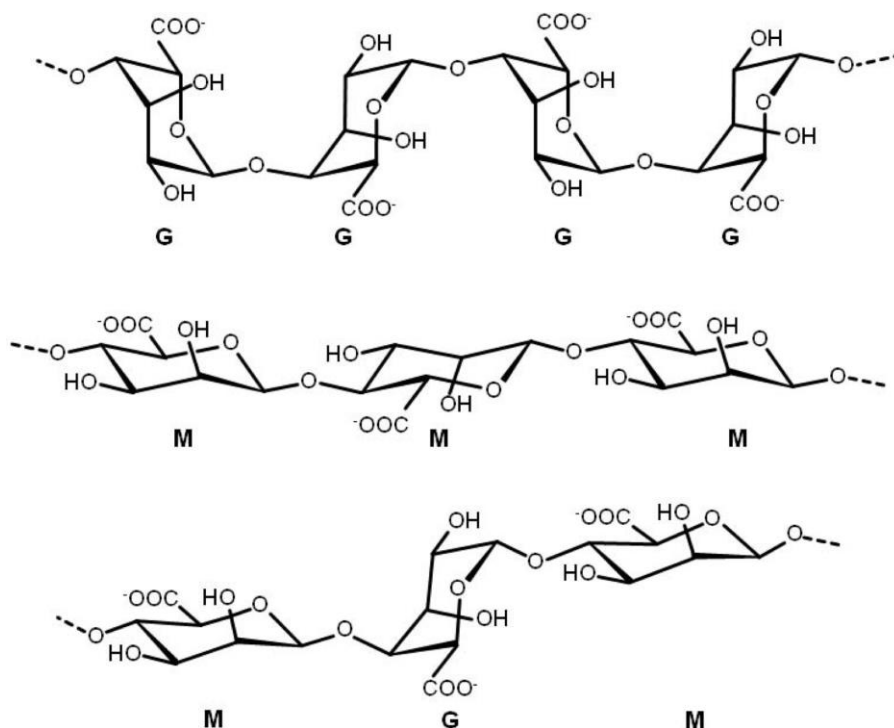


Figura 2 - Estrutura química do bloco G, bloco M e bloco alternado (TØNNESEN; KARLSEN, 2002).

Na medicina e biomedicina, o alginato é, geralmente, empregado na forma de géis. É utilizado em curativos, sistemas de liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos.

Hidrogéis são definidos como materiais poliméricos reticulados que possuem a habilidade de intumescer e reter uma quantidade significativa de água na sua estrutura, mas que não são dissolvidos em água. Podem ser obtidos por reticulação iônica, reticulação covalente, gelificação térmica e reticulação celular. Dentre esses, o tipo mais comum de obtenção do hidrogel de alginato é através de reticulação iônica (AHMED, 2015, LEE; MOONEY, 2012; KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

A reticulação iônica do alginato ocorre quando uma solução aquosa de alginato é combinada com uma solução contendo agentes reticulantes, como cátions bivalentes. Esses cátions possuem maior afinidade aos blocos G do que pelos blocos M, pois se ligam, principalmente, aos grupamentos COO^- do α -L-gulonato (G) (Figura 3). Portanto, quanto menor a razão M/G, maior a chance de se obter um hidrogel altamente reticulado (TØNNESSEN; KARLSEN, 2002; LEE; MOONEY, 2012; KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

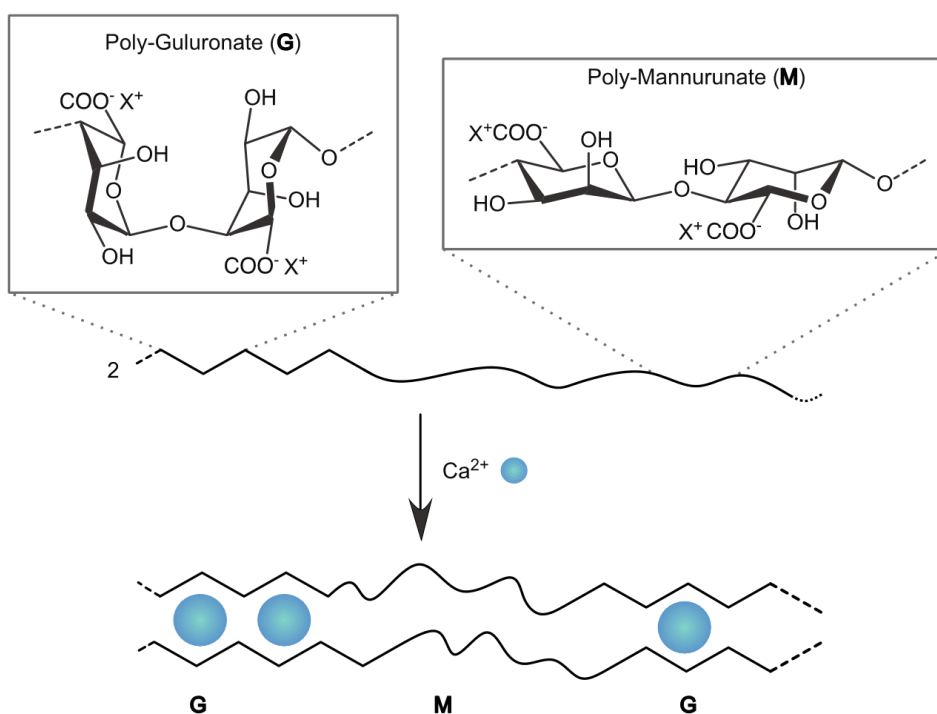


Figura 3 - Representação dos blocos do alginato e sua reação de reticulação (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

A reação de reticulação do alginato dá origem a um gel que possui estrutura tridimensional de acordo com o modelo chamado “*egg-box*” (Figura 4). Nesse modelo, cátions polivalentes são incorporados a estrutura dos blocos de α -L-gulonato do alginato. Os blocos G da estrutura do alginato adotam uma conformação helicoidal, que formam regiões curvadas, dando origem a estruturas complexas. Cátions divalentes, como o Ca^{2+} , se

ligam coordenadamente às carboxilas dessa estrutura, formando o gel (FANG *et al.*, 2007; LEICK *et al.*, 2010).

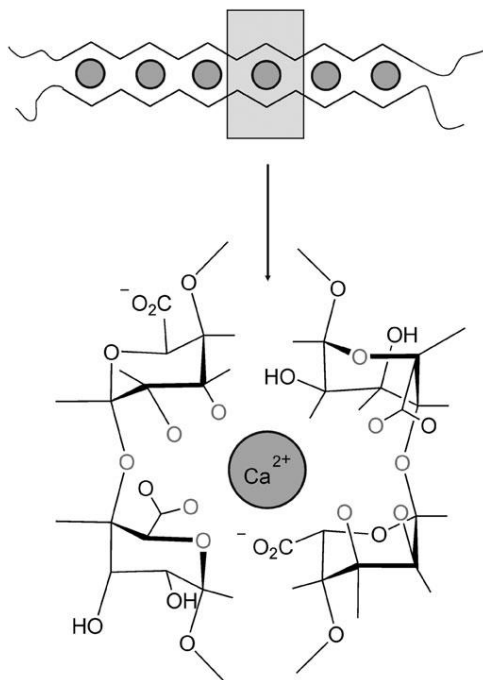


Figura 4 - Representação da estrutura "egg-box" do alginato de cálcio (LEICK *et al.*, 2010).

Os hidrogéis obtidos pela reticulação do alginato podem possuir diferentes formas, incluindo filmes e microesferas, de acordo com o processo realizado para a obtenção do gel. Para o preparo de filmes, por exemplo, pode ser utilizada a técnica *casting*, onde o polímero é solubilizado em um solvente adequado e posteriormente é adicionado o agente reticulante. A solução obtida é transferida para uma placa suporte e é seca em estufa ou temperatura ambiente. As microesferas podem ser obtidas por meio da técnica de extrusão, onde pequenas gotas da solução polimérica são colocadas em contato com a solução reticulante (CHAN *et al.*, 2009; TURBIANI; KIECKBUSCH; GIMENES, 2011).

Além da solução de alginato e da solução contendo cátions bi ou trivalentes, podem-se ainda ser utilizados agentes plastificantes na síntese do hidrogel de alginato. Os plastificantes atuam diminuindo a interação entre as cadeias do polímero e aumentando a mobilidade molecular, o que torna os filmes mais flexíveis e menos quebradiços. Podem ser utilizados como plastificantes, por exemplo, sorbitol, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000; VANIN *et al.*, 2005).

Diferentes agentes reticulantes, como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} etc. podem ser empregados na reticulação do alginato, gerando hidrogéis com

diferentes propriedades. Quando o íon utilizado possui carga +1, são formados filmes solúveis em água. Quando são utilizados íons com carga +2 ou +3, os filmes formados são insolúveis. Um dos agentes reticulantes mais utilizados é o cátion Ca^{2+} , que forma o alginato de cálcio. O alginato de cálcio, assim como o de sódio, é não tóxico e biocompatível e, portanto, pode ser utilizado em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (TØNNESEN; KARLSEN, 2002; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2010; LEE; MOONEY, 2012; SILVA, 2014).

No caso dos curativos, os hidrogéis de alginato são utilizados devido a sua capacidade de absorver grandes quantidades de exsudato de úlceras e facilitar o desbridamento. Por isso, são utilizados em feridas exsudativas ou com escara. Quando em contato com sangramentos, os íons Ca^{2+} presentes fazem com que esses curativos exibam um efeito hemostático. Além disso, o alginato pode auxiliar no processo de cicatrização, aumentando a migração celular, a angiogênese e a produção de colágeno tipo I, e reduzindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias nas feridas (MOURA *et al.*, 2013; LIAKOS *et al.*, 2014; VOWDEN; VOWDEN, 2017; KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

Os curativos de alginato podem ser encontrados na forma de cordas ou blocos e podem ser utilizados em úlceras infectadas e não infectadas. São não-aderentes e, por isso, precisam de um curativo secundário, como espumas ou hidrocolóides, que auxiliam sua fixação e evitam que o alginato seque. Caso a ferida esteja infectada, é necessário que o curativo secundário seja não-oclusivo. Esses curativos podem ser removidos facilmente de úlceras. Dependendo de sua viscosidade, podem ser removidos intactos ou com o auxílio de irrigação com soro fisiológico. Entretanto, é necessário que algumas medidas de proteção sejam tomadas. Devido à sua alta capacidade de absorver fluidos, é possível que haja maceração da pele ao redor da ferida. Para evitar esse problema, o curativo deve ser cortado com o formato da ferida e não deve ser aplicado nas suas adjacências (FONDER *et al.*, 2008; VOWDEN; VOWDEN, 2017).

Novos curativos têm sido desenvolvidos, com a adição de fármacos, formando sistemas de liberação controlada. A droga ou componente ativo é aprisionada na estrutura do alginato de cálcio e é lentamente liberada conforme o alginato é exposto a condições ambientais determinadas. Além dos filmes, os hidrogéis de alginato obtidos na forma de microesferas, que podem ou não ser recobertas com outro material, também são utilizadas em sistemas de liberação controlada de fármacos, principalmente para aplicação oral (REMMINGHORST; REHM, 2006).

1.5.1 Produção de filmes de alginato de cálcio

Os filmes de alginato podem ser produzidos pela gelificação do alginato de sódio, dando origem a um gel de alginato de cálcio, por exemplo, dependendo do agente reticulante utilizado. No caso do alginato de cálcio, essa gelificação ocorre de forma instantânea, quando são adicionados íons cálcio a uma solução de alginato de sódio. Dessa forma, se torna impossível o manuseio do gel e o mesmo não pode ser vertido em um suporte para secagem e formação de um filme homogêneo (TURBIANI, 2007).

Para evitar esse problema, pode-se utilizar sais de cálcio de baixa solubilidade. Nesse caso, um sal de cálcio de baixa solubilidade é disperso em uma solução de alginato e, subsequentemente, íons de cálcio são homogeneamente liberados nesta solução. Assim, enquanto os íons liberados interagem com o polímero, mais sal será solubilizado, dando origem a um gel homogêneo, que pode ser utilizado na confecção de filmes. Os efeitos de pH e temperatura devem ser considerados, para o controle da gelificação do polímero (TURBIANI, 2007; TURBIANI; KIECKBUSCH; GIMENES, 2011).

Outra opção consiste na difusão de íons cálcio no interior da solução de alginato. Dessa forma, íons cálcio são colocados em contato com o alginato, gerando rapidamente um gel na interface. Ao longo do tempo os íons cálcio difundem através dessa interface, prosseguindo com a gelificação. Ao final do processo, o gel formado pode ser vertido em um suporte para secagem e formação do filme. O filme formado é solúvel em água e pode ser necessária uma nova etapa de reticulação para a formação de um filme insolúvel. (ZACTITI, 2004; TURBIANI, 2007; PACHECO, 2016).

1.6 Carreadores de Fármaco

Carreadores de fármaco são sistemas micro ou nanoestruturados que promovem a liberação de fármacos de forma controlada. Enquanto as terapias convencionais de administração de fármacos têm o objetivo de liberar rapidamente o agente ativo ou terapêutico, os carreadores de fármacos têm o intuito de liberar o agente mais lentamente e durante um maior período de tempo. Em terapias convencionais, a concentração de fármaco na corrente sanguínea aumenta rapidamente até atingir um pico de dissolução e, após isso, declina. Para manter sua concentração, é necessária a administração de uma nova dose, que gera um novo pico de concentração da droga. Por outro lado, em terapias com liberação controlada não são gerados esses picos, a concentração de fármaco a ser liberada na corrente

sanguínea pode ser contínua e uma única dose pode ser utilizada durante um período de tempo prolongado (Figura 5) (CUNHA, 2009; BIZERRA; SILVA, 2016).

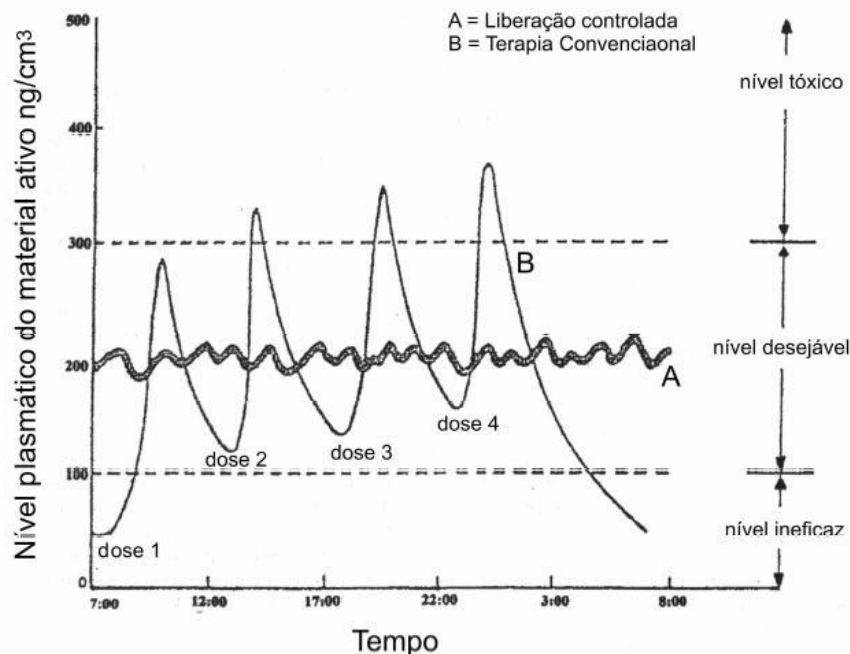


Figura 5 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por liberação controlada (A) e por terapia convencional (B) (BIZERRA; SILVA, 2016).

Os picos de concentração da droga criados na administração convencional são indesejáveis, pois altas concentrações podem ser tóxicas, enquanto baixas concentrações podem ser ineficazes. Para contornar esse problema, podem ser utilizados sistemas de liberação controlada. As vantagens de utilização dos sistemas de liberação controlada incluem: maior controle da liberação do princípio ativo; redução da possibilidade de existência de doses tóxicas ou ineficazes; monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação; obtenção de altas doses locais de fármaco, quando comparadas com os níveis após aplicação oral; e redução do intervalo de dosagens (BIZERRA; SILVA, 2016).

Os principais sistemas de carreadores de fármacos incluem nano e micropartículas poliméricas, lipossomas, ciclodextrinas, dendrímeros, biocompósitos e MOFs (Metal Organic Frameworks). As micropartículas poliméricas são carreadores de fármaco que possuem formato esférico, com diâmetro na escala micrométrica (entre 1 e 1000 μ m), que incluem as microcápsulas e as microesferas (Figura 6). As microcápsulas, também chamadas de sistemas reservatório, são micropartículas que possuem um núcleo que contém o fármaco, delimitado por um outro material, como um polímero. O núcleo das microcápsulas pode ser sólido, líquido ou gasoso. Por outro lado, as microesferas, também chamadas de sistemas matriciais,

são micropartículas compostas por uma mistura homogênea de uma substância ativa e um polímero ou outra matéria-prima (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; CUNHA, 2009; CAMPOS *et al.*, 2013).

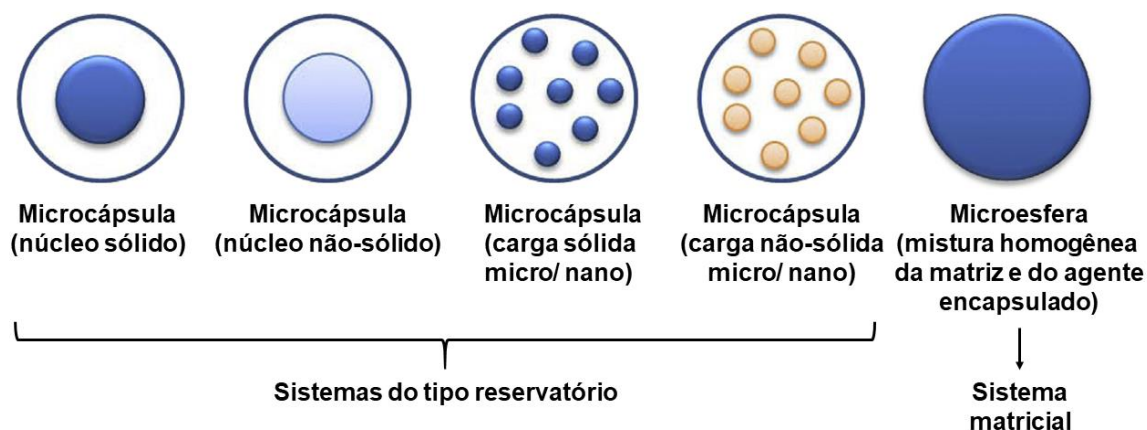


Figura 6 - Diferentes categorias de micropartículas (CAMPOS *et al.*, 2013).

O mecanismo de liberação de drogas de microcápsulas e microesferas pode ocorrer por difusão, erosão ou ação de solventes. No caso da difusão, ambos os tipos de sistema permitem a difusão da droga pelo hidrogel, conforme seus poros são preenchidos com fluidos. A liberação da droga de um reservatório por difusão é realizada segundo uma taxa constante, que é possibilitada pela alta concentração de droga no centro do sistema (Figura 7) (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; BIZERRA; SILVA, 2016).

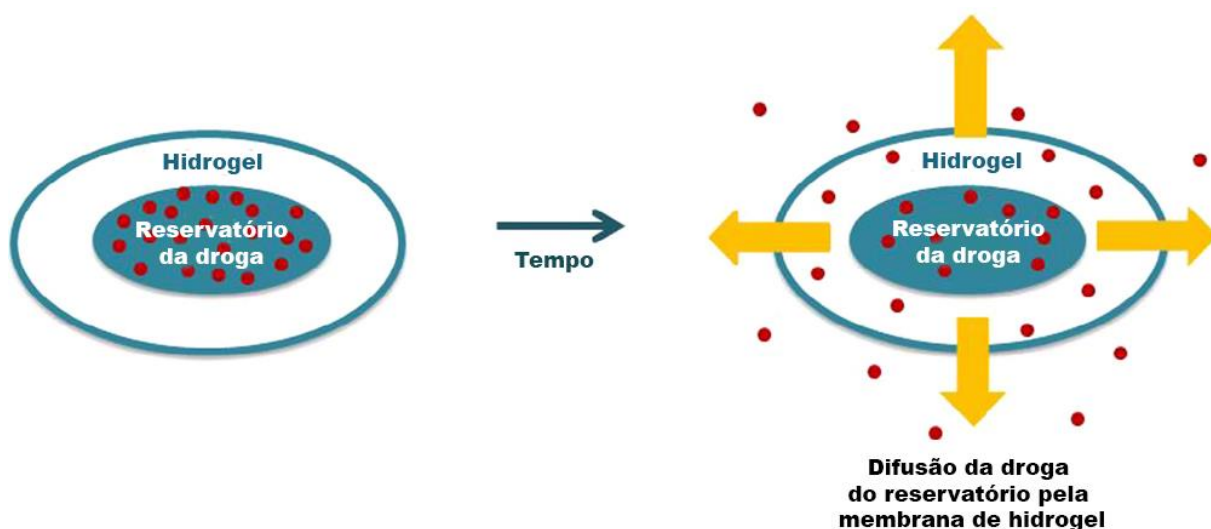


Figura 7 - Esquema de liberação da droga por uma membrana de hidrogel em um reservatório (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).

A liberação da droga de sistemas matriciais, diferente dos reservatórios, não apresenta uma taxa constante. A taxa inicial de liberação, neste caso, é proporcional à raiz quadrada do tempo de contato do polímero com o ambiente que promove um gradiente de concentração (Figura 8) (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; BIZERRA; SILVA, 2016).

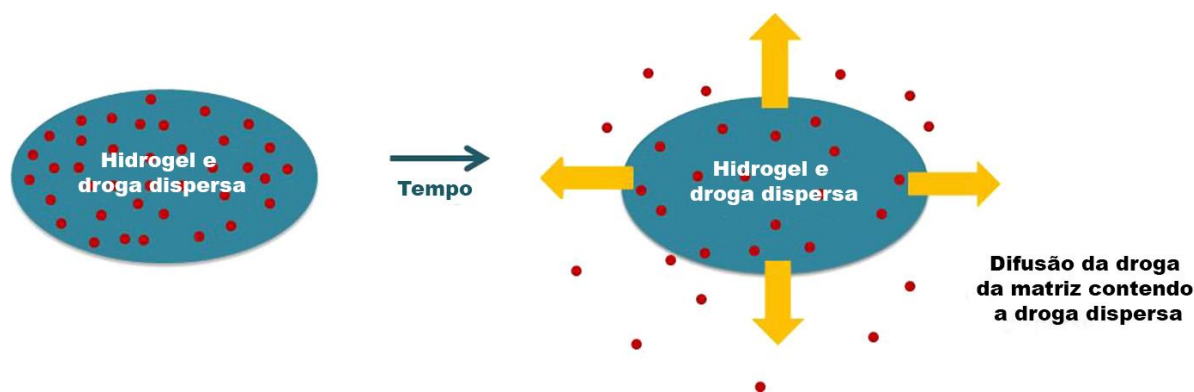


Figura 8 - Esquema de liberação da droga por uma matriz de hidrogel (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).

A liberação de fármacos por erosão ocorre por meio da degradação da matriz, e a taxa de liberação é dependente do tipo de polímero utilizado. No processo de liberação por ativação por solvente, as cadeias poliméricas são quebradas pela clivagem de suas ligações intermoleculares, liberando o fármaco durante essa degradação (BIZERRA; SILVA, 2016).

1.6.1 Produção de micropartículas de alginato

As micropartículas de alginato podem ser produzidas por diversas técnicas, incluindo extrusão (gelificação ionotrópica ou por difusão), coacervação, emulsão e *spray drying* (secagem por aspersão). Dentre elas, destaca-se a técnica de extrusão, por ser uma técnica simples, de baixo custo e favorável a aplicações clínicas (AGÜERO *et al.*, 2017).

Na técnica de extrusão (Figura 9), uma solução de alginato, contendo ou não um agente ativo, é extrudada através de um capilar e é deixada escapar pelo bocal na forma de gotas, sob ação da força gravitacional ou por influência externa. Essas gotas entram em contato com uma solução reticulante, que pode conter íons Ca^{2+} ou outros cátions, onde ocorre a gelificação superficial do alginato por meio da difusão do agente reticulante rumo ao centro do gel, formando as micropartículas. Essa técnica é considerada simples, pois os equipamentos necessários para sua aplicação laboratorial são apenas seringas ou buretas, e para aplicação industrial, bombas (SACCHETIN, 2009; CHAN *et al.*, 2009; LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013).

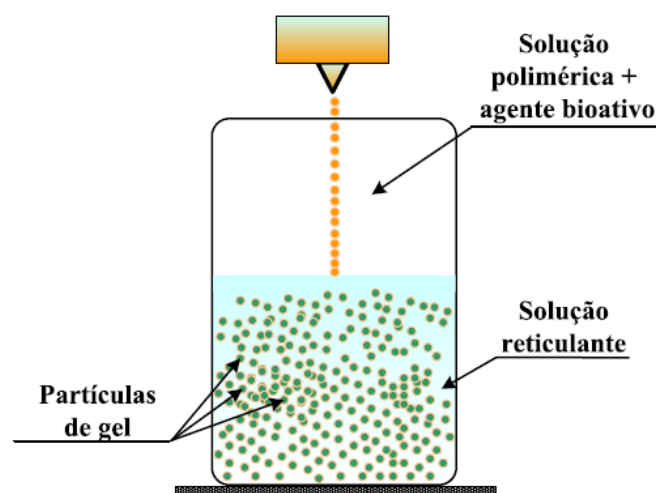


Figura 9 - Esquema de produção de micropartículas por extrusão (SACCHETIN, 2009).

Durante o preparo das micropartículas é importante que alguns parâmetros sejam fixados, para que todas as partículas formadas tenham o mesmo formato e tamanho. Dentre esses parâmetros se destacam as propriedades físicas do alginato, como densidade e viscosidade da solução e razão de blocos M/G; o diâmetro da agulha utilizada e a velocidade de agitação do banho reticulante, que influenciam no tamanho da partícula; a distância de coleta da gota e a velocidade de contato entre a gota e a solução reticulante, que afetam o formato da partícula (CHAN *et al.*, 2009; LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013).

1.7 Fármacos Para o Tratamento de Úlcera Diabética

Durante o tratamento das úlceras diabéticas deve ser realizado o controle da infecção. Para isso, são utilizados antibióticos e agentes antimicrobianos, que são indicados conforme o tipo de microrganismo presente nas feridas. Para facilitar o controle e a aplicação adequada desses fármacos, curativos podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada. A aplicação local de antibióticos nas úlceras é preferível, em comparação com a administração oral, pois há menor possibilidade de desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos em questão. Em adição, o uso de baixas doses de antibióticos incorporados aos curativos reduz consideravelmente o risco de toxicidade dessas drogas. Além disso, a aplicação local reduz o risco de ineficiência no tratamento oral devido à má circulação sanguínea nos membros inferiores, que está frequentemente presente em pacientes com úlceras diabéticas (BOATENG *et al.*, 2008; LABOVITIADI; LAMB; MATTHEWS, 2012; ALAVI *et al.*, 2014b; POWERS *et al.*, 2016).

O efeito da droga a ser aplicada pode ser prolongado com a aplicação local por meio de curativos que permitem sua liberação contínua. Além disso, a liberação controlada permite que os curativos possam ser deixados por um maior período de tempo em contato com a ferida, sem a necessidade de trocas frequentes. Tem-se assim vantagem para o tratamento de úlceras crônicas, onde os pacientes passam por longos períodos de tratamento, diminuindo as trocas de curativos que podem ser dolorosas (BOATENG *et al.*, 2008).

Um dos tipos de curativos mais utilizados para a liberação controlada de fármacos são os hidrogéis. A liberação de fármacos a partir de hidrogéis é controlada por diferentes processos físicos: hidratação do polímero pelo exsudato; intumescimento para formação de gel; difusão da droga pelo gel; e possível erosão da parte gel do polímero (Figura 10). Quando o curativo seco entra em contato com ferida exsudativa, esse exsudato penetra na matriz polimérica, causando a hidratação e o intumescimento do polímero, que forma um gel sobre a superfície da ferida. O gel formado atua como um sistema de liberação controlada. A liberação da droga pode se dar por diferentes mecanismos, como: difusão controlada, intumescimento controlado, quimicamente controlado e liberação sensível ao ambiente (BOATENG *et al.*, 2008; CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; BOATENG; CATANZANO, 2015).

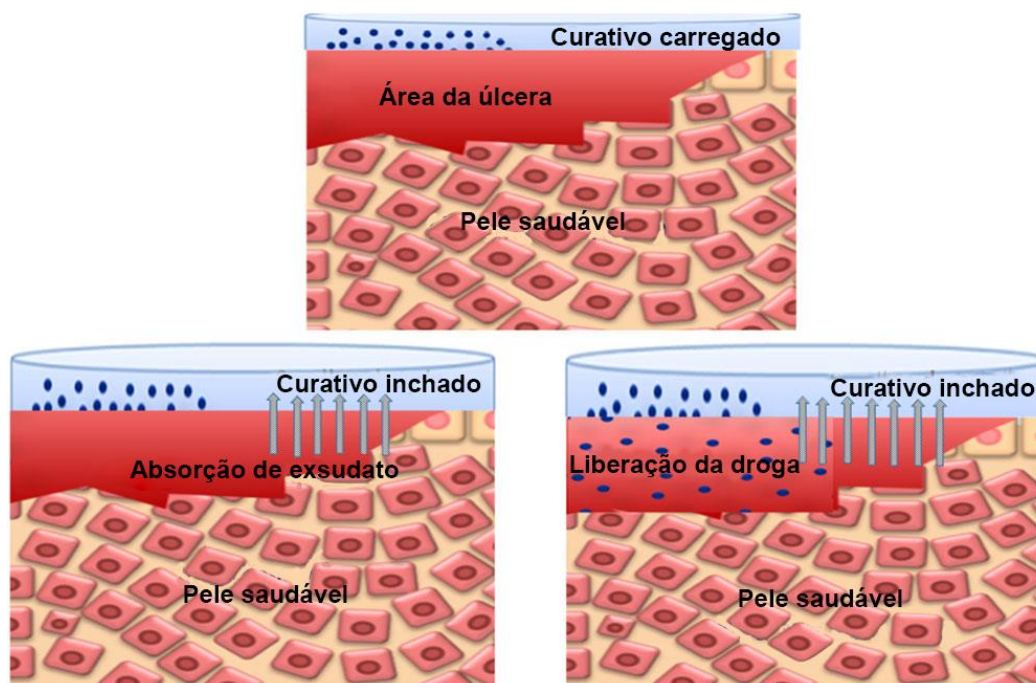


Figura 10 - Representação esquemática do movimento do exsudato para interior do hidrogel e da droga para seu exterior durante a aplicação sobre uma úlcera (BOATENG; CATANZANO, 2015).

Os fármacos a serem utilizados no tratamento da infecção de úlceras deveriam ser determinados de acordo com os patógenos encontrados no local. Todas as feridas abertas são colonizadas por diversos microrganismos e, por isso, as infecções geralmente não podem ser facilmente definidas microbiologicamente. Frequentemente, feridas diabéticas agudas são colonizadas apenas por bactérias Gram-positivas do tipo *cocos*. Entretanto, a maior parte das úlceras diabéticas são crônicas. Essas úlceras são colonizadas por diferentes tipos de microrganismos, em especial por *Staphylococcus aureus*. Além deste, podem ser encontrados *Streptococcus* hemolíticos dos grupos A, C, G e especialmente do grupo B, vários *Enterobacteriaceae*, anaeróbios obrigatórios, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Enterococcus* e, algumas vezes, bactérias Gram-negativas não fermentadoras. Dentre estas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* não precisam de tratamento. Porém, os outros patógenos encontrados devem ser controlados pelo uso de antibióticos (CAVANAGH *et al.*, 2005; LIPSKY *et al.*, 2006; PAPANAS; MALTEZOS, 2007; FONDER *et al.*, 2008). A Tabela 3 mostra um resumo dos tipos de patógenos que podem ser encontrados em cada tipo de ferida.

Tabela 3 - Patógenos associados a diversos tipos de úlceras infectadas.

Tipo de úlcera infectada	Patógenos
Úlcera “fechada”, com a presença de celulite	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos ^a
Úlcera infectada sem uso prévio de antibióticos ^b	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos ^a
Úlcera crônica infectada ou úlcera infectada com uso prévio de antibióticos ^c	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos e Enterobacteriaceae
Úlcera macerada devido ao excesso de fluidos ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (geralmente em combinação com outros microrganismos)
Úlcera crônica, de longa duração, com uso prévio de antibióticos de grande espectro ^{c,d}	Cocos aeróbios Gram positivos (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa), difteróides, Enterobacteriaceae, espécies de <i>Pseudomonas</i> , bastonetes Gram-negativos não fermentadores e, possivelmente, fungos
Úlcera com necrose extensa ou gangrena, com mal odor ^c	Misturas de cocos Gram positivos anaeróbios, incluindo <i>Enterococcus</i> , Enterobacteriaceae, bastonetes Gram-negativos não fermentadores e anaeróbios obrigatórios

^a Grupos A, B, C e G.

^b Geralmente monomicrobiana.

^c Geralmente polimicrobiana.

^d Espécies resistentes a antibióticos são comuns.

Fonte: LIPSKY et al., 2006.

Para o controle dos patógenos encontrados nas úlceras podem ser utilizados antibióticos e antimicrobianos locais, orais, parenterais ou intravenosos. Cada tipo de aplicação está relacionado à gravidade da infecção. Os antibióticos locais ou tópicos, que podem ser aplicados por meio de sistemas de liberação controlada, mais utilizados incluem: neomicina, bacitracina, mupirocina, metronidazol, derivados de prata, e gentamicina, sendo a

neomicina um dos mais utilizados no tratamento de úlceras diabéticas (POWERS *et al.*, 2016; FONDER *et al.*, 2008; KAVITHA *et al.*, 2014).

A neomicina é um antibiótico do tipo aminoglicosídeo natural complexo. É apresentada sob a forma de sulfato de neomicina. É solúvel em água e mantém sua eficiência em soluções aquosas e outros veículos. Possui ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, e algumas microbactérias, porém possui pouca ação contra *Pseudomonas aeruginosa*. Sua absorção pelo organismo é baixa, fazendo com que haja um acúmulo do fármaco na superfície da ferida, quando aplicado por via tópica. Além disso, deve ser utilizada de acordo com orientação médica, somente durante o tempo em que haja infecção, pois seu uso prolongado pode causar reações alérgicas, incluindo riscos de toxicidade renal e auditiva. Seu uso tópico pode ser realizado isolado ou em combinação com outros antibióticos ou outros fármacos. Uma das suas apresentações mais comuns é a combinação de neomicina e bacitracina, na forma de pomadas (TAVARES, 2014; ROBERTSON; MAIBACH, 2014; DECK; WINSTON, 2014; JABEEN *et al.*, 2017).

Antibióticos tópicos são preferíveis em casos de úlceras superficiais contaminadas, pois atacam diretamente o foco bacteriano e diminuem a chance de ocorrer resistência bacteriana. Entretanto, a resistência bacteriana pode ocorrer mesmo com o uso de antibióticos tópicos e, por isso, seu uso deve ser suspenso quando a úlcera estiver limpa e livre de infecção (POWERS *et al.*, 2016; FONDER *et al.*, 2008; KAVITHA *et al.*, 2014). Assim, sempre que possível, o uso de antibióticos deve ser utilizado em conjunto ou substituído por antissépticos, que diminuem a incidência de resistência microbiana (ROBERTS; LEAPER; ASSADIAN, 2017).

Uma alternativa ao uso de antibióticos é a utilização de produtos naturais no combate a infecções. Plantas e outras classes de produtos naturais têm sido alvo de diversos estudos que visam identificar sua ação bacteriana, fungicida, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante. Além dos extratos e óleos essenciais de plantas, a própolis é um dos produtos naturais que possuem ação antimicrobiana e cujas propriedades e aplicações têm sido estudadas (DUARTE, 2006; PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomas e balsâmicas, de consistência, textura e coloração variada. É coletada por abelhas a partir de diversas partes de plantas, como botões, florais, brotos e exsudatos resinosos, que a utilizam como uma “arma química” contra a entrada de patógenos nas colmeias. Devido ao fato de ser uma mistura de

substâncias naturais, sua composição química é muito variada, porém apresenta tipicamente resinas (50%) compostas por flavonoides e ácidos fenólicos, graxas (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outros compostos orgânicos variados (5%). Possui ação anti-inflamatória e bacteriostática, podendo ser bactericida em altas concentrações. Sua ação antibacteriana se dá pela presença de compostos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres. Dentre esses, os flavonoides estão presentes em maior quantidade. Estudos realizados por Kalogeropoulos *et al.* (2009) e Zeighampour *et al.* (2014) indicam que extratos alcoólicos de própolis são eficientes no combate a bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, e *Listeria monocytogenes*, e a bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Escherichia cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A própolis pode ser utilizada no tratamento de mau hálito, eczema, úlceras, infecções urinárias, infecções na garganta, inflamação, doenças do coração, diabetes e câncer e pode ser apresentada na forma de cremes dermatológicos, loções, tabletes, cápsulas, gomas de mascar, pastas de dentes e enxaguantes bucais (JULIANO; PALA; COSSU, 2007; PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011; TORLAK; SERT, 2013; BODINI *et al.*, 2013).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão abordados os materiais e equipamentos utilizados, bem como a metodologia de preparo dos filmes e micropartículas e as técnicas de análise utilizadas. A Figura 11 mostra o fluxograma de atividades desenvolvidas neste trabalho.

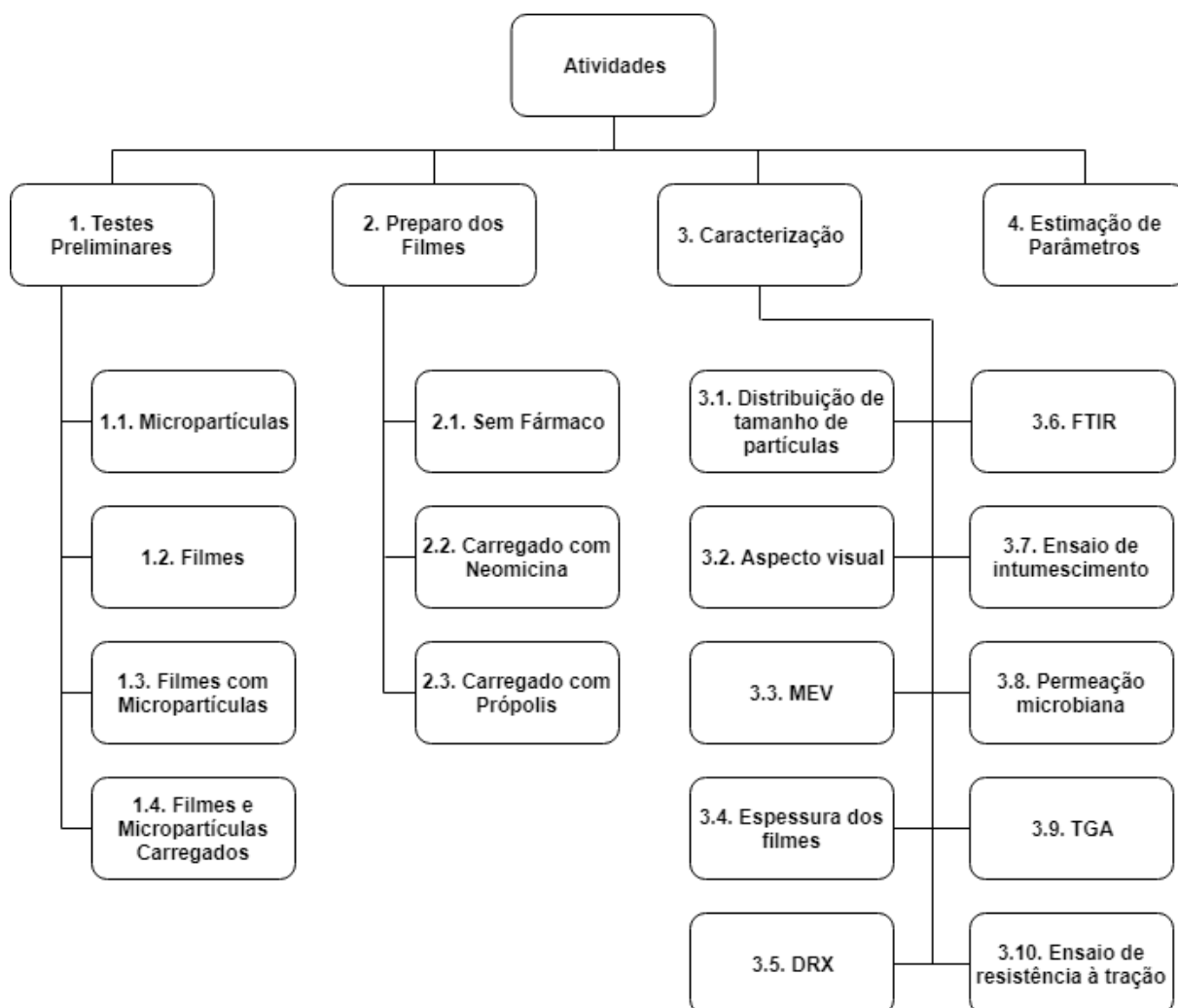


Figura 11 - Fluxograma de atividades realizadas.

Inicialmente, foram realizados testes no preparo dos filmes e micropartículas carregados ou não com fármaco natural ou sintético, com o objetivo de ajustar a forma de preparo e a concentração de fármaco. Após isso, foram preparados os filmes sem fármaco, carregados com neomicina ou com própolis, e carregados com micropartículas de acordo com o planejamento experimental realizado, e os mesmos foram caracterizados por meio de análises de distribuição do tamanho de partículas, aspecto visual dos filmes, Microscopia

Eletrônica de Varredura (MEV), espessura dos filmes, Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), grau de intumescimento, fração gel e perda de massa, permeação microbiana, Análise Termogravimétrica (TGA) e ensaio de resistência à tração (tensão e deformação na ruptura). Por fim, foi realizada uma estimação de parâmetros.

2.1 Planejamento Experimental

Os experimentos realizados neste trabalho foram definidos de acordo com o planejamento experimental fatorial completo do tipo 2^2 , ou seja, dois fatores em dois níveis, com triplicata no ponto central. A Figura 12 mostra a correlação entre esses fatores (quantidade de micropartículas e tipo de fármaco) e seus níveis.

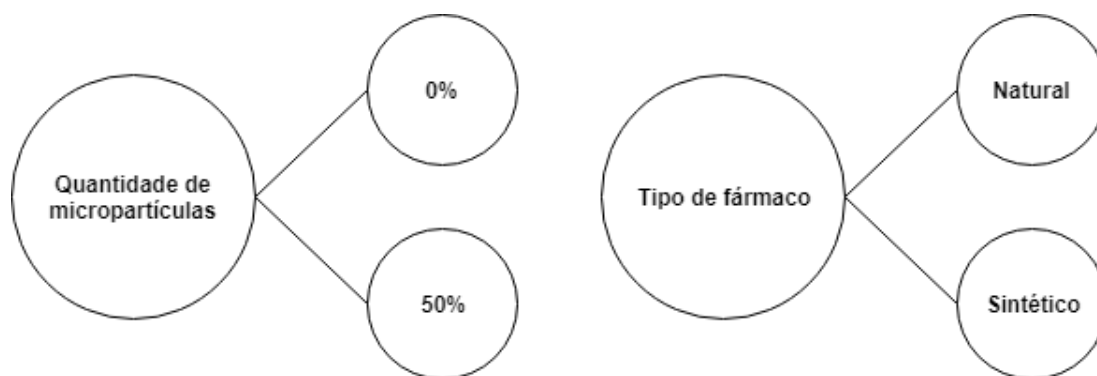


Figura 12 - Correlação entre a quantidade de micropartículas e o tipo de fármaco.

De acordo com o planejamento realizado, foram preparados 10 filmes (Tabela 4). Os filmes foram produzidos com combinação entre a quantidade de micropartículas (0 ou 50% em massa de polímero) e do tipo de fármaco: natural (própolis) ou sintético (sulfato de neomicina). Foram preparados seis filmes com a condição do ponto central (experimentos 5 a 10), com 25% de massa de polímero substituídos por micropartículas, sendo três filmes com o fármaco natural e três com o fármaco sintético. Todos esses filmes e micropartículas foram carregados com um dos tipos de fármaco. Além dos filmes carregados, foi preparado um filme sem micropartículas e sem fármaco, chamado branco, para comparação.

Tabela 4 - Planejamento experimental 2².

Número do Experimento	Quantidade de Micropartículas	Tipo de Fármaco
1	0%	Natural
2	50%	Natural
3	0%	Sintético
4	50%	Sintético
5	25%	Natural
6	25%	Sintético
7	25%	Natural
8	25%	Sintético
9	25%	Natural
10	25%	Sintético

2.2 Micropartículas

As micropartículas utilizadas neste trabalho foram preparadas pela técnica de extrusão, de acordo com o estudo realizado por Lee, Ravindra e Chan (2013). Para isso, foram utilizados alginato de sódio (Sigma-Aldrich) e cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich).

2.2.1 Preparo das micropartículas sem fármaco

Para o preparo das micropartículas sem fármaco, uma solução de alginato de sódio 1% m/v foi preparada por meio da solubilização de 0,1 g de alginato de sódio em 10 mL de água deionizada. Após isso, essa solução foi gotejada em 150 mL de solução de cloreto de cálcio 0,15 mol/L, chamada solução reticulante, com o auxílio de uma seringa extrusora e uma agulha hipodérmica 26G (BD PrecisionGlide™), com diâmetro interno de 0,45 mm. Foi utilizada agitação magnética durante a extrusão das partículas, para evitar a agregação das mesmas e para favorecer a homogeneidade da reação de reticulação (SMRDEL; BOGATAJ; MRHAR, 2008; LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013).

As partículas formadas foram deixadas em contato com o banho reticulante por 5 minutos e, após isso, foram coletadas com o auxílio de uma peneira. Após preparadas, as micropartículas foram estocadas em solução de cloreto de cálcio 0,045 mol/L até sua utilização. O esquema experimental utilizado para a extrusão das micropartículas está representado na Figura 13.

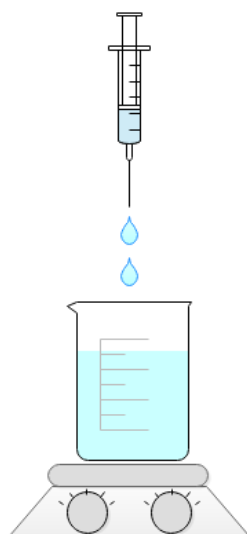


Figura 13 - Representação esquemática da etapa de extrusão das micropartículas.

2.2.2 Preparo das micropartículas contendo própolis

As micropartículas contendo extrato de própolis verde (doação da Prof. Rosane Nora Castro, PPGQ/UFRRJ) foram preparadas de forma semelhante às micropartículas sem fármaco. Neste caso, 0,1 g de alginato de sódio foi dissolvido em 9 mL de água deionizada. Após isso, foi adicionado à solução 1 mL de extrato de própolis, ou seja, 10% da água utilizada na solubilização do alginato de sódio foi substituída pelo extrato de própolis. A seguir, as micropartículas foram obtidas por extrusão com o auxílio de uma seringa provida de uma agulha 26G e deixadas em contato com 150 mL da solução reticulante durante 2 minutos e em seguida coletadas com o auxílio de uma peneira. O tempo de reticulação utilizado foi menor do que o anterior para evitar que houvesse a liberação dos componentes da própolis no banho reticulante (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2012). Neste caso, as micropartículas foram utilizadas logo após o seu preparo, não sendo possível seu armazenamento em solução estoque.

2.2.3 Preparo das micropartículas contendo neomicina

Para o preparo das micropartículas contendo sulfato de neomicina (Sigma-Aldrich) foi utilizada uma solução 0,01% m/v de sulfato de neomicina para a dissolução do polímero. A concentração da solução utilizada está de acordo com a metodologia proposta por Nitanan *et al.* (2013): inicialmente foi preparada a solução 0,01% m/v de sulfato de neomicina pela solubilização de 10 mg deste reagente em 100 mL de água deionizada. Em seguida, 10 mL desta solução foram utilizados para dissolver 0,1 g de alginato de sódio. A solução obtida foi

gotejada em 150 mL de solução reticulante de cloreto de cálcio 0,15 mol/L, novamente com o auxílio de seringa e agulha 26G. As partículas formadas foram deixadas em contato com o banho reticulante por 2 minutos e foram coletadas com o auxílio de peneira. Assim como as micropartículas carregadas com própolis, as micropartículas carregadas com neomicina não foram armazenadas em solução estoque, para evitar a liberação indesejada do fármaco.

2.3 Filmes

Os filmes deste trabalho foram preparados pela técnica *casting*, segundo as metodologias propostas por Zactiti (2004) e Pacheco (2016). Foram preparados filmes conforme o planejamento experimental descrito na Tabela 4. Para isso, foram utilizados alginato de sódio (Sigma-Aldrich), cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich) e glicerol P.A. (Vetec).

2.3.1 Preparo dos filmes sem micropartículas e sem fármaco

Os filmes de alginato sem a presença de micropartículas e fármaco foram preparados pela técnica *casting*, onde uma solução filmogênica é aplicada em um suporte e, posteriormente, o solvente é evaporado (TURBIANI; KIECKBUSH, 2011). Os filmes foram preparados em duas etapas.

Na primeira etapa, chamada de primeiro estágio de reticulação, ocorre a produção de um filme com baixo grau de grau de reticulação. Para sua produção, uma solução foi preparada pela dissolução de 0,6g de alginato de sódio e 0,36g de glicerol, que age como um agente plastificante, em 60 mL de água deionizada. A esta solução, sob agitação magnética a 70°C, foram lentamente adicionados 4,5 mL de solução reticulante de cloreto de cálcio 0,045 mol/L, em uma vazão de 1 mL/min. Alíquotas de 30 mL da solução filmogênica obtida foram transferidas para placas de vidro de 9 cm de diâmetro e foram secas em estufa a 50° C por 20 h, dando origem aos filmes de primeiro estágio.

Na segunda etapa, chamada de segundo estágio de reticulação, ocorre a reticulação complementar dos filmes. Os filmes de primeiro estágio secos são imersos por 30 minutos em 50 mL de uma solução de cloreto de cálcio 0,045 mol/L a qual são adicionados 2,5 mL de glicerol e 5 gotas de ciclopirox olamina 10 mg/mL (antifúngico). Em seguida, os filmes são lavados com água deionizada para a remoção do excesso de íons cálcio, secos em temperatura ambiente por dois dias, removidos da placa de vidro e guardados para posterior caracterização.

2.3.2 Preparo dos filmes sem micropartículas e com fármaco

O preparo dos filmes sem micropartículas e com fármaco, extrato de própolis ou sulfato de neomicina, seguiu o procedimento anteriormente descrito, com a adição de fármaco nos dois estágios de reticulação.

Para o caso do extrato de própolis, 10 % da água deionizada utilizada para a solubilização do alginato de sódio e do glicerol foram substituídos por extrato de própolis e seguiu-se com o preparo dos filmes de primeiro estágio normalmente. Após seco, esse filme passou pelo segundo estágio de reticulação, conforme descrito anteriormente, exceto que, nesse caso, 10 % da água deionizada utilizada no preparo da solução de cloreto de cálcio 0,045 mol/L foi substituída por extrato de própolis e essa solução foi utilizada para a imersão dos filmes de primeiro estágio, dando origem aos filmes de segundo estágio.

Para o caso do sulfato de neomicina, a água deionizada utilizada para a dissolução do alginato de sódio dos filmes de primeiro estágio foi substituída por uma solução de sulfato de neomicina 0,01 % m/v. A mesma solução foi utilizada para a solubilização do cloreto de cálcio para o preparo da solução utilizada na segunda etapa de reticulação dos filmes.

2.3.3 Preparo dos filmes com micropartículas

Os filmes com a presença de micropartículas foram preparados com a adição das micropartículas na solução filmogênica da primeira etapa de reticulação. Os filmes de primeiro estágio contendo fármaco (própolis ou sulfato de neomicina) foram preparados normalmente. Ao final de seu preparo, micropartículas de alginato de sódio (dando origem a um filme com 25% ou 50% em massa de micropartículas) foram adicionadas a solução filmogênica, sob agitação magnética, por 1 minuto, e alíquotas de 30 mL foram transferidas para placas de vidro de 9 cm de diâmetro e foram secas em estufa a 50 °C durante 20 h. A segunda etapa de reticulação para cada um dos filmes foi realizada da mesma forma que para os filmes sem micropartículas.

2.4 Caracterização

As micropartículas e os filmes preparados foram caracterizados por meio das seguintes análises: distribuição do tamanho de partículas, aspecto visual dos filmes, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), espessura dos filmes, Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), grau de

intumescimento, fração gel e perda de massa, permeação microbiana, Análise Termogravimétrica (TGA) e ensaio de resistência à tração (tensão e deformação na ruptura).

2.4.1 Distribuição de tamanho das micropartículas

A distribuição de tamanho das micropartículas foi determinada por meio de difração de raios laser, utilizando o equipamento Malvern Mastersize 2000 (LEF/UFRRJ). As partículas sem fármaco, após a reticulação, foram dispersas em água deionizada e submetidas ao teste. O índice de refração do alginato utilizado no teste foi de 1,33, próximo ao da água, e a análise foi realizada utilizando a aproximação de Fraunhofer (ZIMMERMANN, 2001; CHOI *et al.*, 2015). Foram obtidas, também, informações sobre o diâmetro da partícula através de imagens com o auxílio de um microscópio on-line Particle View v19 Mettler Toledo.

2.4.2 Aspecto visual dos filmes

O aspecto visual dos filmes foi verificado por meio de fotografias, registradas por uma câmera Sony Cyber-Shot DSC-HX200V. As fotografias foram feitas em uma câmara escura, que consistia em uma caixa/câmara escura com duas lâmpadas adaptadas nas laterais, de modo a não haver qualquer sombra sobre os filmes. Foram avaliadas as seguintes características dos filmes, segundo descrito por Carvalho (2002): homogeneidade (ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme), continuidade (ausência de rupturas ou fraturas após a secagem) e flexibilidade.

2.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que consiste na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, que deve ser condutora, possibilitando sua caracterização morfológica. No caso dos materiais poliméricos, é necessário que haja uma preparação da amostra anterior ao ensaio, para torná-la condutora. Para isso, as amostras devem ser recobertas pela deposição de íons metálicos (“sputtering”), como ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd) ou platina (Pt), entre outros. Para auxiliar a caracterização morfológica, podem ser realizadas análises na superfície de corte da amostra, permitindo uma visualização da estrutura de regiões internas da amostra. É recomendável que a fratura das amostras, para essa análise, seja uma fratura criogênica (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A superfície das amostras, a região interna das amostras (por meio da superfície de quebra) e as micropartículas (secas, não incorporadas aos filmes) foram analisadas em um microscópio eletrônico TM3030Plus Hitachi (CETEM/UFRJ), operando sob vácuo e a 15kV. Para analisar a superfície externa das amostras, foram utilizadas amostras de 5x5mm e para analisar a superfície interna das amostras, amostras de 5 mm de largura foram mergulhadas em nitrogênio líquido e fraturadas. Para analisar as micropartículas, cerca de 10 mg de amostra foi utilizada. Todas as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro antes da análise (SCD005 Sputter Coater BAL-TEC).

2.4.4 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi mantida constante por meio da adição da mesma massa de polímero em todas as amostras. A espessura dos filmes foi medida por meio de um paquímetro da marca MARBERG. Foram coletadas 5 medidas aleatórias em diferentes regiões de cada filme e a espessura final foi calculada como a média das mesmas.

2.4.5 Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X é uma técnica utilizada para a determinação de fases cristalinas em materiais. Para isso, um feixe de raios X, ondas eletromagnéticas que possuem elevadas energias e baixos comprimentos de onda, incide sobre a amostra e sua interferência com a amostra é medida. A teoria de difração tridimensional foi simplificada por William Henry Bragg e William Laurence Bragg em 1914, considerando a radiação difratada como sendo refletida por conjuntos de planos atômicos paralelos (CALLISTER, 2002; CLEARFIELD, 2008).

Amostras dos filmes de 2x2 cm foram analisadas em um equipamento Brucker-AXS D8 Advance Eco (CETEM/UFRJ), com radiação $\text{CuK}\alpha$, tensão de 40kV, corrente de 25 mA, varredura contínua, com passo do ângulo de 0,02 graus e velocidade de 2 graus por minuto. A varredura foi realizada em ângulos de 4° a 70°.

2.4.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise microestrutural das amostras foi realizada por meio de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. A técnica baseia-se na incidência de um feixe de radiação infravermelha na amostra e na observação da frequência e intensidade da radiação transmitida pela amostra. Dessa forma é possível obter informações estruturais da amostra,

como estrutura configuracional e conformacional. Além disso, é possível identificar a presença de interações intermoleculares na amostra (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

Para essa análise, amostras de 5x5 mm foram cortadas e analisadas em um espectrômetro Spectrum 100 Perkin Elmer (COPPE/UFRJ), com varredura de 32 scans por amostra e resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 4000 a 550 cm⁻¹, utilizando o módulo de ATR.

2.4.7 Grau de intumescimento, fração gel e perda de massa

O grau de intumescimento, fração gel e perda de massa foram obtidos por meio de ensaio de intumescimento das amostras. Nesse ensaio, realizado à temperatura ambiente, amostras secas de 1cm x 1cm (em triplicata) foram pesadas e tiveram sua massa normalizada (m_s). Após isso, as amostras foram colocadas em um frasco contendo 10 mL de água destilada. Em intervalos de tempo de (0,5, 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72 e 96) h, as amostras foram retiradas do frasco, secas com papel filtro, pesadas (m_i) e recolocadas dentro do frasco. Ao final do ensaio, após 96h, as amostras foram secas em estufa e novamente pesadas (m_{is}) (TURBIANI, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O grau de intumescimento (GI) é uma medida de quanto fluido pode ser absorvido pelo hidrogel, gerando uma mudança no arranjo estrutural das moléculas e, conseqüentemente, um aumento de volume da amostra. É calculado pela Equação 1 (TURBIANI, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

$$GI(\%) = 100 \frac{m_i - m_s}{m_s} \quad (1)$$

A fração gel (FG) indica indiretamente o grau de reticulação do polímero e é calculada pela Equação 2, onde m_{is} é a massa seca da amostra após o último instante do ensaio de intumescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

$$FG(\%) = 100 \frac{m_{is}}{m_s} \quad (2)$$

A perda de massa das amostras (PM), após quatro dias de ensaio, pode ser calculada pela Equação 3, e está relacionada com a degradação hidrolítica da amostra e com a liberação da substância ativa (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

$$PM(\%) = 100 \frac{m_s - m_{is}}{m_s} \quad (3)$$

2.4.8 Permeação microbiana

A capacidade dos filmes de impedir a permeação e penetração microbiana foi testada. Para isso, tubos contendo 5 mL de meio de crescimento de microorganismos nº 1 (Sigma-Aldrich) foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Amostras dos filmes de 3,5 cm de diâmetro foram cortadas, esterilizadas por 15 minutos de cada lado por radiação UV em uma capela de fluxo laminar, colocadas sobre os tubos e fixadas com auxílio de material adesivo. Para o controle negativo, os tubos contendo o meio de cultura e esterilizados foram vedados e para o controle positivo, os tubos contendo o meio de cultura e esterilizados foram mantidos abertos. Todos os tubos e amostras foram analisados em duplicata (SINGH; PAL, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; GENESI, 2015). Para a determinação do crescimento microbiano, a turbidez do meio foi observada durante 28 dias. Foram realizadas medidas da turbidez do meio por meio de leituras a cada 7 dias em um espectrofotômetro (Spectrophotometer SP1105 BEL Photonics – IT/UFRRJ), utilizando o comprimento de onda de 600 nm (MYERS; CURTIS; CURTIS, 2013).

2.4.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função do tempo ou da temperatura. No caso dos polímeros, essa análise pode ser realizada com o objetivo de obter informações sobre sua degradação térmica. Nessa técnica, amostras do material estudado são submetidos a um aquecimento, a taxa de 5 a 10°C/min (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). Cerca de 10 mg de cada amostra foram analisadas em um analisador térmico TGA 50 Shimadzu (COPPE/UFRJ). Foi utilizada uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, de 25 a 450 °C, em atmosfera inerte (N₂).

2.4.10 Ensaio de Resistência à Tração (Tensão e deformação na ruptura)

As propriedades mecânicas de polímeros podem ser determinadas por meio de diversos ensaios, incluindo tração, compressão, flexão e cisalhamento, entre outros. Os ensaios de tração são os mais utilizados e dão informações sobre o módulo de Young ou de elasticidade, tensão e deformação no escoamento, tensão máxima e/ou tensão de ruptura (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

Para realizar a análise, os filmes foram intumescidos em água por 30 minutos e cortados segundo a norma ASTM D 882-02, em amostras de 10 x 20 mm de comprimento útil. Foi utilizada a Máquina de Ensaio Universal EMIC DL 10000 (COPPE/UFRJ), com célula de carga de 50 kgf e taxa de deformação de 10 mm/min até a fratura. O ensaio foi realizado em triplicata para cada composição.

O módulo de elasticidade está relacionado com a rigidez do hidrogel e é obtido pela inclinação da curva tensão x deformação a baixas deformações. Pode ser calculado pela Equação 4, onde E é o módulo de elasticidade de Young, s é a tensão e e é a deformação, ambos medidos no mesmo ponto e a baixas deformações – parte elástica da curva (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

$$E = \frac{s}{e} \quad (4)$$

As deformações no escoamento e na ruptura estão relacionadas com a capacidade de as moléculas escoarem umas sobre as outras durante o estiramento, bem como à ação de reticulação. A deformação pode ser calculada pela Equação 5, onde e é a deformação, $\Delta l = l - l_0$ é a variação do comprimento da região útil do corpo de prova no instante a ser medido e l_0 é o comprimento inicial do corpo de prova (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

$$e = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (5)$$

2.4.11 Estimação de parâmetros

Os resultados experimentais do ensaio de intumescimento e tração foram ajustados ao modelo descrito pela Equação 6, com o objetivo de se obter os parâmetros da equação, para cada variável de saída e prever o comportamento de suas propriedades frente à variações da quantidade de micropartículas e ao tipo de fármaco adicionados. Além disso, a estimação é útil, também, para corroborar os resultados obtidos pela análise estatística dos dados experimentais (AHMED *et al.*, 2017). Nesta equação, Y é a resposta, A é referente a quantidade de partículas, B é referente ao tipo de fármaco e β_0 , β_1 , β_2 e β_{12} são os parâmetros do modelo.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_{12} AB \quad (6)$$

Foi realizada uma estimação não-linear para a obtenção dos parâmetros de cada equação e sua significância, bem como o valor final da função objetivo utilizada no ajuste, que neste caso foi a função dos mínimos quadrados. Os resultados da estimação de parâmetros foram obtidos em função das variáveis padronizadas, que se encontram entre +1 e -1 (Tabela 5).

Tabela 5 - Variáveis padronizadas para a estimação de parâmetros.

Amostra	Quantidade de micropartículas	Tipo de fármaco	A	B
FA0N	0	neomicina	-1	-1
FA25N	25%	neomicina	0	-1
FA50N	50%	neomicina	1	-1
FA0P	0	própolis	-1	1
FA25P	25%	própolis	0	1
FA50P	50%	própolis	1	1

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Distribuição do tamanho de partículas

A distribuição de tamanho de partículas obtido para as partículas dispersas em água está ilustrada na Figura 14. As partículas apresentam diâmetros na faixa de 13 μm a 1900 μm . É provável que as partículas encontradas com diâmetros muito pequenos (menores que 150 μm) sejam provenientes de contaminação no equipamento por amostras analisadas anteriormente.

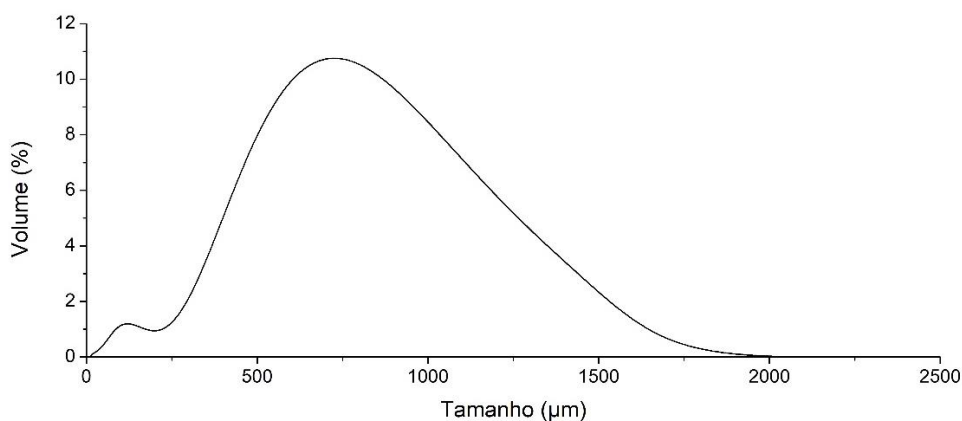


Figura 14 - Distribuição de tamanho das partículas.

Foram obtidos também os diâmetros característicos dessa distribuição, que estão descritos na Tabela 6. O diâmetro médio de Sauter ($D[3,2]$) está relacionado com o diâmetro de uma esfera que possui a mesma razão entre sua área superficial externa e seu volume. Por outro lado, o diâmetro $D[4,3]$ é o diâmetro utilizado quando se deseja considerar a média da distribuição de massa ou volume da partícula. Os diâmetros $d(0,1)$, $d(0,5)$ e $d(0,9)$ estão relacionados, respectivamente, às partículas encontradas com diâmetros iguais a 10%, 50% e 90% da distribuição volumétrica cumulativa (ALLEN, 2003; RAWLE, 2018).

Tabela 6 - Diâmetros médios da distribuição de tamanho de partículas.

Diâmetro	Tamanho (μm)
$D[3,2]$	304,897
$D[4,3]$	619,345
$d(0,1)$	152,594
$d(0,5)$	600,082
$d(0,9)$	1061,52

Para corroborar os resultados obtidos pela distribuição de tamanho das partículas, foram obtidas imagens das partículas dispersas em água por um microscópio on-line (Figura 15). Nessa análise, a maioria das partículas observadas apresentam diâmetros entre o diâmetro médio de Sauter e o $D[4,3]$.

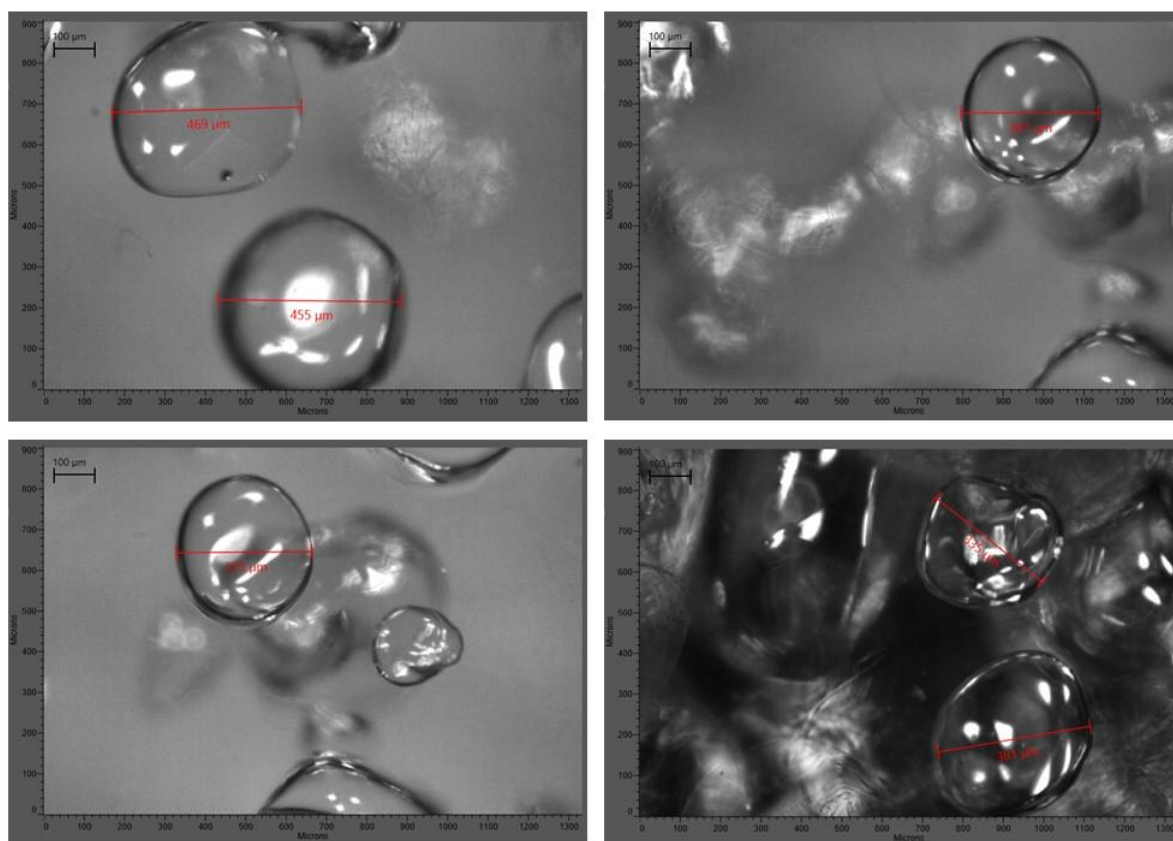


Figura 15 - Tamanho e morfologia de partículas vistas por um microscópio on-line.

Zimmermann (2001) obteve resultados semelhantes ao analisar o tamanho de partículas de alginato de cálcio obtidos pela técnica de atomização e gelificação. Para partículas preparadas a partir de uma solução de alginato de sódio 2% adicionada por um atomizador de 1 mm de diâmetro em uma solução de CaCl_2 0,1% m/v, foram obtidos os diâmetros $D[4,3] = 290 \mu\text{m}$, $d(0,1) = 42 \mu\text{m}$ e $d(0,9) = 711 \mu\text{m}$. Os diâmetros são menores do que os obtidos nesse trabalho devido às diferenças entre os processos de obtenção das micropartículas, como, por exemplo, a automatização do processo.

Segundo Lee, Ravindra & Chan (2013), partículas de tamanho entre 200 e 800 μm são desejáveis para a maioria dos processos de encapsulamento. Além disso, partículas muito pequenas ou muito grandes podem influenciar negativamente na uniformidade dos filmes

contendo micropartículas. A maior parte das partículas produzidas (cerca de 65%) se encontra dentro dessa faixa de tamanhos e, portanto, seriam adequadas para esta aplicação.

3.2 Aspecto visual dos filmes

O aspecto visual dos filmes branco (FA0B) e dos filmes carregados com sulfato de neomicina (FA0N, FA25N1, FA25N2, FA25N3 e FA50N) pode ser observado na Figura 16.



Figura 16 - Aspecto visual dos filmes: (a) Branco (FA0B), (b) FA0N, (c) FA25N1, (d) FA25N2, (e) FA25N3, (f) FA50N.

O filme branco, que não contém micropartículas e não foi carregado com fármaco, apresenta aspecto homogêneo, incolor e sem a presença de partículas insolúveis. Não há rachaduras ou rupturas, sendo caracterizado como contínuo. O filme é flexível, não quebradiço de fácil manuseio (CARVALHO, 2002).

O filme FA0N, carregado com sulfato de neomicina, mas sem a presença de micropartículas, é homogêneo, incolor, sem a presença de partículas insolúveis e pode ser caracterizado como contínuo, assim como o filme branco. Entretanto, o filme é quebradiço e seu manuseio requer cuidado.

Os filmes FA25N1, FA25N2 e FA25N3, carregados com sulfato de neomicina e com 25% de sua massa polimérica na forma de micropartículas, são incolores. Pode ser observada a presença das micropartículas adicionadas em sua formulação. Os filmes são contínuos, flexíveis, não quebradiços e de fácil manuseio.

O filme FA50N, carregado com sulfato de neomicina e com 50% de sua massa na forma de micropartículas, também é incolor e apresenta micropartículas visíveis em sua

estrutura. Entretanto, diferente dos anteriores, o filme não é contínuo, apresentando rachaduras. Essas rachaduras podem ocorrer devido à grande quantidade de micropartículas adicionadas à solução filmogênica. Essas partículas podem ter sido agregadas umas às outras, devido a forças de capilaridade, tornando o filme não uniforme. O efeito de capilaridade ocorre quando duas ou mais partículas presentes em um filme se atraem e formam aglomerados. Os aglomerados formados causam uma deformação interfacial no fluido que os envolve, devido às propriedades de molhabilidade das partículas, que demandam uma maior quantidade de solução envolvendo as partículas (KRALCHEVSKY; NAGAYAMA, 2000). Essa deformação pode ter sido responsável pelo deslocamento de fluido, e como consequência, a solução filmogênica pode não ter sido suficiente para envolver as micropartículas, formando um filme não uniforme após a secagem.

O aspecto visual dos filmes branco (FA0B) e carregados com própolis (FA0P, FA25P1, FA25P2, FA25P3 e FA50P) pode ser observado na Figura 17.

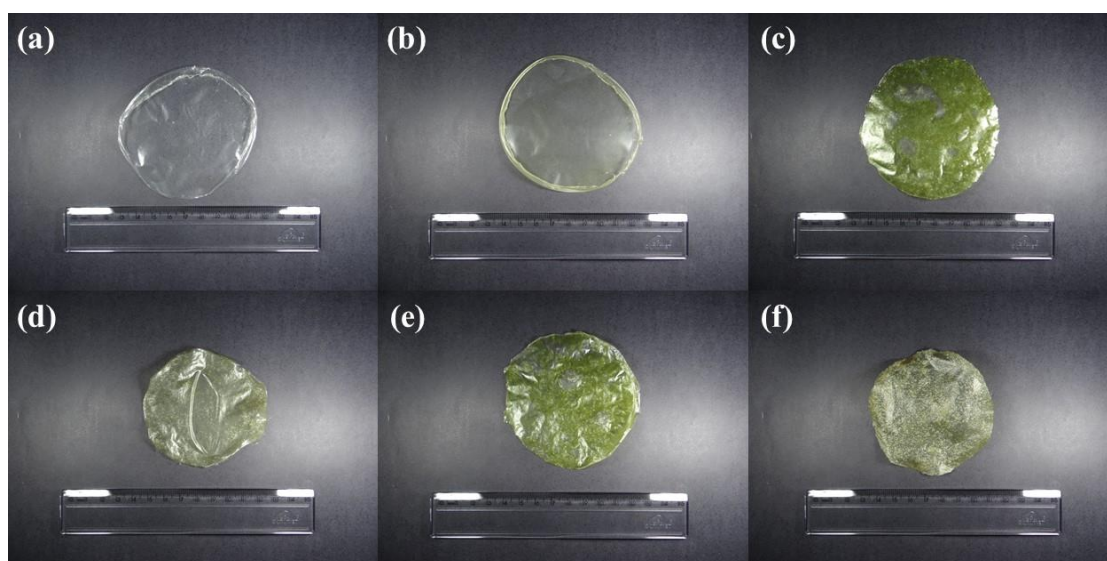


Figura 17 - Aspecto visual dos filmes: (a) branco, (b) FA0P, (c) FA25P1, (d) FA25P2, (e) FA25P3, (f) FA50P.

O filme FA0P, carregado com própolis e sem a adição de micropartículas, tem aspecto homogêneo, sem a presença de partículas insolúveis e coloração amarela clara uniforme. O filme é contínuo, flexível, não quebradiço e de fácil manuseio.

Os filmes FA25P1, FA25P2 e FA25P3, carregados com própolis e com a adição de 25% de micropartículas (em massa de polímero), não possuem aspecto homogêneo, apresentando diferenças de coloração em algumas partes dos filmes. Essas diferenças de coloração podem se dar devido à baixa solubilidade do extrato alcóolico de própolis na

solução filmogênica (aquosa), dando origem a zonas contendo baixa quantidade de própolis (KUBILIENE *et al.*, 2015). Além disso, pode ser observada a presença das micropartículas adicionadas ao filme. Apesar da não uniformidade dos filmes, os mesmos não possuem rachaduras ou rupturas e são flexíveis/não quebradiços.

O filme FA50P, carregado com extrato de própolis e com a adição de 50% (em massa) de micropartículas, apresenta coloração uniforme e nele podem ser visualizadas as micropartículas adicionadas ao filme. Apresenta características similares às daquelas dos demais filmes carregados com própolis.

Na Figura 18 pode ser observada uma comparação entre os filmes carregados com sulfato de neomicina e com própolis.

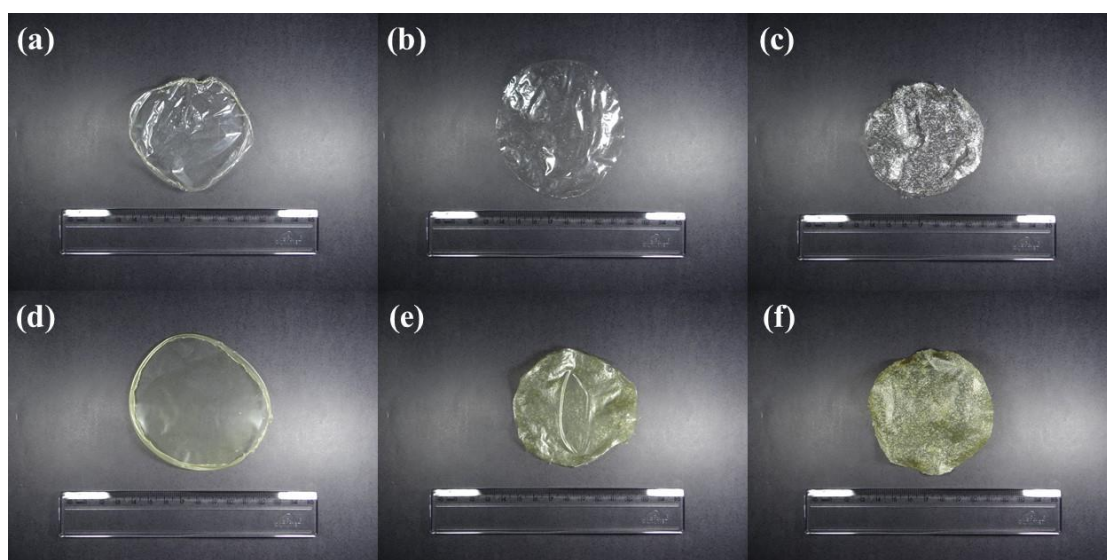


Figura 18 - Aspecto visual dos filmes: (a) FA0N, (b) FA25N, (c) FA50N, (d) FA0P, (e) FA25P, (f) FA50P.

Ao se comparar os filmes sem a adição de micropartículas (FA0N e FA0P), pode-se observar, além da diferença de coloração, que o filme carregado com sulfato de neomicina é quebradiço enquanto o filme carregado com própolis é flexível. Esse fato pode se dar devido à presença de moléculas características da própolis entre as cadeias do alginato, que agem como um plastificante, tornando o material mais flexível.

Quando comparados os filmes FA25N e FA25P, carregados com sulfato de neomicina e própolis, respectivamente, e com a presença de 25% (em massa) de micropartículas, pode se observar diferenças em suas colorações. Entretanto, as demais propriedades (homogeneidade dos filmes, continuidade e flexibilidade) se apresentam de maneira semelhante nos dois tipos de filme.

Os filmes FA50N e FA50P carregados com sulfato de neomicina e própolis, respectivamente, e contendo 50% da massa polimérica na forma de micropartículas possuem, além da diferença de coloração, diferenças em sua continuidade.

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície dos filmes e suas respectivas superfícies de fratura foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A superfície do filme branco (FA0B) apresenta-se uniforme, sem a presença de partículas (Figura 19-a). A micrografia de sua superfície de corte é mostrada na Figura 19-b, c e d. Nessas imagens é possível observar as marcas de corte nas amostras, embora relativa homogeneidade possa ser observada.

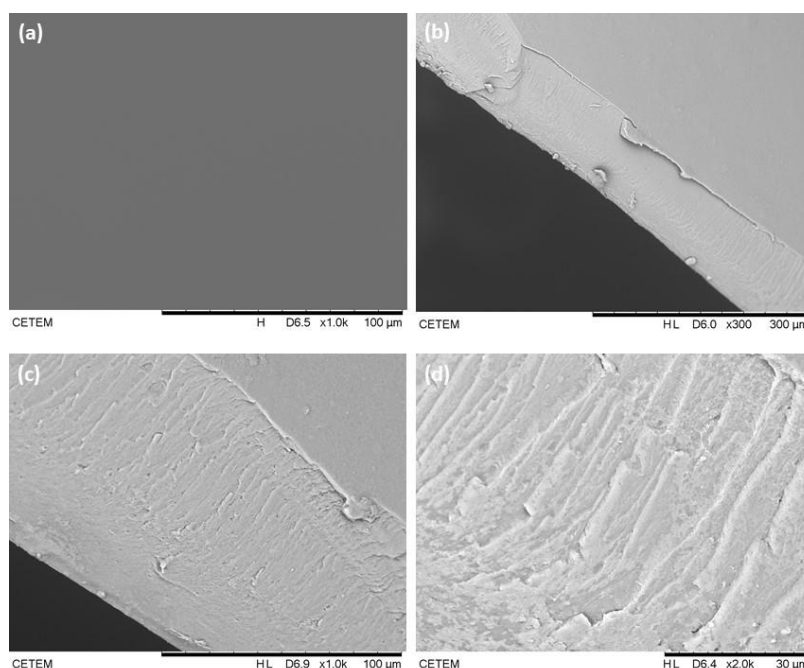


Figura 19 - Micrografia da amostra FA0B: (a) imagem topográfica com ampliação de 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (b) 300x, (c) 1000x e (d) 2000x.

Ao analisar as micrografias dos filmes carregados com neomicina, sem a adição de micropartículas, FA0N, é possível perceber semelhanças ao filme branco. Sua imagem topográfica (Figura 20-a) também é uniforme, porém há a presença de corpos diferentes da matriz, prováveis partículas. Quando analisadas suas imagens de fratura (Figura 20-b, c e d), é possível perceber a marca de corte, bem como a ausência de relativa porosidade.

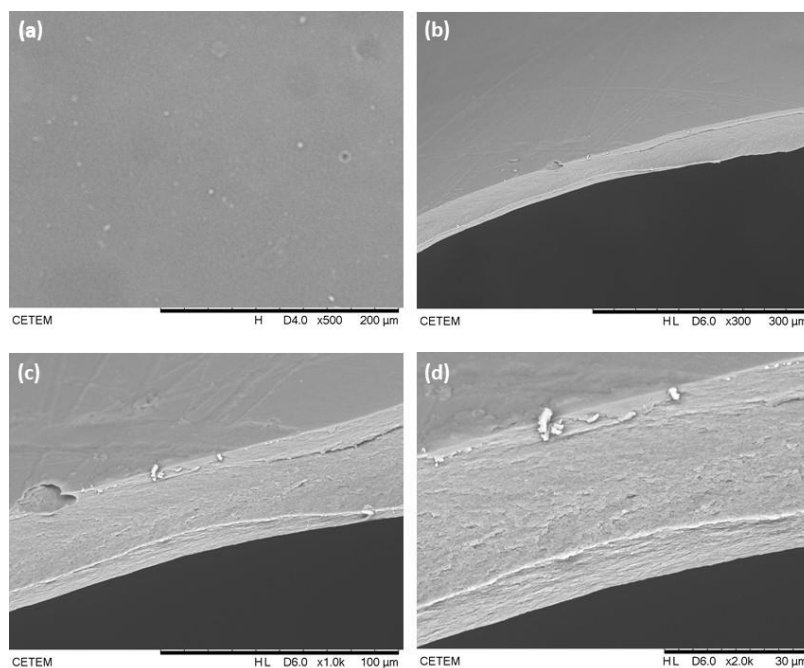


Figura 20 - Micrografia da amostra FA0N: (a) imagem topográfica com ampliação de 500x; e imagens da fratura com ampliação de (b) 300x, (c) 1000x e (d) 2000x.

A amostra FA0P, sem a presença de micropartículas e carregada com própolis apresenta superfície e interior diferente das amostras anteriores, Figura 21. Sua superfície se apresenta não uniforme. Na superfície de corte observam-se poros, sugerindo que a evaporação do álcool do extrato de própolis possa ser responsável pelas alterações morfológicas (VILELA, 2010).

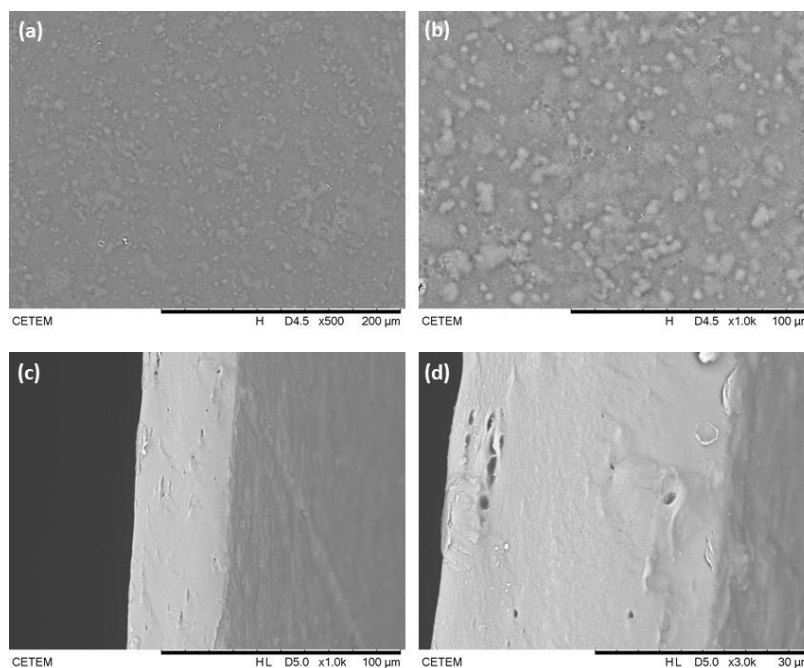


Figura 21 - Micrografia da amostra FA0P: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 1000x e (d) 3000x.

Com a adição de micropartículas nos filmes, sua estrutura muda e, para comparação, foi feita a análise por microscópio eletrônico de varredura também das micropartículas isoladas e sem a adição de fármaco. As micropartículas, quando secas, formam aglomerados difíceis de se separar e, por isso, as mesmas foram analisadas por meio de pequenas aglomerações. A Figura 22 mostra a micrografia das micropartículas em diferentes ampliações. As micropartículas, quando secas e aglomeradas, apresentam porosidade, gerada provavelmente pela evaporação do solvente (ZIMMERMANN, 2001), Figura 22-c e d.

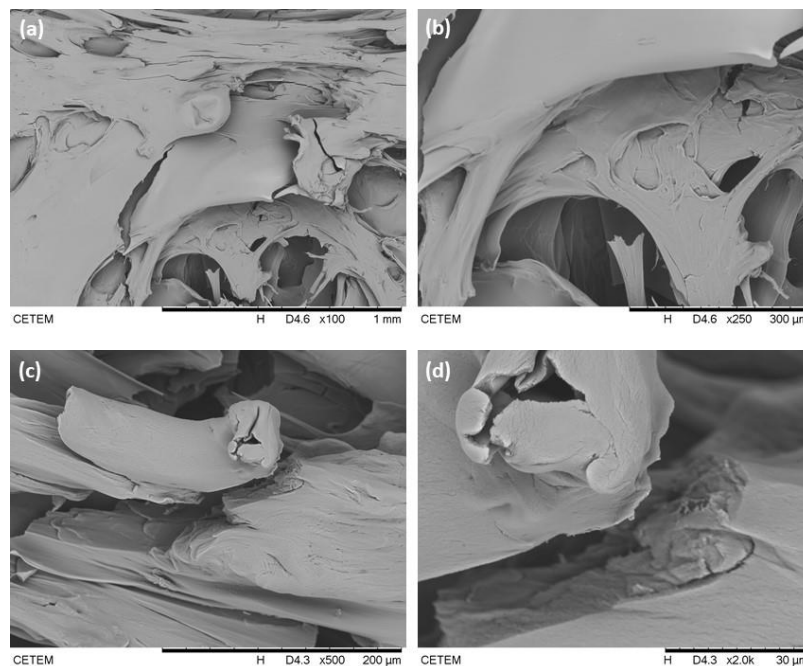


Figura 22 - Micrografia das micropartículas com ampliação de (a) 100x, (b) 250x, (c) 500x e (d) 2000x.

As micrografias dos filmes carregados com sulfato de neomicina e com a adição de 25% e 50% em peso são mostradas nas Figuras 23 e 24, respectivamente. Nas micrografias do filme FA25N é possível observar que em sua superfície topográfica há a presença de partículas (Figura 23-a), provavelmente aquelas adicionadas em sua estrutura. Ao adicionar mais partículas, a quantidade de micropartículas visíveis em sua imagem topográfica aumenta, como pode ser visualizado na Figura 33-a e b, para a amostra FA50N. Ao se analisar a superfície de corte do filme FA25N, pode-se perceber uma estrutura semelhante ao filme carregado com neomicina e sem a presença de micropartículas. Ao analisar as micrografias da superfície de corte da amostra FA50N, pode-se perceber certo “desfolhamento” do filme (Figura 24-f). Esse desfolhamento pode ser gerado pela menor quantidade de matriz disponível para envolver as partículas, devido a efeitos de capilaridade, quando as amostras são secas (KRALCHEVSKY; NAGAYAMA, 2000). Além disso, uma vez que se observa estrutura semelhante à das micropartículas aglomeradas, é provável que se esteja observando as micropartículas.

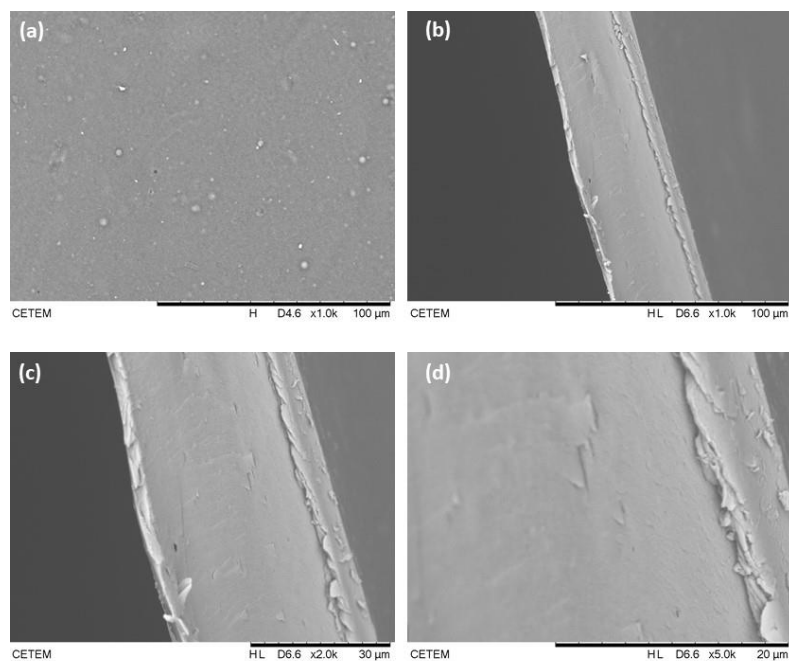


Figura 23 - Micrografia da amostra FA25N: (a) imagem topográfica com ampliação de 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (b) 1000x, (c) 2000x e (d) 3000x.

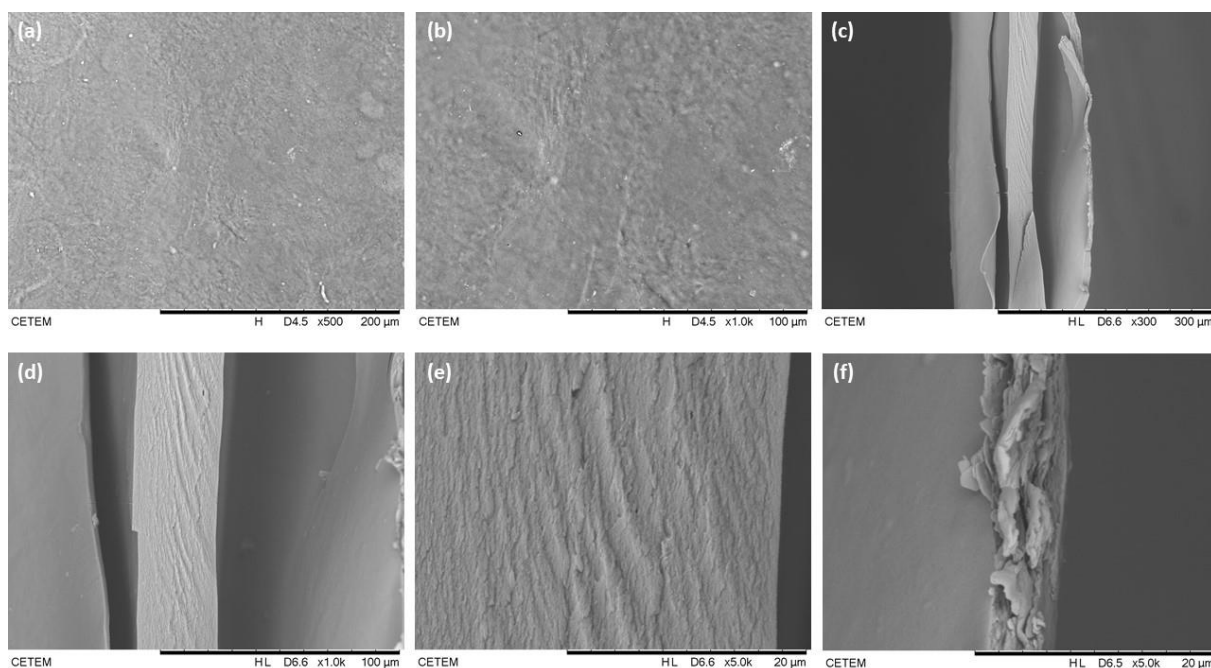


Figura 24 - Micrografia da amostra FA50N: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 300x, (d) 1000x, (e) 5000x e (f) 5000x.

As micrografias dos filmes carregados com extrato de própolis e contendo micropartículas são mostradas nas Figuras 25 e 26. Nessas figuras, a presença de micropartículas nas imagens topográficas dos filmes FA25P (Figura 25-a, b) e FA50P (Figura 26-a, b) é mais visível que nos filmes carregados com sulfato de neomicina. Nas micrografias

da amostra FA25P é possível perceber uma estrutura com 22 μm de diâmetro (Figura 25-c, d), semelhante a estrutura encontrada nas aglomerações de micropartículas, quando analisadas isoladas, o que indica a possibilidade de as micropartículas se encontrarem aglomeradas também na estrutura dos filmes. Pode-se visualizar o “desfolhamento” na amostra FA50P (Figura 26- c, d), e porosidade pela provável evaporação do álcool do extrato (Figura 26-e, f).

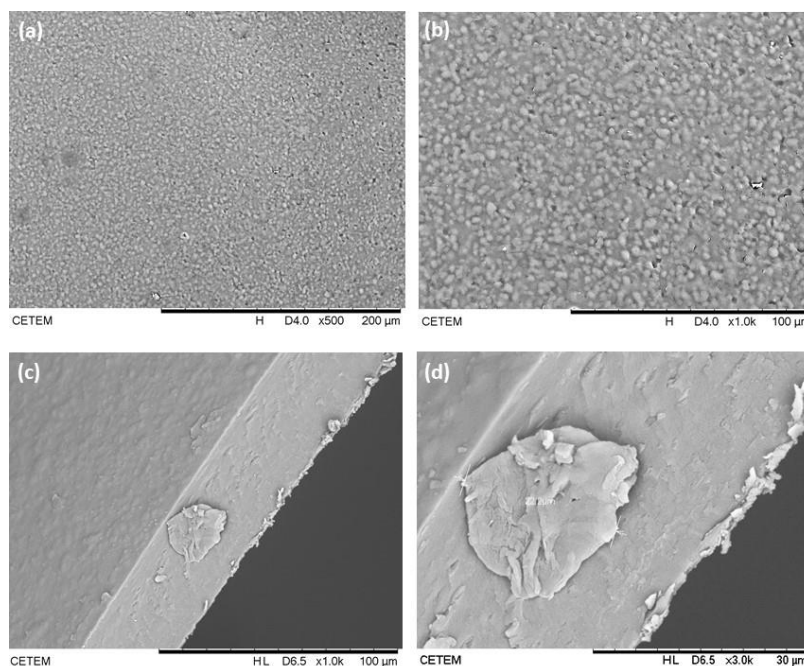


Figura 25 - Micrografia da amostra FA25P: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 1000x e (d) 3000x.

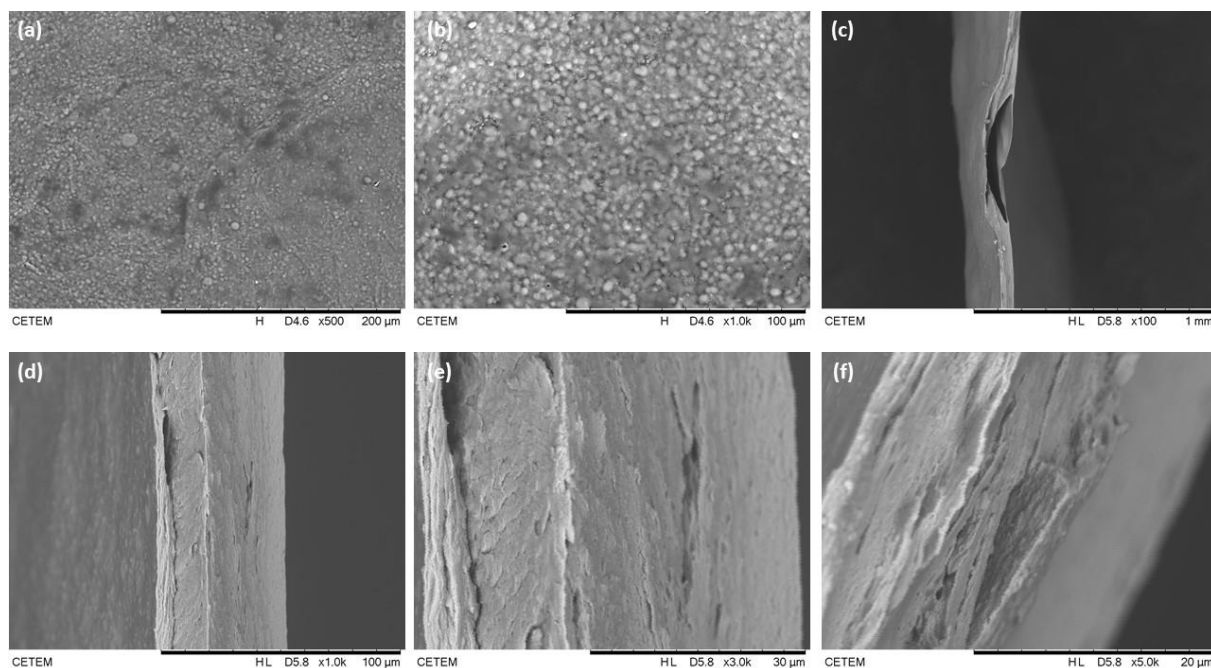


Figura 26 - Micrografia da amostra FA50P: imagens topográficas com ampliação de (a) 500x e (b) 1000x; e imagens da fratura com ampliação de (c) 100x, (d) 1000x, (e) 3000x e (f) 5000x.

3.4 Espessura dos filmes

As espessuras dos filmes foram medidas e os resultados são mostrados na Tabela 7. Analisando os resultados obtidos, pode-se observar que o filme de menor espessura foi o FA0B, branco. Ao se adicionar o fármaco (tanto o sulfato de neomicina quanto a própolis), houve um aumento da espessura dos filmes sem a adição de micropartículas (FA0N e FA0P), quando comparados ao branco. Pires *et al.* (2018) obtiveram resultados semelhantes ao estudar blendas de alginato/quitosana carregadas com fármaco. Ao aumentar a quantidade de fármaco adicionado houve aumento na espessura dos filmes. Segundo os autores, o fármaco adicionado pode ter atuado com um plastificante, modificando a organização tridimensional dos polímeros, diminuindo suas interações intermoleculares e aumentando o volume livre e mobilidade das cadeias, o que gerou um aumento na espessura dos filmes. O mesmo pode ter acontecido com a adição de neomicina e própolis nos filmes de alginato e, devido a atuação dos fármacos como plastificante, houve o aumento da espessura desses filmes.

Tabela 7 - Espessuras das amostras.

Amostra	Espessura (mm)					Média (mm)*
	1	2	3	4	5	
FA0B	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05 ± 0,00
FA0N	0,05	0,05	0,05	0,1	0,05	0,06 ± 0,03
FA25N1	0,1	0,15	0,1	0,05	0,1	0,1 ± 0,04
FA25N2	0,05	0,1	0,05	0,1	0,1	0,08 ± 0,03
FA25N3	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05	0,06 ± 0,03
FA50N	0,1	0,2	0,15	0,2	0,25	0,18 ± 0,07
FA0P	0,05	0,025	0,05	0,075	0,05	0,05 ± 0,02
FA25P1	0,1	0,05	0,1	0,1	0,05	0,08 ± 0,03
FA25P2	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	0,11 ± 0,03
FA25P3	0,1	0,15	0,15	0,15	0,1	0,13 ± 0,03
FA50P	0,2	0,15	0,15	0,15	0,3	0,19 ± 0,08

*O erro foi calculado considerando um intervalo de confiança de 95%.

A adição de micropartículas levou a um aumento da espessura dos filmes, como era esperado. Os filmes que apresentaram a maior espessura foram os filmes contendo 50% de micropartículas, seguidos pelos filmes contendo 25%. O mesmo comportamento foi observado por Musazzi *et al.* (2019), que observou aumento significativo de espessura em filmes carregados com 30% ou mais de micropartículas. Ademais, os filmes carregados com própolis apresentam, de forma geral, maior espessura que os filmes carregados com sulfato de neomicina (comparando os filmes com as mesmas quantidades de micropartículas), embora de modo não significativo ($p > 0,05$).

3.5 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas das amostras são mostrados na Figura 27. As curvas mostradas para as amostras FA25N e FA25P são as médias das curvas das amostras FA25N1, FA25N2 e FA25N3; e FA25P1, FA25P2 e FA25P3, respectivamente. O difratograma do pó de alginato de sódio mostra picos largos em 13° e 22° e um halo amorfo em 40°, característicos do alginato (FONTES *et al.*, 2013; MOREIRA, 2014). Segundo Sundarrajan *et al.* (2012), o alginato de sódio, polímero precursor dos filmes produzidos, apresenta pico em 13,5°, referente a reflexão do grupo gurulonato, e em 22°, referente a reflexão do grupo manuronato, além de um halo amorfo em 39°.

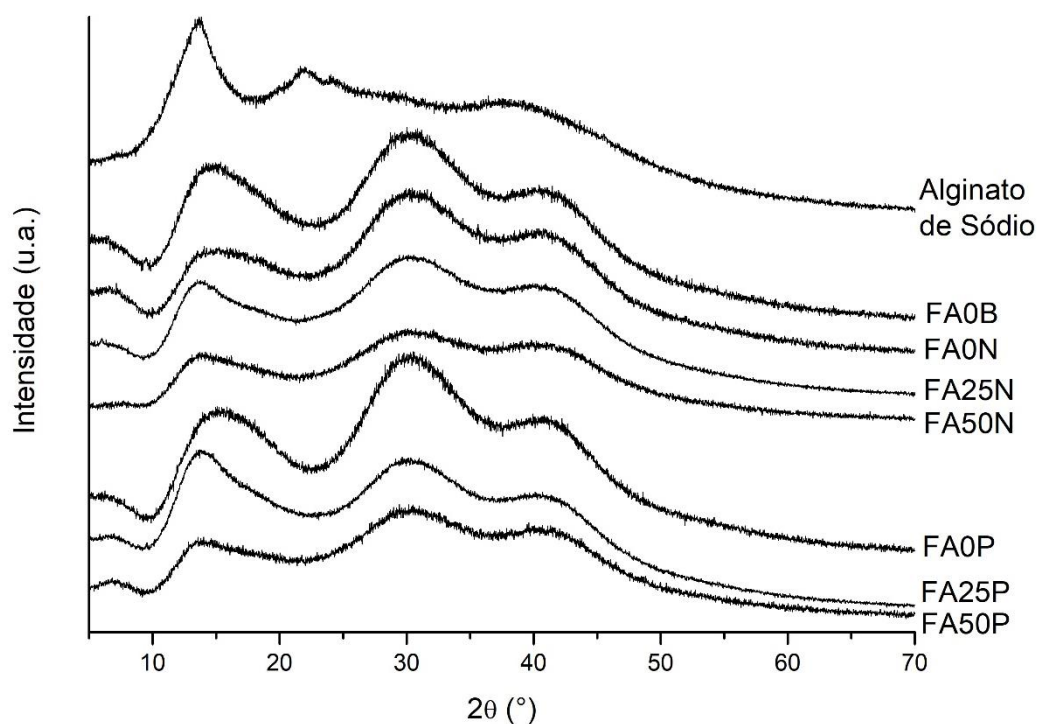


Figura 27 - Difratoograma das amostras e do pó de alginato de sódio.

O comportamento das amostras se modificou, quando comparados ao alginato de sódio. Todas as amostras apresentaram picos largos em 13°, 30° e 40°, indicando que houve interação entre o cálcio utilizado como reticulante com o alginato (FABIA; SLUSARCZYK; GAWLOWSKI, 2005). Com a adição de micropartículas, a intensidade dos picos diminuiu e as amostras tornaram-se mais amorfas (FABIA; SLUSARCZYK; GAWLOWSKI, 2005; SUNDARRAJAN *et al.*, 2012). Ao se adicionar fármaco nas amostras, sulfato de neomicina ou própolis, o comportamento dos difratogramas permaneceu o mesmo, provavelmente devido à baixa quantidade desses materiais presente nas amostras (CHUN *et al.*, 2004). Scatolini (2017) analisou amostras de extrato de própolis verde seco por DRX e observou característica amorfa, com um pico largo em 19,5°. Entretanto, esse pico não pôde ser observado nas amostras carregadas. De maneira semelhante, os picos característicos do sulfato de neomicina, em 19,5 e 23,6° (SCHEIDT, 2018) não aparecem nos difratogramas das amostras carregadas com esse fármaco.

3.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados obtidos na análise de FTIR para as amostras não carregadas, carregadas com sulfato de neomicina e com própolis são mostrados nas Figuras 28, 29 e 30,

respectivamente. Nelas estão incluídos, também, os espectros do alginato de sódio, do sulfato de neomicina e da própolis, utilizados para o preparo das amostras.

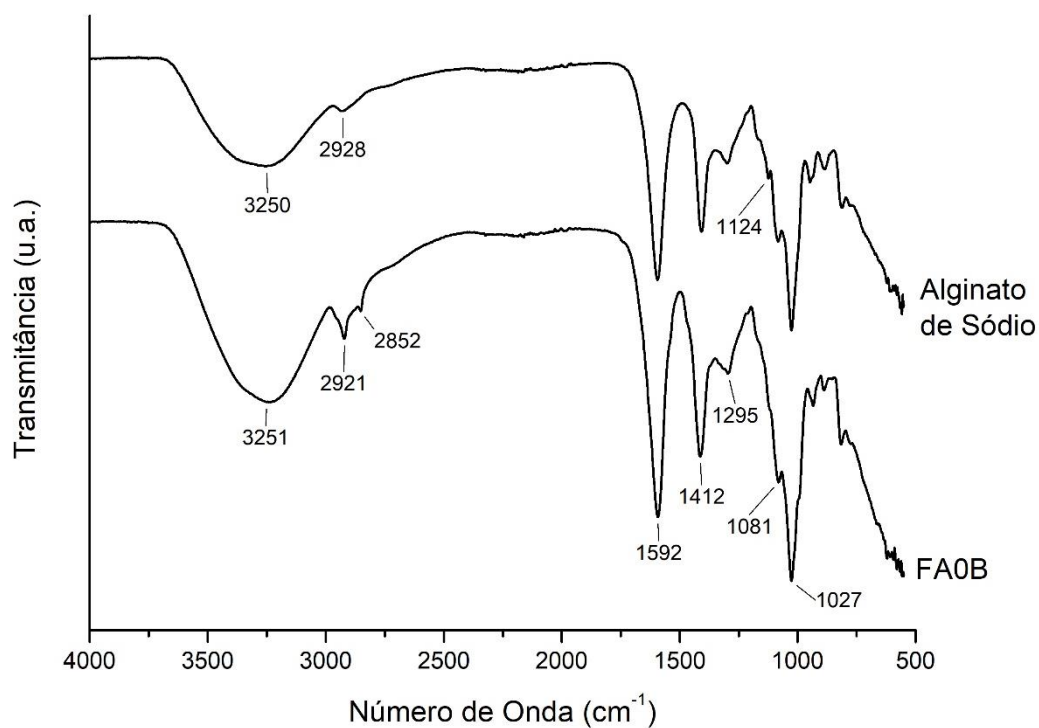


Figura 28 - Espectro de FTIR para o alginato de sódio e a amostra FA0B.

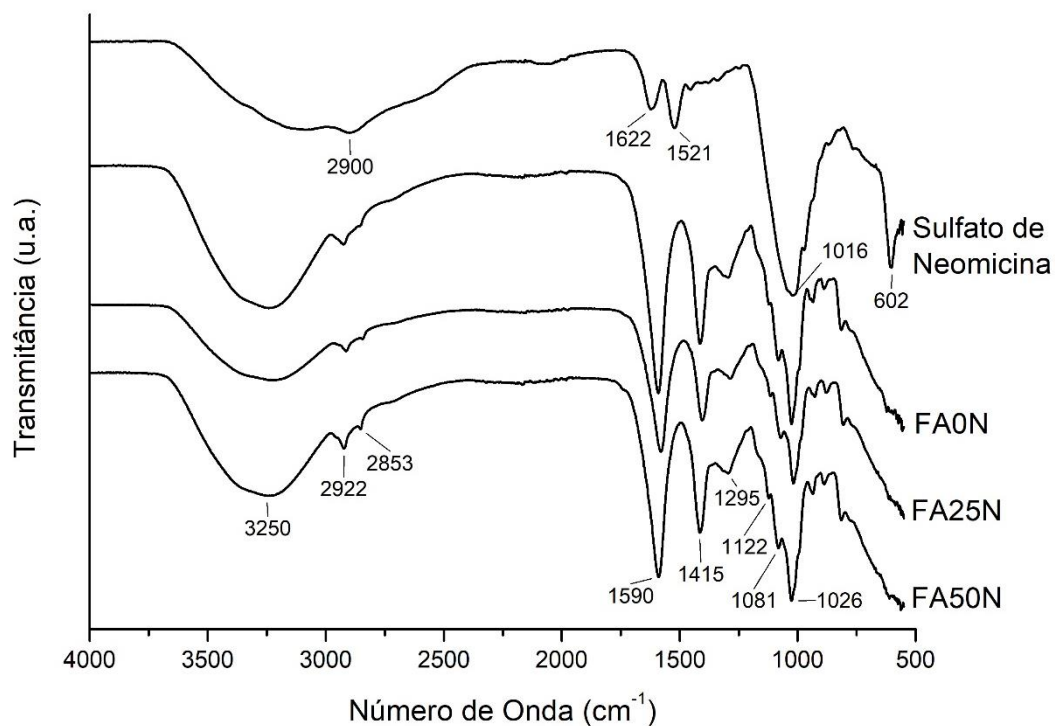


Figura 29 - Espectro de FTIR para o sulfato de neomicina e para as amostras FA0N, FA25N e FA50N.

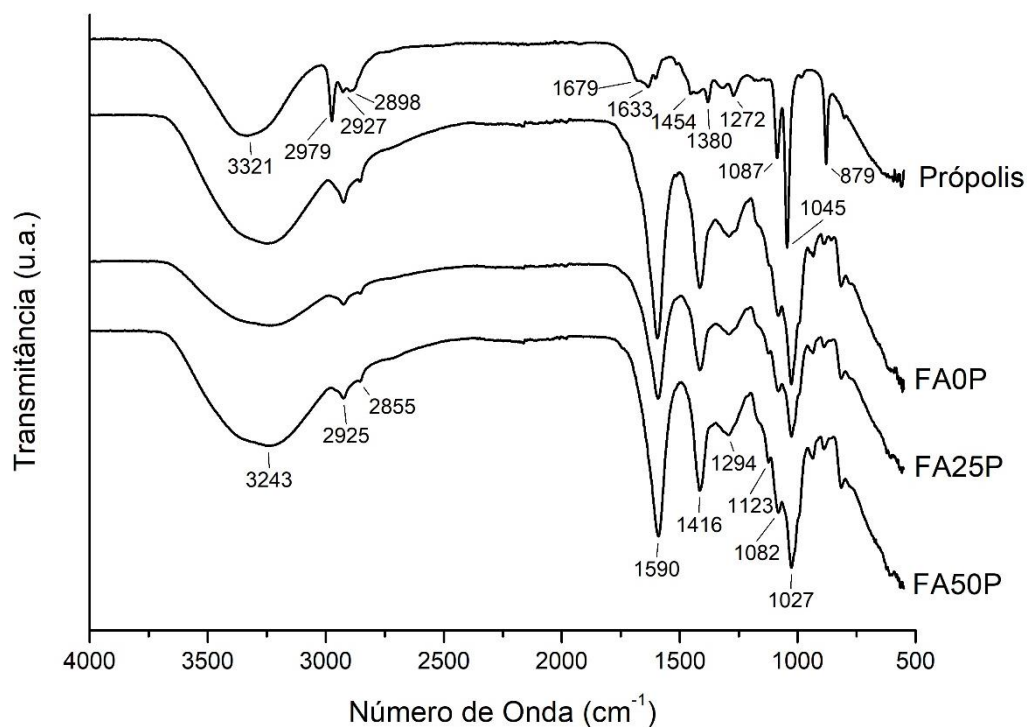


Figura 30 - Espectro de FTIR para a própolis e para as amostras FA0P, FA25P e FA50P.

Nos espectros de todas as amostras é possível perceber uma banda larga no comprimento de onda em torno de 3250 cm^{-1} . Essa banda sugere a presença de água nas amostras, o que condiz com o seu preparo (PATACA, 2016; FREITAS, 2018). Após a segunda etapa de reticulação, as amostras passam por uma etapa de secagem a temperatura ambiente, que não é capaz de retirar toda a água residual da estrutura dos filmes.

As bandas características do alginato de sódio e da amostra FA0B, assim como seus modos de vibração, estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Bandas (cm^{-1}) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de alginato de sódio e FA0B.

Alginato	FA0B	Modo de vibração	Referência
3250	3251	Estiramento de O-H	Papageorgiou et al. (2010); Paşcalău et al. (2012)
2928	2921, 2852	Estiramento de C-H	Papageorgiou et al. (2010); Paşcalău et al. (2012)
1594	1592	Estiramento axial de ligação COO- assimétrica	Papageorgiou et al. (2010); Paşcalău et al. (2012)
1406	1412	Estiramento axial de ligação COO- simétrica	Papageorgiou et al. (2010); Paşcalău et al. (2012)
1299	1295	Estiramento de CCH e OCH	Papageorgiou et al. (2010)
1124	-	Estiramento de C-O	Jaya; Durance; Wang (2009); Papageorgiou et al. (2010)
1079	1081	Estiramento de C-O-C em éter cíclico	Papageorgiou et al. (2010); Paşcalău et al. (2012)
1026	1027	Estiramento de C-O	Papageorgiou et al. (2010)
947	934	Estiramento de CO em ácido urônico (estrutura polissacarídica)	Jaya; Durance; Wang (2009); Papageorgiou et al. (2010)
884	889	Estiramento de C1-H em resíduos de ácido manurônico	Papageorgiou et al. (2010)
812	815	Resíduo de ácido manurônico	Papageorgiou et al. (2010)

Ao se comparar os espectros do alginato de sódio e do filme FA0B, pode-se perceber um pequeno deslocamento de algumas bandas características. As bandas presentes na amostra de alginato em 1594 cm^{-1} e 1406 cm^{-1} , referentes, respectivamente, ao estiramento axial de ligação COO^- assimétrica e simétrica foram deslocadas para 1592 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} no filme FA0B. Esse deslocamento indica uma diferente interação entre os íons Na^+ (presentes no alginato de sódio) e Ca^{2+} (presentes na amostra FA0B), e os íons carboxilato presentes na estrutura dos blocos M e G do alginato. Essa diferente interação indica que houve a substituição de íons Na^+ na estrutura polimérica dos filmes FA0B, por consequência da reticulação (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004).

Além do deslocamento nas bandas relativas ao íon carboxilato, houve um deslocamento também nas demais bandas do espectro, incluindo as bandas relativas aos resíduos de ácido manurônico, onde os comprimentos de onda em 884 e 812 cm^{-1} do alginato de sódio passaram para 889 e 815 cm^{-1} no filme FA0B. Em nenhum dos espectros foi detectada a presença do ácido algínico, que possui uma banda característica em torno de 1747 cm^{-1} (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004).

Na Figura 31 encontra-se uma comparação entre os espectros do alginato de sódio, do sulfato de neomicina e do filme FA0N, carregado com neomicina e sem a adição de micropartículas. Ao analisar o espectro da amostra FA0N e compará-lo com os espectros das amostras de alginato e de neomicina, é possível observar que não houve a formação de novas bandas, o que indica que não houve a formação de novas ligações químicas e que não ocorreu reação entre o sulfato de neomicina e o polímero. Além disso, é possível observar a presença de uma banda em 2859 cm^{-1} no espectro do filme FA0N e um aumento da intensidade das bandas em 1591 e 1413 cm^{-1} , quando comparadas com as bandas presentes no espectro do alginato, o que pode ser um indício da presença do sulfato de neomicina na estrutura dos filmes carregados com este fármaco. Além disso, há um leve deslocamento de algumas bandas nos filmes contendo neomicina para números de onda menores, quando comparados ao filme não carregado. Segundo Merlusca *et al.* (2017), a interação do sulfato de neomicina com matrizes poliméricas é responsável por esse deslocamento, sendo esse mais um indicativo da incorporação da neomicina nos hidrogéis/interação da neomicina com a matriz.

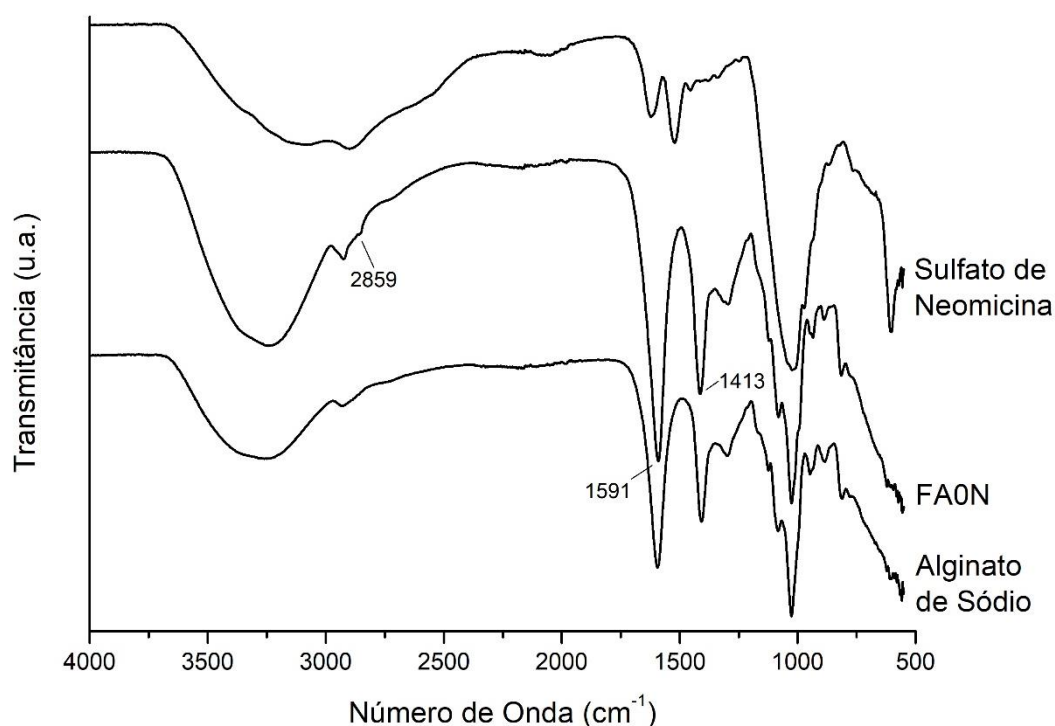


Figura 31 - Comparação entre os espectros de FTIR do alginato de sódio, do sulfato de neomicina e da amostra FA0N.

Na Tabela 9 se encontram listadas as bandas características do sulfato de neomicina e das amostras FA0N, FA25N e FA50N, assim como seus modos de vibração.

Tabela 9 - Bandas (cm⁻¹) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de sulfato de neomicina, FA0N, FA25N e FA50N.

FA0N	FA25N	FA50N	Sulfato de Neomicina	Modo de vibração	Referência
3252	3240	3250	3252	Estiramento de O-H, N-H e estiramento aromático de C-H; presença de moléculas de água coordenada.	Swathi et al. (2013); Anjali et al. (2016); Freitas (2018); Supriya et al. (2018)
2925, 2859	2914, 2844	2922, 2853	2900	Estiramento de C-H e C-H aromático; estiramento simétrico e assimétrico de C-H do grupo metileno	Anjali et al. (2016); Freitas (2018); Scheidt (2018); Supriya et al. (2018)
-	-	-	2069		
1591	1580	1590	1622	Estiramento de N-H e C-O; deformação angular das moléculas de H ₂ O	Anjali et al. (2016); Freitas (2018); Scheidt (2018)
-	-	-	1521	Estiramento de C-C e C-N	Swathi et al. (2013); Anjali et al. (2016); Freitas (2018); Scheidt (2018)
1413	1403	1415	1455		
1295	1286	1295	-	Estiramento de C-N	Swathi et al. (2013)
1121	1115	1122	-	Estiramento de C-O presentes em éter	Scheidt (2018)
1081	1071	1081	-	Estiramento de C-O	Swathi et al. (2013); Anjali et al. (2016); Freitas (2018); Supriya et al. (2018)
1026	1018	1026	1016		
936	927	936	-		
889	879	887	871		
815	806	815	-	Resíduo de ácido manurônico	Papageorgiou et al. (2010)
-	-	-	602	Estiramento de N-H fora do plano	Scheidt (2018)

Uma comparação entre os espectros do alginato de sódio, da própolis e do filme FA0P, carregado com própolis e sem a adição de micropartículas, pode ser observada na Figura 32.

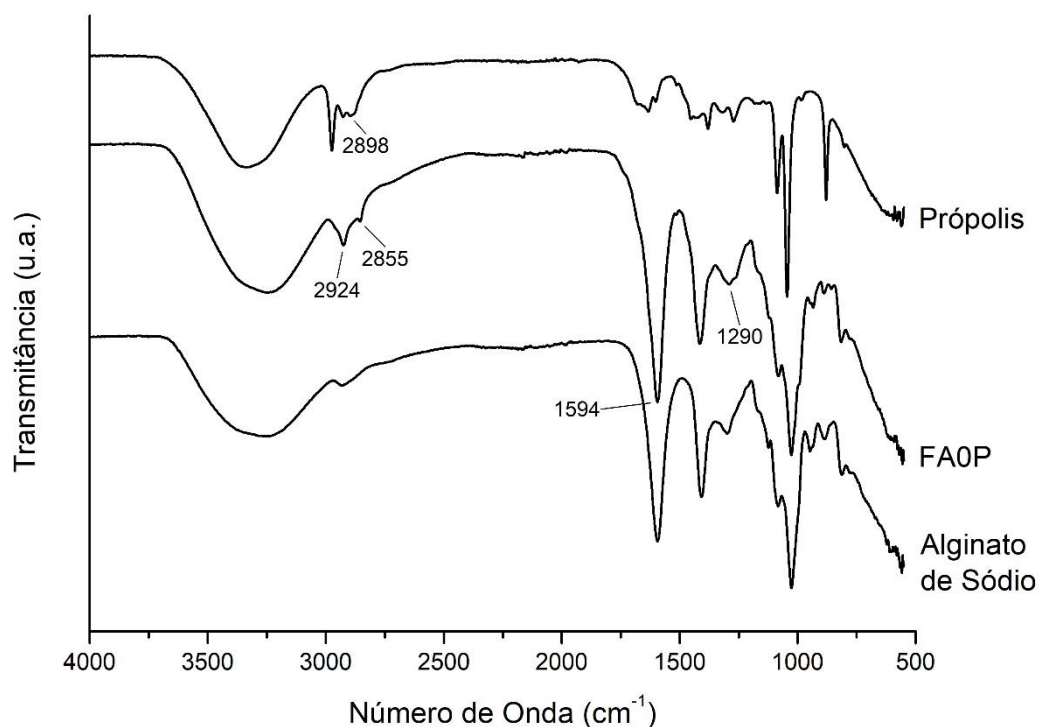


Figura 32 - Comparação entre os espectros de FTIR do alginato de sódio, da própolis e da amostra FA0P.

Ao comparar os espectros de FTIR da amostra FA0P com os espectros do alginato e da própolis é possível perceber que não houve a formação de novas bandas, o que indica que também não houve reação química entre o alginato de sódio e os componentes da própolis. Além disso, é possível verificar a existência da banda em 2855 cm^{-1} na amostra FA0P, presente na própolis em 2898 cm^{-1} , que não se encontra presente no alginato de sódio. Essa banda está presente também nas demais amostras contendo própolis, o que sugere a presença de componentes da própolis nas amostras carregadas com esse ativo. Além disso, na amostra FA0P (e nas demais amostras contendo própolis, com leve deslocamento) há a presença de bandas em 2924 cm^{-1} , referente a presença de grupos aromáticos; em 1594 cm^{-1} (sobreposta a banda do alginato), referente a presença de flavonoides; e em 1290 cm^{-1} , referente a presença de polióis. Scatolini (2017) estudou amostras de hidroxiapatita contendo própolis e atribuiu a presença de bandas em 2929 , 1606 e 1257 cm^{-1} à incorporação da própolis nas amostras e à presença de anéis aromáticos, ácidos fenólicos e flavonóides. Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) estudaram filmes de quitosana contendo própolis e atribuíram a presença de bandas em 2930 , 1647 e 1257 cm^{-1} à presença de compostos fenólicos incorporados ao material. Portanto, a presença das bandas descritas anteriormente como resultado desta análise sugere que houve a incorporação da própolis nos hidrogéis. Por fim, na Tabela 10 estão listadas as bandas e respectivos modos de vibração da própolis e das amostras FA0P, FA25P e FA50P.

Tabela 10 - Bandas (cm⁻¹) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de própolis, FA0P, FA25P e FA50P (continua).

FA0P	FA25P	FA50P	Própolis	Modo de vibração	Referência
3243	3240	3243	3321	Estiramento axial de O-H em fenóis e álcoois; estiramento de N-H; presença de água	Gatea et al. (2015); Oliveira et al. (2016); Pataca (2016)
-	-	-	2979	Estiramento axial de C-H em aromáticos	Scatolini (2017)
2925, 2855	2924, 2855	2925, 2855	2927, 2898	Estiramento axial C-H em alcanos e aldeídos; estiramento axial de C-H em grupos alifáticos; presença de etanol	Sharaf, Higazy, Hebeish (2013); Gatea et al. (2015); Oliveira et al. (2015); Scatolini (2017)
-	-	-	1679	Estiramento axial de C=O	Sharaf, Higazy, Hebeish (2013)
1594	1591	1590	1633	Estiramento axial de C=C em deformações de anéis aromáticos, flavonóides e aminoácidos; estiramento axial de C=O e C=C; estiramento angular assimétrico de N-H; presença de água	Oliveira et al. (2015); Pataca (2016)
-	-	-	1602		
-	-	-	1513	Estiramento axial de C-C em grupos aromáticos	Gatea et al. (2015)
-	-	-	1454	Estiramento angular de C-H e estiramento axial de grupos aromáticos e flavonoides	Oliveira et al. (2015)
1415	1415	1416	1424, 1380	Estiramentos que confirmam o pico de hidrocarbonetos na região de 2950-2840 cm ⁻¹	Gatea et al. (2015)
-	-	-	1318		
1290	1291	1294	1272	Estiramento de C-O em polióis	Oliveira et al. (2015)
1118	1124	1123	-		
1082	1082	1082	1087	Estiramento de C-O em ésteres; presença de álcoois secundários	Oliveira et al. (2015)

Tabela 10 - Bandas (cm^{-1}) presentes no espectro de FTIR e seus respectivos modos de vibração para as amostras de própolis, FA0P, FA25P e FA50P (continuação).

FA0P	FA25P	FA50P	Própolis	Modo de vibração	Referência
1027	1026	1027	1045	Presença de álcoois primários	Pataca (2016)
935	935	936	985	Estiramento de C-H fora do plano	Gatea et al. (2015)
888	888	888	879	Estiramento em anéis aromáticos; presença de etanol	Oliveira et al. (2015)
858	864	-	-		
816	815	815	-	Resíduo de ácido manurônico	Papageorgiou et al. (2010)
777	774	781	802		

3.7 Grau de intumescimento, fração gel e perda de massa

O grau de intumescimento das amostras é mostrado na Figura 33, onde as barras de erro foram calculadas considerando um intervalo de confiança de 95%.

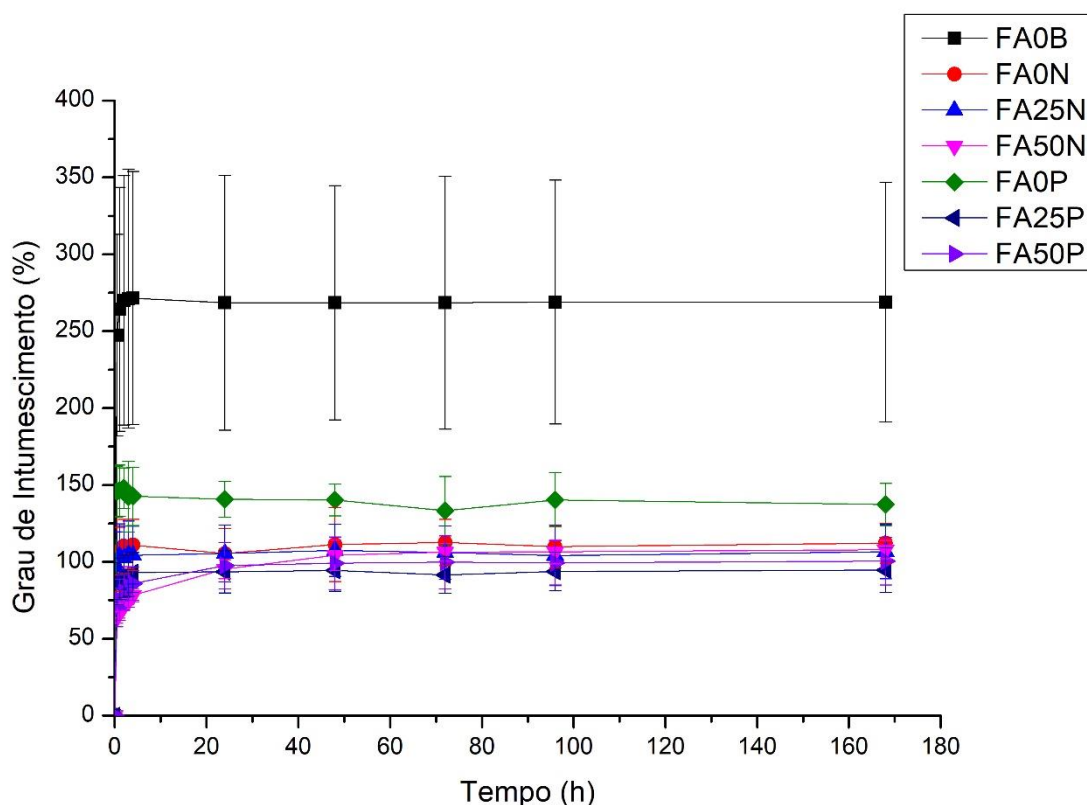


Figura 33 - Grau de intumescimento das amostras.

O grau de intumescimento da amostra FA0B, branco, em todos os tempos, foi consideravelmente maior do que o grau de intumescimento das demais amostras. Isso se deve ao fato de que, durante o ensaio, moléculas de água têm maior facilidade de se difundir entre

as cadeias de alginato quando as mesmas estão ligadas apenas por íons cálcio (agente reticulante) e quando possuem apenas glicerol como agente plastificante em sua estrutura. Ao se adicionar um novo componente, como o sulfato de neomicina ou a própolis, novas moléculas se encontram no caminho em que as moléculas de água deveriam percorrer para preencher os espaços entre as cadeias de alginato. Esse resultado mostra que os filmes foram carregados com fármacos com sucesso (OTTENBRITE; PARK; OKANO, 2010; LEE, MOONEY, 2012).

Ao se analisar o grau de intumescimento das amostras no equilíbrio, após 162 horas de ensaio, e ao realizar uma análise ANOVA e Teste de Tuckey para médias, é possível perceber que o grau de inchamento no equilíbrio (GIE) da amostra FA0B é significativamente diferente do grau de inchamento no equilíbrio das demais amostras ($p < 0,05$). Por outro lado, não há diferença significativa entre o GIE das demais amostras, carregadas com sulfato de neomicina ou própolis e contendo ou não micropartículas, com exceção da amostra FA0P, quando comparada com as demais amostras contendo própolis. Lima *et al.* (2016) estudaram hidrogéis de PVA carregados com própolis e obtiveram resultados semelhantes em um ensaio de intumescimento, onde as amostras carregadas com própolis mostraram um GIE menor do que da amostra não carregada. Os autores relacionam este resultado à interação da própolis com a matriz polimérica e ao aumento das interações intermoleculares, que dificultam a entrada de água entre as cadeias. Além disso, os resultados do FTIR (Figuras 31 e 32) mostraram que não houve ligação química entre a neomicina ou a própolis e o alginato. Esses materiais podem ter se depositado nos poros dos hidrogéis, ocupando o espaço livre que a água ocuparia durante o ensaio de intumescimento (SANDEEP; HARIKUMAR; KANUPRIYA, 2012).

O grau de intumescimento das amostras carregadas com sulfato de neomicina é mostrado na Figura 34, onde as barras de erro foram calculadas considerando um intervalo de confiança de 95%.

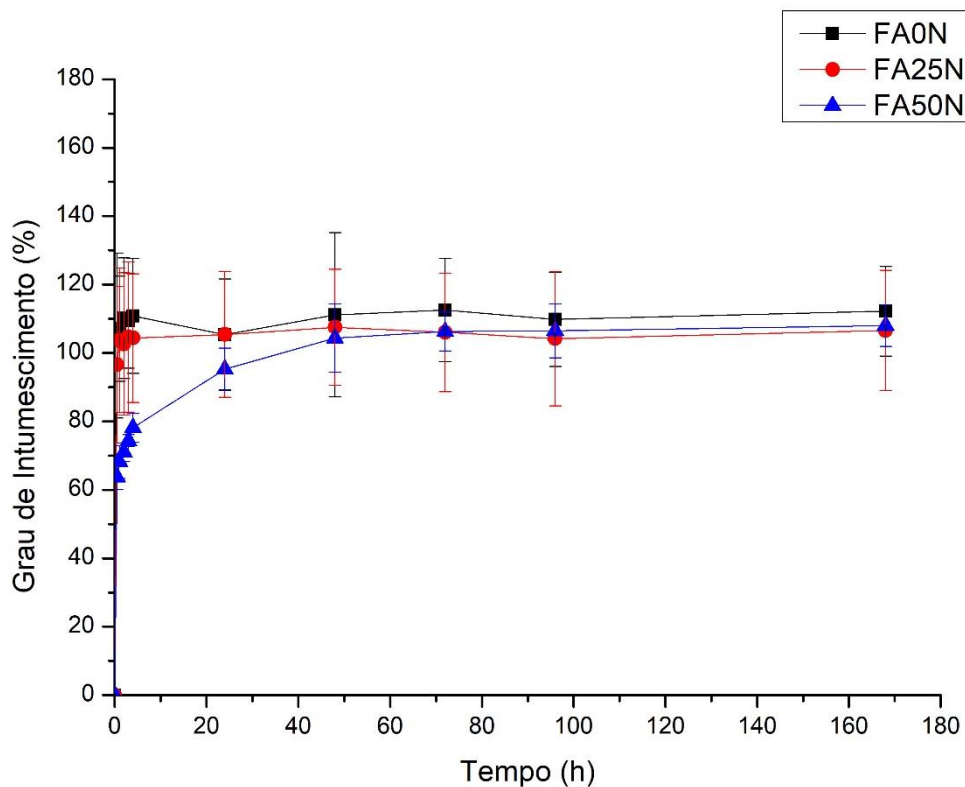


Figura 34 - Grau de intumescimento das amostras carregadas com sulfato de neomicina.

No início do experimento, a amostra com maior grau de intumescimento foi a FA0N, sem a adição de micropartículas em sua formulação. Em seguida, se encontrava a amostra FA25N e, por último, a amostra FA50N. Esse resultado sugere que a presença de micropartículas nos filmes gera uma dificuldade da difusão de moléculas de água nos filmes, quando comparados aos filmes com uma menor quantidade de micropartículas. Essa dificuldade se deve à maior concentração de reticulações nas micropartículas, unindo as cadeias de alginato e gerando menos espaços disponíveis para a absorção de água, resultado em um menor grau de intumescimento nas amostras com maior quantidade de micropartículas (OTTENBRITE; PARK; OKANO, 2010). Entretanto, ao passar do tempo de ensaio, a água é capaz de superar a barreira que as micropartículas geram na difusão e essa diferença deixa de ser significativa. No equilíbrio, todas as amostras passam a ter grau de intumescimento em torno de 100%.

O grau de intumescimento das amostras carregadas com própolis é mostrado na Figura 35, onde as barras de erro foram calculadas considerando um intervalo de confiança de 95%. Assim como nas amostras carregadas com sulfato de neomicina, nos momentos iniciais da análise a amostra sem adição de micropartículas apresentou um maior grau de intumescimento, seguida pela amostra contendo 25% e pela amostra contendo 50% de

micropartículas. Entretanto, o comportamento das amostras contendo 25 e 50% de micropartículas é estatisticamente o mesmo ($p > 0,05$).

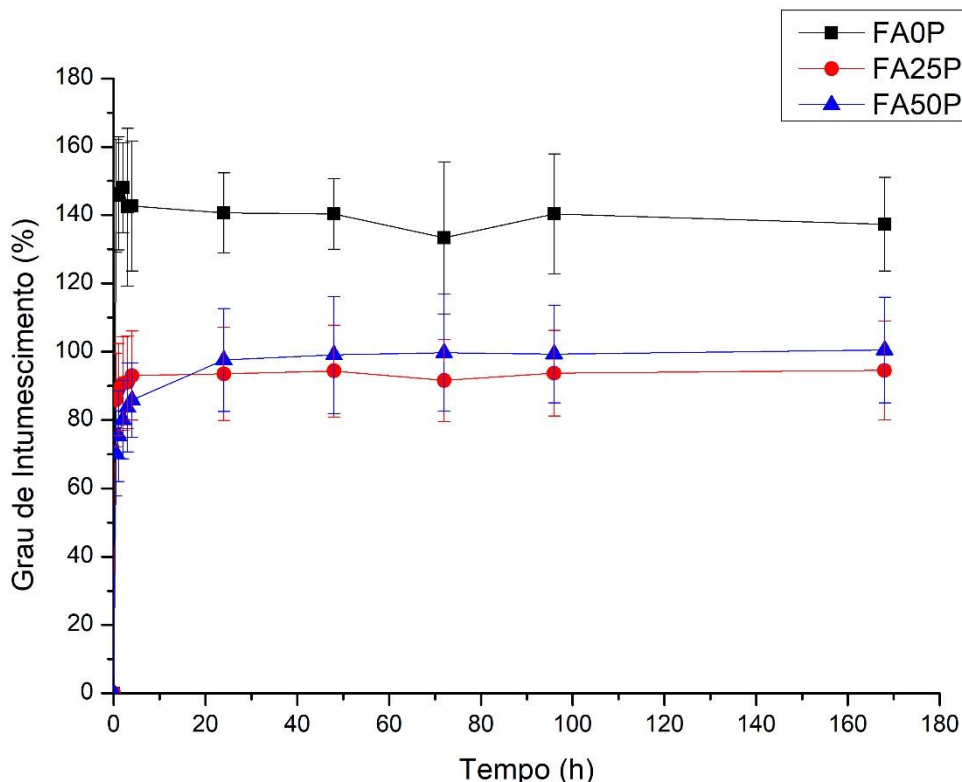


Figura 35 - Grau de intumescimento das amostras carregadas com própolis.

Após os minutos iniciais do ensaio, a amostra FA0P continuou com um grau de intumescimento superior aos das amostras FA25P e FA50P. Essa diferença pode acontecer devido à liberação mais rápida da própolis carregada na amostra sem micropartículas, que era esperada por conta da menor reticulação da matriz polimérica, quando comparada com os filmes contendo micropartículas. Assim, a água é capaz de preencher espaços entre as cadeias de alginato, antes ocupadas pelas moléculas que compõem a própolis (LEE; MOONEY, 2012). Quando comparadas as amostras FA0N e FA0P, pode-se observar que o sulfato de neomicina apresenta afinidade maior com alginato do que a própolis, que leva a uma liberação mais lenta do fármaco/intumescimento mais lento. Além disso, um maior volume de própolis foi adicionado a amostra FA0P, quando comparado a quantidade de neomicina adicionada a amostra FA0N. A própolis possui composição variada (JULIANO; PALA; COSSU, 2007) e é possível que seus componentes possam interferir com a reação de reticulação, o que não aconteceria no caso das amostras carregadas com neomicina. Ao final do ensaio, o grau de

intumescimento da amostra FA0P foi de 137% enquanto que das amostras FA25P e FA50P, foram em torno de 100%.

A fração gel e a perda de massa das amostras ao final do ensaio são mostradas na Figura 36.

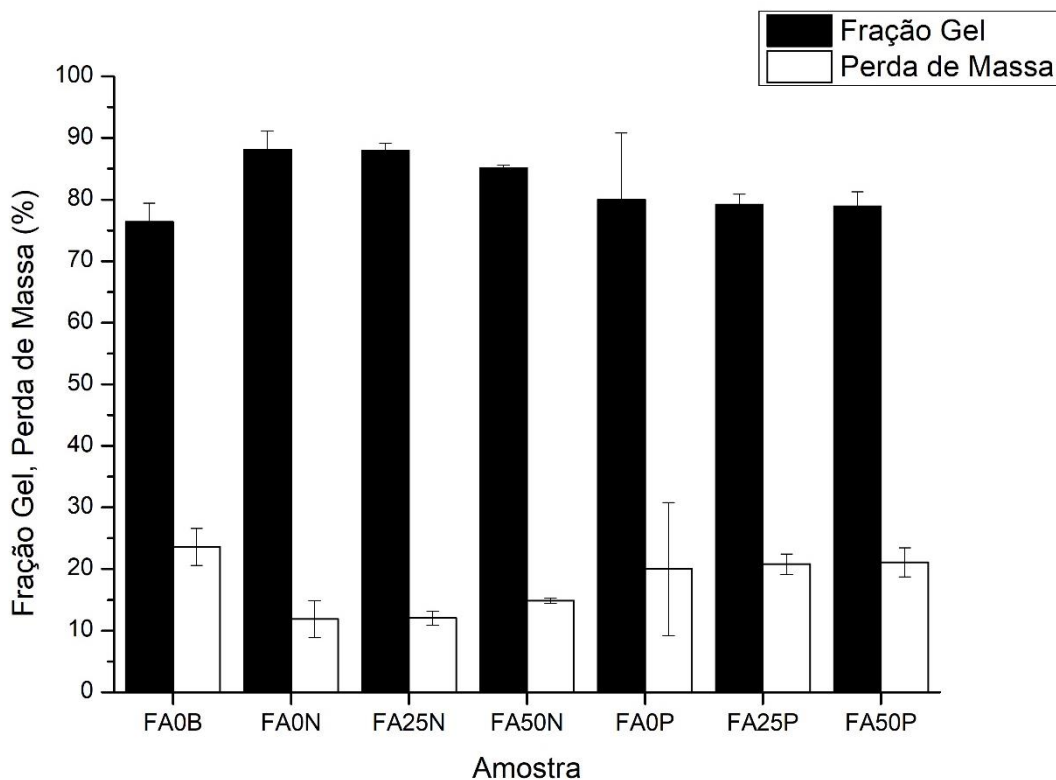


Figura 36 - Fração gel e perda de massa das amostras.

Para amostras não carregadas com fármaco, a fração gel está diretamente ligada a quantidade de reticulações e enovelamento de cadeias amorfas presentes na matriz polimérica. Quanto maior o grau de reticulação do hidrogel, maior é a fração gel esperada (OTTENBRITE; PARK; OKANO, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Entretanto, para amostras carregadas, não é possível fazer essa comparação direta, pois, além do agente reticulante, o fármaco também pode interagir com a cadeia polimérica, o que geraria maior ancoramento de cadeias e aumento da fração gel (LEE; MOONEY, 2012). Além disso, segundo Patel *et al.* (2016), amostras com maior grau de reticulação apresentam maior probabilidade de aprisionar fármacos em sua estrutura tridimensional, o que causaria um aumento ainda maior no grau de reticulação do hidrogel caso a interação fosse efetiva. Nesse caso, amostras com mais reticulações, ou seja, maior quantidade de partículas adicionadas, seriam capazes de aprisionar maior quantidade de fármaco em sua estrutura.

A amostra FA0B (branco) apresenta a menor fração gel dentre as amostras estudadas. Ao carregar as amostras com sulfato de neomicina, é possível perceber um aumento na fração gel. Ao se adicionar própolis, também há um aumento da fração gel das amostras, embora não significativo ($p > 0,05$), o que indica que os fármacos adicionados interagem com as cadeias poliméricas, e que a interação entre o polímero e o sulfato de neomicina é maior que a interação entre o polímero e a própolis. A análise de FTIR mostrou que há um aumento de intensidade das bandas em 1592 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} , relativas a reticulação do alginato, nas amostras contendo neomicina, sugerindo que nessas amostras a reticulação foi mais efetiva.

A perda de massa está relacionada com a degradação hidrolítica dos géis e com a liberação da substância ativa (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Ao analisar as amostras carregadas com fármaco e comparando amostras com a mesma quantidade de micropartículas, é possível perceber que as amostras carregadas com sulfato de neomicina apresentam perda de massa menor do que as amostras carregadas com própolis ($p < 0.05$). Dessa forma, é esperado que as amostras contendo sulfato de neomicina tenham uma liberação de fármaco menor do que as amostras contendo própolis.

3.8 Permeação microbiana

A montagem do experimento de permeação microbiana é mostrada na Figura 37. Nele estão presentes os tubos contendo meio de crescimento fechados com as amostras branca, contendo neomicina ou própolis, que foram fixadas com fita adesiva e tubos controle positivo, aberto para o ambiente, e negativo, selado e tampado.



Figura 37 - Montagem do experimento de permeação microbiana.

Após 7 dias de ensaio, todos os tubos que foram selados com as amostras permaneceram sem crescimento visível de colônias microbianas ou mudanças na turbidez do meio. O controle negativo também permaneceu sem mudanças. Por outro lado, um dos tubos abertos ao ambiente apresentou o crescimento de uma colônia fúngica compacta. Após 14 dias, todas os tubos fechados com as amostras e o controle negativo permaneceram sem mudanças na turbidez ou crescimento aparente. Os dois tubos controle apresentaram crescimento de colônia e aumento da turbidez do meio. Após 21 dias, assim como nas análises anteriores, apenas nos tubos controle positivo estavam presentes colônias de microrganismos e turbidez superior ao controle negativo. Ao final do ensaio, após 28 dias, houve aumento da turbidez do meio nos tubos controle positivo e os demais tubos permaneceram sem crescimento (Figura 38). O crescimento microbiano nos tubos controle ao longo do tempo de ensaio pode ser observado na Figura 39.



Figura 38 - Resultados do crescimento microbiológico, após exposição de 28 dias, (a) das amostras e (b) do controle negativo.

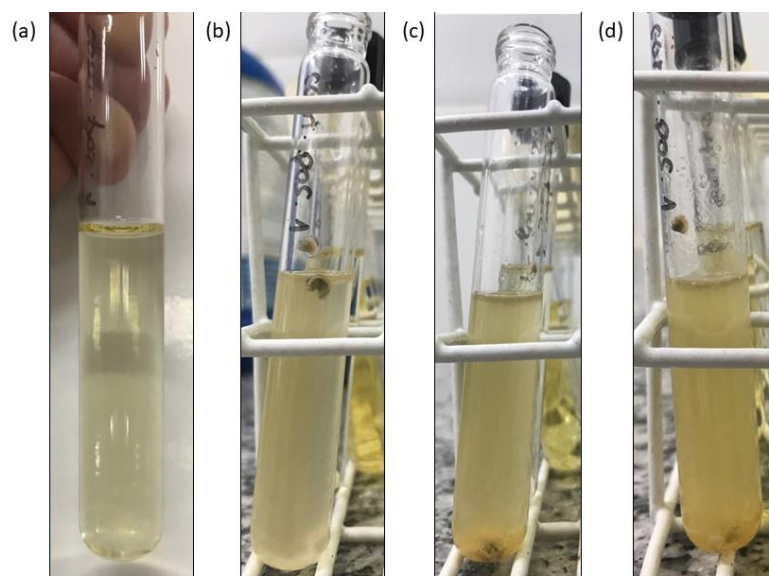


Figura 39 - Resultados do crescimento microbiano da amostra controle positivo após exposição de (a) 7 dias, (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 28 dias.

Todas amostras preparadas, incluindo a amostra FA0B, sem a presença de fármaco, agiram como uma barreira para entrada de microrganismos nos tubos. Apesar de o alginato não apresentar propriedades antimicrobianas quando utilizado sem a adição de fármacos, a amostra FA0B também agiu como uma barreira física para entrada de microrganismos, gerada, provavelmente, pela sua estrutura tridimensional. Além disso, a alta capacidade de absorção desses hidrogéis, verificada pelo seu grau de intumescimento, auxilia na minimização da infecção bacteriana da úlcera (JONES; VAUGHAN, 2005; LEE; MOONEY, 2012). Dessa forma, os filmes preparados, carregados ou não, podem reduzir o risco de uma

segunda contaminação microbiana nas úlceras (SINGH; PAL, 2012). Entretanto, filmes sem a adição de fármacos podem não ser eficientes no combate a infecções primárias das úlceras.

3.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

Foi realizada análise termogravimétrica das amostras e os resultados são mostrados na Figura 40 e na Tabela 11. As curvas das amostras FA25N e FA25P mostradas são referentes às médias das curvas obtidas para as amostras FA25N1, FA25N2 e FA25N3; e FA25P1, FA25P2 e FA25P3, respectivamente. A degradação completa do alginato de sódio ocorre após 600°C (SOARES *et al.*, 2004). Entretanto, a análise foi realizada apenas na faixa de 25 a 450°C e os resíduos de massa dispostos na Tabela 11 são referentes ao resíduo a 450°C.

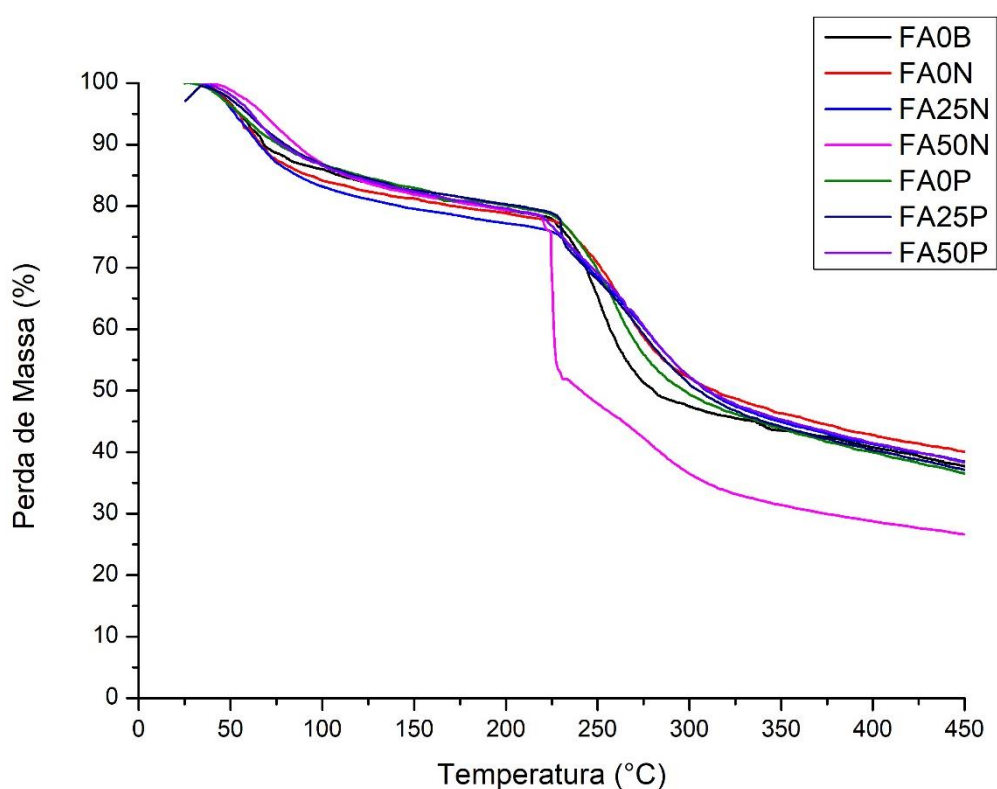


Figura 40 - Curvas da análise termogravimétrica para as amostras FA0B, FA0N, FA25N, FA50N, FA0P, FA25P e FA50P.

Tabela 11 - Temperaturas e perdas de massa referentes à degradação térmica das amostras.

Amostra	1ª etapa de degradação		2ª etapa de degradação		Resíduo (%)
	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	
FA0B	38,9 - 225,7	21,8	225,7 - 450	40,5	37,7
FA0N	39,16 - 229,5	23,1	229,5 - 450	36,8	40,1
FA25N1	31,8 - 222,5	23,8	222,5 - 450	33,0	43,2
FA25N2	38,2 - 231,1	24,2	231,1 - 450	38,1	37,7
FA25N3	38,3 - 227,9	24,2	227,9 - 450	35,3	40,5
FA50N	42,4 - 219,6	21,9	219,6 - 450	51,3	26,8
FA0P	34,8 - 225,7	21,3	225,7 - 450	41,9	36,8
FA25P1	33,7 - 230,3	24,7	230,3 - 450	37,8	37,5
FA25P2	39,4 - 225,2	19,3	225,2 - 450	40,3	40,4
FA25P3	44,8 - 228,6	20,3	228,6 - 450	45,6	34,1
FA50P	39,48 - 218,5	21,6	218,5 - 450	39,9	38,5

Ao analisar a Figura 40, pode-se perceber que todas as amostras, com exceção da amostra FA50N, apresentam curvas de degradação térmica semelhantes, que se sobrepõem. Entretanto, mesmo com a diferença entre a curva da amostra FA50N e das demais amostras, suas temperaturas de degradação são semelhantes, como é mostrado na Tabela 11. Segundo uma análise ANOVA, realizada utilizando o planejamento experimental com triplicata no ponto central, a adição de fármaco nas amostras não foi um fator importante para a degradação. Entretanto, a quantidade de micropartículas influenciou a primeira temperatura de degradação das amostras. Com o aumento da quantidade de partículas, houve um aumento da primeira temperatura de degradação, especialmente nas amostras contendo própolis ($p < 0,05$). Essa temperatura está relacionada com a desidratação das amostras (SOARES *et al.*, 2004). Segundo Patel *et al.* (2016), que estudou partículas de alginato preparadas com diferentes concentrações de agente reticulante para a liberação de fármaco, a quantidade de reticulações presentes na amostra influencia sua estabilidade térmica. Mais reticulações geram amostras mais estáveis termicamente. Portanto, a maior estabilidade térmica de amostras de alginato de cálcio com maior quantidade de micropartículas, que provavelmente possuem mais reticulações que a solução filmogênica, está relacionada com a quantidade de reticulações presentes.

A segunda etapa de degradação, que corresponde à decomposição do alginato, não foi significativamente influenciada pela adição de micropartículas ou de fármacos ($p > 0,05$). Essa etapa foi responsável por cerca de 40% da perda de massa das amostras. A degradação térmica da própolis ocorre em temperaturas a partir de 81,7°C (NASCIMENTO *et al.*, 2016) e a degradação térmica do sulfato de neomicina ocorre a partir de 94,9°C (NUGRAHANI;

MIN, 2015), ambas temperaturas referentes à desidratação dos materiais. Não foi possível perceber influência da degradação desses componentes na análise das amostras, provavelmente, devido ao baixo teor dos mesmos na matriz polimérica.

3.10 Ensaio de Tração (Tensão e deformação na ruptura)

Com os dados obtidos no ensaio de tração, foram plotadas as curvas de tensão versus deformação das amostras, Figuras 41 (amostras contendo sulfato de neomicina e branco) e 42 (amostras contendo própolis e branco). As curvas mostradas para as amostras FA25N e FA25P são as médias das curvas obtidas para as amostras FA25N1, FA25N2 e FA25N3; e das amostras FA25P1, FA25P e FA25P3, respectivamente. As barras de erro foram calculadas considerando intervalo de confiança de 95%.

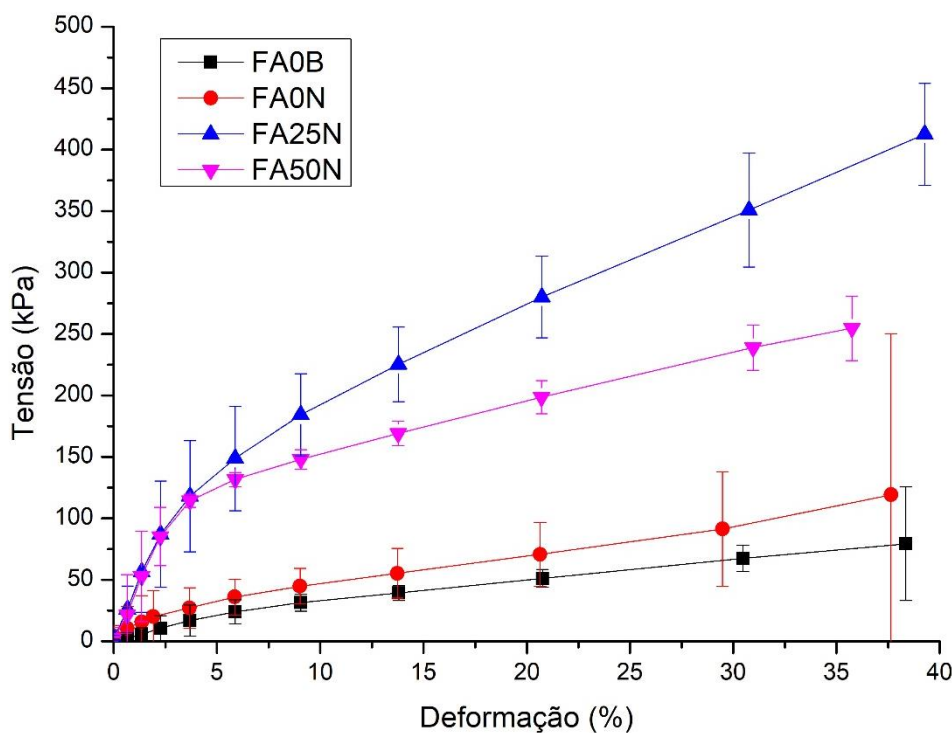


Figura 41 - Curva de tensão versus deformação para as amostras FA0B, FA0N, FA25N e FA50N.

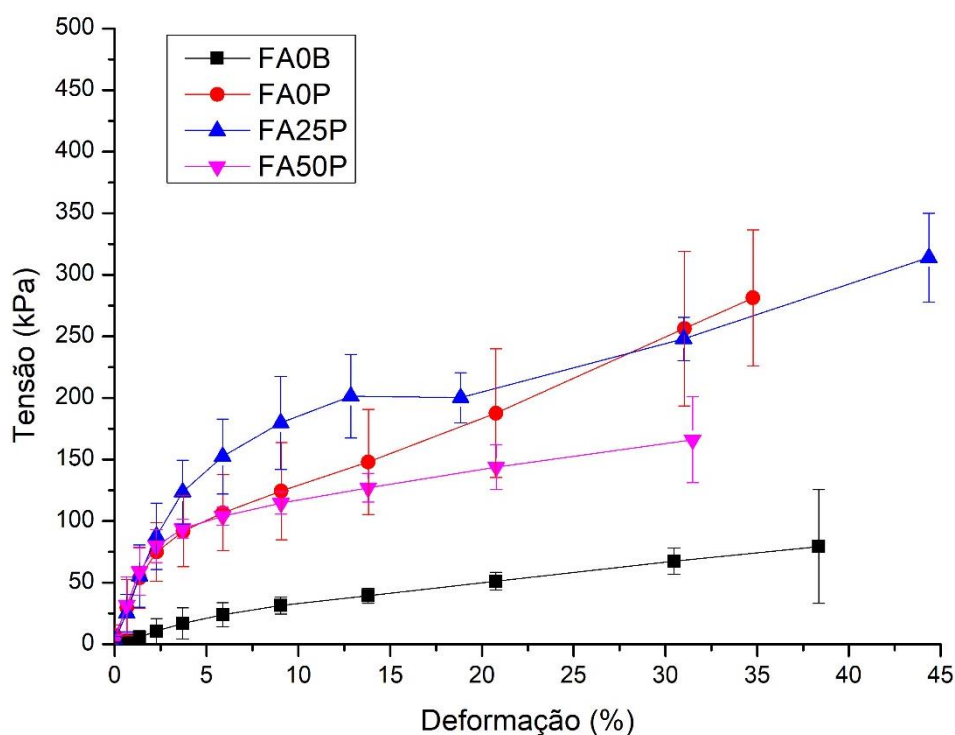


Figura 42 - Curva de tensão versus deformação para as amostras FA0B, FA0P, FA25P e FA50P.

Ao observar as curvas é possível perceber um aumento das propriedades mecânicas de todos os filmes carregados quando comparados ao branco, com exceção da amostra FA0N. Ao adicionar micropartículas e fármaco, foi observado um aumento na fração gel das amostras (Figura 36). É esperado que com o aumento do grau de reticulação das amostras, pela adição de maior quantidade de micropartículas, a resistência mecânica dos filmes aumente. Isso pode ser explicado pela formação da estrutura de “egg-box” do alginato, que confere maior estabilidade ao hidrogel (COSTA *et al.*, 2018). Além disso, as micropartículas e os fármacos adicionados poderiam ancorar as cadeias, ou mesmo alterar o enovelamento, tornando os filmes mais resistentes à tração. A partir dessas curvas, foram obtidos o módulo de Young (medido em 1,3% de deformação) e valor da tensão na ruptura (Tabela 12). Os desvios encontrados foram calculados considerando um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 12 - Tensão na ruptura e módulo de Young para as amostras.

Amostra	Tensão na ruptura (kPa)	Módulo de Young (kPa)
FA0B	74,93 ± 21,18	4,30 ± 3,88
FA0N	105,10 ± 66,13	11,59 ± 15,82
FA25N	412,48 ± 41,36	39,75 ± 18,37
FA50N	254,68 ± 26,27	41,78 ± 24,40
FA0P	281,19 ± 55,37	40,84 ± 18,53
FA25P	256,98 ± 40,15	39,13 ± 27,29
FA50P	166,11 ± 34,89	43,70 ± 14,37

O módulo de elasticidade não se apresentou como um parâmetro significativamente diferente em nenhum dos filmes, provavelmente devido ao grande erro calculado ($p > 0,05$). Apesar disso, é possível perceber um aumento do módulo de elasticidade com a adição de micropartículas nos filmes contendo neomicina (FA25N e FA50N) e com a adição de micropartículas e própolis nos filmes contendo própolis (FA0P, FA25P e FA50P). Nos filmes carregados com sulfato de neomicina, a adição de micropartículas nos filmes gera um aumento significativo no valor da tensão na ruptura dos filmes. Entretanto, maior adição de micropartículas (filme FA50N), acarreta diminuição da resistência. Para os filmes carregados com própolis, os filmes sem partículas são significativamente mais resistentes que o FA50P ($p < 0,05$). No caso do filme FA50P, uma vez que a adição de muitas partículas (alta área superficial) pode por capilaridade acarretar envolvimento das partículas por matriz, a quantidade de matriz entre partículas é menor, diminuindo a resistência das mesmas, como observado no MEV.

Ao analisar o comportamento das curvas obtidas para as amostras carregadas com sulfato de neomicina, pode-se observar que a amostra FA0N, que não possui micropartículas em sua estrutura, apresenta um comportamento semelhante, e estatisticamente igual, ao comportamento do filme não carregado, FA0B. Ao se adicionar micropartículas em sua estrutura, o comportamento das amostras frente à tração se modificou. No início do ensaio, as duas amostras carregadas com micropartículas apresentaram um comportamento semelhante e, como consequência, um módulo de elasticidade semelhante. Ao longo do ensaio esse comportamento se modifica, são obtidas tensões na ruptura distintas para cada amostra (Tabela 12). Entretanto, ao se adicionar mais partículas, como na amostra FA50N, o excesso de micropartículas, juntamente à presença do fármaco, acarretou em uma diminuição da tensão suportada pelo material até a ruptura.

O comportamento dos filmes carregados com própolis foi diferente do comportamento dos filmes contendo sulfato de neomicina. Para esses filmes, a adição da própolis foi suficiente para aumentar as propriedades mecânicas dos filmes, quando comparados ao branco. É provável que a própolis interaja com as cadeias do alginato de forma a funcionar como um impedimento à reticulação, atuando como plastificante e deixando as cadeias livres para escoarem quando submetidas à tração. Esse comportamento pode ser observado nos resultados do FTIR, onde há uma diminuição da intensidade das bandas relativas a reticulação do alginato, em 1592 e 1412 cm^{-1} , nas amostras contendo própolis. O filme carregado com 50% de micropartículas, assim como o carregado com neomicina, possui comportamento mecânico inferior aos demais filmes carregados com própolis e o comportamento incomum da amostra FA25P pode se dar devido à baixa homogeneidade dessas amostras, como observado na Figura 17.

3.11 Estimação de parâmetros

A estimação de parâmetros foi realizada para os resultados das seguintes análises: grau de intumescimento no equilíbrio, fração gel, perda de massa, tensão na ruptura e módulo de Young. Os resultados serão descritos separadamente para cada resposta.

3.11.1 Grau de intumescimento no equilíbrio

A Equação 7 foi obtida na estimação de parâmetros para a prever o comportamento do grau de intumescimento no equilíbrio para as amostras.

$$GI (\%) = 106,1444 - 10,2472A - 1,8400B - 8,1490AB \quad (7)$$

Nessa equação, os parâmetros β_1 , β_2 e β_{12} , relacionados a quantidade de partículas e tipo de fármaco, foram considerados não significativos, por obter um p-valor maior que 0,05. Esse resultado está de acordo com o esperado, pois, segundo a análise ANOVA, as amostras carregadas com fármaco obtiveram grau de intumescimento no equilíbrio estatisticamente iguais, com exceção da amostra FA0P. Todas as amostras se diferenciaram apenas da amostra FA0B, que não foi incluída na estimação. O coeficiente de determinação do modelo, R^2 , foi de 0,432. Dessa forma, esse não foi um bom modelo para explicar os dados experimentais.

3.11.2 Fração gel

A Equação 8 foi obtida para prever o comportamento da fração gel das amostras.

$$FG = 83,3648 - 1,0258A - 4,0595B + 0,4780AB \quad (8)$$

Nessa equação, os parâmetros relacionados a quantidade de partículas, β_1 e β_{12} , foram considerados não significativos ($p > 0,05$). Segundo a análise ANOVA realizada, a quantidade de partículas adicionadas nos filmes não influenciou a fração gel das amostras, porém a mesma foi influenciada pelo tipo de fármaco adicionado. As amostras carregadas com sulfato de neomicina obtiveram fração gel significativamente maior do que as demais amostras, carregadas com própolis ou não carregada. O coeficiente de determinação do modelo, R^2 , foi 0,911, então o modelo estimado pode ser considerado um bom modelo.

3.11.3 Perda de massa

A estimação de parâmetros para a perda de massa deu origem a Equação 9.

$$PM = 16,6352 + 1,0258A + 4,0595B - 0,4780AB \quad (9)$$

Assim como na equação estimada para a fração gel, os parâmetros β_1 e β_{12} , relacionados a quantidade de partículas, não foram considerados significativos ($p > 0,05$). Foi verificado na análise ANOVA que as amostras contendo sulfato de neomicina obtiveram perda de massa menor que a amostra sem fármaco e as amostras contendo própolis. Por outro lado, a quantidade de micropartículas adicionada não influenciou significativamente a perda de massa das amostras ($p > 0,05$). O coeficiente de determinação do modelo, R^2 , foi 0,911 e, assim como o modelo para a fração gel, esse foi um bom modelo para a estimação da perda de massa.

3.11.4 Tensão na ruptura

A Equação 10 mostra o resultado da estimação de parâmetros da tensão de ruptura das amostras.

$$TR = 281,5455 + 8,6241A - 37,8972B - 66,1620AB \quad (10)$$

Nessa equação, o parâmetro β_1 , relativo a quantidade de micropartículas, não foi um parâmetro significativo ($p > 0,05$). A adição de micropartículas nas amostras gera um aumento na tensão na ruptura das amostras e uma posterior diminuição da mesma, com uma maior adição de micropartículas (amostras FA50N e FA50P). Esse aumento e posterior diminuição da tensão na ruptura não pôde ser previsto por esse tipo de equação e justifica a não-significância do parâmetro β_1 . O coeficiente de determinação, R^2 , foi 0,530 e o modelo não pode ser considerado bom para a estimação da tensão na ruptura.

3.11.5 Módulo de Young

A Equação 11 foi obtida para prever o comportamento do módulo de Young das amostras.

$$MY = 33,0926 - 6,3635A - 0,4269B - 14,5173AB \quad (11)$$

Nesta equação, os parâmetros β_1 , β_2 e β_{12} , relacionados a quantidade de partículas e tipo de fármaco, foram considerados não significativos ($p > 0,05$). A análise ANOVA realizada mostrou que nenhuma das amostras obteve módulo de elasticidade estatisticamente diferente do módulo das demais amostras ($p > 0,05$), provavelmente devido ao grande erro experimental observado. Dessa forma, nenhum dos fatores utilizados no planejamento de experimentos foi relevante para a variação do módulo de Young. O coeficiente de determinação do modelo para o módulo de Young foi igual a 0,354 e esse modelo não pode ser considerado um bom modelo.

A estimação de parâmetros não foi capaz de prever o comportamento das amostras, porém foi útil para comparação com os resultados da ANOVA. As únicas análises que obtiveram bons modelos e que se ajustam bem aos dados experimentais, foram os modelos para a fração gel e perda de massa. O resíduo observado entre esses modelos e os dados experimentais foi satisfatório e podem ser observados na Figura 43.

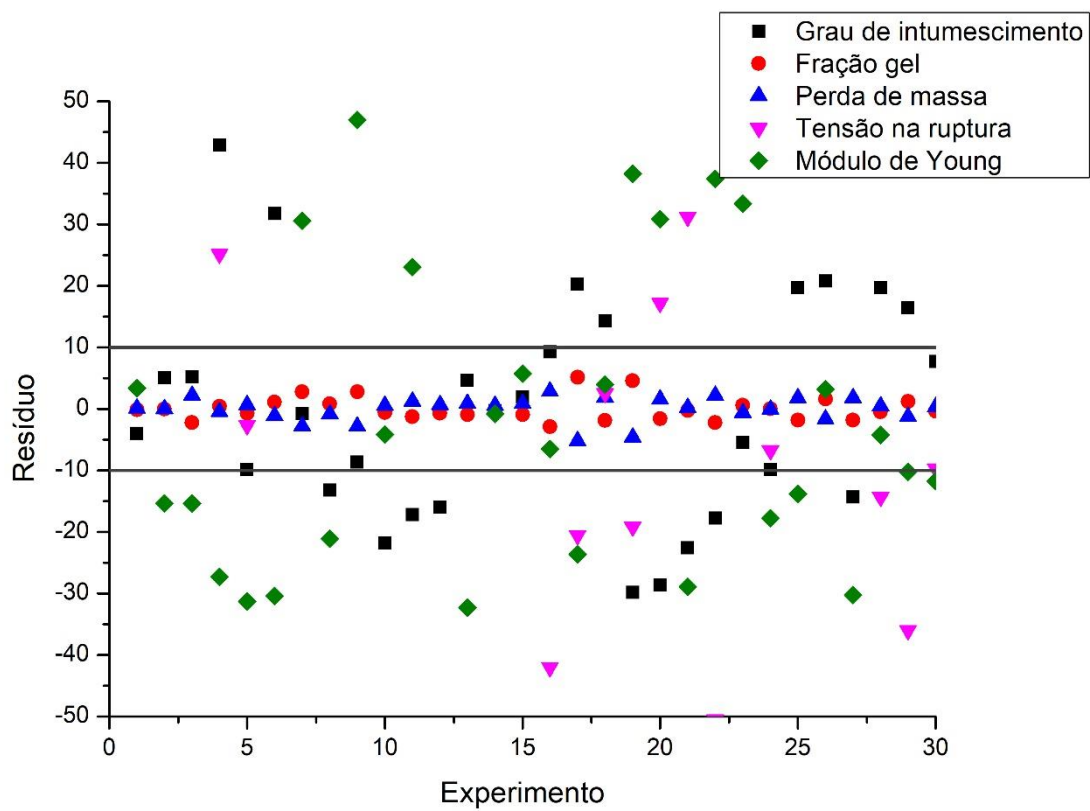


Figura 43 - Resíduos entre os valores experimentais e preditos pela estimação de parâmetros.

4 CONCLUSÕES

Filmes e micropartículas de alginato foram preparados de acordo com a metodologia proposta. As micropartículas obtidas possuem diâmetro entre 13 e 1900 μm , apropriado para a utilização em sistemas de liberação controlada e para serem carregadas nos filmes. Com exceção do filme FA25P, todos os filmes foram caracterizados como homogêneos, ou seja, apresentam ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme. Os filmes foram reticulados com a adição de íons Ca^{2+} , como sugerem os resultados do DRX e FTIR e imagens do MEV mostraram que as amostras foram efetivamente carregadas com micropartículas. Além disso, as amostras foram também carregadas com sulfato de neomicina ou própolis, como visualizado nas análises de FTIR. Com a adição dos fármacos e micropartículas, houve um aumento na espessura dos filmes. Foi verificado que todas as amostras possuem grau de intumescimento no equilíbrio superiores a 100%, tornando-as boas candidatas para a produção de curativos absorventes. A liberação dos fármacos não foi avaliada neste trabalho, porém a menor perda de massa apresentada pelas amostras carregadas com neomicina (11,9, 12,0 e 14,9% para as amostras FA0N, FA25N e FA50N, respectivamente), quando comparadas com as amostras carregadas com própolis (20,0, 20,8 e 21,1%, para as amostras FA0P, FA25P e FA50P, respectivamente), sugere que a liberação dessa droga é menor. Todas as amostras são termicamente estáveis na temperatura corporal e possuem propriedades mecânicas que permitem a sua utilização como curativos. Entretanto, maior adição de micropartículas pode gerar uma diminuição dos valores de tensão na ruptura, e levar a possível ruptura dos filmes durante a aplicação ou retirada dos curativos. Por fim, todas as amostras foram eficientes como proteção a uma contaminação externa por microrganismos, incluindo a amostra não carregada. O modelo utilizado para a estimação de parâmetros foi um bom modelo apenas para prever o comportamento da fração gel e perda de massa das amostras, obtendo um coeficiente de determinação de 0,911. Entretanto, a estimação foi útil, mesmo nos casos onde o modelo não se mostrou bom, para confirmar os resultados da análise ANOVA.

A adição de micropartículas gerou melhora em diversas propriedades dos filmes, como: aumento da espessura, aumento da primeira temperatura de degradação e aumento da resistência mecânica (neste caso, em filmes com até 25% de partículas). A adição de fármaco, por sua vez, é importante pela necessidade de tratamento das infecções presentes nas úlceras

neuropáticas, que não seria eficaz apenas com o uso de curativos comuns. Quando comparados os filmes carregados com sulfato de neomicina e própolis, é possível perceber que os dois possuem características semelhantes e que ambos são bons candidatos ao uso como curativos. Entretanto, o uso de antibióticos pode gerar efeitos não desejáveis, como alergias, desenvolvimento de resistência bacteriana e risco de toxicidade. Por isso, os filmes carregados com micropartículas e própolis podem ser considerados excelentes substitutos dos curativos carregados com antibióticos e mostram grande potencial para esta aplicação.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a liberação de fármacos de ambos os filmes;
- Utilizar extratos aquosos de própolis ou outros produtos naturais para carregar os filmes, com o objetivo de aumentar a homogeneidade nesses filmes;
- Testar a atividade antimicrobiana das amostras, para verificar se há o controle da infecção das úlceras;
- Testar outras quantidades de micropartículas adicionadas ao filme, para determinar a concentração ideal de micropartículas a serem carregadas;
- Adicionar micropartículas de alginato em outras matrizes poliméricas, a fim de se obter filmes com propriedades diversificadas;
- Testar diferentes modelos não-lineares para a estimação de parâmetros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÜERO, L.; ZALDIVAR-SILVA, D.; PEÑA, L.; DIAS, M. L. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 168, p. 32-43, 2017.
- AHMED, A.; MANDAL, U. K.; TAHER, M. SUSANTI, D. JAFFRI, J. PVA-PEG physically cross-linked hydrogel film as a wound dressing: Experimental design and optimization. **Farmaceutical Development and Technology**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.751-760, 2017.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, charactetization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.
- ALAVI, A.; SIBBALD, R. G.; MAYER, D.; GOODMAN, L.; BOSTROS, M.; ARMSTRONG, D. G.; WOO, K.; BOENI, T.; AYELLO, E. A.; KIRSNER, R. S. Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 1.e1-1.e18, 2014a.
- ALAVI, A.; SIBBALD, R. G.; MAYER, D.; GOODMAN, L.; BOSTROS, M.; ARMSTRONG, D. G.; WOO, K.; BOENI, T.; AYELLO, E. A.; KIRSNER, R. S. Diabetic foot ulcers: Part II. Management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 21.e1-21.e24, 2014b.
- ALLEN, T. **Powder Sampling and Particle Size Determination**. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 34, Supplement 1, 2011.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D 882-02**: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. West Conshohocken: Astm International, 2002.
- ANJALI; GOWDA, D. V.; GOWRAV, M. P.; SRIVASTAVA, A.; OSMANI, R. A. M. A study of chitosan nanofibers containing neomycin sulphate for wound healing activity. **Der Pharmacia Lettre**, [s.l.], n. 8, v. 11, p. 128-139, 2016.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, Três Lagoas, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.
- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing — A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 104, n. 11, p. 3653-3680, 2015.
- BODINI, R. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CARVALHO, R. A. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT – Food Science and Technology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.
- BOULTON, A. J. M.; PEDROSA, H. C. Manuseio da Neuropatia Diabética. In: VILAR, L. **Endocrinologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 741-763.
- CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

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

CAMPOS, E.; BRANQUINHO, J.; CARREIRA, A. S.; CARVALHO, A.; COIMBRA, P.; FERREIRA, P.; GIL, M. H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**, [s.l.], v. 49, n. 8, p. 2005-2021, 2013.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Ciência dos Polímeros**: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2002.

CARVALHO, R. A. **Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente**. 2002. 227 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, 2002.

CARVALHO, V. F.; COLTRO, P. S.; FERREIRA, M. C. Feridas em pacientes diabéticos. **Rev. Med**, São Paulo, v. 89, n. 3/4, p. 164-169, 2010.

CASTRO, C. L. N.; KNACKFUSS, I. G. Pé diabético. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus** – Clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 281-297.

CAVANAGH, P. R.; LIPSKY, B. A.; BRADBURY, A. W.; BOTEK, G. Treatment for diabetic foot ulcers. **The Lancet**, [s.l.], v. 366, n. 9498, p. 1725-1735, 2005.

CHAN, E.-S.; LEE, B.-B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 338, n. 2009, p. 63-72, 2009.

CHOI, M.; HUMAR, M.; KIM, S.; YUN, S-H. Step-index Optical Fiber Made of Biocompatible Hydrogels. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 27, n. 27, p. 4081-4086, 2015.

CHUN, Y.; XU, Q.; ZHOU, W.; HE, Y.; HUA, F. A convenient route to inactivate the external surfaces of zeolite HZSM-5. **Studies In Surface Science And Catalysis**, [s.l.], p.2289-2295, 2004.

CLEARFIELD, A. Introduction to Diffraction. In: CLEARFIELD, A.; REINBENSPIES, J. H.; BHUVANESH, N. **Principles and Applications of Powder Diffraction**. Chichester: John Wiley & Sons LTD, 2008. p. 73-121.

CORRALES, P. J. P.; MENESES, M. A. L. Neuropatías Diabéticas. **Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 17, p. 1021-1031, 2012.

COSTA, M. J.; MARQUES, A. M.; PASTRANA, L. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILLANKORVA, S. M.; CERQUEIRA, M. A. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 81, p.442-448, 2018.

CUBAS, M. R.; DOS SANTOS, O. M.; RETZLAFF, E. M. A.; TELMA, H. L. C.; DE ANDRADE, I. P. S.; MOSER, A. D. L.; ERZINGER, A. R. **Pé diabético**: orientações e conhecimentos sobre cuidados preventivos. *Fisioter. Mov.*, Curitiba, v. 26, n. 3, p. 647-655, 2013.

CUNHA, D. P. **Redes de coordenação**: Novos sistemas carregadores de fármacos. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

DÉAT-LAINÉ, E.; HOFFART, V.; CARDOT, J.; SUBIRADE, M.; BEYSSAC, E. Development and in vitro characterization of insulin loaded whey protein and alginate microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 439, n. 1-2, p. 136-144, 2012.

DECK, D. H.; WINSTON, L. G. Aminoglicosídeos e espectinomicina. In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 821-829.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: Aplicações e preparação de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. *E-book*. Disponível em: <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/acessolivre/livros/microscopia.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2018.

DIAS, R. J. S.; CARNEIRO, A. P. Neuropatia diabética: fisiopatologia, clínica e eletroneuromiografia. **Acta Fisiátrica**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 35-44, 2000.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. 2006. In: Construindo a História dos Produtos Naturais. **MultiCiência**. CPQBA/UNICAMP, n.7, 2006. Disponível em: https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf. Acesso em: 26 jul. 2018.

DUARTE, N.; GONÇALVES, A. Pé diabético. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 65-79, 2011.

FABIA, J.; SLUSAREZYK, C.; GAWLOWSKI, A. Supramolecular structure of alginate fibres for medical applications studied by means of waxes and saxs methods. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, [s.l.], v. 13, n. 5, p. 114-117, 2005.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **The Lancet**, [s.l.], v. 366, n. 9498, p. 1736-1743, 2005.

FANG, Y.; AL-ASSAF, S. PHILLIPS, G. O.; NISHINARI, K.; FUNAMI, T.; WILLIAMS, P. A.; LI, L. Multiple Steps and Critical Behaviours of the Binding of Calcium to Alginate. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 111, n. 10, p. 2456-2462, 2007.

FONDER, M. A.; LAZARUS, G. S.; COWAN, D. A.; ARONSON-COOK, B.; KOHLI, A.; MAMELAK, A. J. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 58, n. 2, p. 185-206, 2008.

FONTES, G. C.; CALADO, V. M. A.; ROSSI, A. M.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Characterization of Antibiotic-Loaded Alginate-Osa Starch Microbeads Produced by Iontropic Pregelation. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-11, 2013.

FREITAS, A. K. C. **Obtenção de fitas cerâmicas baseadas em paligorskita/PVA via tape casting como veículo para neomicina**. 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018.

GATEA, F.; TEODOR, E. D.; SECIU, A. M.; COVACI, O. I.; MANOIU, S.; LAZAR, V.; RADU, G. L. Antitumour, antimicrobial and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized by different pH propolis extracts. **Journal Of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.320-320, jul. 2015.

GENESI, B. P. **Desenvolvimento de curativo a base de quitosana e gelatina contendo óleo de copaíba para tratamentos de queimados**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2015.

GROSSI, S. A. A. Prevenção de úlceras nos membros inferiores em pacientes com diabetes mellitus. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 32, n. 4, p. 377-385, 1998.

JABEEN, S.; ISLAM, A.; GHAFAR, A.; GULL, N.; HAMEED, A.; BASHIR, A.; JAMIL, T.; HUSSAIN, T. Development of a novel pH sensitive silane crosslinked injectable hydrogel for controlled release of neomycin sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 97, p. 218-227, 2017.

JAYA, S.; DURANCE, T. D.; WANG, R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. **Journal Of Microencapsulation**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.143-153, 20 out. 2008.

JONES, A.; VAUGHAN, D. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. **Journal Of Orthopaedic Nursing**, [s.l.], v. 9, Suppl. 1, p.S1-S11, dez. 2005.

JULIANO, C.; PALA, C. L.; COSSU, M. Preparation and characterization of polymeric films containing propolis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 177-181, 2007.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 116, n. 2, p. 452-461, 2009.

KAVITHA, K. V.; TIWARI, S.; PURANDARE, V. B.; KHEDKAR, S.; BHOSALE, S. S.; UNNIKRISHNAN, A. G. Choice of wound care in diabetic foot ulcer: A practical approach. **World Journal of Diabetes**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 546-556, 2014.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. **European Polymer Journal**, [s.l.], v. 100, p. 1-11, 2018.

KRALCHEVSKY, P. A.; NAGAYAMA, K. Capillary interactions between particles bound to interfaces, liquid films and biomembranes. **Advances In Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 85, n. 2-3, p.145-192, mar. 2000.

KUBILIENE, L.; LAUGALIENE, V.; PAVILONIS, A.; MARUSKA, A.; MAJIENE, D.; BARCAUSKAITE, K; KUBILIUS, R.; KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-7, 27 maio 2015.

LABOVITIADI, O.; LAMB, A. J.; MATTHEWS, K. H. In vitro efficacy of antimicrobial wafers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Therapeutic Delivery**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 443-455, 2012.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; PAGGIARO, A. O.; HOSAKA, E. M.; FERREIRA, M. C. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares. **Revista de Medicina**, [s.l.], v. 90, n. 3, p. 122-127, 2011.

LEE, B.-B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E.-S. Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. **Chemical Engineering & Technology**, [s.l.], v. 36, n. 10, p. 1627-1642, 2013.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEICK, S., HENNING, S., DEGEN, P., SUTER, D. E REHAGE, H. Deformation of liquid-filled calcium alginate capsules in a spinning drop apparatus. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 2950, 2010.

LIAKOS, I.; RIZZELLO, L. SCURR, D. J. POMPA, P. P.; BAYER, I. S. ATHANASSIOU, A. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 463, n.2, p. 137-145, 2014.

LIMA, G. G.; SOUZA, R. O.; BOZZI, A. D.; POPLAWSKA, M. A.; DEVINE, D. M.; NUGENT, M. J. D. Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 3, p.1248-1257, mar. 2016.

LIPSKY, B. A.; ARAGÓN-SÁNCHEZ, J.; DIGGLE, M.; EMBIL, J.; KONO, S.; LAVERY, L.; SENNEVILLE, É.; URBANCIC-ROVAN, V.; SAN ASTEN, S.; PETERS, E. J. G. Guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes.

International **Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF)**, 2015. Disponível em: <http://www.iwgdf.org>. Acesso em: 08 fev. 2018.

LIPSKY, B. A.; BERENDT, A. R.; DEERY, H. G.; EMBIL, J. M.; JOSEPH, W. S.; KARCHMER, A. W.; LEFROCK, J. L.; LEW, D. P.; MADER, J. T.; NORDEN, C.; TAN, J. S. Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 212S-238S, 2006.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros**: Determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MERLUSCA, I. P.; MATIUT, D. S.; LISA, G.; SILION, M.; GRADINARU, L.; OPREA, S.; POPA, I. M. Preparation and characterization of chitosan–poly(vinyl alcohol)–neomycin sulfate films. **Polymer Bulletin**, [s.l.], v. 75, n. 9, p.3971-3986, 23 nov. 2017.

MOREIRA, A. P. D. **Desenvolvimento de microesferas de alginato / beta-fosfato tricálcico / estrôncio para liberação *in vitro* de estrôncio**. 2014. 145 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

MOUËS, C. M.; HEULE, F.; LEGERSTEE, R.; HOVIUS, S. Five Millennia of Wound Care Products — What is New? A Literature Review. **Ostomy Wound Management**, [s.l.], v. 55, n. 3, 2009.

MOURA, L. I. F.; DIAS, A. M. A.; CARVALHO, E.; SOUSA, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - a review. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 7093-7114, 2013.

MUSAZZI, U. M.; DOLCI, L. S.; ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; CILURZO, F. A new melatonin oral delivery platform based on orodispersible films containing solid lipid microparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 559, p.280-288, mar. 2019.

MYERS, J.; CURTIS, B.; CURTIS, W. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. **BMC Biophysics**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.4-19, 2013.

NASCIMENTO, O. J. M. Neuropatia diabética: diagnóstico e tratamento. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus** – Clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 183-197.

NASCIMENTO, T. G.; SILVA, P. F.; AZEVEDO, L. F.; ROCHA, L. G.; PORTO, I. C. C. M.; MOURA, T. F. C. L.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B.; FONSECA, E. J. S.; OLIVEIRA, E. J.; WATSON, D. G. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-16, 17 jun. 2016.

NIDDK – NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. Diabetic neuropathies: the nerve damage of diabetes. **National Institutes of Health**, n. 9-3185, 2009.

NITANAN, T.; AKKARAMONGKOLPORN, P.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; OPANASOPIT, P. Neomycin-loaded poly(styrene sulfonic acid-co-maleic acid) (PSSA-MA)/polyvinyl alcohol (PVA) ion exchange nanofibers for wound dressing materials. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 448, n. 1, p. 71-78, 2013.

NIX, D. P. Skin and wound inspection and assessment. In: BRYANT, R. A.; NYX, D. **P. Acute and Chronic Wounds**: current management concepts. 5. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2015.

NUGRAHANI, I.; MIN, S. S. Hydrate transformation of sodium sulfacetamide and neomycin sulphate. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 7, n. 10, p. 409-415, 2015.

OBOLENSKIY, V. N.; LEVAL, P. S.; ERMOLOVA, D. A.; PROTSKO, V. G. Diabetic foot syndrome: Our approach to the treatment of the patients. **Wound Medicine**, [s.l.], v. 4, p. 30-36, 2014.

OLIVEIRA, J. E. P. Conceitos, classificação e diagnóstico do diabetes mellitus. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus – Clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 7-18.

OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, P. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

OLIVEIRA, R. N. ROUZÉ, R.; QUILTY, B.; ALVES, G. G.; SOARES, G. D. A.; THIRÉ, R. M. S. M.; MCGUINNESS, G. B. Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcohol-nano-silver hydrogel wound dressings. **Interface Focus**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-11, 2013.

OLIVEIRA, R. N.; MANCINI, M. C.; OLIVEIRA, F. C. S.; PASSOS, T. M.; QUILTY, B.; THIRÉ, R. M. S. M.; MCGUINNESS, G. B. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.767-779, 2016.

OLIVEIRA, R. N.; MOREIRA, A. P.; THIRÉ, R. M. S. M.; QUILTY, B.; PASSOS, T. M.; SIMON, P.; MANCINI, M. C.; MCGUINNESS, G. B. Absorbent Polyvinyl Alcohol-Sodium Carboxymethyl Cellulose Hydrogels for Propolis Delivery in Wound Healing Applications. **Polymer Engineering and Science**, [s.l.], v. 57, n. 11, p. 1224-1233, 2017.

OTTENBRITE, R. M.; PARK, K.; OKANO, T. **Biomedical Applications of Hydrogels Handbook**. Londres: Springer, 2010.

OVINGTON, L. G. Wound Management – Ancient Origins and Advances of the Past 20 Years. **Home Healthcare Nurse**, v. 20, n. 10, p. 252-256, 2002.

PACHECO, L. R. E. **Obtenção e caracterização de uma matriz polimérica a base de alginato com diferentes agentes reticulantes**. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016.

PAPAGEORGIOU, S.K.; KOUVELOU, E. P.; FAVVAS, E. P.; SAPALIDIS, A. A.; ROMANOS, G. E.; KATSAROS, F. K. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 345, n. 4, p. 469-473, 2010.

PAPANAS, N.; MALTEZOS, E. The Diabetic Foot: Established and Emerging Treatments. **Acta Clinica Belgica**, [s.l.], v. 62, n. 4, p. 230-238, 2007.

PAŞCALĂU, V.; POPESCU, V.; POPESCU, G. L.; DUDESCU, M. C.; BORODI, G.; DINESCU, A.; PERHAÎTA, I.; PAUL, M. The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. **Journal Of Alloys And Compounds**, [s.l.], v. 536, p.S418-S423, set. 2012.

PATACA, L. C. M. **Análises de mel e própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2006. 97 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PATEL, N.; LALWANI, D.; GOLLMER, S.; INJETI, E.; SARI, Y.; NESAMONY, J. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. **Progress In Biomaterials**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.117-133, jul. 2016.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 76-100, 2011.

PIRES, A. L. R. MOTTA, L. A.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H. C.; MORAES, Â. M.; BRAGA, M. E. M. Towards wound dressings with improved properties: Effects of poly(dimethylsiloxane) on chitosan-alginate films loaded with thymol and beta-carotene. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 93, p.595-605, dez. 2018.

POWERS, J. G.; HIGHAM, C.; BROUSSARD, K.; PHILLIPS, T. J. Wound healing and treating wounds. **American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 74, n. 4, p. 607-625, 2016.

RAWLE, A. **Basic principles of particle size analysis**. Disponível em: www.malvern.co.uk. Acesso em: 20 dez. 2018.

REBOLLEDO, F. A. Guía clínica “Neuropatía Diabética” para médicos. **Plasticidad y Restauración Neurológica**, [s.l.], v. 4, n. 1-2, p. 35-47, 2005.

REIBER, G. E.; VILEIKYTE, L.; BOYKO, E. J.; DEL AGUILA, M.; SMITH, D. G.; LAVERY, L. A.; BOULTON, A. J. M. Causal pathways for incident lower-extremity in patients with diabetes from two settings. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 22, p. 157-162, 1999.

REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 28, n. 21, p. 1701-1712, 2006.

RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 18, p.4363-4373, ago. 2004.

ROBERTS, C. D.; LEAPER, D. J.; ASSADIAN, O. The Role of Topical Antiseptic Agents Within Antimicrobial Stewardship Strategies for Prevention and Treatment of Surgical Site and Chronic Open Wound Infection. **Advances in Wound Care**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 63-71, 2017.

ROBERTSON, D. B.; MAIBACH, H. I. Farmacologia dermatológica. In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 1061-1079.

SACCHETIN, P. S. C. **Incorporação de Flavobacterium columnare inativado em micropartículas de alginate e quitosana para a imunização de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) por via oral**. 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SACCO, I. C. N.; SARTOR, C. D.; GOMES, A. A.; JOÃO S. M. A.; CRONFLI, R. Avaliação das perdas sensório-motoras do pé e tornozelo decorrentes da neuropatia diabética. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2007.

SALAZAR, J. J.; ENNIS, W. J.; KOH, T. J. Diabetes medications: Impact on inflammation and wound healing. **Journal of Diabetes and its Complications**, [s.l.], v. 30, n. 4, p. 746-752, 2016.

SANDEEP, C.; HARIKUMAR, S. L.; KANUPRIYA. Hydrogel: a smart drug delivery system. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 603-614, 2012.

SCATOLINI, A. M. **Estudo de hidroxapatita contendo própolis de origem brasileira: caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos materiais**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

SCHAFFAZICK S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHEIDT, D. T. **Eletrofiação da quitosana e sua aplicação como curativo para feridas**. 2018. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2018.

SHARAF, S.; HIGAZY, A.; HEBEISH, A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 59, p.408-416, ago. 2013.

SHU, A. D.; MYERS JR., M. G.; SHOELSON, S. E. Farmacologia do pâncreas endócrino. In: GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 493-506.

SILVA, C. M. L. **Modificação de filmes do compósito alginato de sódio-poli(etileno glicol)-glicerol com óxidos de tungstênio e titânio: interações físicas que influenciam no transporte de carga**. 2014. 125 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

SINGH, B.; PAL, L. Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, [s.l.], v. 9, p.9-21, maio 2012.

SINGH, N.; ARMSTRONG, D. G.; LIPSKY, B. A. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. **Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 293, n. 4, p. 217-228, 2005.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 61, p.695-702, dez. 2016.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; MRHAR, A. The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Iontropic Gelation. **Scientia Pharmaceutica**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 77-89, 2008.

SOARES, J. P.; SANTOS, J. E.; CHIERICE, G. O.; CAVALHEIRO, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclética Química**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.57-64, 2004.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on oxygen permeability of beta-lactoglobulin films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, n.12, p. 6298-6302, 2000.

SUNDARRAJAN, P.; ESWARAN, P.; MARIMUTHU, A.; SUBHADRA, L. B.; KANNAIYAN, P. One Pot Synthesis and Characterization of Alginate Stabilized Semiconductor Nanoparticles. **Bulletin Of The Korean Chemical Society**, [s.l.], v. 33, n. 10, p.3218-3224, 20 out. 2012..

SUPRIYA, A.; SUNDARASEELAN, J.; MURTHY, B. R. S.; PRIYA, M. B. Formulation and *In vitro* Characterization of Neomycin Loaded Chitosan Nanoparticles. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], n. 2, v. 2, p. 34-40, 20 jan. 2018.

SWATHI, V.; VIDYAVATHI, M.; PRASAD, T. N. V. K. V.; KUMAR, R. V. S. Design, Characterization and Evaluation of Metallic Nano Biocomposites of Neomycin. **Journal Of Applied Solution Chemistry And Modeling**, [s.l.], n. 2, p.136-144, 2013.

TAVARES, W. Aminoglicosídeos. In: TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014a. p. 241-268.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J. M.; DYCK, P. J.; FREEMAN, R.; HOROWITZ, M.; KEMPLER, P.; LAURIA, G.; MALIK, R. A.; SPALLONE, V.; VINIK, A.; BERNARDI, L.; VALENSI, P. – TORONTO DIABETIC NEUROPATHY EXPERT GROUP. Diabetic Neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 33, p. 2285-2293, 2010.

TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 621-630, 2002.

TORLAK, E.; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 60, p. 52-55, 2013.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Ativos de Alginato de Sódio Reticulados com Bezoato de Cálcio**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G. Propriedades mecânicas e de barreira de filmes de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio e/ou cloreto de cálcio. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 82-90, 2011.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Liberação de Benzoato de Cálcio de Filmes de Alginato de Sódio Reticulados com Íons Cálcio. **Polímeros**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 175-181, 2011.

VANIN, F. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Effect of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin based films. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 889-907, 2005.

VILELA, D. D. **Hidrogel de carboximetilcelulose de sódio e própolis: Desenvolvimento e caracterização**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**, [s.l.], v. 35, n. 9, p. 489-494, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global report on diabetes**. França, 2016.

ZACTITI, E. M. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de alginatoe de cálcio sem e com sorbato de potássio**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ZEIGHAMPOUR, F.; MOHAMMADI-SICHANI, M.; SHAMS, E.; NAGHAVI, N. S. Antibacterial Activity of Propolis Ethanol Extract against Antibiotic Resistance Bacteria Isolated from Burn Wound Infections. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 25-30, 2014.

ZIMMERMANN, A. L. S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida**. 2001. 133 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.