

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL COM  
NANOPARTÍCULA DE CÉRIO, *Calendula officinalis* OU *Bixa orellana L.*,  
COMO POTENCIAIS CURATIVOS DE FERIDAS CRÔNICAS**

**TALITA COLOMBI REZENDE**

ALEGRE, ES

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL COM  
NANOPARTÍCULA DE CÉRIO, *Calendula officinalis* OU *Bixa orellana* L.,  
COMO POTENCIAIS CURATIVOS DE FERIDAS CRÔNICAS**

**TALITA COLOMBI REZENDE**

ALEGRE, ES

2018

**Talita Colombi Rezende**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL COM  
NANOPARTÍCULA DE CÉRIO, *Calendula officinalis* OU *Bixa orellana* L.,  
COMO POTENCIAIS CURATIVOS DE FERIDAS CRÔNICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Linha de Pesquisa: Materiais, Bioprocessos e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Christiano Jorge Gomes Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Heberth de Paula

ALEGRE, ES

Fevereiro, 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

---

R467p Rezende, Talita Colombi, 1990-  
Preparação e caracterização de hidrogel com nanopartícula de cério, *Calendula officinalis* ou *Bixa orellana* L., como potenciais curativos de feridas crônicas / Talita Colombi Rezende. – 2018.  
78 f. : il.

Orientador: Christiano Jorge Gomes Pinheiro.

Coorientador: Heberth de Paula.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Feridas e lesões - Tratamento. 2. Curativos. 3. Nanopartículas. 4. Cério. 5. Radiação. I. Pinheiro, Christiano Jorge Gomes. II. Paula, Heberth de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 66.0

---

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL COM  
NANOPARTÍCULA DE CÉRIO, *Calendula officinalis* OU *Bixa orellana* L.,  
COMO POTENCIAIS CURATIVOS DE FERIDAS CRÔNICAS**

**Talita Colombi Rezende**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Examinada em 27 de fevereiro de 2018.



---

Prof. Dr. Christiano Jorge Gomes Pinheiro  
Universidade Federal do Espírito Santo



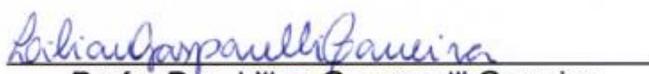
---

Profa. Dra. Iara Rebouças Pinheiro  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

Prof. Dr. Pedro Alves Bezerra Moraes  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

Profa. Dra. Lilian Gasparelli Carreira  
Universidade Federal do Espírito Santo

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por terem me  
ensinado a ter perseverança para alcançar meus objetivos.  
A vocês todo o meu amor.*

*“Quem o pouco não agradece o muito não merece”*

(NASCIMENTO, Jair Rezende)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho e guiado meus passos e a nossa Senhora, por sempre me cobrir com seu manto.

Aos meus pais, Jair e Terezinha, pelas palavras de incentivo e força que recebi em todos os momentos e pelo amor incondicional.

Ao meu namorado Arthur por estar presente a todo o momento, fazendo o impossível para eu não deixar de sonhar.

Ao meu orientador Christiano Jorge Gomes Pinheiro e coorientador Heberth de Paula, pelos sábios conselhos, por todo o direcionamento dado, pelo incentivo constante e confiança no meu trabalho.

A prof. Lousiane, a equipe do HOVET por todo suporte e ensinamento com os testes “in vivo”. Toda minha gratidão a Mayra Wandermurem pela disponibilidade e por ser a melhor pessoa “vamos”.

As minhas meninas do mestrado por todo apoio, amizade e desabafos desde o início deste trabalho, são elas: Ana Júlia Nali Giori, Flaviane Mendonça Ambrozim, Rayane Grizotti Kiefer, Rhuany de Oliveira Silva, Rhynara Niandra Silva de Carvalho, e Thaís Machado Soares.

Aos amigos e familiares, por entenderem minhas ausências como parte do processo de realização deste trabalho e ainda assim continuarem do meu lado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa concedida.

A esta universidade, corpo docente e corpo técnico-administrativo, por me proporcionar os recursos necessários e um ambiente de aprendizado e crescimento.

## RESUMO

REZENDE, Talita Colombi. **Preparação e caracterização de hidrogel com nanopartícula de cério, *Calendula officinalis* ou *Bixa orellana L.*, como potenciais curativos de feridas crônicas.** 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientador: Christiano Jorge Gomes Pinheiro. Coorientador: Heberth de Paula.

O desenvolvimento de novas tecnologias e descobrimento de novos ativos tem proporcionado um grande avanço no tratamento de feridas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Assim, em todo o mundo tem-se observado um crescente interesse no uso do hidrogel para aplicações como curativos de ferimentos, uma vez que favorecem o alívio da dor. Além disso, os hidrogéis também podem ser aplicados como matrizes para sistema de liberação controlada de princípios ativos. O objetivo desse trabalho foi incorporar a nanopartícula de cério, a *Calendula officinalis* e a *Bixa orellana L.* como ativos em membranas de hidrogel para avaliar a eficiência na cicatrização. A nanopartícula de cério, a *Calendula officinalis* e a *Bixa orellana L.* são ativos que possuem uma excelente ação anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana. Foi realizado o estudo das propriedades mecânicas, físico-químicas e a biocompatibilidade “*in vivo*” das membranas de hidrogel de poli(vinilpirrolidona) (PVP), obtidas por reticulação pela radiação gama. As membranas preparadas neste trabalho foram caracterizadas por intumescimento, fração-gel, ensaio de tração, microscopia eletrônica de varredura, difração de raio-X, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica. A matriz de hidrogel sintetizada mostrou ser uma ótima base para receber os ativos propostos. O teste “*in vivo*” desses hidrogéis mostrou ser promissor para aplicar no processo de cicatrização, depositadas diretamente em superfície lesionadas, sendo que os hidrogéis com *Calendula officinalis* apresentaram melhor contribuição para redução no tamanho do ferimento.

Palavras-chave: Hidrogel, Radiação Gama, Curativos, Nanopartícula de Cério, *Calendula officinalis*, *Bixa orellana L.*

## ABSTRACT

REZENDE, Talita Colombi. **Synthesis and characterization of hydrogel with cerium nanoparticle, *Calendula officinalis* or *Bixa orellana*, as potential materials of chronic wounds dressings.** 2018. Dissertation. (Master degree in Chemical Engineering) – Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Adviser: Christiano Jorge Gomes Pinheiro. Co-adviser: Heberth de Paula

The development of new technologies and discovery of new resources has a great advance the treatment of wounds, improving the patients life quality. Thus, throughout the world there has been a growing interest in using the hydrogel for applications as wound dressings, since they favor pain relief. In addition, hydrogels can also be applied as matrices to the principle controlled release system. The aim of this work was to incorporate the cerium nanoparticle, the *Calendula officinalis* and the *Bixa orellana L.* as active in hydrogel membranes in order to evaluate the efficiency in the healing. The cerium nanoparticle, the *Calendula officinalis* and the *Bixa orellana L.* are actives which are excellent antioxidant and antibacterial anti-inflammatory properties. The study of mechanical, physical-chemical properties and “*in vivo*” biocompatibility of poly (vinylpyrrolidone) (PVP) hydrogel membranes obtained by gamma cross-linking was carried out. The membranes prepared in this study are characterized by swelling, gel-fraction, traction test, scanning electron microscopy, X-ray diffraction, transmission electron microscopy and atomic force microscopy. A synthesized hydrogel matrix proved to be a great base for receiving the active purposes. The “*in vivo*” assays showed a promising application to apply in the cicatrization process, deposited directly in the dissemination of the lesions, and the hydrogels with *Calendula officinalis* presented a better contribution to the size reduction of the fertilizer.

Keywords: Hydrogel, Gamma Radiation, Wound dressing, Cerium Nanoparticle, *Calendula officinalis*, *Bixa orellana L.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração esquemática do processo de cicatrização de lesões cutâneas.....	20
Figura 2 Ilustração da estrutura 3-D dos hidrogéis.....	25
Figura 3 Mero Poli(n-vinil-2-pirrolidona) PVP .....	26
Figura 4 Formação do radical polimérico .....	29
Figura 5 Esquema de rede de hidrogel. Círculo denota espaço disponível para a difusão.....	30
Figura 6 Estrutura ideal cúbica de face centrada do tipo fluorita do CeO <sub>2</sub> . .....	31
Figura 7 <i>Calendula officinalis</i> .....	34
Figura 8 <i>Bixa orellana L.</i> .....	35
Figura 9 Fonte de Cobalto 60 do Laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN. ....	38
Figura 10 Imagem do texturômetro utilizado .....	42
Figura 11 Imagem do liofilizador de bancada utilizado.....	42
Figura 12 Imagem do microscópio eletrônico de varredura.....	43
Figura 13 Imagem do microscópio eletrônico de transmissão.....	44
Figura 14 Imagem do Microscópio de Força Atômica. ....	45
Figura 15 Fluxograma do procedimento escolhido para o tratamento dos grupos experimentais. ....	47
Figura 16 Rato depilado com incisão dorsal.....	48
Figura 17 Fotos apresentando a sequência de aplicação dos curativos de hidrogel (A e B) .....	48
Figura 18 Matriz de hidrogel de PVP.....	50
Figura 19 Resultado do teste esterilização da matriz de hidrogel. (19a) controle padrão em ágar nutriente; (19b) hidrogel irradiado a 25 kGy.....	51
Figura 20 Gráfico do perfil de intumescimento dos hidrogéis reticulados a 25 kGy, temperatura ambiente e atmosfera comum - solução tampão e água deionizada.....	53
Figura 21 Representação gráfica do resultado do teste de resistência mecânica da matriz de hidrogel em relação à perfuração, obtido por texturômetro. ....	55
Figura 22 Micrografias de SEM da matriz de hidrogel reticulada e liofilizada. (22a) 100x; (22b) 1000x.....	56
Figura 23 XRD da membrana em 25 kGy. ....	57
Figura 24 Imagens superficiais do hidrogel seco e molhado.....	58
Figura 25 Hidrogel de PVP incorporados com os princípios ativos (25a) Nanopartícula de cério; (25b) <i>Calendula officinalis</i> ; (25c) <i>Bixa orellana L.</i> .....	59
Figura 26 Perfil de intumescimento dos hidrogéis reticulados a 25 kGy, com nanopartícula de cério, temperatura ambiente e atmosfera comum - água deionizada.....	60
Figura 27 Micrografias de MEV da matriz de hidrogel liofilizada incorporada com nanopartículas de CeO <sub>2</sub> (27a) aumento 100x (27b) aumento 1000x.....	60
Figura 28 Imagens obtidas por MET de uma amostra irradiada de hidrogel incorporado com nanopartículas de CeO <sub>2</sub> .....	61
Figura 29 Difractograma de difração de raios-X da amostra de (29a) nanopartículas de CeO <sub>2</sub> ; (29b) hidrogel / nanopartículas de CeO <sub>2</sub> . irradiados. 62	62
Figura 30 Micrografias de MEV da matriz de hidrogel liofilizada incorporada com <i>Calendula officinalis</i> (30a) aumento 100x (30b) aumento 1000x.....	63
Figura 31 Micrografias de MEV da matriz de hidrogel liofilizada incorporada com <i>Bixa orellana L</i> (31a) aumento 100x (31b) aumento 1000x .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fração Gel obtida pela matriz de hidrogel PVP .....	52
Tabela 2 Aparências da lesão em diferentes dias .....	65
Tabela 3 Tamanho da lesão cirúrgica no dorso por porcentagem. ....	66

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo Geral .....	18
2.2	Objetivos específicos .....	18
3	Fundamentação Teórica.....	19
3.1	Processo de cicatrização .....	19
3.1.1	Curativos para o tratamento de feridas.....	21
3.2	Biomateriais.....	22
3.3	Hidrogel.....	24
3.3.1	Hidrogel Reticulado por Radiação Gama .....	28
3.4	Nanopartícula de Cério .....	31
3.5	<i>Calendula officinalis</i> .....	33
3.6	<i>Bixa Orellana</i> .....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1	Metodologia.....	37
4.1.1	Preparação das soluções de hidrogel.....	37
4.1.2	Reticulação por radiação gama .....	38
4.1.3	Incorporação dos princípios ativos .....	38
4.2	Caracterização da matriz de hidrogel.....	39
4.2.1	Esterilização .....	39
4.2.2	Fração gel.....	40
4.2.3	Intumescimento .....	40
4.2.4	Propriedades mecânicas .....	41
4.2.5	Liofilização das membranas de hidrogel.....	42
4.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	43
4.2.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) .....	43
4.2.8	Difração de Raio-X (XRD).....	44
4.2.9	Microscopia de Força atômica (AFM) .....	45
4.3	Teste Biológico.....	45
4.3.1	Inoculação dos modelos experimentais para uso das matrizes de hidrogel.....	46
4.3.2	Avaliação da lesão dos ratos Wistar .....	47
4.3.3	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
5.1	Obtenção das matrizes de hidrogel.....	50
5.2	Esterilização .....	50
5.3	Fração gel .....	51

5.4	Intumescimento .....	52
5.5	Propriedades mecânicas.....	54
5.6	Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	55
5.7	Difração de raio-X (XRD) .....	56
5.8	Microscopia de força atômica (AFM).....	57
5.9	Obtenção e organização dos ativos na matriz.....	58
6	RESULTADO DO TRATAMENTO DOS ANIMAIS LESIONADOS .....	65
7	CONCLUSÃO .....	68
	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

**LISTA DE ABREVIações E SIMBOLOS**

AFM	Microscopia de Força Atômica
CeO <sub>2</sub>	Oxido de Cério (II)
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DMSO	Dimetilsulfoxido
kGy	Unidade de dose de radiação
kV	Kilovolt
LABIOM	Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares
LUCCAR	Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins
MM	Massa Molecular
PBS	Solução tampão fosfato salina
PEG	Poli(etileno-glicol)
PVP	Poli(N-vinil-2-pirrolidona)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal do Espírito Santo
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UV-C	Luz ultravioleta curta
XRD	Difração de Raios X
$\gamma$	Raio gama

## 1 INTRODUÇÃO

Tratar uma ferida, principalmente crônica, ainda é um desafio. No entanto não significa que seja novo. Atualmente, alguns protocolos vêm sendo estabelecidos visando acelerar o processo cicatricial, para que sejam obtidos resultados mais eficientes em relação ao tempo, para a totalização do processo e quanto à qualidade da cicatriz.

A cicatrização de feridas é um processo muito complexo. Os agentes curativos são ferramentas terapêuticas que auxiliam na resolução de lesões e ferimentos cutâneos (BROUGHTON *et al.*, 2006). Dentre inúmeros curativos estudados, o hidrogel tem se mostrado muito eficiente por ser hidroativo, possuir baixo custo e obter um processo simples e seguro (WELLER e SUSSMAN, 2006). Com o intuito de melhorar as funções gerais dos curativos, tem-se estudado a incorporação de bioativos, drogas, nanopartículas e / ou outros potenciadores de cura, podendo estes ser incorporados nos curativos para feridas de matrizes poliméricas principalmente para melhorar qualidade e acelerar a cicatrização de lesões (MOURA *et al.*, 2013; WELLER e SUSSMAN, 2006).

Hidrogéis são redes tridimensionais constituídas por cadeias poliméricas, capazes de absorver grandes quantidades de água e fluidos biológicos em sua estrutura sem se dissolver (PEPPAS *et al.*, 2000; ROSIAK e ULANSKI, 1999). Estes polímeros podem ser preparados por processos físicos e químicos que envolvem reticulação por radiação ou agentes químicos (PEPPAS e KHARE, 1993). O uso da radiação gama na formação de hidrogéis se tornou mais viável, pois possibilita a reticulação e a esterilização simultaneamente, além de ser uma tecnologia que permite a simplificação do processo de produção (BISWAL *et al.*, 2007; FOROUTAN e RABANI, 2007).

Os hidrogéis sintetizados para este estudo são à base de polivinilpirrolidona (PVP), poli (etilenoglicol) (PEG) e ágar. Podem ser produzidos a um custo relativamente baixo, sendo um processo simples, seguro e eficiente (WONA e JANIK, 2010). A escolha de hidrogéis de PVP como matriz polimérica para incorporação e liberação de princípios ativos foi motivada pela comprovada biocompatibilidade e o alto grau de intumescimento do mesmo.

Dentre os ativos incorporados para melhoria da cicatrização, a nanopartícula de cério, que têm sido estudadas em numerosas aplicações de engenharia tradicionais, não teve muita atenção para aplicações biomédicas até recentemente. Um maior interesse foi despertado quando os pesquisadores descobriram que as nanopartículas de cério possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (WANG *et al.*, 2013).

O uso dos extratos naturais de *Calendula officinalis* e *Bixa orellana L.* são consideradas grandes promessas na área biomédica. São encontradas em abundância na natureza e são fáceis de serem adquiridas em mercados. Sendo conhecidas popularmente por suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, antioxidante, cicatrizantes e comprovadas cientificamente.

Diante deste contexto, a incorporação de ativos na matriz polimérica de PVP utilizando nanopartícula de cério, *Calendula officinalis* ou *Bixa orellana L.* podem apresentar um novo passo para a obtenção de curativos mais eficientes na melhora da cicatrização de feridas crônicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é a síntese, caracterização e comparação da eficiência biológica do hidrogel de polivinilpirrolidona (PVP) como matriz polimérica, incorporados aos ativos: nanopartícula de cério, e extratos de *Calendula officinalis* e *Bixa orellana* frente ao tratamento de feridas crônicas no processo de cicatrização.

### 2.2 Objetivos específicos

Para alcançar este objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- Sintetizar as membranas de hidrogel de PVP propostas;
- Caracterizar as membranas de hidrogel desenvolvidas incorporadas com nanopartícula de cério, *Calendula officinalis* ou *Bixa orellana* L.;
- Estudar a incorporação dos ativos na matriz polimérica;
- Testar “*in vivo*” a eficiência das membranas de hidrogel incorporadas com os princípios ativos.

### 3 Fundamentação Teórica

#### 3.1 Processo de cicatrização

A informação relacionada tanto ao processo de cicatrização de ferimentos quanto à utilização de técnicas curativas tem se expandido e vem sofrendo alterações drásticas nas últimas três décadas. No passado, o processo de cicatrização era considerado um processo natural de cunho temporal, ficando o paciente refém do mesmo (BARANOSKI e AYELLO, 2008).

A cicatrização, ilustrada na Figura 1, é um processo biológico complexo, multifatorial, contínuo e que se dá fundamentalmente no tecido conjuntivo. Ela está dividida em três fases distintas, didaticamente, porém sobrepostas: inflamatória, fibroblástica e remodelamento. Em diferentes regiões de uma mesma ferida, diferentes fases da cicatrização podem estar ocorrendo concomitantemente (BROUGHTON *et al.*, 2006; STRONCEK *et al.*, 2009).

##### - Fase inflamatória

A fase inicial – inflamatória - é fundamental no processo de reparo e tem duração de um a quatro dias, tendo como objetivo conter e definir a extensão da área lesionada, combater a contaminação por bactérias e controlar o acúmulo de tecidos mortos ou danificados. (BALBINO *et al.*, 2005)

##### - Fase Fibroblástica

Também é conhecida como fase de reparação, onde se dá início à síntese dos componentes da matriz extracelular (fibrogênese), rica em ácido hialurônico e colágeno tipo I e III. A ação de macrófagos inicia a transição para esta segunda fase do reparo da lesão em que se desenvolve a formação do tecido de granulação. O tecido de granulação consiste de uma densa população de macrófagos, fibroblastos e novos vasos, embebidos em uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico (BALBINO *et al.*, 2005).

##### - Fase de Remodelamento ou maturação

Esta fase é dinâmica e objetiva a formação do tecido cicatricial com redução da superfície sangüinolenta, produzindo a aproximação das bordas da lesão, contribuindo para o fechamento da mesma. Esta fase é longa, tem início entre o sétimo e o décimo quarto dias de lesão e geralmente, atinge um valor de até 80% da força apresentada pela pele íntegra. O valor total pode ser apresentado em até um ano (BALBINO *et al.*, 2005; BROUGHTON *et al.*, 2006).

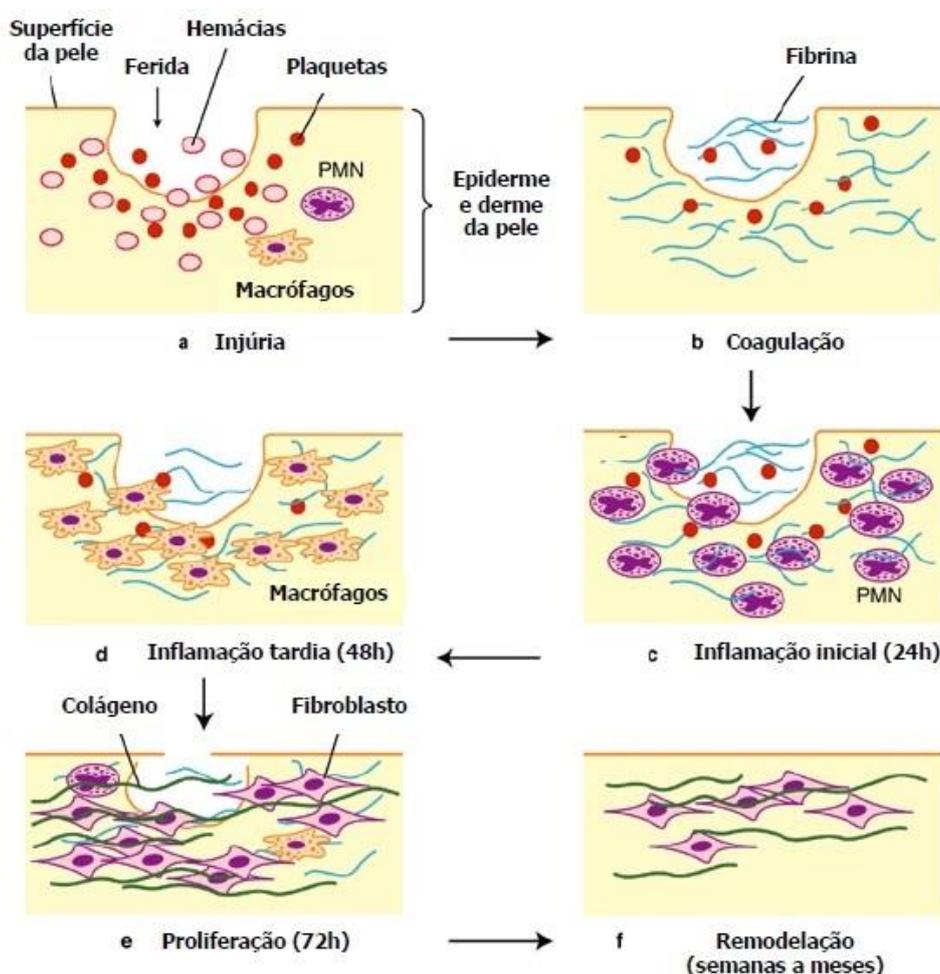


Figura 1 Ilustração esquemática do processo de cicatrização de lesões cutâneas.  
Fonte: VITORINO FILHO (2011), modificado pelo autor.

A cicatrização processa-se na maioria das vezes de forma rápida e satisfatória. Nos casos de ferimentos crônicos, esta progressão natural é afetada, ocorrendo à ausência ou a lentidão deste processo de reparo (MANNING *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2011). No entanto, fatores como estado nutricional, doenças preexistentes, uso de vestimenta, álcool e fumo podem influenciar negativamente neste processo de regeneração da pele (MARTINS *et al.*, 2006).

Se ocorrer contaminação por bactérias, principalmente se esta contaminação estiver acima de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) por miligrama de tecido, ocorre a interrupção do processo de cicatrização, mesmo com a utilização de enxertos ou recobrimentos secundários. A infecção por bactérias atinge a fase inflamatória de maneira a prolongá-la, resultando na reepitelização, contração e deposição de colágeno, o que dá origem, nestas condições, ao tecido necrosado (BONACIN, 2006).

Os principais fatores que podem favorecer a cicatrização são: programas de controle de infecções; combate ao estresse, devido a sua interferência maléfica no equilíbrio hormonal orgânico e uso de substâncias farmacológicas que comprovadamente apresentem favorecimento do processo cicatricial (MARTINS *et al.*, 2006).

### **3.1.1 Curativos para o tratamento de feridas**

A pele natural é considerada um cobrimento perfeito para uma ferida, assim um curativo ideal deve tentar replicar suas propriedades (MORIN e TOMASELLI, 2007). Historicamente, os curativos foram desenvolvidos primeiramente para desempenhar apenas um papel passivo e protetor no processo de cura (HARDING *et al.*, 2000). Novas e recentes alternativas aos curativos convencionais têm sido desenvolvidas; estas incluem a mistura de diferentes polímeros utilizando métodos de reticulação mais eficientes para criar materiais melhorados que garantem um ambiente ideal para a cicatrização da ferida.

Nas últimas décadas, o tratamento de feridas obteve uma evolução com a descoberta de curativos úmidos, característica que pode tornar o processo de cicatrização mais rápido e eficiente. Um ambiente úmido é também um fator importante para induzir a proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos bem como para aumentar a síntese de colágeno, levando à formação reduzida de cicatriz (MOURA *et al.*, 2013).

Além de garantir a umidade ideal para ambientes de feridas, atualmente é aceito que um curativo também deve: (i) ter a capacidade para proporcionar o isolamento térmico, a troca de gases, e ajudar a remoção de detritos promovendo, assim, uma melhoria do processo de reconstrução de tecidos; (ii)

ser biocompatível e não provocar qualquer reação alérgica; (iii) proteger a ferida de infecções; e (iv) ser facilmente aplicado e removido sem causar trauma (MORIN e TOMASELLI, 2007; MOURA *et al.*, 2013).

Em tratamento de feridas crônicas, geralmente são utilizados curativos hidroativos, uma vez que facilmente se adaptam às feridas e são capazes de manter um ambiente úmido que pode melhorar o processo de cura (WELLER e SUSSMAN, 2006). Para complementar e melhorar as funções gerais dos curativos, várias estratégias diferentes tem sido desenvolvidas, uma delas as que envolve a incorporação de substâncias bioativas. Drogas e / ou outros potenciadores de cura, como extratos naturais, podem ser incorporados nos curativos para feridas de matrizes poliméricas principalmente para melhorar e acelerar a cicatrização (MOURA *et al.*, 2013; WELLER e SUSSMAN, 2006).

A utilização de materiais poliméricos, tais como hidrogéis, como biometrias para a gestão de cuidados de feridas tem aumentado nos últimos tempos, uma vez que estes materiais apresentam diversas vantagens, tais como o alívio da dor, absorção, barreira para os microrganismos, permeabilidade ao oxigênio, a transparência, o comportamento mecânico que pode ser adequado de acordo com a aplicação e capacidade geral para administrar fármacos de uma maneira controlada (ROGERO *et al.*, 2003).

Curativos de hidrogéis são capazes de promover o desbridamento autolítico (consiste na remoção do tecido não viável, detritos celulares, exsudado e todos os resíduos estranhos, de forma a minimizar a infecção da ferida e promover a sua cicatrização) de tecidos necróticos e são geralmente mais eficientes na secagem de feridas com alguns exsudados (secreção) (DUMVILLE *et al.*, 2012).

### **3.2 Biomateriais**

Os biomateriais são usados em recursos médicos, sobretudo naqueles que são implantados temporariamente ou permanentemente no corpo humano. O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982 como:

Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais em origem, que são usadas por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS e TWEDEN, 1995).

A parte realmente significativa da definição da Conferência de Consenso é que ela foi referida à interação com sistemas biológicos. Para se qualificar para esta definição descrita, um material deve ser usado em uma situação na qual deve permanecer em contato com sistemas vivos por um tempo suficientemente longo para que alguma interação significativa ocorra (DOUGLU, 2004).

Um biomaterial é um material usado para substituir parte de um sistema vivo ou para funcionar em contato íntimo com tecido vivo. A palavra biomaterial é geralmente utilizada para reconhecer materiais para aplicações biomédicas, destinado a salvar vidas, aliviar o sofrimento e melhorar a qualidade de vida para um grande número de pacientes a cada ano. Os biomateriais são classificados em quatro grupos: polímeros, metais, cerâmicas e compósitos (SAHA *et al.*, 2011)

Dentre os muitos biomateriais utilizados, os polímeros apresentam grande potencial de uso, por apresentarem características mecânicas semelhantes as dos materiais biológicos e ser de fácil manuseio (GRIFFITH, 2000). Entre os biomateriais poliméricos destacam-se os hidrogéis (PEPPAS *et al.*, 2006) os quais possuem diversas aplicações como vasta utilidade na área da medicina, desde a oftalmologia, à ortopedia, cardiologia, até aos sistemas de liberação controlada. Dentre todas estas aplicações biomédicas, os estudos se concentram no desenvolvimento de hidrogéis poliméricos como curativo de feridas com material cicatrizante considerando sua aplicação para fins extracorpóreos (SAHA *et al.*, 2011).

Há uma enorme variedade de biomateriais que podem ser denominados, de forma geral, polímeros naturais, sintéticos e derivados de matrizes acelulares. No entanto, para ser considerado biomaterial, estes devem ser isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ser atóxico, não carcinogênico, antigênico e mutagênico (SILVA, 2007).

Nesse aspecto, destaca-se a modificação de polímeros sintéticos e naturais que, combinados entre si, produzem misturas poliméricas (blendas) com

propriedades desejadas (ação e biocompatibilidade) para a obtenção de novos produtos para uso biomédicos (PAUL, 1985). A utilização de radiação ionizante tem-se demonstrado importante no decorrer dos anos para progressos nas modificações de polímeros (JESZKA *et al.*, 2006).

Quando o corpo humano entra em contato com um material sintético, o tecido reage aos implantes de forma diferentes dependendo da composição, das características superficiais e da carga funcional aplicada. No geral alguns termos descrevem ou classificam uma biomaterial em relação a sua interação com o tecido, como bioinerte, bioativo e biodegradável (RODRIGUEZ e BICALHO, 2009). Porém o termo bioinerte não é adequado, de acordo com a Conferência de Sociedade Europeia para Biomaterias realizada na Inglaterra em 1986, já que todo material induz algum tipo de resposta, mesmo que mínima (BERTRAN, 2000).

### **3.3 Hidrogel**

Os hidrogéis podem ser definidos como polímeros reticulados constituindo de uma estável rede tridimensional e são capazes de intumescer e reter grandes quantidades de água ou fluidos biológicos, que preenchem o espaço entre as macromoléculas sem se dissolver, podendo chegar a centenas de vezes a massa dos polímeros original envolvidos no sistema (ROSIK e ULANSKI, 1999, LUGÃO e MALMONGE, 2001).

Hidrogéis têm recebido atenção considerável nos últimos 50 anos, devido a sua promissora gama de aplicações. Eles também possuem um grau de flexibilidade muito semelhante ao tecido natural devido ao seu grande conteúdo de água (AHMED, 2015). Suavidade, elasticidade e capacidade para armazenar um fluido preservando sua integridade fazem do hidrogel um material exclusivo (ROSIK e ULANSKI, 1999; LUGÃO e MALMONGE, 2001).

A insolubilidade e a estabilidade desses hidrogéis variam em função da formação da rede tridimensional. A capacidade para absorver água surge a partir dos grupos hidrofílicos funcionais -OH, -COOH, -CONH, -SO<sub>3</sub>H, entre outros ligados ao esqueleto polimérico, enquanto sua resistência à dissolução surge de ligações cruzadas entre as cadeias de rede poliméricas, dando

origem à sua estrutura 3-D, como ilustra a Figura 2 (HENNINK e VAN NOSTRUM, 2012; AHMED, 2015).

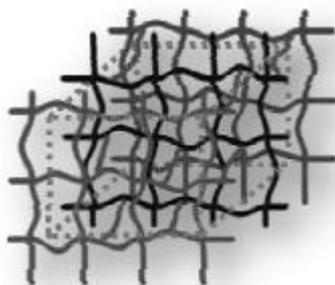


Figura 2 Ilustração da estrutura 3-D dos hidrogéis  
Fonte: BONACIN (2006, p. 34)

Deste modo, os hidrogéis são comumente classificados como químicos ou físicos, de acordo com a natureza das suas ligações cruzadas (PEPPAS *et al.*, 2000). Além disso, podem ser de origem natural ou sintética. Normalmente possuem aparência como matriz, filme ou microesferas, dependendo da técnica de polimerização envolvida na preparação processo.

Os hidrogéis sintéticos tem despertado interesse com o estabelecimento dos primeiros por Wichterle e Lim, em 1954. Mas especialmente durante as duas últimas décadas, hidrogéis de origem natural foram gradualmente substituídos por hidrogéis sintéticos, pois estes apresentam longa vida útil, elevada capacidade de absorção de água, elevada resistência do gel e estabilidade a variações de temperatura. Os polímeros sintéticos são hidrofóbicos na natureza e quimicamente mais fortes em comparação com polímeros naturais (AHMED, 2015).

Os hidrogéis por serem de consistência muito flexível, não abrasiva, permeáveis e com capacidade de absorver e trocar fluidos com organismos vivos encontram grande emprego como biomateriais. Seus principais usos são como lentes de contato, substratos para engenharia de tecidos, membranas para liberação controlada de fármaco, de aplicações em ortodontia, implantes de cartilagem e cardiovasculares, curativos para ferimentos, queimaduras, entre outros (VILLANOVA *et al.*, 2010).

Os hidrogéis à base de polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG) e ágar, foram desenvolvidos, em primeiro lugar, como curativos para ferida oriunda de queimadura pelo Dr. Rosiak, de origem Polonesa (ROSIK *et al.*, 1989). Este

obteve um amplo sucesso com pedido de tratamento médico em outros tipos de ferimentos e doenças desde a sua introdução no mercado, em 1992 (SOLER *et al.*, 2012). Podem ser produzidos a um custo relativamente baixo, sendo um processo é simples, seguro e eficiente (WONA e JANIK, 2010).

A poli(N-vinil-2-pirrolidona) também conhecida por polivinilpirrolidona (PVP) , é classificado como um polímero sintético. Foi obtido no início da 2ª Guerra a partir da polimerização da amida cíclica N-vinil -2-pirrolidona (OLIVEIRA, 2012). Este polímero destaca-se por ser biocompatível, apresentar caráter anfipático, que possibilita a formação de hidrogéis, bem como a inclusão de moléculas de interesse (PINTO *et al.*, 1999) e apresenta propriedades semelhantes às de uma proteína devido à sua estrutura de pirrolidona (SALLES *et al.*, 2015) .A Figura 3 apresenta o mero de PVP.

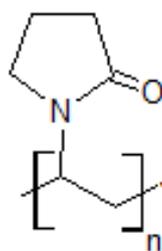


Figura 3 Mero Poli(n-vinil-2-pirrolidona) PVP  
Fonte: Próprio autor.

A Polivinilpirrolidona (PVP) vem sendo amplamente utilizada para a produção de hidrogéis, pois apresenta potencial para ser aplicada nas mais diversas áreas, principalmente a biomedicina. Tem sido usada com sucesso como um material básico para a fabricação de curativos de hidrogel sendo membranas compostas por sistemas poliméricos reticulados (ou entrelaçados), em função de apresentar boa biocompatibilidade, serem constituídos com cerca de 90% de água (se o teor em água é superior a 90%, estes materiais são geralmente designado como superabsorventes) (JEFFCOATE *et al.*, 2004), permeabilidade ao oxigênio e podendo também reter substâncias solubilizadas, com propriedades específicas (AJJI *et al.*, 2005, ROSIAK e YOSHII, 1999). A reticulação do PVP em solução aquosa para formação de hidrogel foi feita por pela primeira vez por Charlesby e Alexander em 1995 (ALCÂNTARA, 2013).

O poli(etilenoglicol) (PEG) é um homopolímero termoplástico, obtido pela polimerização catalítica do óxido de etileno (CAREY e SUNDBERG, 2007). É

miscível em água, possui baixa toxicidade, consegue ser compatível com uma grande variedade de formulações e possui uma boa estabilidade. (CLINTON e MATLOCK, 1990).

O ágar é uma mistura complexa de polissacarídeos extraídos de espécies de algas vermelhas. É insolúvel em água e solúvel em água fervente. Quando fervido (não fundido abaixo de 85 °C) torna-se um líquido límpido e na temperatura entre 32 °C e 38 °C ele torna-se sólido para resultar em um gel firme (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1997).

O plastificante poli(etilenoglicol) e o gelificante ágar utilizados não fazem parte da reticulação formada pela polivinilpirrolidona, a reação é sensível aos componentes da solução a ser irradiada, como solvente e aditivos que afetam a conformação da cadeia polimérica (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A síntese do hidrogel pode ser a partir de qualquer polímero hidrofílico que possa ser reticulado formando uma rede tridimensional. A reticulação pode ser de natureza química ou física. (PEPPAS e KHARE, 1993; SHETYE *et al.*, 2015).

A reticulação por reação química necessita de um agente reticulante. Este agente normalmente liga as cadeias de polímeros através de seus grupos multifuncionais, como por exemplo, a reação de Frenon. Um segundo método utilizado é a reação de copolimerização entre dois ou mais monômeros e um monômero multifuncional, que é presente em menor quantidade. Outro método envolve o uso da combinação de um monômero e uma cadeia polimérica linear que são reticulados por um agente químico (PEPPAS, 1996).

A reticulação de hidrogéis via radiação ionizante, pode ser dada através da radiação gama ou da UV-C. O uso da radiação na reticulação de hidrogéis pode ser definido como resultado de combinação mútua de macros radicais. A radiação gama, em especial, se tornou mais eficiente e viável, pois possibilita a reticulação e a esterilização simultaneamente, além de ser uma tecnologia que permite a simplificação do processo de produção (BISWAL *et al.*, 2007; FOROUTAN e RABANI, 2007).

Os agentes de reticulação têm de ser introduzidos para evitar a dissolução das cadeias ou segmentos poliméricos hidrofílicos na fase aquosa. Uma grande variedade de métodos de reticulação já foram utilizados para preparar hidrogéis (HENNINK e VAN NOSTRUM, 2012). No entanto, a elevada solubilidade em

água impede que a PVP seja moldada *in vivo*, de modo que a PVP seja utilizada principalmente na forma de uma rede reticulada. Por outro lado, o hidrogel, depois de ser reticulado, torna-se não biodegradável, o que limita a sua aplicação no campo da engenharia de tecidos (JIAO *et al.*, 2006).

### 3.3.1 Hidrogel Reticulado por Radiação Gama

Desde os primeiros biomateriais de origem polimérica, cientistas se depararam com um problema decorrente do uso de iniciadores químicos nas suas reações de reticulação e a conseqüente toxicidade dos mesmos. Este problema foi o ponto de partida para a pesquisa de novas formas de reação consideradas “limpas”, ou seja, fabricar um produto puro, não-contaminado com materiais de lastro ou os resíduos de iniciadores tóxicos, mas que, ao mesmo tempo, conseguissem produzir materiais comparativamente semelhantes aos conseguidos por métodos anteriormente testados (CASIMIRO *et al.*, 2005; CASIMIRO *et al.*, 2005; ROSIAK *et al.*, 1995).

Foi neste cenário que surgiu a utilização da radiação de alta energia na preparação de biomaterias. As radiações de alta energia, como a radiação  $\gamma$ , é um exemplo de tipos de radiação atualmente usada para este fim. Contendo instalações seguras para os seres humanos e meio ambiente (ROSIK *et al.*, 1995).

Os raios  $\gamma$  foram descobertos no início do séc. XX, em 1900, por Paul-Ulrich Villard e posteriormente estudados por Marie e Pierre Curie. Ao contrário de outros tipos de radiação, como a alfa ou a beta, os raios  $\gamma$  propagam-se como uma onda eletromagnética ao invés de se propagar através de partículas. Além disso, não apresentam qualquer tipo de carga elétrica (HALLIDAY *et al.*, 1995).

Os raios  $\gamma$  utilizáveis em laboratório são produzidos geralmente após uma reação de decaimento nuclear. Em diferentes elementos, após reações deste tipo, o núcleo permanece num estado de energia superior ao fundamental, ocorrendo então a liberação dessa energia em excesso através de radiação eletromagnética e radiação  $\gamma$ . Desta forma, isótopos instáveis, como o  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  e  $^{60}\text{Co}$ , são as fontes primordiais deste tipo específico de radiação (ALMEIDA, 2010; XAVIER *et al.*, 2007).

Os raios  $\gamma$  possuem comprimentos de onda muito pequenos, no intervalo de  $10^{-12}$  a  $10^{-14}$  metros, apesar de apresentarem um comprimento de onda fixo associado ao tipo de fonte emissora. Além disso, a fonte de radiação  $\gamma$  é liberada de forma contínua e, devido ao seu comprimento de onda, possui um poder de penetração bastante elevado, sendo necessário equipamento específico de proteção (HALLIDAY *et al.*, 1995; ROSIAK, *et al.*, 1995; ROSIAK e YOSHII, 1999).

As reações de reticulação provocadas pela radiação  $\gamma$  ocorrem por meio dos radicais livres formados durante a transferência de energia da radiação para o sistema eletrônico do átomo ou da molécula, por tal motivo é denominada também por radiação ionizante. A interação da radiação ionizante com a matéria promove eventos físicos-químicos, em nível atômico. A Figura 4 mostra os dois caminhos para a formação de um radical polimérico: o direto e o indireto (LOPERGOLO, 2002).

#### Direto



Onde P é a molécula polimérica

#### Indireto

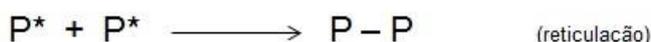
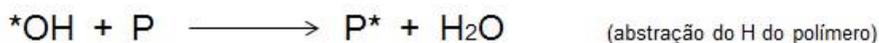
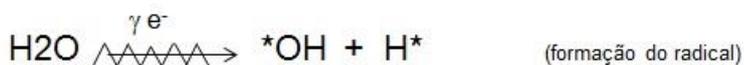


Figura 4 Formação do radical polimérico  
Fonte: AMARAL (2009, p. 31), modificado pelo autor..

A irradiação da solução aquosa de PVP resulta na formação de macroradicaís e radicais Hidroxilas ( $OH^*$ ) formados durante a radiólise do solvente. A reticulação é resultante da recombinação mútua de macroradicaís formados, e

como resultado desse processo há formação de ligações covalentes entre estas moléculas, Se a quantidade destas novas ligações for suficientemente grande, aparece no sistema uma fração gel insolúvel ( ROSIAK e ULANSKI, 1999).

O espaço entre as cadeias é acessível para a difusão de solutos, representado pela Figura 5. Quando inchado estes espaços contem água ou, de um modo geral, a moléculas de solvente, podendo também obter ativos adicionados ao hidrogel. As dimensões características nesta região dependem do grau de reticulação. Quanto maior o grau de reticulação, menor quantidade de água pode ser absorvida (ROSIAK *et al.*, 1995).

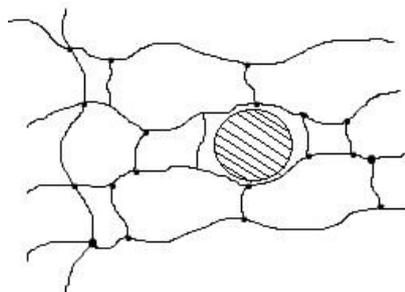


Figura 5 Esquema de rede de hidrogel. Círculo denota espaço disponível para a difusão.  
Fonte: Próprio autor.

Os polímeros podem ser reticulados por radiação em diferentes condições tanto no estado sólido como em solução, sendo a água o solvente mais utilizado. No entanto, a reticulação feita no estado sólido requer maior dose de radiação (ROSIAK *et al.*, 1995)

O processo de formação de hidrogéis por radiação  $\gamma$  possui algumas vantagens controle reacional facilitado, reticulação em baixas temperaturas, esterilização em uma única etapa tecnológica, custos relativamente baixos de operação e ausência de contaminação por iniciadores químicos, faz com que este tipo de reação seja cada vez mais utilizado na síntese de materiais para aplicação biomédica (BISWAL *et al.*, 2007; FOROUTAN e RABANI., 2007; ROSIAK *et al.*, 1995).

### 3.4 Nanopartícula de Cério

Entre os elementos de terras raras (os 15 lantanídeos, juntamente com o escândio e o ítrio), o cério é o elemento mais abundante, com 66,5 ppm na crosta terrestre, seguido do cobre (60 ppm) e do estanho (2,3 ppm) (WANG *et al.*, 2013).

Dentre os compostos de Cério, o dióxido de Cério ( $\text{CeO}_2$ ), também chamado de óxido de Cério (IV) é o mais estável devido a sua estrutura cúbica do tipo fluorita tanto no material massivo como e na forma de nanopartículas - diâmetro entre 1 e 100 nanômetros. (SANTOS, 2013; MUMANI, 2009). A Figura 6 ilustra a estrutura ideal cúbica de face centrada do tipo fluorita do  $\text{CeO}_2$ , onde as esferas brancas simbolizam os cátions  $\text{Ce}^{+4}$  e as vermelhas, os ânions  $\text{O}^{-2}$ .

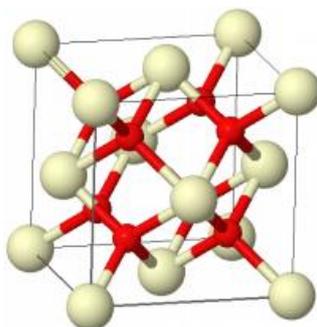


Figura 6 Estrutura ideal cúbica de face centrada do tipo fluorita do  $\text{CeO}_2$ .  
Fonte: SANTOS (2013, p. 28)

As nanopartículas de  $\text{CeO}_2$ , também chamadas de *ceria*, possuem uma elevada relação superfície-área-volume que cria vacâncias de oxigênio, oriundas da redução de átomos de  $\text{Ce}^{4+}$  para  $\text{Ce}^{3+}$ , gerando assim, uma grande versatilidade de uso para este produto (HIRST *et al.*, 2013).

As vacâncias ou locais reativos na superfície da nano- $\text{CeO}_2$ , que atuam como locais para a eliminação de radicais livres e propriedades de transporte, estão sendo investigados atualmente como intervenções terapêuticas em sistemas biológicos. Tais radicais livres são formados em geral em regiões submetidas a algum dano, seja ele patogênico ou mecânico (NOLAN *et al.*, 2006; HIRST *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; GENIËR *et al.*, 2017).

O crescimento de nanocompósitos poliméricos, comumente através da união de polímeros artificiais e partículas inorgânicas ou pela combinação de

nanopartículas a matrizes de polímeros, é projetado para produzir materiais, que demonstram características melhoradas e podem ser considerados uma nova classificação de materiais (AL-HADA *et al.*, 2016).

No entanto, as nanopartículas de CeO<sub>2</sub> têm sido estudadas para numerosas aplicações científicas e de engenharia tradicionais, não havendo muitos estudos sobre as potenciais aplicações biomédicas da ceria atualmente, quando foi demonstrada sua propriedade antioxidante (WANG *et al.*, 2013; GENIÉR *et al.*, 2017).

As nanopartículas de óxido de cério foram propostas para aumentar o poder antioxidante devido ao seu efeito catalítico na estimulação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) - que é uma enzima importante na defesa antioxidante na maioria das células - permanecendo ativa nos tecidos por longos períodos, movendo-se espontaneamente entre o estado oxidado e reduzido (POURKHALILI *et al.*, 2011). Em estudos recentes, essa habilidade antioxidante possibilitou a aplicação de nanopartículas de CeO<sub>2</sub> para proteger contra danos por radiação, estresse oxidativo e inflamação celular (WANG *et al.*, 2013).

Adicionalmente, foi demonstrada a capacidade de nanopartículas de óxido de cério para radioproteção e conferir proteção neuronal e ocular (OUYANG *et al.*, 2016; PONNURANGAM *et al.*, 2014; PIERSCIONEK *et al.*, 2009). Este biomaterial versátil tem potencial para ser usado em nanoterapêuticos, diminuindo mediadores de inflamação crônica sem dosagem repetida. (HIRST *et al.*, 2011). Outros estudos mostram atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de bactérias (BABENKO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Os estudos de toxicidade da nanopartícula de cério ainda são muito recentes. Forest (2017) demonstrou um impacto da morfologia das nanopartículas de CeO<sub>2</sub> sobre a sua toxicidade "*in vitro*". Citando que as nanopartículas cúbicas / octaédricas, dependendo da dose, apresentaram melhores respostas anti-inflamatória e de citotoxicidade. Embora outros estudos complementares ainda sejam necessários, isso argumenta fortemente para o fato de que a geometria da nanopartícula de cério é um aspecto que não deve ser negligenciado (FOREST *et al.*, 2017).

Os testes de toxicidade da nanopartícula de cério são muito dependentes de propriedades superficiais. Por esta razão, é uma boa ideia realizar ensaios de

toxicidade para os materiais recentemente desenvolvidos em condições que imitem a exposição ao potencial organismo. Enquanto não for desenvolvida uma base de dados detalhada para materiais à base de nanopartícula de cério, é essencial testar todos os materiais desenvolvidos, designados para aplicações biomédicas, utilizando uma configuração experimental como representativa na possível aplicação (GAGNON e FROMM, 2015).

### 3.5 *Calendula officinalis*

- POSIÇÃO TAXONÔMICA

Segundo Volpato (2005 apud CRONQUIST, 1988):

Reino – *PLANTAE*

Divisão – *MAGNOLIOPHYTA*

Classe - *MAGNOLIOPSIDA (DICOTILEDONEA)*

Sub-classe – *ASTERIDAE*

Ordem – *ASTERALES*

Família – *ASTEARACEAE*

Gênero - *CALENDULA*

Espécie – *Calendula officinalis*

Dos métodos utilizados em terapia na Medicina Natural, a fitoterapia é, sem dúvida, um dos mais antigos. Já nos primórdios da humanidade, o homem, ao procurar nas plantas uma fonte de alimento, observou que algumas delas promoviam efeitos terapêuticos. Essa informação foi passada para outras gerações, propagando o conhecimento dos efeitos médicos até a atualidade (OZAKI e DUARTE, 2006).

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo, notadamente, nestes últimos anos, tanto que, em 2001, o mercado mundial de fitoterápicos girou em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares.

(YUNES *et al.*, 2001). E em 2011, este mercado mundial movimentou US\$ 26 bilhões (DE CASTRO e ALBIERO, 2016).



Figura 7 *Calendula officinalis*

Fonte: [www.boironcalendula.com/about/garden-marigold](http://www.boironcalendula.com/about/garden-marigold) (2017)

A *Calendula officinalis* é uma planta herbácea, que contém seus princípios ativos principalmente nos capítulos florais. Frequentemente pesquisada e conhecida popularmente apenas como calêndula. Esta planta é originária do Mediterrâneo e hoje disseminada pelo mundo. Como observa-se na Figura 7, a calêndula possui flores alaranjadas das quais se extrai óleo por maceração. A sua composição química é bastante variada, compreendendo os princípios ativos formado por calendulina, ácido málico, mucilagem, cumarinas, quinonas, óleos essenciais voláteis, carotenoides, terpenoides, saponinas, flavonoide, tarino, saponina triterpênica e ácido salicílico (PARENTE *et al.*, 2002; MULEY *et al.*, 2009).

Em estudos anteriores foi mostrado que este óleo apresenta ação externa e interna sobre todas as feridas traumáticas, produzindo rápida cicatrização e impedindo a supuração (BALDUCCI-ROSLINDO *et al.*, 1999). Além disso, a calêndula é anti-inflamatória, antiespasmódica, cicatrizante, analgésica, colerética e antitumoral, sendo usada sob as mais variadas formas, tais como: infusões, tintura, unguento, utópico, por via oral e através de uso homeopático (PARENTE *et al.*, 2002; MULEY *et al.*, 2009; DELLA LOGGIA *et al.*, 1994; JIMÉNEZ-MEDINA *et al.*, 2006).

A ação anti-inflamatória é a atividade mais estudada e com melhores resultados pela *Calendula officinalis*, sendo que os principais constituintes fitoquímicos responsáveis pela ação são as saponinas (aproximadamente 6%)

e flavonóides (0,2-0,9%). (PARENTE *et al.*, 2002; MULEY *et al.*, 2009; BALDUCCI-ROSLINDO *et al.*, 1999; DELLA LOGGIA *et al.*, 1994). Desta forma, é apresentada potencialmente como uma planta medicinal importante para a humanidade.

### 3.6 *Bixa Orellana*

- POSIÇÃO TAXONÔMICA

Reino – *PLANTAE*

Divisão – *MAGNOLIOPHYTA*

Classe - *MAGNOLIOPSIDA*

Ordem – *MALVALES*

Família – *BIXACEAE*

Gênero - *BIXA*

Espécie – *Bixa Orellana* L.

*Bixa orellana* L. (família *Bixaceae*), comumente conhecida como urucum, é originária da América Tropical. É uma planta muito conhecida e utilizada tradicionalmente pelos Índios brasileiros e peruanos, como fonte de matéria prima para tinturas vermelhas usadas para os mais diversos fins, entre eles, protetor da pele contra o sol e contra picadas de insetos; há também o simbolismo de agradecimento aos deuses pelas colheitas, pesca ou saúde do povo (ROBINEAU, 1995).



Figura 8 *Bixa orellana* L.

Fonte: [www.ibflorestas.org.br/loja/muda-40a60-urucum-290ml.html](http://www.ibflorestas.org.br/loja/muda-40a60-urucum-290ml.html) (2017)

O pigmento do urucum é extraído da camada externa das sementes de *Bixa orellana* L., consistindo basicamente de cis-bixina, incluindo bixina e norbixina, que representa mais de 80% dos carotenoides totais ali presentes. Além disso, existem também alguns terpenoides, tocotrienóis, azenos e flavonoides (JONDIKO e PATTENDEN, 1989; SHILPI *et al.*, 2006). Este pigmento é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, e de tintas e vernizes. Do urucum são fabricados os corantes mais difundidos na indústria de alimentos. (SILVA, 2007; SHILPI *et al.*, 2006).

Estudos farmacológicos descritos na literatura revelaram que os extratos de *Bixa orellana* L. ligados à presença de grande quantidade de bixina e norbixina, possuem atividade anti-protozoária e antiagregante plaquetária (VILLAR *et al.*, 1997; BARRIO *et al.*, 2004; COSTA e CHAVES, 2005). Apresentaram também atividade antimicrobiana “*in vitro*” (CASTELLO *et al.*, 2002; VENUGOPALAN *et al.*, 2011), atividade antioxidante (MARTINEZ-TOME *et al.*, 2001; VENUGOPALAN *et al.*, 2011), e atividade anticlastogênica (ANTUNES *et al.*, 2005).

Em estudos recentes foram evidenciados também sua atividade antibacteriana (MEDINA-FLORES *et al.*, 2016; MAJOLO *et al.*, 2013), contra espécies selecionadas que associadas a diarreia e disenteria, e pela sua capacidade para neutralizar os radicais livres *in vitro* (MARTINEZ-TOME *et al.*, 2001). Apresentaram também controle metabólico da glicose, em roedores, para tratamento do *Diabetes mellitus* (COSTA e CHAVES, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Metodologia

#### 4.1.1 Preparação das soluções de hidrogel

Os materiais utilizados para a síntese do hidrogel foram a Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) K90 (pó; MM = 360000; Sigma-Aldrich), utilizando o poli(etileno glicol) (PEG) 300 (líquido; MM = 300; Sigma-Aldrich) como plastificante e o ágar (pó; puríssimo; Isofar) como gelificante.

A síntese foi executada de acordo com o proposto por Amaral (2009) e Momesso e colaboradores (2010), como apresentado no Quadro 1. Para o preparo de 1 L de hidrogel, foram adicionados 60 g de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) K 90, 15 g de PEG 300 e completou-se com água deionizada para o volume final de 1 L. Após repouso de 24 horas em temperatura ambiente, aqueceu-se até a fervura e adicionou-se 5 g de ágar, mantendo em aquecimento até completa dissolução dos componentes.

Quadro 1 Descrição da formulação do hidrogel de PVP

<b>Matriz</b>	<b>Composição</b>	<b>Concentração (%)</b>
PVP	PVP K 90	6,0
	PEG 300	1,5
	ÁGAR	0,5
	ÁGUA DEIONIZADA	92,0

Fonte: AMARAL (2009), modificado pelo autor.

A solução preparada foi brevemente resfriada e adicionada em moldes circulares (placa de petri) medindo de 100 mm de diâmetro até atingir 3 mm de espessura, as quais, após resfriamento total, foram seladas com plástico-filme, embaladas adequadamente e enviadas para reticulação em uma fonte emissora de raios gama.

#### 4.1.2 Reticulação por radiação gama

A reticulação da solução foi feita usando radiação gama de forma a obter os hidrogéis, com uma dose de 25 kGy. A irradiação foi realizada com fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Cobalto 60), fabricado pela MDS Nordion no Canadá, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, de geometria circular, Figura 9, operando em doses de 2 kGy/h localizada no Laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN/UFMG, Belo Horizonte, Brasil.



Figura 9 Fonte de Cobalto 60 do Laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN.  
Fonte: Próprio autor.

#### 4.1.3 Incorporação dos princípios ativos

- Incorporação da nanopartícula de cério na matriz de hidrogel

Com as matrizes prontas, 100 mg de nanopartícula de cério, foram sintetizadas no Laboratório de Química da UFES, Campus Alegre. A incorporação das nanopartículas na matriz de hidrogel foi realizada logo após a preparação da fórmula do hidrogel.

Primeiramente obtiveram-se as formulações da matriz polimérica de acordo com a metodologia descrita no item 4.1. Após o resfriamento em aproximadamente 60°C, foi incorporado 0,5 g/L da nanopartícula de cério e misturado até completa homogeneização. Após o procedimento as amostras

foram seladas e enviadas para reticulação. Foram guardadas em temperatura ambiente e lugar escuro, para evitar foto-oxidação.

- Incorporação da *Calendula officinalis* na matriz de hidrogel

Com as matrizes sintetizadas e irradiadas, 0,5 mg de óleo vegetal puro de *Calendula officinalis* (Força da Terra), e 10 mL de solução DMSO 1 % foram incorporado por intumescimento. Após o procedimento a amostra foi novamente selada e guardada em temperatura ambiente e lugar escuro, para evitar foto-oxidação do extrato.

- Incorporação da *Bixa Orellana L.* na matriz de hidrogel

Com as matrizes sintetizadas e irradiadas, 0,3 mg de extrato puro de *Bixa Orellana L.*, gentilmente cedido por Corantec Produtos naturais Ltda, foi diluída em 10 mL de solução DMSO 1 %, após aproximadamente 10 minutos as partículas não dissolvidas e a fase líquida com o pigmento vermelho foram incorporado por intumescimento. Após o procedimento a amostra foi novamente selada e guardada em temperatura ambiente e lugar escuro, para evitar foto-oxidação.

## **4.2 Caracterização da matriz de hidrogel**

### **4.2.1 Esterilização**

Para este teste, uma porção do hidrogel reticulado por radiação gama foi depositada em recipientes com ágar nutriente com auxílio de uma pinça, tudo assepticamente e incubado a 35°C. Após quatro dias na incubadora, as amostras foram retiradas da incubadora e fotografadas para análise de crescimento de microrganismos.

#### 4.2.2 Fração gel

As amostras de membranas de hidrogel reticulados por radiação gamma foram secas em estufa na temperatura de 60°C até massa constante. Após a secagem, cada amostra com cerca de 800mg, em triplicata, foram empacotadas em saquinhos de tecido *non woven* e colocadas para remoção da fração solúvel, por 36h, no extrator *Soxhlet*, utilizando com o solvente a água deionizada. Presume-se que todo o material solúvel tenha sido extraído pela água e o material residual insolúvel (parte reticulada) é a fração gel. Decorrido este tempo as amostras foram novamente secas em estufa na temperatura de 60°C até atingirem peso constante.

O cálculo da fração gel foi realizado pelas Equações 1 e 2 de acordo com a norma ASTM D 2765 (ASTM, 2001).

$$FS (\%) = [(M_i - M_f) / M_i] \times 100 \quad (1)$$

$$FG (\%) = 100\% - FS \quad (2)$$

Sendo FS a fração solúvel, FG a fração gel,  $M_i$  a massa inicial da amostra e  $M_f$  a massa do hidrogel seco.

#### 4.2.3 Intumescimento

O Intumescimento foi caracterizado por dois métodos distintos, o primeiro utilizando água e o segundo uma solução tampão.

- Água

Para determinação do intumescimento máximo, após a síntese, as amostras de hidrogel foram secas em estufa a 50 °C até a obtenção de massa constante. Em seguida, os hidrogéis secos, com cerca de 0,5 g cada, em triplicata, foram imersos em água deionizada, na qual permaneceu por um período total de 24 h à temperatura ambiente e sem agitação, condições consideradas ideais para atingirem o equilíbrio total do intumescimento. A água superficial das amostras intumescidas foi removida com cuidado utilizando papel de filtro. A massa era

verificada a cada hora durante as 8 primeiras horas e posteriormente, quando completado 24 horas. O resultado foi obtido usando-se a equação 3, de acordo com a norma (ASTM D 570).

$$\text{Intumescimento (\%)} = [(m_s - m_d) / m_d] \times 100 \quad (3)$$

Cuja unidade é em porcentagem sendo que  $m_s$  é a massa do polímero intumescido e  $m_d$  a massa do polímero seco em gramas.

- Solução salina

Este ensaio foi realizado com o mesmo procedimento de secagem, porem o teste de intumescimento foi realizado com imersão em solução tampão fosfato salina (PBS), com pH 7,4, que é uma solução simuladora de fluido biológico. As medidas da massa foram realizadas a cada 10 minutos durante os 30 primeiros minutos e a cada 1 hora, por um período de 8 horas e, finalmente, após 24 horas do início do ensaio. Os testes foram realizados em temperatura ambiente e o grau de intumescimento foi calculada pela equação 3.

#### 4.2.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das matrizes de hidrogel foram avaliadas pelo ensaio de tração, para medir o módulo elástico da membrana, importante para analisar a resistência adequada na manipulação. Foi utilizado o texturômetro Brookfield CT-3 Texture Analyzer (Figura 10), disponível no Laboratório da Engenharia de Alimentos da UFES, Campus Alegre.

Foram utilizados corpos de prova retangulares ( $4 \text{ cm}^2$ ) fixados em *probes roller grips* (4 mm D – Aço inox 10 g). No ensaio, as amostras, em triplicata, sujeitas a uma velocidade de 1 mm/s e faixa de carga de 10 Kg, foram comprimidas até a ruptura.



Figura 10 Imagem do texturômetro utilizado  
Fonte: Próprio Autor

#### 4.2.5 Liofilização das membranas de hidrogel

A liofilização é um processo de conservação de produto que envolve dois métodos existentes confiáveis: congelamento e desidratação. Para ser liofilizada, primeiro a membrana de hidrogel foi congelada a uma temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e depois submetida a vácuo, fazendo com que a água presente nas membranas fosse retirada por sublimação. O resultado final é uma membrana com uma estrutura porosa e livre de umidade, sendo capaz de ser reconstruída pela simples adição de água. Foi usado para tal processo o liofilizador L101 da Liotop, localizado no LABIOM - Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares – localizado na UFES, ilustrado na Figura 11.



Figura 11 Imagem do liofilizador de bancada utilizado  
Fonte: [labiom.ufes.br/lioilizador-l101-da-liotop%C2%AE](http://labiom.ufes.br/lioilizador-l101-da-liotop%C2%AE) (2017)

#### 4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A técnica foi utilizada para verificar a estrutura polimérica das amostras. Para a obtenção de alta resolução em escala nano e micro, foi usada baixa tensão na faixa de 20 kV. O aparelho JEOL (JSM – 6610LV) ilustrado na Figura 12 está localizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da UFES. Para a obtenção das imagens por MEV, o preparo das amostras já liofilizadas consistiu na fixação destas com fita de carbono dupla-face no porta amostras e, em seguida, na metalização com ouro para aumento da condutividade elétrica na superfície do material.



Figura 12 Imagem do microscópio eletrônico de varredura  
Fonte: [www.luccarufes.com.br/infraestrutura](http://www.luccarufes.com.br/infraestrutura) (2017)

#### 4.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A técnica foi utilizada para verificar o tamanho e a organização das nanopartículas de cério incorporado na matriz de hidrogel. Para a obtenção das imagens por TEM, o preparo das amostras da nanopartícula de cério em pó consistiu na suspensão da mesma em etanol absoluto e posterior secagem sobre uma grade de carbono de 200 mesh (EMS, Electron Microscope Science). Para a preparação das amostras de hidrogel com a nanopartícula, foi realizada a desidratação de um pequeno pedaço do material com gradiente crescente de acetona e, em seguida, foram incluídas em uma resina epon (EMbed 812, Electron Microscopy Sciences), sendo polimerizado por 48 horas a 60 °C. O material foi seccionado em ultramicrótomos (Power Tome X, RMC Instruments) em seções de 60 a 100 nm de espessura. Nesta etapa foram

utilizadas facas de vidro obtidas pelo equipamento Knife Maker Glass (RMC Instruments, Modelo 12096KM). Os cortes foram colocados em grades de cobre e foram levadas ao microscópio para visualização a 120KV em um Microscópio Eletrônico de Transmissão. O aparelho JEOL (JEM1400, Inc. USA), para visualização a 120 KV, ilustrado na Figura 13 está localizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da UFES sendo utilizado o filamento de hexaboreto de lantânio (LaB6) como fonte de elétrons.



Figura 13 Imagem do microscópio eletrônico de transmissão  
Fonte: [www.luccarufes.com.br/infraestrutura](http://www.luccarufes.com.br/infraestrutura) (2017)

#### 4.2.8 Difração de Raio-X (XRD)

Para avaliar a cristalinidade das membranas e a incorporação dos ativos na matriz polimérica, foi realizada Difração de Raios-X a altos ângulos. O equipamento utilizado foi disponibilizado pelo Laboratório de Materiais Carbonosos e Cerâmicos (LMC), localizado no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo (Vitória-ES). Para este ensaio, o hidrogel seco foi prensado sobre o porta-amostra e levado ao difratômetro, equipamento que realiza a difração de raios-X. As medidas foram realizadas com alvo de cobre e uma varredura contínua com  $2\theta$  variando entre  $10^\circ$  a  $90^\circ$ .

#### 4.2.9 Microscopia de Força atômica (AFM)

A técnica microscopia de força atômica foi usada para verificação das superfícies das amostras. É utilizado um microscópio que utiliza uma sonda que varre ou escaneia toda a superfície da amostra desejada. Atualmente, essa técnica tem sido muito difundida para o estudo de polímeros.

A SPM utiliza as forças de interação entre uma ponta e a superfície para gerar uma imagem tridimensional da superfície. Esta técnica possui três habilidades principais: medição de força, imagem e manipulação. O tipo de interação definida no modo de operação foi imagem O equipamento utilizado foi o Microscópio de Força Atômica Agilent ILM 6000 (acoplado a microscópio de fluorescência Zeiss Axostar Plus), ilustrado na Figura 14, este localizado no laboratório de nanoscopia, associado ao SisNANO da UFV.



Figura 14 Imagem do Microscópio de Força Atômica.  
Fonte: [http://www.posfisicaaplicada.ufv.br/?page\\_id=81#NU](http://www.posfisicaaplicada.ufv.br/?page_id=81#NU)

#### 4.3 Teste Biológico

O termo biocompatibilidade pressupõe que a aplicação clínica de um biomaterial não cause reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente. O primeiro critério para verificar a biocompatibilidade de um material é a avaliação de sua citotoxicidade. Foi realizada uma vasta pesquisa bibliográfica, pela qual foi possível concluir a total biocompatibilidade dos materiais utilizados neste estudo (AJJI *et al*, 2004; AMARAL, 2009; BONACIN, 2006; DAI *et al*, 2012; DARWIS, 2010; FLEISCHER *et al*, 2003; GAGNON e FROMM, 2015; HIGA *et al*, 1999; KUMARI *et al*, 2014; MAJOLO *et al*, 2013;

MULEY *et al*, 2009; NITZ *et al*, 2006; ROGERO *et al*, 2003; WONA e JANIK, 2010 ).

Os animais utilizados foram ratos Wistar, isogênico, machos, estes que configuram a linhagem mais utilizada para estudos experimental de melhoria de cicatrização. Os animais usados neste estudo foram disponibilizados pelo Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Vitória e foram mantidos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre até a finalização deste trabalho.

O teste de cicatrização ocorreu “*in vivo*” utilizando o menor número de animais válidos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no uso de animais (CEUA), da Universidade Federal do Espírito Santo, sob número de protocolo 45/2017, “Preparação e caracterização de hidrogel com nanopartícula de cério, *Calendula officinalis* ou *Bixa orellana L.*, como potenciais curativos de feridas crônicas”, 06 de outubro de 2017.

#### **4.3.1 Inoculação dos modelos experimentais para uso das matrizes de hidrogel.**

Os animais, 250-300 gramas, foram alocados em caixas de polipropileno (um animal/caixa) com grade metálica, mantidos em sala climatizada a 22 °C ± 2 °C, ciclo de luz de 12 h e foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Após um período de aclimatização de duas semanas e meia os animais foram divididos randomicamente entre os 6 grupos experimentais, sendo alocado 10 animais por grupo.

O fluxograma da Figura 15 apresenta o procedimento escolhido para inoculação dos 6 grupos de animais.

Os curativos utilizados foram sintetizados e caracterizados pelo próprio autor, exceto o grupo 6. Neste foi utilizado um gel comercial encontrado em farmácias locais e de fácil acesso titulado de Cicatricure, produzido pelo laboratório Genomma Lab, que tem como especificação estimular a regeneração da pele.

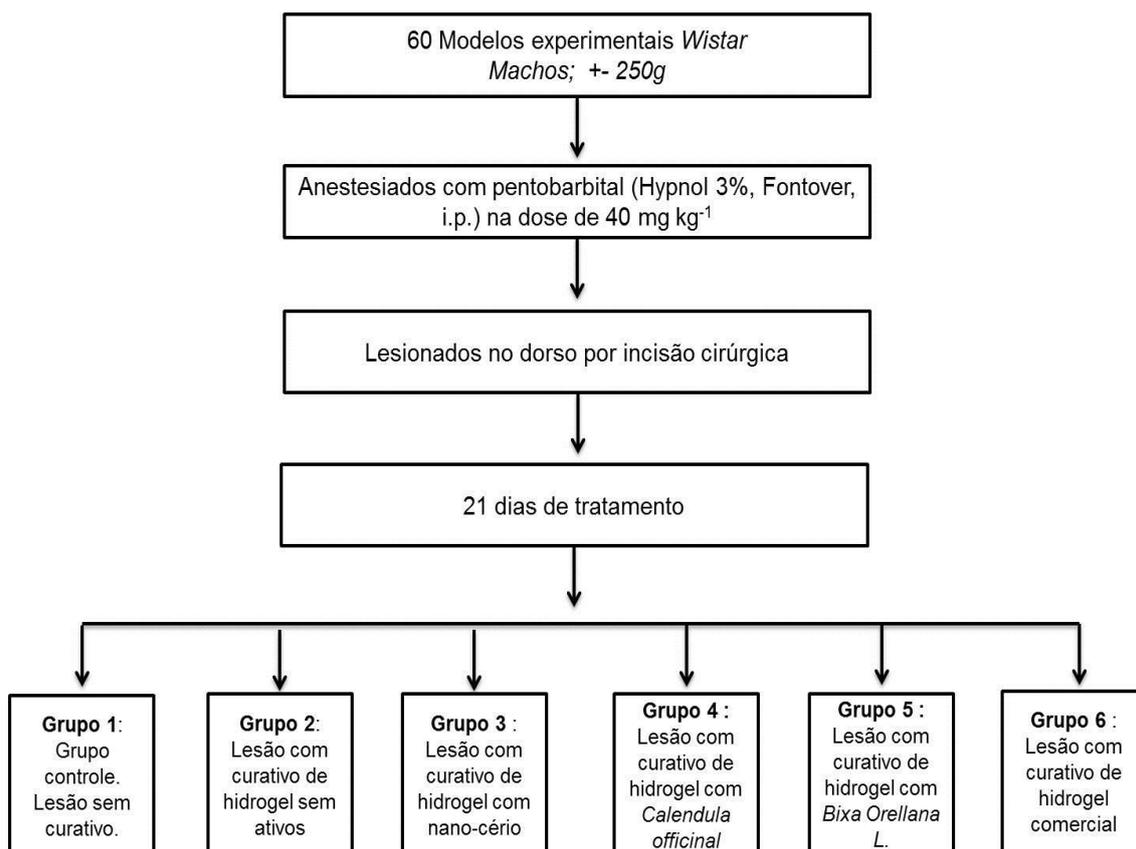


Figura 15 Fluxograma do procedimento escolhido para o tratamento dos grupos experimentais.  
Fonte: Próprio autor.

#### 4.3.2 Avaliação da lesão dos ratos Wistar

As lesões foram realizadas pela equipe de veterinários capacitados no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre, na qual foi realizada uma epilação por tração manual dos pelos do dorso com extensão de 5 cm no comprimento e de largura. Em seguida, foi produzida uma incisão cirúrgica circular no centro da área epilada, que provocou um dano na pele do animal de 2 cm de diâmetro usando um punch dermatológico estéril descartável. Com tesoura, aprofundou-se a incisão até a fáscia (Figura 16). A hemostasia foi feita por compressão digital com gases esterilizados.



Figura 16 Rato depilado com incisão dorsal.  
Fonte: Próprio Autor

O tratamento foi iniciado de imediato com aplicação dos curativos. O curativo foi utilizado de acordo com a Fig. 17 (A e B)

Durante todo o experimento foi realizada a avaliação clínica dos animais onde foram avaliadas aceitação e rejeição do curativo e evolução da cicatrização. A avaliação clínica ocorreu com registros fotográficos e medição do tamanho da lesão (elipse) com o auxílio de um paquímetro nos dia 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento.

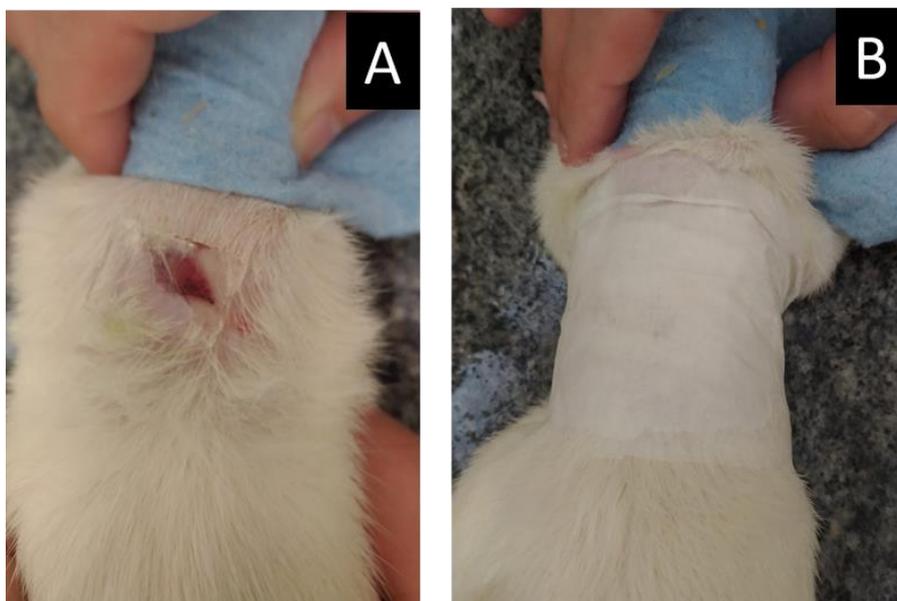


Figura 17 Fotos apresentando a seqüência de aplicação dos curativos de hidrogel (A e B)  
Fonte: Próprio Autor

O procedimento para todos os grupos ocorreu na sequência abaixo (DE OLIVEIRA, 2013):

- 1º Limpeza dos ferimentos com gases estéreis e soro fisiológico;
- 2º Os curativos foram colocados sobre as lesões cutâneas por 48 horas;
- 3º Retirou-se os curativos e deixou-se o ferimento exposto por 24 horas;
- 4º Alternou-se este procedimento por um período de 21 dias.

Depois de 21 dias todos os animais de cada grupo experimental foram eutanasiados, após fim dos registros e tratamentos. Para a eutanásia foram seguidas as normas éticas segundo as normas da resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os animais foram anestesiados com pentobarbital (Hypnol 3%®, Fontover, i.p.) na dose de 40 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, seguido do método físico de exsanguinação.

#### **4.3.3 Análise estatística**

Os dados estatísticos foram analisados utilizando-se o programa *Microsoft Excel* e *graphpad prism for Windows*. A análise conjunta dos efeitos do dia (3, 7, 14 e 21) e dos 6 grupos de hidrogéis distintos, utilizando variável numérica (área da lesão) foi feita pelo teste de ANOVA, isto é, análise de variância com dois fatores, dia e grupo com interação entre eles, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância  $p$ , utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Obtenção das matrizes de hidrogel

As matrizes de hidrogel de PVP foram obtidas por meio da radiação gama conforme descrito em materiais e métodos.

O critério para considerar as membranas adequadas ou não para serem submetidas aos ensaios de caracterização foi a formação de um filme homogêneo, transparente, sem cheiro, elástico, com boa adesividade e com uma resistência adequada para a manipulação, parâmetros avaliados visualmente e manualmente, como pode ser observado na Figura 18.



Figura 18 Matriz de hidrogel de PVP  
Fonte: Próprio Autor

### 5.2 Esterilização

Após o processo de irradiação das membranas de hidrogel, estes permaneceram lacrados e ficaram armazenados em caixas de isopor fechadas em um laboratório controlado até a data de utilização.

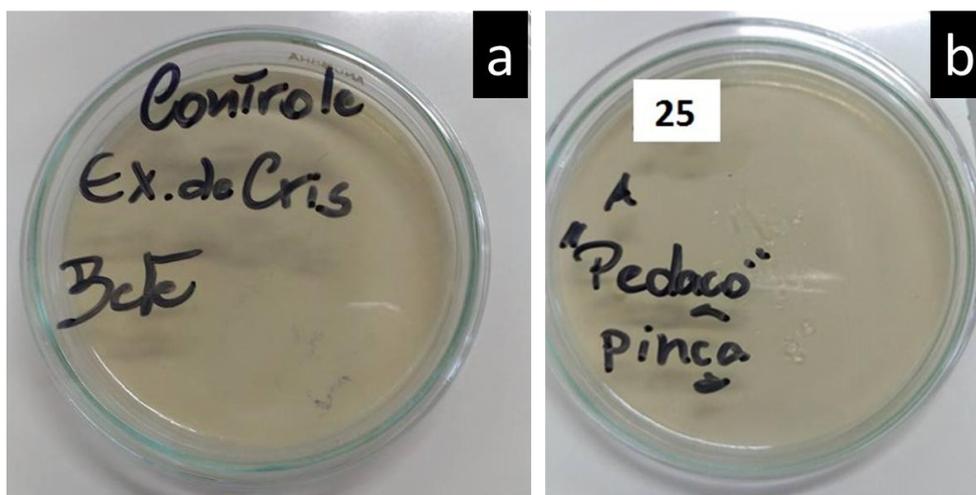


Figura 19 Resultado do teste esterilização da matriz de hidrogel. (19a) controle padrão em ágar nutriente; (19b) hidrogel irradiado a 25 kGy.

Fonte: Próprio Autor

Um simples teste de esterilização foi realizado para entender melhor a eficiência das doses de radiação sobre a contaminação proveniente do processo de síntese. Supõe-se que, com a etapa de radiação, deveria acontecer a total eliminação da vida microbiológica destes materiais, pois ao encontrar os micro-organismos, a energia rompe a cadeia de DNA desses seres, levando-os à morte ou à incapacidade de reprodução. Como as ondas eletromagnéticas possuem grande poder de penetração, os organismos podem ser alcançados onde quer que estejam, tanto em embalagens lacradas como em produtos acondicionados das mais variadas maneiras, o que garante a total eficácia do processo.

Na norma de esterilidade, ISO 11137, a dose absorvida de referência no processo de garantia de esterilização é de 25 kGy, levando em conta a eficiência da dose e o menor tempo de exposição da amostra (AJJI *et al*, 2005). No teste realizado, não foi encontrado nenhum traço de contaminação (Figura 19b) por micro-organismo, sendo assim o hidrogel sintetizado estéril e seguro para uso como curativos para feridas crônicas.

### 5.3 Fração gel

A fração de gel é a fração em massa do material resultante de uma formação de rede tridimensional, mostrando o comportamento de reticulação do hidrogel.

As macromoléculas de hidrogéis formados por radiação estão ligadas entre si através de ligações covalentes. (ROSIK *et al*, 1995). Apenas as moléculas de PVP sofrem reticulação no processo de radiação. Outros materiais não participam da rede estrutural formada, o PEG atua como plastificante podendo melhorar as propriedades físicas das membranas de hidrogel e o ágar atuando como gelificante. (FOROUTAN e RABANI 2007; LUGÃO *et al*, 1998).

Neste teste, os hidrogéis reticulados apresentaram um alto teor de gel, indicando uma alta reticulação entre as moléculas poliméricas. Os resultados são apresentados na Tabela. 1

Tabela 1 Fração Gel obtida pela matriz de hidrogel PVP

<b>Membrana</b>	<b>mi (g)</b>	<b>mf (g)</b>	<b>% fração gel</b>
PVP 6%	0,0914	0,0688	75,13 ± 0,18
	0,0986	0,0742	
	0,1035	0,0775	

Fonte: Próprio Autor

Os resultados obtidos a partir de testes de fração de gel (Tabela 1) mostraram um bom nível de reticulação na dose de radiação proposta, 25 kGy. Foi obtido um percentual de reticulação média de 75 %, o que representa uma rede com alta reticulação. Segundo estudos semelhantes apresentado por Aiji e colaboradores (2005) e Benamer e colaboradores (2006), com 6 % e 7 % de PVP respectivamente, foram obtidos percentuais de reticulação de cerca de 81 %.

#### **5.4 Intumescimento**

O intumescimento é definido como a quantidade de fluido absorvido pelo material polimérico no equilíbrio, quando o mesmo é submerso em fluido por um período de tempo suficiente para que o sistema atinja volume constante (FLORY, 1953). Em uma determinada dose fixa de irradiação, o grau de intumescimento no equilíbrio depende da concentração de polímero utilizada (BENAMER *et al*, 2006).

Em ambas as soluções utilizadas para os testes de intumescimento, a capacidade de inchaço para a matriz de hidrogel PVP o equilíbrio foi alcançado, em média, 7 horas após o tempo 0 como apresentados na Fig. 20.

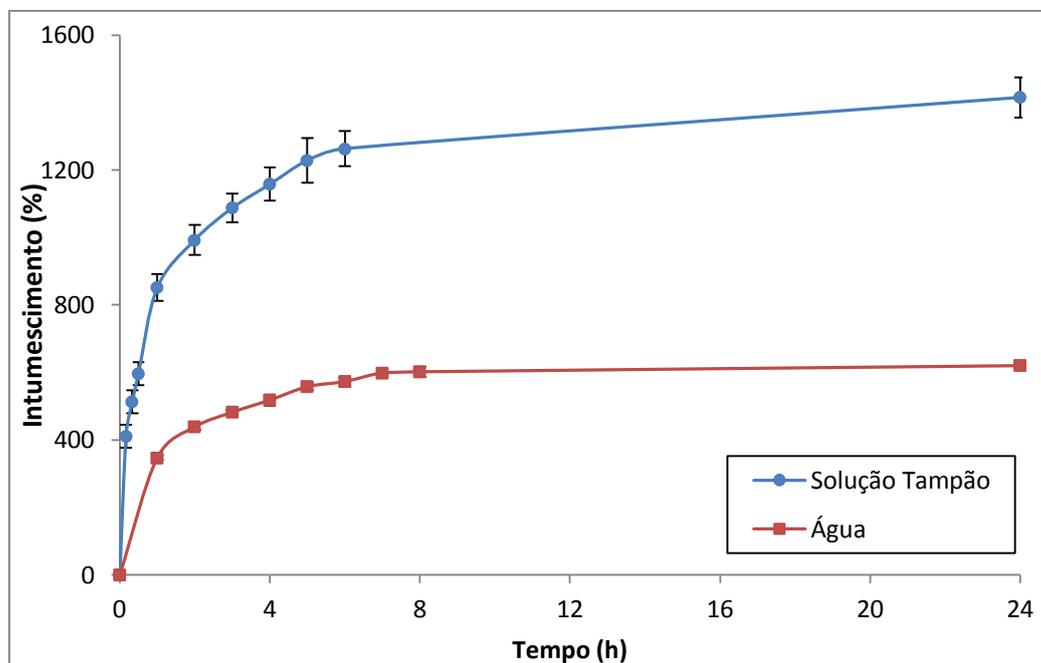


Figura 20 Gráfico do perfil de intumescimento dos hidrogéis reticulados a 25 kGy, temperatura ambiente e atmosfera comum - solução tampão e água deionizada  
Fonte: Próprio Autor

De modo geral, a capacidade de intumescimento depende da hidrofiliicidade da cadeia polimérica (BENAMER *et al*, 2006), da concentração dos componentes, quando esta for o caso, do tamanho e tipo de estrutura dos poros (AJJI *et al*, 2005; FOROUTAN e RABANII, 2007; GANJI *et al*, 2010) do conteúdo iônico da solução (OMIDIAN e PARK, 2008; GANJI *et al*, 2010) e da densidade de reticulação.

Os resultados mostram que a matriz de hidrogel de PVP possui uma boa capacidade de intumescimento, sendo que nas 2 primeiras horas observa-se um intumescimento rápido para ambos os meios utilizados. Pode ser verificado que o hidrogel apresentou intumescimento maior com teste por solução tampão, esta diferença deve ser levada em consideração o conteúdo iônico da solução, assim afirmando a eficiência de uma eventual utilização de incorporação de agente ativo na matriz de hidrogel de PVP.

No estudo de Aiji e colaboradores (2005) sobre a produção de curativos de hidrogéis de PVP por meio de radiação gama, foi verificado que com matrizes

de hidrogel compostas por PVP, PEG e ágar em diferentes doses de radiação a matriz com 5 % de PVP e irradiada a uma dose de 25 kGy mostrou um grau de expansão de cerca de 1500 % após 24 h. Utilizando a mesma dose de 25 kGy e 6 % de PVP o resultado foi de 1400 %.

Observa-se também que o conteúdo iônico da solução aumenta a porcentagem de intumescimento. À medida que o número de íons dentro da estrutura do hidrogel aumenta mais e mais forças osmóticas e eletrostáticas serão criadas dentro da estrutura do hidrogel (OMIDIAN e PARK, 2008; GANJI *et al*, 2010).

A fração de gel (Tabela 1) e o grau de intumescimento (Figura. 20) demonstram que este é um sistema altamente reticulado e que mostra um maior nível de inchaço na solução de PBS, sendo assim, um sistema adequado para utilização como matriz polimérica, indicado para uso de curativos como assim proposto (MOMESSO *et al*, 2010).

## 5.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas estão associadas à habilidade do material polimérico a resistir a tensões mecânicas. O ensaio de resistência à tração avalia a tensão máxima requerida para deformação e, ou ruptura do material. Vários fatores estruturais podem influenciar os comportamentos mecânicos, tais como: reticulações, ramificações, massa molar, grau de cristalinidade, morfologia cristalina, plastificação, copolimerização, entre outros (MACDERMOTT e SHENOY, 1997).

As propriedades mecânicas dos hidrogéis estão associadas à habilidade do material resistir às tensões mecânicas, principalmente, com a aptidão do polímero em formar ligações nas cadeias poliméricas, dificultando ou não a separação destas cadeias quando submetidos a tensões mecânicas. Foram efetuados testes de resistência mecânica da matriz de hidrogel em relação à perfuração (Figura 21).

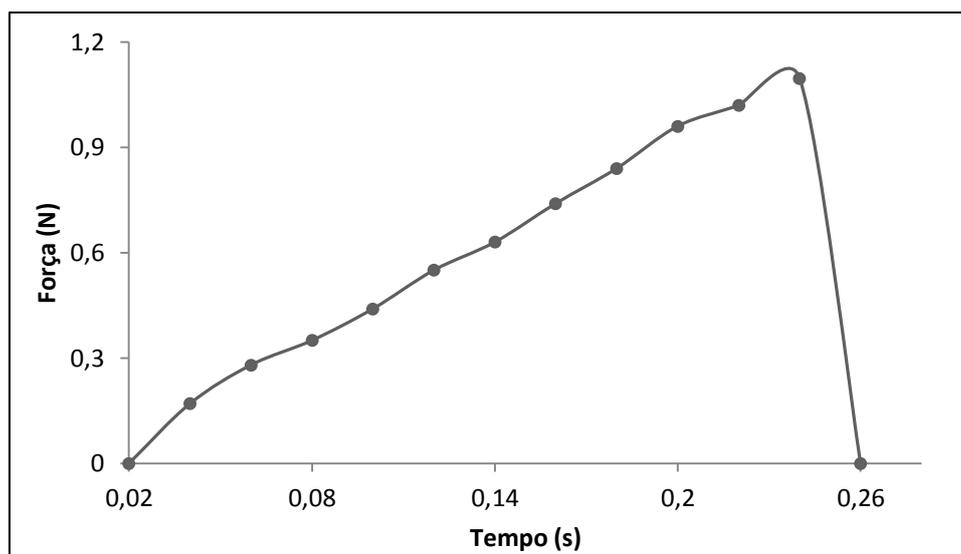


Figura 21 Representação gráfica do resultado do teste de resistência mecânica da matriz de hidrogel em relação à perfuração, obtido por texturômetro.

Fonte: Próprio Autor

O ensaio de perfuração mede a resistência à compressão, em Newton (N), em função do tempo a que o filme é sujeito até sua ruptura. Os resultados ilustrados na Figura 21 apresentam resultado de 1,1 N de força para perfuração total da matriz, e pico de tensão de 15,52 N/cm<sup>2</sup>, mostrando resultados semelhantes entre aos encontrados na literatura para força de ruptura que foi de 1,13 N, em média (AMARAL, 2009). Segundo Darwis e colaboradores (1993) a adição de ágar e PEG na composição de hidrogéis de PVP pode melhorar as propriedades mecânicas das matrizes.

## 5.6 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A estrutura interna do hidrogel foi observada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) após liofilização, para que seus poros não colapsassem e suas estruturas se mantivessem fidedignas. As imagens das superfícies estão apresentadas na Figura. 22.

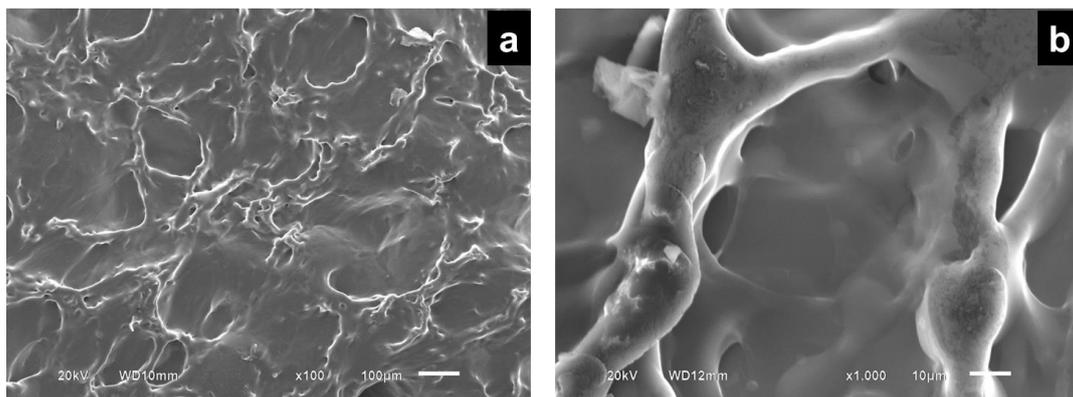


Figura 22 Micrografias de SEM da matriz de hidrogel reticulada e liofilizada. (22a) 100x; (22b) 1000x.

Fonte: Próprio Autor

Observando as micrografias da matriz polimérica, pode-se observar uma topologia com estrutura porosa, com poros em distribuição aleatória, exibindo uma estrutura interna densa de reticulação. Tal resultado justifica os bons resultados de fração gel e do grau de intumescimento. Assim, apresentando boa estrutura e resistência para incorporação de ativos no hidrogel.

A quantidade de poros e macro poros observados nas amostras são características dos hidrogéis liofilizados. Após a retirada da água por liofilização verifica-se a organização e formatos desses poros, formados durante o rearranjo das moléculas na reticulação. O tamanho dos poros do material polimérico depende principalmente da dose de radiação e composição do polímero (SOLER *et al*, 2012).

## 5.7 Difração de raio-X (XRD)

A técnica de Difração de Raios-X (XRD) foi utilizada para caracterizar o produto de síntese quanto às suas propriedades cristalinas para uma matriz polimérica neutra e eficiente. A Figura 23 apresenta o difratograma obtido a partir da análise de DRX com incidência de raios-X gerados por alvo de cobre com comprimento de onda igual a 1,540562 Å.

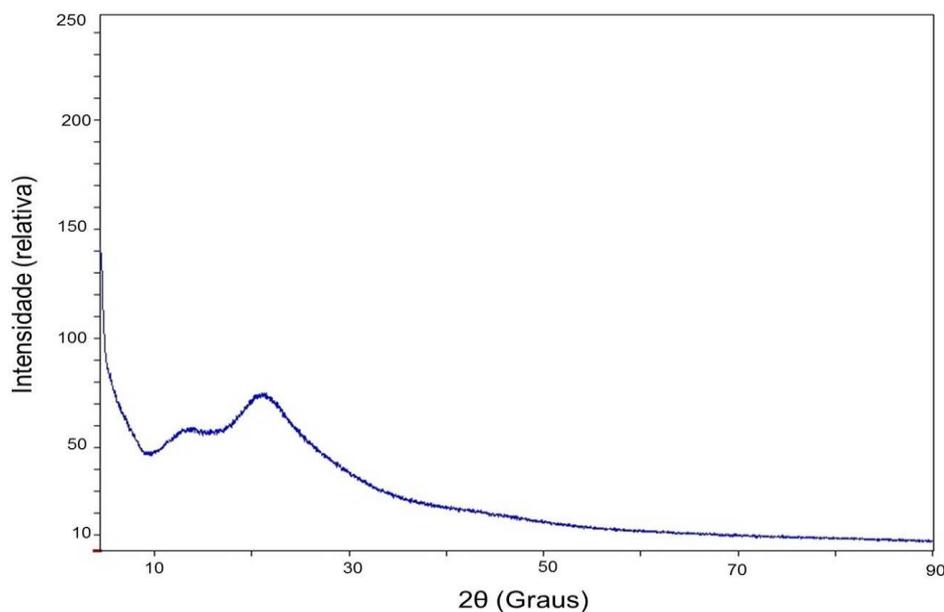


Figura 23 XRD da membrana em 25 kGy.  
Fonte: Próprio Autor

É possível observar uma primeira raia inesperada  $2\theta = 13,78^\circ$ , e a existência de uma segunda raia ampla em torno de  $2\theta = 21,55^\circ$ , correspondente para o pico de PVP K90 cristalino (RAZZAK *et al*, 1999; DAI *et al*, 2012; BAI *et al*, 2008). A raia inesperada pode indicar que o PVP utilizado (amostra comercial) contém duas fases amorfas. O resultado corrobora com a literatura que sugere o PVP como um polímero amorfo, caracterizado pela baixíssima cristalinidade, sugerindo que a orientação molecular e a disposição do polímero estavam desordenadas (DAI *et al*, 2012).

## 5.8 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de superfície da microscopia de varredura por sonda do hidrogel de PVP secos e úmidos são mostradas na Fig. 24.

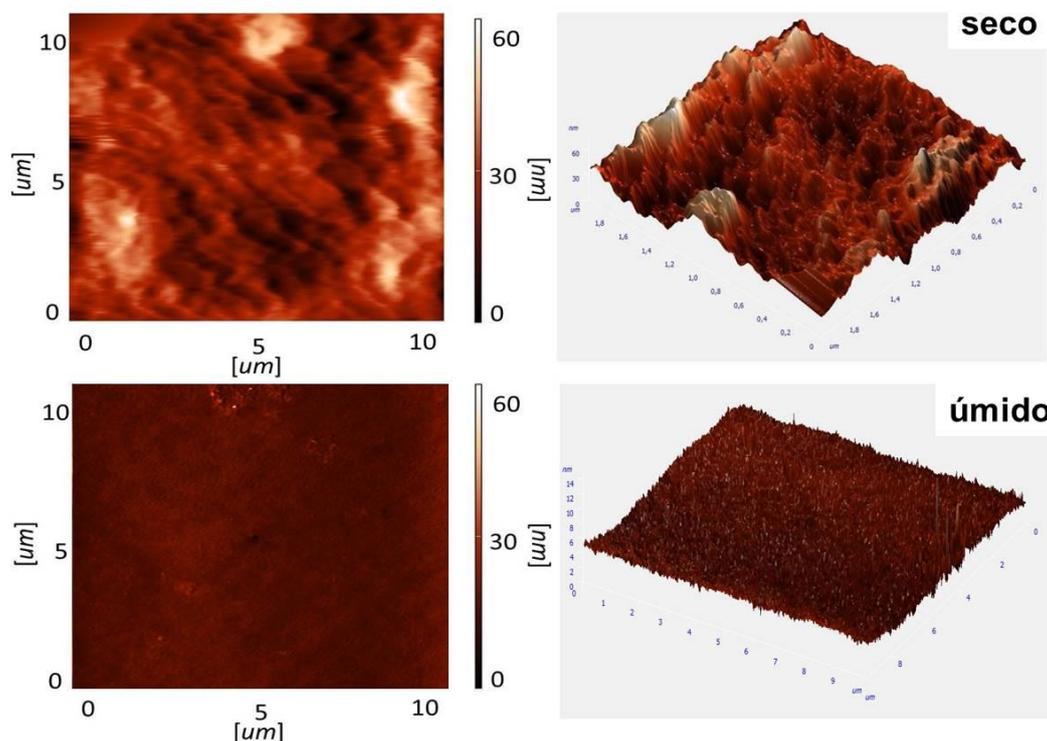


Figura 24 Imagens superficiais do hidrogel seco e molhado  
Fonte: Próprio Autor

Pela Figura 24 é possível observar que o hidrogel intumescido (úmido) apresenta um preenchimento dos seus poros. Este fato gerou, conseqüentemente, uma superfície mais lisa na amostra levando-a a uma melhor biocompatibilidade para uso como curativo quando comparado ao hidrogel de superfície seca. Apresentando assim, melhor indicação de uso como curativo úmido. Em 2004, Hayama e colaboradores concluíram que hidrogéis úmidos apresentam maior biocompatibilidade com excelente resistência mecânica são alcançadas misturando o PVP K90 a, em media, 6 % em peso.

### 5.9 Obtenção e organização dos ativos na matriz

Com a matriz de hidrogel caracterizada e dentro dos padrões esperados, foi realizada a incorporação dos ativos por intumescimento. Os dispositivos de hidrogel de PVP contendo os ativos propostos foram obtidos conforme descrito no item 4.1.3 em materiais e métodos.

O critério para considerar os dispositivos adequados ou não para serem submetidos a uso como curativos no processo de cicatrização foi a formação de uma membrana homogênea, flexível, macia e de fácil manipulação. As matrizes foram avaliadas visualmente e pelo tato como podem ser observadas na Fig. 25.

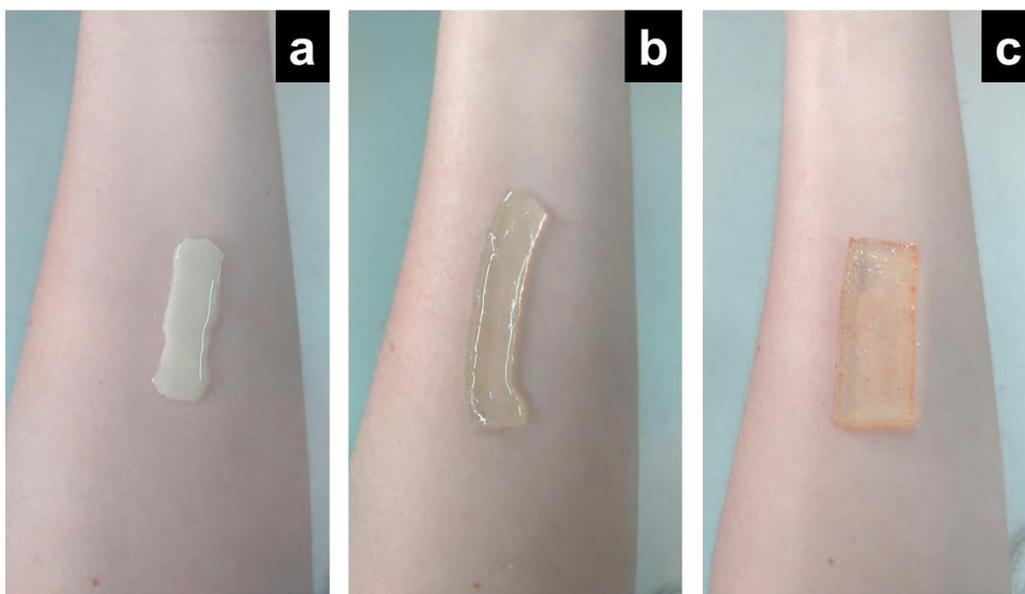


Figura 25 Hidrogel de PVP incorporados com os princípios ativos (25a) Nanopartícula de cério; (25b) *Calendula officinalis*; (25c) *Bixa orellana L.*  
Fonte: Próprio Autor

Observa-se na Figura 25b, uma coloração amarelada e de aparência brilhante, devido à presença de óleo, meio onde o extrato da *Calendula officinalis* foi utilizado. A matriz de hidrogel com presença de *Bixa orellana L* (Fig. 25c), que possui um pigmento de coloração vermelha, apresenta a mesma cor avermelhada após a incorporação por intumescimento.

No hidrogel ilustrado na Figura 25a, foi observada uma coloração amarelada justificada pela coloração típica da nanopartícula de óxido de cério incorporada a matriz de hidrogel.

Como na metodologia descrita, a nanopartícula foi incorporada antes da radiação, fazendo parte do hidrogel antes de passar pelo processo de reticulação. Foi observada uma estrutura menos rígida neste hidrogel do que com aqueles incorporados por intumescimento após a radiação. Mesmo que não afetasse a estrutura flexível, macia e de fácil manipulação, foi realizado um teste de intumescimento para entender tal comportamento (Figura 26).

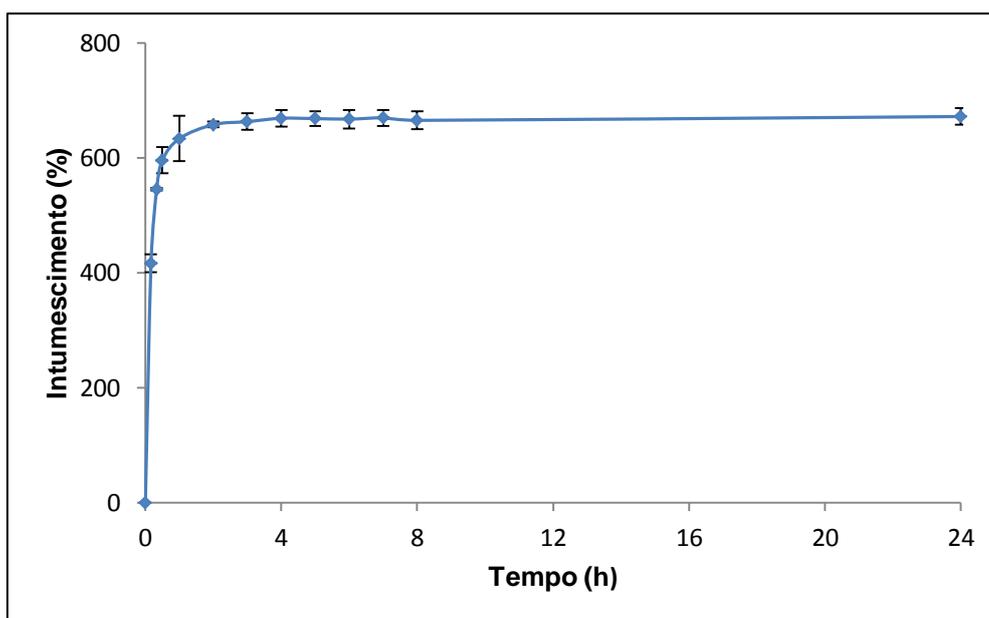


Figura 26 Perfil de intumescimento dos hidrogéis reticulados a 25 kGy, com nanopartícula de cério, temperatura ambiente e atmosfera comum - água deionizada.

Fonte: Próprio Autor

Observa-se no gráfico resultado semelhante ao da matriz de hidrogel, com a mesma capacidade de absorção de água. A nanopartícula incorporada ocupa um espaço insignificante nos poros formados pela reticulação, não alterando a eficiência de intumescimento do curativo proposto. Este fato foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi possível obter imagens ampliadas de até 1000x mostradas na Figura 27.

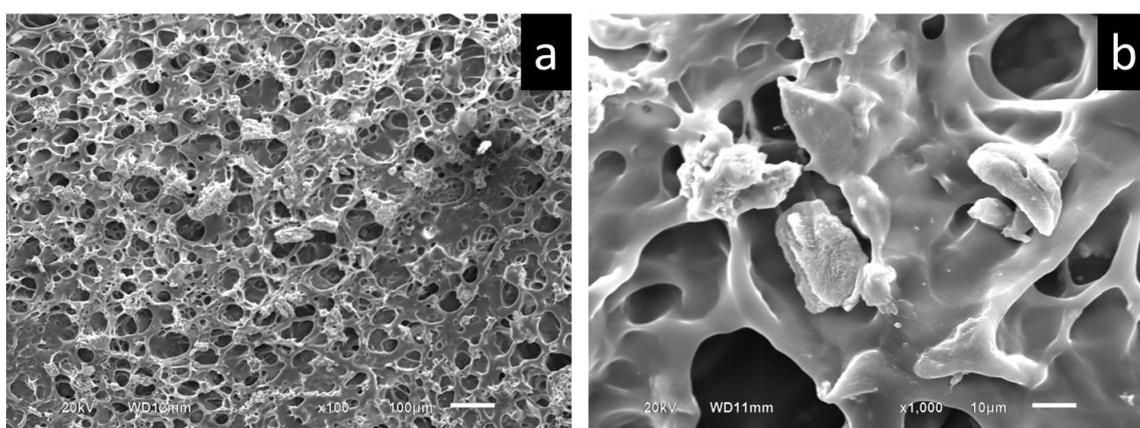


Figura 27 Micrografias de MEV da matriz de hidrogel liofilizada incorporada com nanopartículas de  $\text{CeO}_2$  (27a) aumento 100x (27b) aumento 1000x

Fonte: Próprio Autor

Observa-se uma reticulação menos densa e mais porosa se comparada a matriz de hidrogel sem ativos, explicando o comportamento menos rígido

registrado na análise visual. Apesar de a reticulação estar ligada diretamente com os resultados do teste de intumescimento, esta mudança de reticulação não foi suficiente para uma alteração significativa do resultado no teste de intumescimento.

A presença da nanopartícula pode ter sido um obstáculo durante a reticulação para as ligações acontecerem, podendo os poros terem sido moldados por um excesso de nanopartículas na formulação. A matriz incorporada também apresenta formação de agrupamentos, apresentando *clusters* com ordem de grandeza inferior a 100  $\mu\text{m}$ , podendo ter ocorrido devido à interação do polímero PVP com a nanopartícula antes da reticulação. Pela análise do MEV foi observada somente a superfície da matriz, para uma análise mais completa foi realizado uma Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 28), assim registrando uma incorporação da nanopartícula de forma completa,

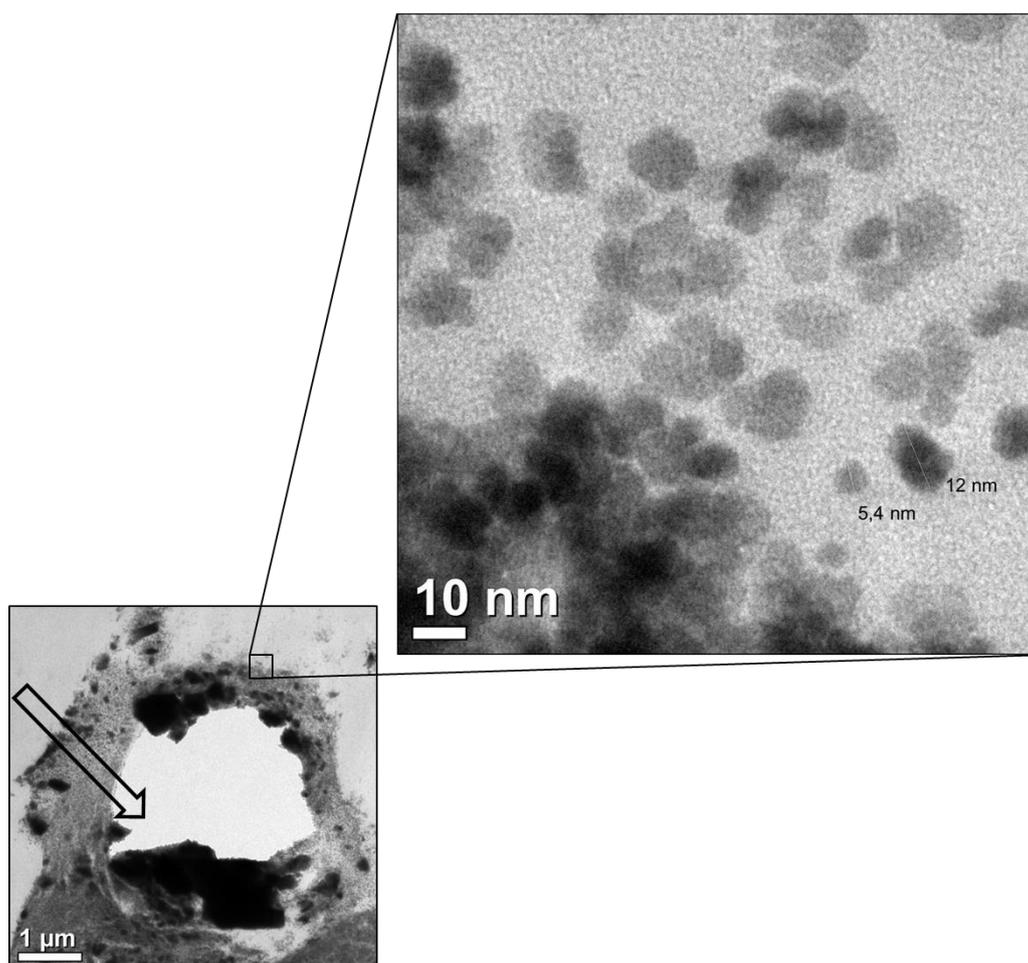


Figura 28 Imagens obtidas por MET de uma amostra irradiada de hidrogel incorporado com nanopartículas de  $\text{CeO}_2$

Fonte: Próprio Autor

Na análise é observado um pequeno *clusters* na borda de uma formação de poro, importante para entender que o registro das nanopartículas ocorreu por toda a matriz, mas tendo as bordas dos poros com principais aglomerados. As partículas, mesmo com formação de *clusters*, permaneceram nas dimensões nano, assim não sofrendo alterações na estrutura e no tamanho devido à etapa de reticulação por radiação gama.

A técnica de Difração de Raios-X (DRX) foi utilizada para caracterizar o produto de síntese quanto às suas propriedades cristalinas, e quanto à incorporação na matriz polimérica. A Figura 29 apresenta o difratograma obtido a partir da análise de DRX com incidência de raios-X gerados por alvo de cobre com comprimento de onda igual a 1,540562 Å.

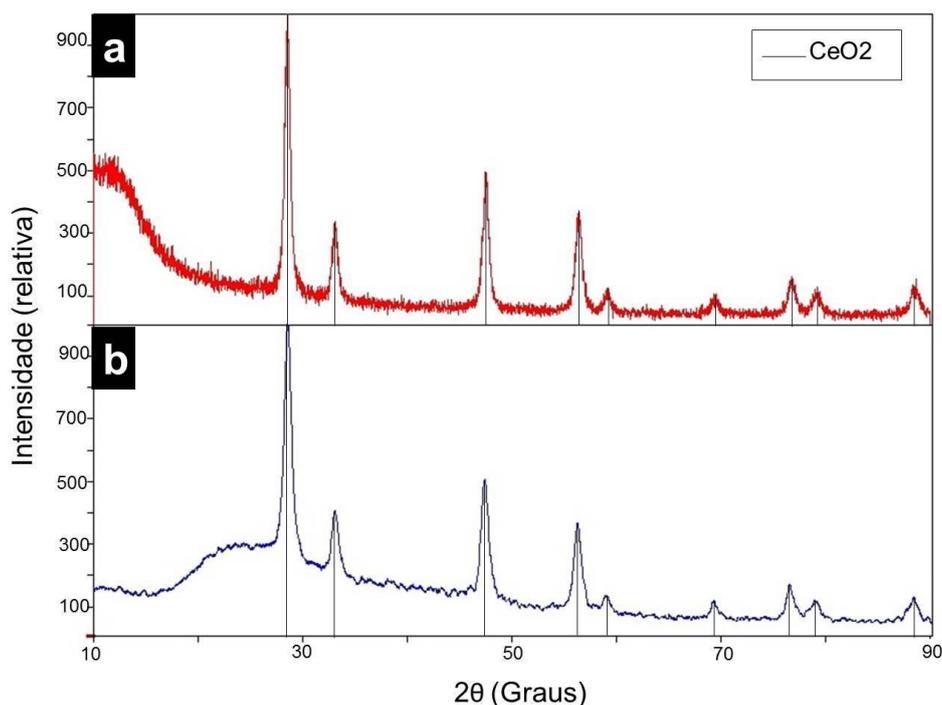


Figura 29 Difratograma de difração de raios-X da amostra de (29a) nanopartículas de  $\text{CeO}_2$ ; (29b) hidrogel / nanopartículas de  $\text{CeO}_2$ , irradiados.  
Fonte: Próprio Autor

O difratograma dos dados de DRX coletados para a amostra de nanopartícula de  $\text{CeO}_2$  cedida para este estudo está ilustrado na Figura 29a. Comparando estes difratogramas com outros resultados de análises estruturais relacionadas

ao  $\text{CeO}_2$ , publicadas na literatura (CORRADI *et al*, 2006; DE OLIVEIRA *et al*, 2011), constata-se que a amostra, de fato, corresponde a uma estrutura atômica composta unicamente pela fase  $\text{CeO}_2$ , sem contaminação. A interação do hidrogel com a nanopartícula de  $\text{CeO}_2$  é observada na Figura 29b, onde apresenta o pico  $2\theta = 21,55^\circ$  referente ao PVP utilizado, porém a interação com a nanopartícula não alterou a estrutura e a cristalinidade desta, apresentando a mesma intensidade e posição dos picos no ângulo  $2\theta$ .

No estudo de Dai e colaboradores (2008), ao incorporar nanopartículas de AgBr, foi obtido resultado semelhante ao deste estudo, onde as raias cristalinas da nanopartícula utilizada e a parte amorfa da matriz polimérica foi observado simultaneamente no difratograma.

Como não foi encontrado registro na literatura da influência da radiação gama na nanopartícula  $\text{CeO}_2$ , não era sabido os efeitos esta para com as nanopartículas utilizadas. A nanopartícula apresentou uma alta resistência à radiação gama, na dose proposta, permanecendo na mesma estrutura inicial. Justificando este como o melhor método de incorporação de nanopartículas na matriz de hidrogel.

Na matriz de hidrogel com os ativos incorporados por intumescimento, sendo eles a *Calendula officinalis* e *Bixa orellana* L., esses ativos não passaram pelo processo de radiação gama, assim não podendo sofrer alterações na sua estrutura original. Foi realizado somente a análise da microscopia eletrônica de varredura, gerando somente imagens da superfície, para estudo de distribuição na matriz de hidrogel.

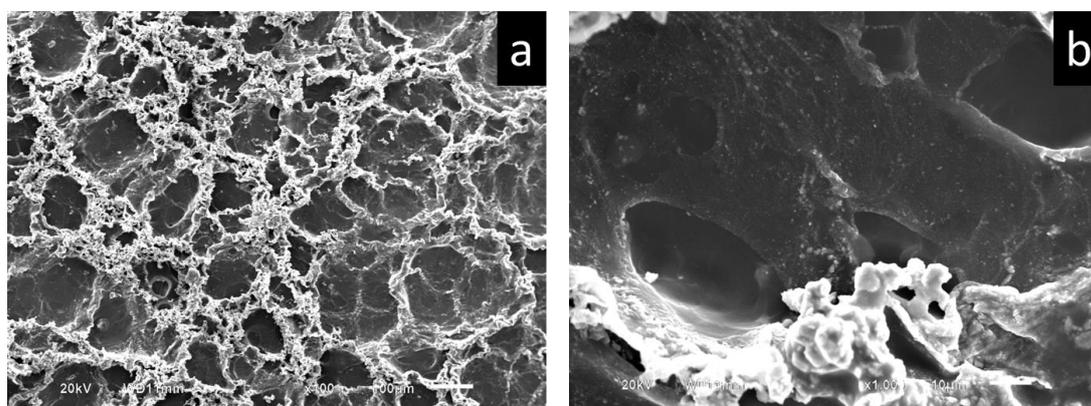


Figura 30 Micrografias de MEV da matriz de hidrogel liofilizada incorporada com *Calendula officinalis* (30a) aumento 100x (30b) aumento 1000x

Fonte: Próprio Autor

A matriz polimérica incorporada com a *Calendula officinalis* (Figura 30) apresenta uma estrutura mais porosa, sendo esses poros de diversos tamanhos. É observado que a estrutura oleosa do extrato da *Calendula officinalis* esta incorporado nas bordas dos poros formados pela reticulação (Figura 30a). Na Figura 30b, é possível concluir que o ativo não incorporou dentro na matriz, tendo sua concentração basicamente na superfície.

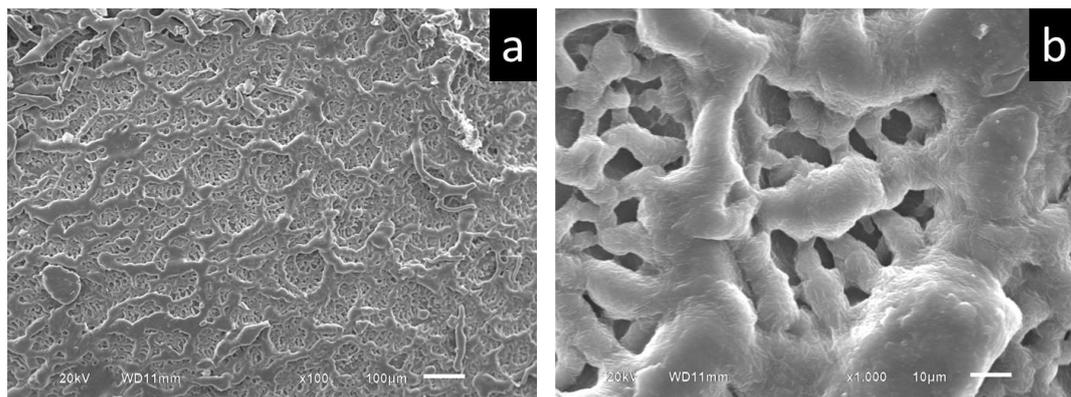


Figura 31 Micrografias de MEV da matriz de hidrogel liofilizada incorporada com *Bixa orellana L* (31a) aumento 100x (31b) aumento 1000x  
Fonte: Próprio Autor

Nota-se na Figura 31, que a matriz polimérica incorporada com a *Bixa orellana L*. apresenta uma estrutura mais densa, pois o pigmento foi incorporado por toda a estrutura, fazendo os poros parecerem menores. O pigmento vermelho do ativo utilizado na matriz de hidrogel foi incorporado tanto na superfície (Figura 30a) quando por dentro dos poros de toda a estrutura reticulada (Figura 31b). Fazendo do método utilizado bastante eficiente para incorporação.

## 6 RESULTADO DO TRATAMENTO DOS ANIMAIS LESIONADOS

O teste “*in vivo*” foi feito a partir do monitoramento de um modelo experimental em que foram aplicados os curativos de hidrogel em 6 grupos distintos conforme a metodologia já descrita.

Tabela 2 Aparências da lesão em diferentes dias

	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	21º dia
Controle negativo					
Hidrogel					
Hidrogel / NanoCeO <sub>2</sub>					
Hidrogel / <i>Calendula officinalis</i>					
Hidrogel / <i>Bixa Orellana L.</i>					
Gel comercial					

Fonte: Próprio Autor

Para composição da Tabela 2 foi selecionada fotos dos animais com os resultados que mais se aproxima da média aritmética do tamanho de todas as lesões, referente à Tabela 3, de cada grupo proposto. Não foi observada nenhuma ocorrência de rejeição aos curativos e infecção, não correndo nenhuma alteração evidente durante todo o tempo de tratamento e não ocorreu nenhum óbito, ao contrário, estavam todos em bom estado de higiene. A manipulação dos animais seguiu a mesma metodologia em todos os grupos, e não foi produzido estresse que pudesse interferir no processo de cicatrização.

Na avaliação macroscópica, até o sétimo dia, o grupo do Controle negativo foi o único que externou surgimento de crosta seca significativa, apresentando mais sangramento e dificuldade de limpeza na troca dos curativos e o grupo Hidrogel / NanoCeO<sub>2</sub> apresentou na ferida uma cor amarelada, porém sendo resultante da coloração do curativo, não aparecendo traços de inflamação visíveis.

Nota-se uma redução significativa entre os diferentes dias, tendo um salto entre os intervalos dos dias 3-7 e 7-14. Já nos intervalos dos dias 14-21 estão mais próximas entre si. Conforme esperado nota-se também que houve efeito de dia no processo de cicatrização; quanto maior o tempo menor ficou a área cirúrgica.

Tabela 3 Tamanho da lesão cirúrgica no dorso por porcentagem.

	Tamanho da lesão (%)				
	dia 1	dia 3	dia 7	dia 14	dia 21
Controle negativo	100	81,38 ± 8,15 <sup>a,b</sup>	44,54 ± 10,93 <sup>a</sup>	9,02 ± 1,73 <sup>a,b</sup>	6,6 ± 0 <sup>a</sup>
Hidrogel	100	82,08 ± 8,13 <sup>a,b</sup>	36,15 ± 6,27 <sup>a</sup>	7,25 ± 3,27 <sup>a,b</sup>	3,3 ± 3,93 <sup>a</sup>
Hidrogel / NanoCeO <sub>2</sub>	100	83,7 ± 13,50 <sup>a,b</sup>	46,96 ± 15,54 <sup>a</sup>	12,4 ± 6,47 <sup>a</sup>	6,88 ± 5,72 <sup>a</sup>
Hidrogel / <i>Calendula officinalis</i>	100	79,84 ± 9,33 <sup>b</sup>	37,93 ± 9,14 <sup>a</sup>	4,97 ± 3,26 <sup>b</sup>	2,38 ± 3,1 <sup>a</sup>
Hidrogel / <i>Bixa Orellana L.</i>	100	74,08 ± 7,75 <sup>b</sup>	40,9 ± 13,34 <sup>a</sup>	8,79 ± 3,46 <sup>a,b</sup>	5,2 ± 3,06 <sup>a</sup>
Gel comercial	100	94,5 ± 13,15 <sup>a</sup>	43,2 ± 8,53 <sup>a</sup>	10,23 ± 2,88 <sup>a,b</sup>	5,07 ± 2,57 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes indicam diferenças nas colunas ( $p < 0,05$ )

Fonte: Próprio Autor

A melhor evolução até o terceiro dia de tratamento foi o grupo tratado com Hidrogel / *Bixa Orellana L.* e com Hidrogel / *Calendula officinalis*, apresentando porcentagens de redução no tamanho das feridas mais significativas (Tabela 3).

Com os testes estatísticos proposto, no sétimo dia de tratamento não foi apresentada diferenças significativas nas médias da Tabela 3. Após 14 dias de tratamento todos os grupos já apresentaram uma redução do ferimento visível, porém percebe-se uma evolução no processo de cicatrização mais avançada no grupo tratado com Hidrogel / *Calendula officinalis*, este já não apresenta lesão exposta, sendo o mais eficiente neste tempo de tratamento. E o pior resultado foi exibido pelo grupo Hidrogel / NanoCeO<sub>2</sub>. Resultado comprovado pela análise estatística realizada.

Após 21 dias de tratamento todos os grupos apresentaram resultados estatísticos pareados, não podendo citar melhores e piores resultados pelos métodos estatísticos utilizados. Por análise clínica macroscópica todos os 6 grupos apresentaram uma cicatrização quase completa, tendo o grupo Hidrogel / *Calendula officinalis* com o melhor efeito visível, apresentando uma cicatrização clínica mais homogênea. É um resultado promissor, visto que o custo financeiro deste ativo, se comparado com outros utilizados neste estudo é significativamente mais baixo e é fácil de ser adquirido.

Mesmo listado em uma vasta revisão bibliográfica as vantagens e propriedades da nanopartícula de  $\text{CeO}_2$ , este não apresentou resultados significantes. O uso de nanopartícula de  $\text{CeO}_2$  em curativos de hidrogel é uma inovadora forma de utilização na área de engenharia de tecidos, visto que não foi encontrado pesquisas descrevendo metodologias para dosagens utilizadas na literatura, fazendo deste estudo base para pesquisas futuras.

## 7 CONCLUSÃO

O hidrogel de PVP sintetizados e irradiados por radiação gama apresentaram características perfeitas para uso como matriz polimérica para incorporação de ativos.

A matriz não apresentou nenhum traço de contaminação, sendo estéril para uso direto como curativo. O comportamento das curvas de intumescimento e o resultado da fração gel das matrizes de hidrogel analisadas podem ser justificados de acordo com a formulação da amostra e assim como as propriedades mecânicas e DRX, apresentaram resultados compatíveis com a literatura. Por MEV foi observado a estrutura da superfície da matriz de hidrogel, sendo ela com densidades e poros coerentes com a dose de radiação recebida, assim também justificando os bons resultados de fração gel e do grau de intumescimento. Foi observada na SPM uma superfície mais lisa na amostra úmida levando-a a uma melhor biocompatibilidade para uso como curativo.

A incorporação da nanopartícula de  $\text{CeO}_2$ , realizada antes da etapa de radiação gama, apresentou uma estrutura física mais frágil, mas que não comprometeu as especificações descrita como um bom curativo. Apresentou distribuição da nanopartícula por toda a matriz. A radiação não alterou a estrutura da nanopartícula de  $\text{CeO}_2$ .

A incorporação da *Calendula officinalis* e da *Bixa orellana L* realizada por intumescimento na matriz já irradiada apresentou uma distribuição homogênea, também sendo ideal para uso como curativo externo.

As aplicações das membranas foram feita em forma de curativos e foi realizada “*in vivo*” no tratamento das lesões cutâneas. Os curativos de Hidrogel / *Calendula officinalis*, tiveram evidente contribuição para a redução do ferimento alcançando, no geral, uma melhor cicatrização clínica. Em termos de comparação a nanopartícula de  $\text{CeO}_2$  não se mostrou viável para uso na concentração e no meio utilizada devido o seu alto custo comercial e fraco desempenho. Por análise estatística conclui-se que o hidrogel, em geral, se fez mais eficiente até o 14<sup>o</sup> dia de tratamento, sendo mais indicado para lesões recentes com liberação de exsudado.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Investigação de diferentes doses de nanopartícula de CeO<sub>2</sub> incorporadas na matriz polimérica para melhoria da cicatrização em feridas crônicas.

- Pesquisar a incorporação de ativos em diferentes tipos de matriz polimérica.

- Estudar outros modelos de reticulação da matriz de hidrogel, e assim comparar melhores matrizes para incorporação de ativos para uso tópico.

- Investigação das membranas de hidrogel para tratamento de outros tipos de lesões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

AJJI, Z.; *et al.* Production of hydrogel wound dressings using gamma radiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 229, n. 3-4, p. 375-380, 2005.

ALCANTARA, M. T. S.. **Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações médicas**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

AL-HADA, N. M. *et al.* The impact of polyvinylpyrrolidone on properties of cadmium oxide semiconductor nanoparticles manufactured by heat treatment technique. **Polymers**, v. 8, n. 4, p. 113, 2016.

ALMEIDA, J. F. da S. L.. **Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.

AMARAL, R. H.. **Estudo da incorporação e liberação de um extrato de algas vermelhas em membranas de hidrogel**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANTUNES, L. M. G. *et al.* Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1, p. 113-119, 2005.

BABENKO, L. P. *et al.* Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms in vitro. **Мікробіологічний журнал**, n. 74, № 3, p. 54-62, 2012.

BAI, J. *et al.* Preparing AgBr nanoparticles in poly (vinyl pyrrolidone)(PVP) nanofibers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 329, n. 3, p. 165-168, 2008.

BALBINO, C. A.; *et al.* Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALDUCCI-ROSLINDO, E.; *et al.* Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 2, p. 181-187, 1999.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E. A. **Wound care essentials: Practice principles**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

BARRIO, G. *et al.* In vitro antiparasitic activity of plant extracts from Panama. **Pharmaceutical biology**, v. 42, n. 4-5, p. 332-337, 2004.

BENAMER, S. *et al.* Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly (vinyl pyrrolidone). **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 248, n. 2, p. 284-290, 2006.

BERTRAN, C. A. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 123-129, 2000.

BISWAL, J. *et al.* Radiation-induced grafting of acrylamide onto guar gum in aqueous medium: Synthesis and characterization of grafted polymer guar-g-acrylamide. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 1624-1630, 2007.

BONACIN, R. F.. **Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/polianidridos como potenciais curativos para feridas crônicas**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BROUGHTON, G. *et al.* Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, 2006.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Advanced organic chemistry. **Springer Science & Business Media**, 2007.

CASIMIRO, M. H. *et al.* Study on chemical, UV and gamma radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate onto chitosan. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 731-735, 2005.

CASIMIRO, M. H.; *et al.* Characterisation of gamma irradiated chitosan/pHEMA membranes for biomedical purposes. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 236, n. 1-4, p. 482-487, 2005.

CASTELLO, Marie-Claire *et al.* Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa orellana* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, p. 1378–1381, 2002.

CLINTON, N.; MATLOCK, P. Poly(ethylene glycol)s. In: MARK; BIKALES; OVERBERGER; MENGES. Concise encyclopedia of polymers science and engineering. **Wiley – Interscience**, p. 3338 – 339, 1990.

CORRADI, A. B. *et al.* Synthesis and characterization of nanosized ceria powders by microwave–hydrothermal method. **Materials research bulletin**, v. 41, n. 1, p. 38-44, 2006.

COSTA, C. L. S. da; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

CRONQUIST, A. *et al.* The evolution and classification of flowering plants. **The evolution and classification of flowering plants.**, 1968.

DAI, Xin-Yi *et al.* Electrospun emodin polyvinylpyrrolidone blended nanofibrous membrane: a novel medicated biomaterial for drug delivery and accelerated wound healing. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 11, p. 2709-2716, 2012.

DARWIS, D. *et al.* Poly (N-vinylpyrrolidone) hydrogels: 1. Radiation polymerization and crosslinking of N-vinylpyrrolidone. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 42, n. 4-6, p. 907-910, 1993.

DARWIS, D. Role of radiation processing in production of hydrogels for medical applications. **Atom Indonesia**, v. 35, n. 2, p. 85-104, 2010.

DE CASTRO, Rafaela Arns; ALBIERO, Adriana Lenita Meyer. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 59-72, 2016.

DE OLIVEIRA, M. J. A.. **Obtenção de Membranas de Hidrogéis para Tratamento Alternativo da Leishmaniose Tegumentar**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE OLIVEIRA, M. J. C. *et al.* 6. Síntese de óxido de cério (CeO<sub>2</sub>) com alta área superficial por meio do método Hidrotérmico assistido por microondas. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 3, 2011.

DELLA LOGGIA, R. *et al.* The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta medica**, v. 60, n. 06, p. 516-520, 1994.

DOUGLU, S. Biomaterials and tissue engineering, **Springer**, p.1, 2004;

DUMVILLE, J. C. *et al.* Systematic review and mixed treatment comparison: dressings to heal diabetic foot ulcers. **Diabetologia**, v. 55, n. 7, p. 1902-1910, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3ed. São Paulo, **Andrei Editora**, 1977.

FLEISCHER, T. C. *et al.* Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 136-138, 2003.

FLORY, P. J. Principles of polymer chemistry. Cornell University Press, 1953.

FOREST, V. *et al.* Impact of cerium oxide nanoparticles shape on their in vitro cellular toxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 38, p. 136-141, 2017.

FOROUTAN, H.; RABANI, M. Investigation of synthesis of PVP hydrogel by irradiation. **Iranian Journal of Radiation Research**, v. 5, n. 3, p. 131-136, 2007

GAGNON, J.; FROMM, K. M. Toxicity and protective effects of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) depending on their preparation method, particle size, cell type, and exposure route. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 27, p. 4510-4517, 2015.

GANJI, F.; *et al.* Theoretical description of hydrogel swelling: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 19, n. 5, p. 375-398, 2010.

GENIÊR, F. S.; *et al.* Synthesis and Characterization of CeO<sub>2</sub> Nanoparticles through Precipitation. **Journal of Physical and Chemical Sciences**, v. 5, p. 1, 2017.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta materialia**, v. 48, n. 1, p. 263-277, 2000.

HALLIDAY, D.; *et al.* Fundamentos de Física 4–Ótica e Física Moderna; 4ª edição. 1995.

HARDING, K. G.; *et al.* Topical treatment: which dressing to choose. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 16, n. S1, 2000.

HAYAMA, M. *et al.* Nanoscopic behavior of polyvinylpyrrolidone particles on polysulfone/polyvinylpyrrolidone film. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 1019-1028, 2004.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Materials Selection. In: Wise, D. L **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering part A** v.1. Dekker,Marcel Inc, p.27-59, 1995.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 223-236, 2012.

HIGA, O. Z. *et al.* Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, n. 5-6, p. 705-707, 1999.

HIRST, S. M. *et al.* Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. **Environmental toxicology**, v. 28, n. 2, p. 107-118, 2013.

JEFFCOATE, W. J.; *et al.* Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 20, n. S1, 2004.

JESZKA, J. K.; *et al.* Simulations of nanogels formation by intramolecular recombination of radicals on polymer chain. Dispersive kinetics controlled by chain dynamics. **Macromolecules**, v. 39, n. 2, p. 857-870, 2006.

JIAO, Y. *et al.* Preparation of biodegradable crosslinking agents and application in PVP hydrogel. **Journal of applied polymer science**, v. 101, n. 3, p. 1515-1521, 2006.

JIMÉNEZ-MEDINA, E. *et al.* A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC câncer**, v. 6, n. 1, p. 119, 2006.

JONDIKO, I. J. O.; PATTENDEN, G.; *Phytochemistry*, v. 28, p. 3159, 1989;

KUMARI, Monika *et al.* Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. **International journal of toxicology**, v. 33, n. 2, p. 86-97, 2014.

LOPÉRGOLO, L. C. *et al.* **Estudo da estrutura e dos parâmetros de reticulação de membranas hidrófilas a base de poli (N-vinil-2-pirrolidona) induzidas por radiação**. 2002. Tese de Doutorado. São Paulo (Estado). Secretaria de Desenvolvimento. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

LUGAO, A. B. *et al.* Study of wound dressing structure and hydration/dehydration properties. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 52, n. 1-6, p. 319-322, 1998.

LUGAO, A. B.; MALMONGE, S. M.. Use of radiation in the production of hydrogels. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 185, n. 1-4, p. 37-42, 2001.

MACDERMOTT, C. P.; SHENOY, A. V. Selecting thermoplastics for engineering applications. 1997.

MAJOLO, C.; *et al.* Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, 2013.

MANNING, C. N. *et al.* The early inflammatory response after flexor tendon healing: a gene expression and histological analysis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 32, n. 5, p. 645-652, 2014.

MARTINEZ-TOME, M. *et al.* Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of food protection**, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

MARTINS, N. L. P. *et al.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. Suppl 3, p. 66-75, 2006.

MEDINA-FLORES, D. *et al.* Antibacterial activity of *Bixa orellana* L.(achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 400-403, 2016.

MOMESSO, R. G. *et al.* Radiation stability of resveratrol in immobilization on poly vinyl pyrrolidone hydrogel dressing for dermatological use. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 283-285, 2010.

MORIN, R. J.; TOMASELLI, N. L. Interactive dressings and topical agents. **Clinics in plastic surgery**, v. 34, n. 4, p. 643-658, 2007.

MOURA, L. IF *et al.* Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—a review. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 7, p. 7093-7114, 2013.

MULEY, B. P.; *et al.* Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 5, 2009.

MUMANI, J. B.. **Estrutura e propriedades de nanopartículas preparadas via sol-gel**. 2009. 200 p. Tese (Doutorado) (Doutor em Ciências)- Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009;

NITZ, A. C. *et al.* Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopudidymus* e *Calendula officinali*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006.

NOLAN, M.; *et al.* CeO<sub>2</sub> catalysed conversion of CO, NO<sub>2</sub> and NO from first principles energetics. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 2, p. 216-218, 2006.

OLIVEIRA, M. J. A. *et al.* Hybrid hydrogels produced by ionizing radiation technique. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 9, p. 1471-1474, 2012.

OLIVEIRA, M. J. A. *et al.*, Hidrogéis poliméricos contendo complexantes para retenção de contaminantes contendo tório. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2005, Santos, Brasil. **INAC: associação brasileira de energia nuclear - ABEN**, p. 1-7, 2005.

OMIDIAN, H.; PARK, K. Swelling agents and devices in oral drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 83-93, 2008.

OUYANG, Z. *et al.* Potential of using cerium oxide nanoparticles for protecting healthy tissue during accelerated partial breast irradiation

(APBI). **Physica Medica: European Journal of Medical Physics**, v. 32, n. 4, p. 631-635, 2016.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. **Revista Pharmacia Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 14-21, 2006.

PARENTE, L. M. L. *et al.* *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 6, n. 2, 2002.

PARK, E. *et al.* Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 410, n. 3, p. 514-519, 2011.

PAUL, D. R. Polymer blends: Phase behavior and property relationship. In multicomponent polymer materials; **Advances in Chemistry**, v. 211, 1985;

PEPPAS, N. A. *et al.* Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. **Advanced materials**, v. 18, n. 11, p. 1345-1360, 2006.

PEPPAS, N. A. *et al.* Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27-46, 2000.

PEPPAS, N. A.; KHARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced drug delivery reviews**, v. 11, n. 1-2, p. 1-35, 1993.

PEPPAS, N.A. Hydrogels In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. (Ed) *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: **Academic Press**, p. 60-64, 1996.

PIERSCIONEK, B. K. *et al.* Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells. **Nanotechnology**, v. 21, n. 3, p. 035102, 2009.

PINTO, J. R.; *et al.* Aqueous dye diffusion in thin films of water-soluble poly (vinyl pyrrolidone) copolymers: A dynamic secondary ion mass spectrometry study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 37, p. 8026-8032, 1999.

PONNURANGAM, S. *et al.* Beneficial effects of cerium oxide nanoparticles in development of chondrocyte-seeded hydrogel constructs and cellular response to interleukin insults. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 21-22, p. 2908-2919, 2014.

POURKHALILI, N. *et al.* Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. **World journal of diabetes**, v. 2, n. 11, p. 204, 2011.

RAZZAK, M. T. *et al.* The characterization of dressing component materials and radiation formation of PVA–PVP hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 153-165, 1999.

ROBINEAU, L.G., Hacia uma farmacopea caribenha/Tramil. **Santo Domingo: Endacaribe UAG & Universidade de Antioquia**, p. 696, 1995. Disponível em: < <http://www.manioc.org/recherch/T17003>>. Acesso em: 02 abr. 2017;

RODRIGUEZ, A. I. R.; BICALHO, S. M. C., **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, FAMED/FAEF, ano VII, n.13, 2009;

ROGERO, S. O. *et al.* Biocompatibility study of polymeric biomaterials. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p. 424-427, 2003.

ROSIK, J. M. *et al.* Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 161-168, 1995.

ROSIK, J. M.; *et al.* **Method of manufacturing hydrogel dressings**. U.S. Patent n. 4,871,490, 3 out. 1989.

ROSIK, J. M.; ULAŃSKI, P. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 139-151, 1999.

ROSIK, J. M.; YOSHII, F.. Hydrogels and their medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 151, n. 1-4, p. 56-64, 1999.

SAHA, N. *et al.* Polymeric biomaterial based hydrogels for biomedical applications. **Journal of Biomaterials and nanobiotechnology**, v. 2, n. 01, p. 85, 2011.

SALLES, T. H. C.; *et al.* Electrospinning of gelatin/poly (vinyl pyrrolidone) blends from water/acetic acid solutions. **Materials Research**, v. 18, n. 3, p. 509-518, 2015.

SANTOS, C. C. L. dos. **Síntese e aplicação biotecnológica de nanoestruturas de óxido de cério (iv), obtidas pelo método hidrotermal de micro-ondas**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba.

SHETYE, S P. *et al.* Hydrogels: introduction, preparation, characterization and applications. **Hum. J**, v. 1, p. 47-71, 2015.

SHILPI, J. A. *et al.* Preliminary pharmacological screening of Bixa orellana L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 264-271, 2006.

SILVA, M. H. P. da; **Apostila de Biomateriais**, CERAMED, 2007;

SILVA, P. I. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (Bixa orellana L.)**. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa,

SOLER, D. M. *et al.* Pilot scale-up and shelf stability of hydrogel wound dressings obtained by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 1249-1253, 2012.

STRONCEK, J. D.; *et al.* Instructional PowerPoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90, n. 4, p. 1230-1238, 2009.

VENUGOPALAN, A.; *et al.* A. Food, ethanobotanical and diversified applications of bixa orellana l.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 1, n. 4, p. 9-31, 2011;

VILLANOVA, J. C.; *et al.* Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, 2010.

VILLAR, R. *et al.* Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 6, p. 441-445, 1997.

VITORINO-FILHO, R. N. L. **Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (Anacardium occidentale L.) na terapêutica tópica de feridas**. 2011. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)– Universidade Federal do Piauí.

VOLPATO, AMM. **Avaliação do potencial antibacteriano de Calendula officinalis (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico** .2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Parana..

WANG, Q.; *et al.* Inhibited growth of Pseudomonas aeruginosa by dextran- and polyacrylic acid-coated ceria nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 3395, 2013.

WELLER, C.; SUSSMAN, G.. Wound dressings update. **Journal of pharmacy practice and research**, v. 36, n. 4, p. 318-324, 2006.

WONA, G.; JANIK, H. Review: Synthetic polymer hydrogels for biomedical application. **Chemistry & Chemical Technology**, v. 4, n. 4, p. 297-304, 2010.

XAVIER, A. M. *et al.* Marcos da história da radioatividade e tendências atuais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 83-91, 2007.

YUNES, R. A.; *et al.* Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.