

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Lilian Vieira Vaz

**CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL DE PVA (ÁLCOOL POLIVINÍLICO) COM
SULFADIAZINA DE PRATA EM ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA**

**Sorocaba/SP
2016**

Lilian Vieira Vaz

**CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL DE PVA (ÁLCOOL POLIVINÍLICO) COM
SULFADIAZINA DE PRATA EM ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Duarte
Carvalho Vila

Coorientador: Prof. Dr. José Martins de
Oliveira Junior

Sorocaba/SP
2016

Lilian Vieira Vaz

**CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL DE PVA (ÁLCOOL POLIVINÍLICO) COM
SULFADIAZINA DE PRATA EM ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Angela Faustino Jozala
Programa de Pós-Graduação em Processos Ambientais e Tecnológicos
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Vitor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade de Sorocaba

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família pelo apoio e força para nunca desistir.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba (Uniso) pelo aprendizado de grande valia.

À minha orientadora Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila por tanta dedicação, paciência e persistência ao meu lado, sem sua excelente orientação este trabalho jamais teria se concretizado.

À Profa. Dra. Angela F. Jozala pela ajuda nos ensaios microbiológicos e de citotoxicidade e pelas alterações sugeridas na dissertação. À Profa.Dra. Denise Grotto pelas análises estatísticas e correções do texto. Ao Prof. Dr.Vitor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão pelas correções e sugestões nesta dissertação. Ao Prof.Dr. José Martins de Oliveira Junior por sua coorientação. Ao Prof. Me. Leo Victorino da Silva pela ajuda na formatação deste trabalho. À Profa Dra. Renata Lima pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade.

Aos colegas de pós-graduação pela parceria e amizade. Em especial, à Alessandra Rios, Bianca Hessel Maschio, Juliana Souza, Natália Tribuiani Silva, que suavizaram “o peso de um mestrado”. As alunas de iniciação científica Gabriela Acca Ribeiro e Kátiusca Pontes pela ajuda em diversos ensaios laboratoriais.

Ao pessoal dos Laboratórios de Saúde da Uniso pela prontidão na ajuda sempre que necessária, em especial à Valéria Orsi e ao Gustavo Alexandre dos Santos.

Ao técnico Denicezar A. Baldo do LaBNUS (Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Uniso) por ser tão prestativo e paciente.

A técnica Thaisa B. Pickler do Lapetox (Laboratório de Pesquisa Toxicológica da Uniso) pela colaboração na realização dos ensaios de citotoxicidade e microbiológicos.

Às técnicas Fabiana Favoretto e Renata Magueta do Instituto Químico da Unicamp pelas análises de calorimetria exploratória diferencial e de difração de raios X, respectivamente.

Ao técnico Hugo Campos Loureiro responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química da Unicamp pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À CAPES/Prosup, pelo suporte financeiro oferecido.

E por fim, às pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho.

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Ferreira Vaz e Leni Vieira Vaz à minha irmã Vanessa Vieira Vaz e à minha filha Júlia Vaz Rosa. A essa família maravilhosa que Deus me deu, pela paciência, pelo amor. Sem o apoio de vocês eu jamais poderia alcançar mais essa vitória. Muito obrigada.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

(Mahatma Gandhi 1869-1948)

RESUMO

Introdução: Hidrogéis são formas farmacêuticas caracterizadas por uma estrutura formada por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos que, em contato com água, intumescem mantendo sua integridade. Os hidrogéis são de particular interesse para emprego no tratamento de feridas tópicas devido a sua baixa toxicidade, potencial de liberação estendida de fármacos e capacidade de manter a ferida hidratada. Dentre os diversos polímeros empregados na obtenção dos hidrogéis destaca-se o álcool polivinílico (PVA), em função de sua versatilidade, baixo custo e atoxicidade. A sulfadiazina de prata é a droga de escolha no tratamento de queimaduras devido ao seu largo espectro de ação antimicrobiana. O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica deve garantir ao consumidor eficácia, eficiência e segurança. Assim, para avaliação da qualidade de um produto farmacêutico são realizados estudos de estabilidade. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar as características de um hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata para uso como curativo tópico em ensaio de estabilidade acelerada. **Material e Métodos:** Os hidrogéis foram preparados utilizando-se 10% de PVA (89% e 99%) e 1; 2,5; 5,0 e 10% de sulfadiazina de prata dissolvida em polietilenoglicol 400 e glutaraldeído como agente reticulador. Para a confirmação da concentração adequada de ativo foi realizado ensaio de citotoxicidade celular pela técnica do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio). Após a preparação dos hidrogéis empregando-se 1% (m/v) de sulfadiazina de prata, as amostras foram embaladas em sachês laminados e realizou-se o ensaio de estabilidade acelerada com análises em 0, 30, 60, 90 e 180 dias em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $60 \pm 5\%$. Os parâmetros de qualidade foram: características organolépticas, umidade, intumescimento, atividade antimicrobiana, resistência mecânica, espectrofotometria de infravermelho, difração de raios X, calorimetria diferencial de varredura, avaliação da liberação de prata por potenciometria e avaliação de morfologia por microscopia eletrônica de varredura. **Resultados e Discussão:** Os hidrogéis apresentaram-se sem rachaduras, bolhas de ar e com coloração uniforme. Após 90 dias de armazenamento as amostras apresentaram escurecimento, provavelmente por reação da sulfadiazina de prata com glutaraldeído residual. Em todos os demais parâmetros não houve diferença significativa. **Conclusão:** O hidrogel é viável como curativo para infecções de pele, devendo ser mantido em temperatura de refrigerador ($2-8^\circ\text{C}$).

Palavras-chave: Hidrogel. Sulfadiazina de prata. Álcool polivinílico. Ensaio de estabilidade.

ABSTRACT

Introduction: Hydrogels are dosage forms characterized by a structure formed by three-dimensional networks of hydrophilic polymers which, in contact with water, swell, maintaining their integrity. Hydrogels are of particular interest for use in the treatment of topical wounds due to their low toxicity, extended release of drugs and potential ability to keep the wound hydrated. Among the various polymers used in the obtaining of hydrogels, the polyvinyl alcohol (PVA) stands out due to its versatility, low cost and low toxicity. Silver sulfadiazine is the drug of choice in the treatment of burns due to its broad antimicrobial spectrum. The development of a pharmaceutical formulation should guarantee effectiveness, efficiency and safety to the consumer. To evaluate the quality of a pharmaceutical product cytotoxicity and stability assays studies are used. **Objective:** The aim of this work was to evaluate the characteristics of a PVA hydrogel and silver sulfadiazine for use as a dressing topic in an accelerated stability test. **Material and Methods:** Hydrogels were prepared using 10% PVA (89% and 99%), 1% (w/v) silver sulfadiazine dissolved in polyethylene glycol 400 and glutaraldehyde as crosslinker. After preparation of the hydrogels, cell viability by MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay was accomplished. Hydrogel samples were packed in sachets and the accelerated stability test was done with analysis at 0, 30, 60, 90 and 180 days under $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity (RH) $60 \pm 5\%$. Quality parameters evaluated were: organoleptic characteristics, moisture, swelling, antimicrobial activity by the diffusion method in agar, mechanical strength, infrared spectrophotometry, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, control release of silver by potentiometry and morphology evaluation by scanning electron microscopy. **Results and Discussion:** The hydrogels were without cracks, air bubbles and had uniform color. After 90 days of storage the samples showed browning reaction probably because of the reaction of silver sulfadiazine with residual glutaraldehyde. In all other parameters no significant difference was observed. **Conclusion:** The hydrogel is feasible as dressing for skin infections and must be kept at refrigerator temperature ($2-8^\circ\text{C}$).

Keywords: Hydrogel. Silver sulfadiazine. Polyvinyl alcohol. Stability tests.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismos de liberação de ativos em hidrogéis | 20 |
| Figura 2. Formação do álcool polivinílico (PVA) a partir do acetato de polivinila..... | 22 |
| Figura 3. Esquema ilustrativo dos graus de queimaduras de pele em função da profundidade da lesão | 24 |
| Figura 4. Formula estrutural da sulfadiazina de prata | 26 |
| Figura 5. Esquema simplificado de preparo do hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata..... | 36 |
| Figura 6. Cortador utilizado para obtenção de amostras de hidrogel utilizadas nos ensaios microbiológicos | 39 |
| Figura 7. Esquema ilustrativo do dispositivo de Enslin-Neff para determinação do perfil de intumescimento..... | 40 |
| Figura 8. Montagem do sistema utilizado para determinação da liberação de prata por potenciometria | 43 |
| Figura 9. Imagem do hidrogel no tempo zero | 45 |
| Figura 10. Citotoxicidade em células de linhagem de fibroblastos L929 expostas a hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata por 24, 48 e 72 horas pelo método de MTS. Resultados expressos em % de viabilidade celular considerando como 100% as células expostas ao meio de cultura (controle) | 48 |
| Figura 11. Citotoxicidade em células de linhagem de fibroblastos L929 expostas a hidrogéis de PVA em 24, 48 e 72 horas de contato pelo método de MTS. Resultados expressos em % de viabilidade celular (considerando 100% as células expostas ao meio de cultura (controle) normalizada como uma função do tempo de contato da célula da célula..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Hidrogel após 30 dias de armazenamento em câmara climatizada a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de UR..... | 50 |
| Figura 13. Características visuais dos hidrogéis armazenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR. | 52 |
| Figura 14. Resultados obtidos no teste de disco-difusão após 24 h de incubação em estufa à 37°C das amostras armazenadas em diferentes tempos de armazenamento a a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR. As placas contendo meio de cultura TSB, da direita foram inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> e as da esquerda com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , sendo: a) tempo 0; b)30 dias de armazenamento; c) 60 dias de armazenamento; d) 90 dias de armazenamento; e) 180 dias de armazenamento; 1 amostras, 2 controle positivo (solução de sulfadiazina de prata 1% (m/v) e 3 controle negativo (hidrogel sem sulfadiazina de prata)..... | 54 |
| Figura 15. A capacidade de absorção de água das amostras de hidrogéis de PVA com sulfadiazina de prata armazenados em 0, 30, 60, 90 e 180 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR. | 58 |
| Figura 16. Representação gráfica dos resultados de resistência mecânica dos hidrogéis obtidos por texturômetro nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR, sendo a) perfuração; b) relaxação; c) resiliência | 60 |
| Figura 17. Curvas de DSC dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata em 0 (a), 30 (b), 60(c), 90(d) e 180(e) dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR | 63 |
| Figura 18. Espectros de infravermelho de sulfadiazina de prata e de hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata armazenados em diferentes tempos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR, sendo a) sulfadiazina de prata; b) hidrogel em 0 dia de armazenamento; c) hidrogel em 30 dias de armazenamento; d) hidrogel em 60 dias de armazenamento; e) hidrogel em 90 dias de armazenamento; f) hidrogel em 180 dias de armazenamento. | 67 |
| Figura 19. Reação de reticulação entre álcool polivinílico (PVA) e glutaraldeído (GA)..... | 68 |
| Figura 20. Mecanismo de reação entre sulfadiazina de prata (SSDZ) e glutaraldeído (GA) .. | 69 |

- Figura 21.** Liberação de prata dos hidrogéis armazenados em 0, 30, 60, 90, 180 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR obtidos por potenciometria.....71
- Figura 22.** Difrátogramas de raios X dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata (SSDZ) em 0, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR.....74
- Figura 23.** Imagens de microscopia eletrônica de hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata: a) imagem de fratura do hidrogel no tempo zero; b) imagem da fratura com 180 dias de armazenamento; c) hidrogel no tempo zero com ampliação de 4000 vezes; d) hidrogel com 180 dias de armazenamento com ampliação de 4000 vezes; e) hidrogel no tempo zero com ampliação de 16000 vezes; f) hidrogel com 180 dias de armazenamento com ampliação de 16000 vezes; g) hidrogel no tempo zero com ampliação de 30000 vezes; h) hidrogel com 180 dias de armazenamento com ampliação de 30000 vezes76
- Figura 24.** Imagem do filme formado de PVA e sulfadiazina de prata sem glutaraldeído78
- Figura 25.** Resultados obtidos no teste de disco-difusão após 24 h de incubação em estufa a 37°C do filme formado de PVA e sulfadiazina de prata sem glutaraldeído. As placas contendo meio de cultura TSB da direita, foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* e as da esquerda com *Pseudomonas aeruginosa*, sendo 1 as amostras, 2 controle positivo (solução de sulfadiazina de prata 1% (m/v) e 3 controle negativo (hidrogel sem sulfadiazina de prata).79

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação de hidrogéis baseada em diferentes características | 21 |
| Tabela 2. Efeitos negativos em produtos farmacêuticos ligados à instabilidade | 29 |
| Tabela 3. Frequência para realização dos testes de estabilidade acelerada, longa duração e de acompanhamento..... | 31 |
| Tabela 4. Condições relativas a temperatura e a umidade* exigidas nos testes de estabilidade acelerada, longa duração e de acompanhamento..... | 32 |
| Tabela 5. Valores médios (n=3) para halos de inibição de crescimento microbiano (mm) empregando amostras de hidrogéis com sulfadiazina de prata em diferentes tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 180 dias)..... | 55 |
| Tabela 6. Diferenças médias dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos em culturas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> empregando amostras de hidrogel armazenadas em diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 180 dias) pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%..... | 56 |
| Tabela 7. Diferenças médias dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos em culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> empregando amostras de hidrogel armazenadas em diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 180 dias.) pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%..... | 57 |
| Tabela 8. Temperaturas dos eventos térmicos observados nas análises de DSC dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata em 0, 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\% \text{UR}$ | 62 |
| Tabela 9. Teores médios (n=3) de umidade obtidos em amostras de hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata nos diferentes tempos de armazenamento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\% \text{UR}$ | 64 |
| Tabela 10. Diferenças médias de umidade entre os diferentes tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 180 dias pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%..... | 65 |
| Tabela 11. Valores de r^2 (coeficiente de determinação) referentes a cinética de liberação de sulfadiazina de prata a partir do hidrogel, obtidos através da construção de gráficos para os modelos de primeira ordem, Higuchi e de Korsmeyer-Peppas..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Tabela 12. Valores de n (coeficiente de liberação) para as amostras de hidrogel nos diferentes tempos de armazenamento..... | 73 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- American Type Culture Collection

BHI - Brain hearth infusion

CMC - Carboximetilcelulose

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's médium (Meio Dulbecco MEM)

DRX - Difração de raios X

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FBS - Soro fetal bovino

FDA - Food and Drug Administration

FESEM- Field emission scanning electron microscopy

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FTIR - Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier

Kgf - Quilograma-força

IV- Infravermelho

MRSA- *Staphylococcus aureus* metilicilina resistente

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mV - Milivolts

n - Número de amostras

n - Exponencial de liberação do fármaco

PA - Pró-Análise

PAA - Poliacido acrílico

PBS-MCF - Solução tampão fosfato, livre de magnésio e cálcio

PEG - Polietilenoglicol

PEG 400 - Polietilenoglicol 400

PEGF- Ésteres de poliglicerol de ácidos graxos

PEO - Polióxido de etileno

PVA 89% - Álcool polivinílico com grau de hidrólise de 89%

PVA 99% - Álcool polivinílico com grau de hidrólise de 99%

PVP - Polivinil pirrolidona

PEN/STREP - Penicilina/estreptomicina

RPM - Rotações por minuto

R² - Coeficiente de determinação

SCQ - Superfície corporal queimada

SSDZ- Sulfadiazina de prata

TSB - Tryptone soy broth

UFC - Unidades formadoras de colônia

UI - Unidades internacionais

UR - Umidade relativa

UTI - Unidade de terapia intensiva

VRE - *Enterococcus* vancomicina resistente

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Hidrogéis | 18 |
| 1.2 Álcool polivinílico | 22 |
| 1.3 Queimaduras | 23 |
| 1.4 Sulfadiazina de prata | 25 |
| 1.5 Ensaio de estabilidade | 28 |
| | |
| 2. OBJETIVOS | 33 |
| 2.1 Objetivo geral | 33 |
| 2.2 Objetivos específicos | 33 |
| | |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL | 34 |
| 3.1 Material e reagentes | 34 |
| 3.2 Equipamentos | 34 |
| 3.3 Métodos | 35 |
| 3.3.1 Preparo dos hidrogéis | 35 |
| 3.3.2 Citotoxicidade celular pelo método do MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio..... | 387 |
| 3.3.3 Ensaio de estabilidade | 378 |
| 3.3.4 Atividade antimicrobiana | 38 |
| 3.3.5 Características organolépticas | 40 |
| 3.3.6 Capacidade de absorção de água | 40 |
| 3.3.7 Propriedades mecânicas..... | 41 |
| 3.3.8 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial | 41 |
| 3.3.9 Teor de umidade | 42 |
| 3.3.10 Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier..... | 42 |
| 3.3.11 Avaliação do perfil de liberação de sulfadiazina de prata no hidrogel..... | 42 |
| 3.3.12 Difração de raios X..... | 43 |
| 3.3.13 Microscopia eletrônica de varredura..... | 43 |
| 3.4 Análise estatística | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5 Estudo cinético da liberação da sulfadiazina de prata a partir do hidrogel desenvolvido..... | 44 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.1 Preparo dos hidrogéis..... | 45 |
| 4.2 Citotoxicidade celular pelo método do MTS3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio | 46 |
| 4.3 Ensaio de estabilidade acelerada | 50 |
| 4.3.1 Características organolépticas | 51 |
| 4.3.2 Atividade antimicrobiana | 52 |
| 4.3.3 Capacidade de absorção de água | 57 |
| 4.3.4 Propriedades mecânicas..... | 59 |
| 4.3.5 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial..... | 61 |
| 4.3.6 Teor de umidade | 64 |
| 4.3.7 Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier..... | 66 |
| 4.3.8 Perfil de liberação de sulfadiazina de prata no hidrogel..... | 70 |
| 4.3.9 Difração de raios X..... | 73 |
| 4.3.10 Microscopia eletrônica de varredura..... | 75 |
| 4.4 Outras considerações..... | 77 |
| 5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS PARA FUTUROS TRABALHOS | 80 |
| REFERÊNCIAS..... | 81 |

APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa que originou esta dissertação de mestrado de título “Características de hidrogel de PVA (álcool polivinílico) com sulfadiazina de prata em ensaio de estabilidade acelerada” foi desenvolvido seguindo uma linha de pesquisa denominada “Sistemas de liberação modificada de fármacos antimicrobianos”. Nesta linha de trabalho diversos estudos estão sendo elaborados pelo nosso grupo de pesquisa, visando desenvolver novas formas farmacêuticas com características modificadas para a liberação de fármacos antimicrobianos. Especificamente, esta proposta de pesquisa deu sequência em trabalhos envolvendo hidrogéis de PVA com sulfadiazina de prata, tendo como foco principal determinar a estabilidade do produto.

Resultados do trabalho desenvolvido foram apresentados na I Mostra de Atividades Acadêmicas (I MAAC) da Universidade de Sorocaba em 2015, com o título “Eficácia antimicrobiana tópica de hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata”, recebendo o primeiro lugar na categoria Trabalhos da Pós-graduação. Também baseado nos resultados obtidos pela pesquisa desenvolvida elaborou-se o artigo científico intitulado “Development and characterization of a hydrogel containing silver sulfadiazine for antimicrobial topical applications. Part II: stability, cytotoxicity and silver release patterns”, o qual se encontra em processo de submissão para publicação.

1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis são formas farmacêuticas caracterizadas por uma estrutura formada por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos que, em contato com a água, intumescem mantendo sua integridade. Hidrogéis são adequados como formulações para liberação controlada, uma vez que ao intumescer, são capazes de liberar princípios ativos incorporados por diversos mecanismos (RODRIGUES, 2012).

Inúmeros tipos de polímeros naturais e/ou sintéticos têm sido utilizados na preparação de hidrogéis como poli (ácido acrílico) (PAA), poli (óxido de etileno) (PEO), poli (etileno glicol) (PEG), poli (vinil pirrolidona) (PVP), álcool polivinílico (PVA), ésteres de poliglicerol de ácidos graxos (PEGF), carbômeros, alginato de sódio, sulfato de condroitina, pectina, dextrana, carboximetilcelulose (CMC) e outros derivados da celulose, quitosana, gelatina e gomas (GIBAS; JANIK, 2010; VILLANOVA et al., 2010). Dentre estes polímeros, o PVA é um dos polímeros sintéticos mais utilizados em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade (KAMOUN et al., 2015). Além disto, o baixo custo e a fácil disponibilidade deste polímero podem ser fatores atraentes para a produção de curativos tópicos, visando acessibilidade do produto a uma extensa faixa da população.

Para o tratamento de feridas tópicas, os hidrogéis são de particular interesse devido (i) capacidade de manter a ferida hidratada, importante fator colaborador no processo de cicatrização, (ii) ao seu potencial de liberação estendida de fármacos, que não exige trocas constantes de curativos, (iii) à sua baixa toxicidade que o torna biocompatível com a pele, e (iv) ao seu comportamento viscoelástico similar ao tecido humano que favorece o uso em diversas partes do corpo humano (SONG; RANE; CHRISTMAN, 2012). Em função destas características, tem-se verificado uma tendência crescente no desenvolvimento de formulações de hidrogel com a utilização de vários materiais, numa tentativa de resolver simultaneamente os diferentes aspectos da cicatrização de feridas (epitelização, síntese de colágeno, vascularização e contração) e o tratamento (com a veiculação de ativos) (MADAGHIELE et al., 2014).

As queimaduras são graves enfermidades que apresentam dificuldade no tratamento em função da dor que provocam, pela possibilidade de contaminação e pelas sequelas em diversos graus (MADAGHIELE et al., 2014). Dentre os produtos utilizados no combate às infecções locais secundárias ligadas às queimaduras, existe consenso na utilização da sulfadiazina de prata (SSDZ), em função de sua capacidade em desbridar tecidos necrosados, combater a infecção local, apresentar boa tolerância, ser efetiva contra uma ampla microbiota

e possuir propriedades cicatrizantes (INTERNATIONAL CONSENSUS, 2012). Neste sentido, curativos oclusivos contendo compostos de prata, como a sulfadiazina de prata, têm merecido atenção por parte da comunidade científica (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; CHAKAVALO et al., 2012; JODAR et al., 2015).

Para o sucesso de uma especialidade farmacêutica, deve-se garantir a qualidade, segurança e eficácia durante todo o período de vida do produto (*shelf life*). Para isto são preconizados ensaios de estabilidade (BRASIL, 2005). Estes ensaios visam avaliar a conformidade do produto com as especificações físico-químicas e microbiológicas, permitindo também determinar as condições de armazenamento compatíveis com a zona climática da região geográfica onde o produto será distribuído (MEIRELES, 2014).

Considerando os fatos mencionados objetivou-se, nesta proposta de pesquisa, a avaliação da qualidade de um hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata, o qual foi desenvolvido para uso como curativo tópico para o tratamento de infecções de pele, utilizando ensaio de estabilidade acelerada.

1.1 Hidrogéis

Hidrogéis são estruturas tridimensionais de polímeros hidrófilos, sendo uma classe de biomateriais que tem demonstrado grande potencial farmacêutico e biomédico (CHIRANI et al., 2015; DAS; BERA; MUKHERJEE, 2012). Este potencial deve-se à possibilidade de originarem materiais com ampla diversidade de propriedades físicas e mecânicas. Dentre suas características, a biodegradabilidade é uma das propriedades de maior interesse pela possibilidade de excreção ou reabsorção sem qualquer tipo de intervenção (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

As aplicações biomédicas de polímeros podem ser classificadas em três grandes categorias, sendo (i) uso extracorpóreo: catéteres, tubos e linhas para fluxos de fluidos, membranas de diálise, dispositivos oculares, curativos para pele ferida e pele artificial; (ii) dispositivos para implantes permanentes: ortopédicos, cardiovasculares, dentais, etc.; (iii) implantes temporários: suturas biodegradáveis; dispositivos implantáveis para entrega de fármacos, *scaffolds* para regeneração de tecidos, enxertos vasculares temporários, *stents* arteriais e dispositivos temporários de fixação óssea (SAHA et al., 2011).

No ano de 1960, Wichterle e Limm apresentaram um dos primeiros trabalhos empregando hidrogéis na área médica apresentando nova utilização para o composto 2-

hidroximetil metacrilato (DELIGKARIS et al., 2010; MAITRA; SHUKLA, 2014). Desde então, hidrogéis obtidos de polímeros naturais ou sintéticos têm sido utilizados como materiais em diversas aplicações biomédicas, como na engenharia de tecidos, regeneração e reparação de órgãos, em sistemas de liberação controlada de fármacos, entre outras (OOMMEN et al., 2013).

O uso crescente destes biomateriais, na forma de hidrogéis, se deve ao fato de apresentarem propriedades físicas semelhantes às dos tecidos vivos, como a capacidade de retenção de elevado teor de água, consistência macia e elástica, porosidade e baixa tensão interfacial (BARCELLOS et al., 2000; CHIRANI e al., 2015; GIBAS; JANIK, 2010).

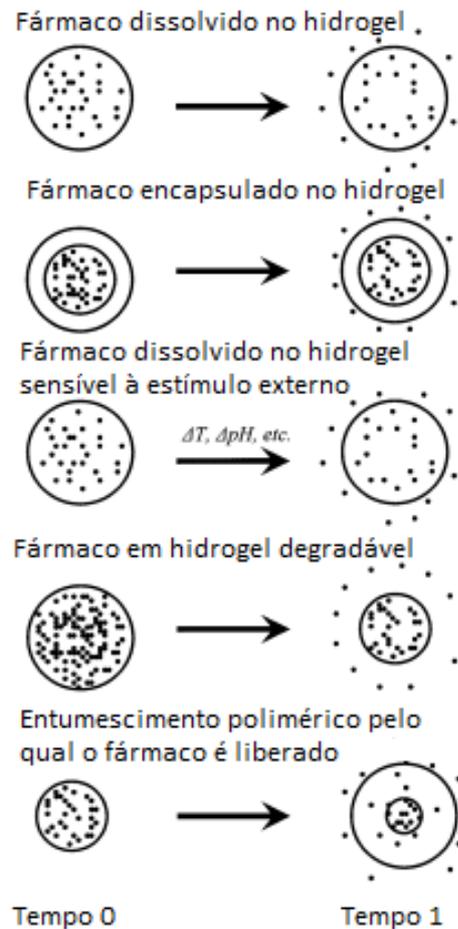
Os hidrogéis são sistemas que apresentam estrutura tridimensional de cadeias de polímeros solúveis em água, com ligações cruzadas e grande quantidade de água retida. Uma das principais características dos hidrogéis é a capacidade de absorver e reter grande quantidade de água e/ou fluídos biológicos, sem que ocorra a perda da sua conformação tridimensional (BRITO; RODRIGUES, 2013). A estrutura tridimensional do hidrogel é formada por ligações covalentes, forças de van der Waals, pontes de hidrogênio e forças iônicas (KIM et al., 2014).

As redes amplamente hidratadas promovem maciez e elasticidade aos produtos e, muitas vezes, podendo conter mais de 90% de água (OOMMEN et al., 2013). A afinidade dos hidrogéis pela água é devida aos grupos hidrofílicos como OH, COOH, NH₂, CONH e CONH₂ presentes nos polímeros (KIM et al., 2014).

Os hidrogéis, normalmente, apresentam estrutura porosa que pode ser modelada pelo controle do número de ligações cruzadas e pela hidrofiliabilidade do polímero. A porosidade permite a liberação de fármacos a uma taxa dependente do coeficiente de difusão das moléculas no hidrogel (MELLO; CUNHA JR; FIALHO, 2012).

A liberação de princípios ativos carregados por hidrogéis pode ocorrer em decorrência de diversos mecanismos em processos isolados ou não, como (i) por dissolução do fármaco, no hidrogel, (ii) por liberação de microcápsulas contendo princípios ativos, (iii) por liberação via estímulos do ambiente como variação de pH, temperatura, etc., (iv) por degradação/erosão do hidrogel, e (v) por intumescimento do hidrogel com liberação do princípio ativo. Estes mecanismos são fortemente influenciados pelas características físico-químicas dos hidrogéis tais como a estrutura molecular da matriz, grau de intumescimento, reticulação, entre outros (ALCÂNTARA, 2013). A Figura 1 ilustra os mecanismos citados.

Figura 1. Mecanismos de liberação de ativos em hidrogéis.



Fonte: PEPPAS et al., 2006.

Os hidrogéis podem ser obtidos por diversos processos químicos e físicos. Estes procedimentos incluem aqueles realizados em uma única etapa de polimerização e reticulação, bem como os procedimentos com diversas fases envolvendo síntese de moléculas poliméricas e posterior reticulação. Os hidrogéis, em função das diversas formas de obtenção e constituintes, podem ser classificados por variados parâmetros, como os apresentados na Tabela 1 (AHMED, 2015; DELIGKARIS et al., 2010).

Tabela 1. Classificação de hidrogéis baseada em diferentes características.

| Características | Classificação |
|------------------------------------|---|
| Origem do polímero | Natural Sintético |
| Composição do polímero | Homopolimérico Copolimérico Multipolimérico |
| Tipo de reticulação | Química Física |
| Aparência física | Matriz Filme Microesferas |
| Estrutura física | Amorfo Semicristalino Ligações hidrogeniônicas Ligações supramoleculares |
| Configuração da carga elétrica | Não iônico (neutra) Iônico (aniônico ou catiônico) Anfotérico <i>Zwitteriônico</i> |
| Sensibilidade a estímulos externos | Sensível Não sensível |

Fonte: AHMED, 2015; DELIGKARIS et al., 2010.

Os hidrogéis passaram a ser utilizados como curativos graças à sua capacidade de fornecer umidade a um tecido desidratado, bem como absorver exsudatos contaminados, provenientes de feridas, mantendo-os retidos no interior da estrutura do hidrogel. Ao absorver tais secreções, ocorre estiramento das ligações cruzadas nas cadeias poliméricas abrindo espaço para inserção de bactérias, detritos, moléculas causadoras de odor e outros corpos estranhos que não voltarão para o ferimento (JONES; VAUGHAN, 2005). Assim, os hidrogéis têm despertado interesse para aplicações na cobertura de feridas, pois além das suas propriedades de biocompatibilidade, podem estar em contato direto com a ferida, gerando um ambiente úmido, ideal para a cicatrização de feridas (ARREDONDO et al., 2011; MADAGHIELE et al., 2014). A importância de proporcionar conforto e comodidade no tratamento de feridas também tem sido uma preocupação por parte da indústria farmacêutica e de biomateriais. A escolha do curativo adequado é fundamental para a cura e a qualidade de vida do paciente, sendo de vital importância considerar parâmetros tais como necessidade de trocas pouco frequentes, relação custo-eficácia e uma vida de prateleira estendida (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015). O uso de hidrogéis como curativos tópicos tem permitido assim,

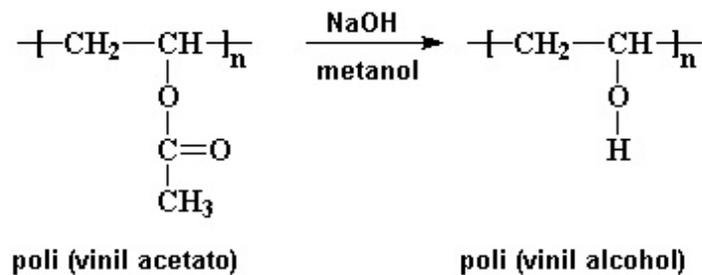
melhor adesão do paciente ao tratamento e redução de efeitos adversos (ALMEIDA, 2010; VASHIST et al., 2014).

Para o sucesso no desenvolvimento de hidrogéis que atendam às necessidades específicas de interesse, a escolha do polímero é crucial. O poli (álcool vinílico) (PVA) é uma escolha excelente para aplicações na engenharia de tecidos e hidrogéis de uso tópico, uma vez que, podem produzir produtos não tóxicos e mecanicamente resistentes (GUPTA; WEBSTER; SINHA, 2011).

1.2 Álcool polivinílico

O álcool polivinílico ou poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético, obtido através da polimerização do acetato de vinila seguido de reação de hidrólise do poli (acetato de vinila) em poli (álcool vinílico) (GAAZ et al., 2015) como pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2. Formação do álcool polivinílico (PVA) a partir do acetato de polivinila.



Fonte: <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.br/2012/03/alcohol-depolivinilo.html>

O grau de hidrólise do PVA é representado através da relação entre o percentual do número total inicial de ácidos acético e, após reação de hidrólise, o número de hidroxilas no polímero final. Através do grau de hidrólise é possível caracterizar as propriedades do PVA, pois um aumento do grau de hidrólise gera uma redução da solubilidade em água, ocorrendo

então a estabilização energética através das pontes de hidrogênio, aumento da adesão em superfícies hidrofílicas, e aumento da resistência à tração e da viscosidade (COSTA; MANSUR, 2008).

Segundo Faria, Vercelheze e Mali (2012) o PVA atua como um reforço mecânico nos produtos em que é adicionado, além de diminuir a permeabilidade ao vapor de água. O PVA é um polímero sintético, hidrofílico, biodegradável, não tóxico, biocompatível e que apresenta boa capacidade de formação de filme. Possui ainda, propriedade de adesão e elevada resistência mecânica e de barreira ao oxigênio, aromas, óleos e solventes. Deste modo, em função de sua versatilidade, o PVA tem sido muito utilizado, desde a primeira metade do século XX, em todo o mundo, para a produção de diversos compostos, como lacas, resinas, fios cirúrgicos, materiais de embalagem para alimentos, entre outros fins (GAAZ et al., 2015).

Hidrogéis de PVA podem ser obtidos através de processos como criogelificação, reticulação química e irradiação resultando, de modo geral, em produtos adequados para inúmeras aplicações na biomedicina. Dentre as propriedades interessantes para o emprego do PVA em hidrogéis destacam-se a alta resistência mecânica e elasticidade, transparência, mínima adesão celular, alta capacidade de intumescimento, atoxicidade, bioadesividade, ausência de carcinogenicidade e facilidade de processamento. Assim, hidrogéis contendo PVA podem ser aplicados *in vivo* sem apresentarem efeitos colaterais significativos (GIBAS; JANIK, 2010; STASKO et al., 2009).

1.3 Queimaduras

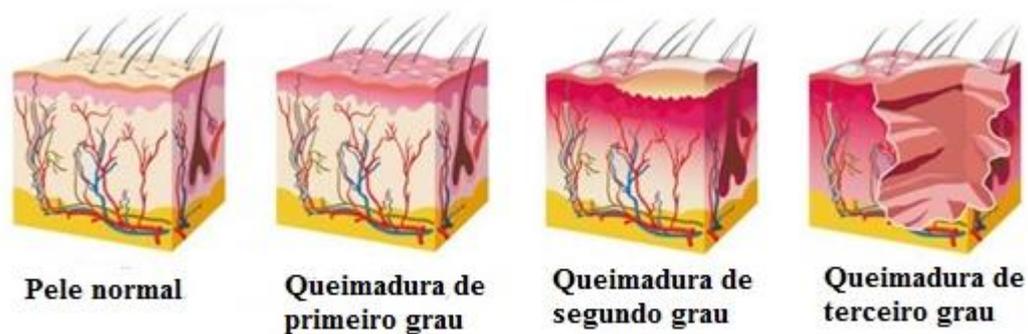
As queimaduras estão entre as mais devastadoras lesões. As queimaduras são consideradas um grave problema de saúde pública e, quando não levam à morte, podem resultar em graves sequelas como limitações funcionais e distúrbios psicológicos e sociais (FERNANDES et al., 2012; ARAGÃO et al., 2012).

As queimaduras são ainda uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo (LEE; JOORY; MOIEMEN, 2014). Estima-se que mais de 300.000 mortes ocorrem a cada ano, como consequência de queimaduras induzida pelo fogo, com mortes adicionais atribuídas às queimaduras de outras origens (queimaduras por eletricidade, produtos químicos, radiação, etc.) (MADAGHIELE et al., 2014). Estima-se que aproximadamente 1 milhão de brasileiros sofram anualmente acidentes com queimaduras, sendo que, apenas 100 mil buscam ajuda médica (DAGA, MORAIS; PRESTES, 2015). No Brasil, no entanto, as

estatísticas são insuficientes, dificultando compreender a magnitude do problema, identificar as populações mais atingidas e as circunstâncias envolvidas nas queimaduras (BISCEGLI et al., 2014).

As queimaduras são classificadas quanto ao seu grau, o qual se relaciona com a extensão da sua profundidade como ilustra a Figura 3, com a área corpórea acometida e com o mecanismo de lesão.

Figura 3. Esquema ilustrativo dos graus de queimaduras na pele em função da profundidade da lesão.



Fonte: <http://healthdefine.com/conselho-medico/prevenção-e-tratamento-de-queimaduras>

As queimaduras de primeiro grau, que acometem somente a epiderme, são causadas normalmente pela exposição a raios solares e resultam em uma inflamação simples que cicatriza em uma semana, sem ocorrência de repercussões sistêmicas. As queimaduras de segundo grau ultrapassam a epiderme e atingem a derme, ocorrendo então, a liberação de mediadores imunes e inflamatórios como histamina, bradecina e interleucinas, que resultam em um aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de líquidos e acúmulo destes sob uma epiderme intacta, formando bolhas. Estas lesões, de modo geral, não apresentam complicações, cicatrizando espontaneamente. Já as lesões de terceiro grau acometem todos os elementos da pele. Como causam destruição dessas estruturas, as feridas não se regeneram, necessitando de implantes cutâneos para o tratamento (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

Um dos aspectos também de grande importância a serem caracterizados nas queimaduras é a extensão da superfície corporal queimada (SCQ). A SCQ deve ser cuidadosamente avaliada devido à sua repercussão sistêmica e à sua influência na sobrevivência do paciente. A avaliação da localização das lesões também se torna importante durante os

cuidados prestados aos pacientes, devido ao prejuízo estético e funcional que queimaduras nas mãos, face e pescoço, podem causar (MONTES; BARBOSA; SOUZA, 2011).

O tratamento das queimaduras abrange cuidados locais e sistêmicos, variando de acordo com a profundidade, localização corporal e extensão. O uso de curativos contendo substâncias cicatrizantes e anti-infecciosas tem sido uma opção para a terapia local, que pode favorecer a restauração da pele queimada. Dentre as substâncias e coberturas utilizadas nos curativos utilizados em queimaduras, pode-se mencionar a sulfadiazina de prata, materiais substitutivos de pele, oxigenoterapia hiperbárica e coberturas impregnadas com prata (TAVARES; SILVA, 2015). Os curativos de prata têm-se mostrado altamente eficazes e, deste modo, têm-se tornado um dos focos para o aprimoramento do tratamento de queimaduras aliado ao uso de compostos bioativos para regeneração dérmica e esclarecimento da fisiopatologia deste tipo de trauma (MOSER et al., 2014).

1.4 Sulfadiazina de prata

A prata tem uma longa história de uso medicinal com base em seus efeitos antimicrobianos, particularmente no tratamento de feridas infectadas. O uso da prata como profilático e no tratamento para a infecção e outras doenças remonta a 1000 aC, quando os antigos gregos e os romanos a usavam como desinfetante (VERMEULEN et al., 2007).

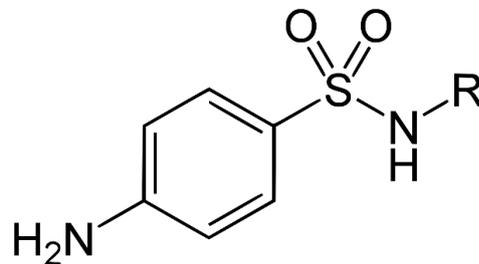
Na medicina moderna, a prata começou a ser utilizada para o tratamento de queimaduras na forma de solução de nitrato de prata a 0,5% (m/v), na década de 1960. A terapia tópica de queimaduras envolvendo a aplicação de soluções de compostos de prata ou de sais de prata foi um marco importante pela redução da taxa de sepse e mortalidade (LEE; JOORY; MOIEMEN, 2014). Posteriormente, desenvolveram-se cremes à base de sulfadiazina de prata. Nos dias de hoje, verifica-se o uso de prata em diferentes formas (ionizada, micronizada ou nanocristalina) e em apresentações de curativos com gaze, *rayon* ou membranas de celulose (MOSER et al., 2014; WHITE; COOPER, 2005).

Em 1968, Charles L. Fox Jr., da Universidade de Columbia (Estados Unidos da América), desenvolveu a sulfadiazina de prata por meio da associação do nitrato de prata e da sulfadiazina, dois agentes já utilizados anteriormente no tratamento de queimaduras. Desenvolveu assim um composto extremamente eficaz contra infecções, que obteve aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) em 1975 (RAGONHA et al., 2005). Este composto uniu a ação inibitória da prata como o efeito antimicrobiano da sulfadiazina

(DAI et al., 2010) e, deste modo, tornou-se o esteio da terapia antimicrobiana tópica em queimaduras devido ao sucesso em controlar infecções e aos mínimos efeitos colaterais (LEE; JOORY; MOIEMEN, 2014).

Do ponto de vista físico-químico, a sulfadiazina de prata apresenta-se na forma de um pó branco, inodoro e hidrossolúvel, de fórmula molecular $C_{10}H_9AgN_4O_2$ (Figura 4) e massa molecular de $357,14 \text{ g.mol}^{-1}$ (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 4. Fórmula estrutural da sulfadiazina de prata.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Sulfadiazina>

A sulfadiazina de prata é um antibiótico de uso tópico da classe das sulfanilamidas, considerado a fármaco de escolha no tratamento de queimaduras devido ao seu largo espectro de ação antimicrobiana. A sulfadiazina de prata é efetiva contra vários microrganismos, particularmente, bactérias Gram negativas (*E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*), incluindo também Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e *Candida albicans* (RAGONHA et al., 2005). Além disto, a utilização de sulfadiazina de prata em queimaduras é favorecida pela sua capacidade de desbridar tecidos necrosados (FERREIRA et al., 2003). Segundo Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum (2003) as vantagens apresentadas pelo uso da sulfadiazina de prata no tratamento de queimaduras são também devidas à facilidade no uso e seu baixo custo. Montes, Barbosa e Souza (2011) destacaram a sulfadiazina de prata a 1% (m/m) como sendo um agente eficaz no tratamento de queimaduras, e ainda como um dos principais produtos empregados.

O mecanismo de ação da sulfadiazina de prata ocorre devido à precipitação de proteínas causada pelos íons de prata, que agem diretamente na membrana citoplasmática das células bacterianas, exercendo ação bactericida imediata e residual ação bacteriostática (SOUZA et al., 2013). Os átomos de prata (Ag) ao perderem um elétron se tornam íons de prata com carga positiva (Ag^+), os quais são altamente reativos. Destaca-se ainda, que a prata elementar ioniza-se mais facilmente quando exposta a um ambiente aquoso, tal como o exsudado da ferida. Compostos de prata contêm íons de prata positivos ligados a íons ou moléculas carregadas negativamente. Quando estas moléculas são expostas a ambientes aquosos, alguns dos íons de prata se separam a partir do composto, ligando-se à membrana de células bacterianas, causando ruptura da parede da célula, infiltração bacteriana e morte celular. Os íons de prata transportados para dentro da célula interrompem a função celular ligando-se a proteínas, interferindo com a produção de energia, alterando funções enzimáticas e a replicação celular. Os íons de prata são ativos contra uma ampla gama de bactérias, fungos e vírus, incluindo bactérias antibióticos resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), importantes agentes causadores de infecções cutâneas de difícil tratamento (INTERNATIONAL CONSENSUS, 2012).

O uso de medicamentos contendo compostos inorgânicos deve ser realizado de forma cautelosa, pois pode ocorrer a bioacumulação dos íons metálicos. (RODRIGUES; RUGGIERO; GUERRA, 2009). No entanto, segundo Lansdown (2010), estudos clínicos com curativos contendo prata têm demonstrado que a maior parte dos íons de prata liberados para o leito da ferida é depositada superficialmente, e que os níveis disponíveis para absorção são mínimos. A absorção de prata na pele intacta é baixa (menos de 1 ppm), pois grande parte dos íons livres é precipitada na forma de sulfeto de prata (Ag_2S) na parte exterior do estrato córneo. Na pele lesionada, pode ocorrer absorção de até 10% da prata aplicada quando utilizada em queimaduras localizadas em regiões muito vascularizadas (LANSDOWN, 2006). Além disto, mesmo se absorvida sistemicamente, a prata é excretada principalmente pela via biliar nas fezes e também na urina, não sendo absorvida para o sistema nervoso central ou periférico (INTERNATIONAL CONSENSUS, 2012). Por outro lado, a prata absorvida pelo intestino, ou a partir de inalação pode se acumular na córnea (argirose) e na derme da pele (argiria) (LANSDOWN, 2006). Segundo Lansdown (2006) a alergia é uma das poucas contraindicações conhecidas advinda do uso tópico da prata. Contudo, em tratamentos de grandes feridas utilizando aplicação tópica de sulfadiazina de prata foram relatados casos de

toxicidade hepática, toxicidade renal e leucopenia, porém com uso justificado por sua eficácia antimicrobiana (SHAHZAD; AHMED, 2013).

Atualmente, há uma gama de produtos de prata disponíveis, com diferentes formulações, substratos e formas de liberação deste princípio ativo. As pesquisas atuais não demonstram, claramente, que um produto é mais eficaz do que outro, sendo que a escolha de um produto deve ser baseada no tipo de ferida, nas características do paciente, na disponibilidade do produto e no custo (LEAPER; DRAKE, 2011; MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013; WOODWARD, 2005). Além disto, um produto farmacêutico deve garantir ao usuário segurança, eficácia e qualidade. Neste sentido, ensaios de estabilidade são fundamentais no desenvolvimento de um produto farmacêutico.

1.5 Ensaios de estabilidade

O ensaio de estabilidade de produtos farmacêuticos compreende um complexo conjunto de procedimentos envolvendo custo elevado, tempo considerável e conhecimento científico apropriado, a fim de avaliar a qualidade, eficácia e segurança de uma formulação medicamentosa (BAJAJ; SINGLA; SAKHUYA, 2012).

Os ensaios de estabilidade têm como objetivos principais garantirem a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica (BRASIL, 2005; SILVA et al., 2009). Também têm como propósito fornecer evidências de como a qualidade de um produto varia com o tempo sob influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luminosidade, e estabelecer o *shelf life*, no caso de produtos finais, além de recomendar condições de armazenamento adequadas (ORIQUEI et al., 2011). A estabilidade química é um dos aspectos mais importantes na avaliação da estabilidade farmacêutica, uma vez que, pode determinar quaisquer incompatibilidades fármaco-excipientes na formulação e permite selecionar as condições de armazenamento e de acondicionamento adequadas para o produto desenvolvido (MEIRELES, 2014).

A estabilidade de um produto é determinada pelo espaço de tempo em que o mesmo, em sua embalagem específica, mantém suas características, dentro de limites especificados, os quais garantem a sua qualidade. A avaliação de uma formulação pode ser efetuada através de ensaios de estabilidade, os quais fornecem informações capazes de indicar o grau de estabilidade relativa de um produto, nas variadas condições de exposição a que possam estar sujeito, até o encerramento de seu prazo de validade. Esse tipo de estudo contribui para

posteriores aprimoramentos nas formulações, na escolha do material adequado para o acondicionamento, na correta estimativa do prazo de validade e ainda na geração de informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (BRASIL, 2005; ORIQUI et al., 2011). Para atender a estes propósitos, os estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos iniciam-se na etapa de pré-formulação e seguem até o produto final com fins de comercialização (BHOWMIK et al., 2012).

A estabilidade das formulações pode ser alterada por fatores extrínsecos e intrínsecos com sérias consequências para a qualidade dos produtos farmacêuticos. A Tabela 2 apresenta alguns efeitos negativos que os medicamentos estão sujeitos em função da perda de estabilidade.

Tabela 2. Efeitos negativos em produtos farmacêuticos ligados à instabilidade.

| Efeitos negativos | Causa |
|---|---|
| Perda da atividade do ativo | Degradação do ativo com perda superior a 10% |
| Aumento da concentração do ativo | Perda por evaporação de solventes/diluentes em produtos em bolsa de perfusão. |
| Alteração da biodisponibilidade | Mudanças na taxa e na extensão da absorção do ativo pelo organismo como, por exemplo, a formação de polimorfos. |
| Contaminação microbiana | Perda da eficácia do antimicrobiano com aumento do número de microrganismos viáveis. |
| Perda da elegância farmacêutica com redução da aceitação pelo usuário | Perda de características organolépticas, como a perda da estabilidade física em emulsões. |
| Formação de produtos tóxicos | Degradação dos componentes da formulação com formação de produtos tóxicos. |
| Perda da integridade da embalagem | Mudança na integridade da embalagem durante armazenamento ou distribuição, como, por exemplo, a perda do torque de tampa de rosca plástica. |
| Perda da qualidade do rótulo | Deterioração da etiqueta com o tempo afetando adversamente a legibilidade, como por exemplo, por migração do plastificante do frasco plástico para o rótulo. |
| Modificação de algum fator funcional de relevância | Mudança de qualquer atributo relevante de um medicamento que afete negativamente a segurança, eficácia, ou a aceitabilidade do paciente ou sua facilidade de utilização, como, por exemplo, a perda da capacidade adesiva de um adesivo transdérmico. |

Fonte: BAJAJ; SINGLA; SAKHUYA, 2012

Destacam-se como fatores extrínsecos ou ambientais causadores de degradação a exposição à temperatura elevada, luz, oxigênio, umidade e microrganismos. Além disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também considera fatores extrínsecos os processos de fabricação, as condições de transporte e ambientais, uma vez que, podem ser responsáveis por alterações na estabilidade dos produtos (BRASIL, 2004).

Fatores intrínsecos são aqueles relacionados com a interação entre os componentes da formulação capazes de influenciar a estabilidade dos medicamentos, propiciando alteração do valor do pH, da viscosidade, das características organolépticas, separação de fases, redução do teor da substância ativa, entre outras mudanças (QUEIROZ, 2008). Os fatores de formulação que influenciam a estabilidade incluem aditivos químicos, excipientes, composição do sistema solvente, incompatibilidade com ânions e cátions, potência da solução iônica, tamanho das partículas, embalagem primária, difusão de fármacos, etc. Assim, qualquer um dos componentes presentes na composição de produtos finais pode ser responsável pela alteração de sua estabilidade (SANTOS Jr; MORETTO, 2005).

Para o procedimento dos ensaios de estabilidade realizados no Brasil, de zona climática IV, as indústrias farmacêuticas seguem a RE nº 1/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005) que define os Estudos de Estabilidade Acelerada, Estabilidade de Longa Duração e Estudo de Estabilidade de Acompanhamento como:

- *Estudo de Estabilidade Acelerada*: estudo desenvolvido para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados alcançados, associados aos derivados dos Estudos de Longa Duração, são usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições às condições fora daquelas estabelecidas pelo fabricante, que podem ocorrer durante o transporte.
- *Estudo de Estabilidade de Longa Duração*: estudo realizado para avaliar características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, eventualmente, depois do prazo de validade estabelecido. Os resultados são utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.
- *Estudo de Estabilidade de Acompanhamento*: estudo projetado para averiguar se o produto farmacêutico preserva suas características físicas, químicas, biológicas, e

microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005; SANTOS Jr; MORETTO, 2005; SILVA et al., 2009).

O Estudo de Estabilidade Acelerada tem o objetivo de fornecer dados preditivos do tempo de vida útil do produto, bem como sua compatibilidade com o material de acondicionamento. O Estudo de Estabilidade Acelerada deve ser de, no mínimo, 90 dias podendo chegar a um ano, sendo necessário avaliar características microbiológicas, organolépticas e físico-químicas. Os testes referentes ao estudo de longa duração devem ser realizados em 0, 3, 6, 9 e 12 meses e, anualmente, após o primeiro ano até o tempo de vida de prateleira declarado no registro. Os testes de acompanhamento exigem que as amostras devam ser testadas em intervalos de 6 meses para confirmação da vida de prateleira prevista ou a cada 12 meses para produtos já estabelecidos. Formulações altamente estáveis podem ser testadas após 12 meses e no final da vida de prateleira. Produtos contendo substâncias menos estáveis devem ser testados a cada 3 meses no primeiro ano, cada 6 meses no segundo ano e depois, anualmente até o tempo de vida de prateleira estabelecido. As frequências dos ensaios estão sumarizadas na Tabela 3 (BRASIL, 2005; MALIK et al., 2011).

Tabela 3. Frequência para realização dos testes de estabilidade acelerada, longa duração e de acompanhamento.

| Ensaio de estabilidade acelerada | Ensaio de estabilidade de longa duração | Ensaio de acompanhamento |
|---|---|---|
| 0, 3, 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Para as demais provas apresentar aos 6 meses estudo comparativo ao momento zero. | 0, 3, 6, 9, 12,18, e 24 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável), e pH (quando aplicável). Para as demais provas apresentar estudo comparativo no prazo requerido ao momento zero. | A cada 12 meses deverão ser realizados todos os testes de estabilidade. |

Fonte: SANTOS Jr; MORETTO, 2005.

Os parâmetros de temperatura e umidade que devem ser respeitados nos ensaios podem ser visualizar na Tabela 4. Estes parâmetros alteram-se em função da temperatura de

armazenamento recomendada pelo fabricante, as quais devem estar indicadas nas bulas e rótulos (SANTOS, Jr; MORETTO, 2005).

Tabela 4. Condições relativas a temperatura e a umidade* exigidas nos testes de estabilidade acelerada, longa duração e de acompanhamento.

| Condições de estocagem recomendadas | Ensaio de estabilidade acelerada | Ensaio de estabilidade de longa duração | Ensaio de acompanhamento |
|--|---|--|---------------------------------|
| 15-30°C | 40 ± 2°C e 75 ± 5% UR | 30 ± 2°C e 75 ± 5% UR | 30 ± 2°C e 75 ± 5% UR |
| 2-8°C | 25 ± 2°C e 60 ± 5%UR | 5 ± 3°C e 60 ± 5% UR | 5 ± 3°C e 60 ± 5% UR |
| -20°C | -20°C ± 5°C | -20°C ± 5°C | -20°C ± 5°C |

* O controle da umidade é necessário para os medicamentos em embalagens semipermeáveis; °C - graus Celsius; UR – umidade relativa.

Fonte: SANTOS Jr; MORETTO, 2005.

Os testes de estabilidade são realizados para que as condições recomendadas de armazenagem e vida de prateleira possam ser incluídas no rótulo para garantir que o medicamento é seguro e eficaz em toda a seu período de vida útil. Assim, os testes de estabilidade são fundamentais no desenvolvimento farmacêutico para um novo medicamento, bem como para uma nova formulação (BAJAJ; SINGLA; SAKHUYA, 2012; BHAGYASHREE et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características de um hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata para uso como curativo tópico em ensaio de estabilidade acelerada.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar o hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata;
- Realizar teste de citotoxicidade celular;
- Realizar ensaios de estabilidade acelerada. Para a determinação dos parâmetros de qualidade foram realizados os ensaios de: avaliação das características organolépticas, teor de umidade, intumescimento, atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, resistência mecânica (perfuração resiliência e relaxação), espectrofotometria de infravermelho, difração de raios X, análise térmica por calorimetria diferencial de varredura, avaliação do comportamento de liberação de ativo (prata) por potenciometria e avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material e reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho de pesquisa foram de grau de pureza farmacêutico ou analítico PA (Pró-Análise) e a água purificada em sistema Milli-Q®. Especificamente, para a obtenção dos hidrogéis foram utilizados álcool polivinílico com grau de hidrólise de 89% (PVA 89%); solução de glutaraldeído em água a 25% (v/v) e polietilenoglicol 400 (PEG 400) adquiridos da empresa Dinâmica Produtos Químicos Ltda. (Diadema, Brasil). O PVA com grau de hidrólise de 98,99% utilizado foi da marca Sigma-Aldrich Chemical (Saint Louis, USA).

Os ensaios microbiológicos foram realizados utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 10390 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721 doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os meios de culturas utilizados foram TSB (*tryptone soy broth*) adquirido da HiMedia Laboratories (Mumbai, Índia) e o agar bacteriológico adquirido da Promidol Biotecnológica (Belo Horizonte, Brasil).

As células utilizadas nos testes de citotoxicidade foram células da linhagem de fibroblastos L929 adquiridos da Sigma (São Paulo, Brasil). O meio de cultura para estas células foi Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 500mL, Low Glucose, Sigma, São Paulo, Brasil), adicionado de 10%, em relação ao volume de DMEM, mais soro fetal bovino (FBS, Sigma, São Paulo, Brasil) e 1% de antibiótico (PEN/STREP, Sigma, São Paulo, Brasil).

O material de embalagem utilizado para proteção dos filmes foram sachês farmacêuticos laminados compostos por camadas de poliéster 17 g/m²; adesivo; alumínio 0,008 mm 21,6 g/m²; adesivo; polietileno 45 g/m² com tamanho de 7,0 cm x 7,0 cm, adquiridos da empresa Tepron Equipamentos para Laboratórios (São Paulo, Brasil).

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados incluíram balança analítica da marca Tecnal, modelo SHI-AUY-220, (Hong Kong, Taiwan), balança analítica da marca Explorer Ohaus modelo 220 (EUA), homogeneizador Ultra-Turrax da marca IKA Hielscher Ultrasonics modelo 50 (Berlim, Alemanha), estufa da marca Fanem modelo 515A (Karnataka, Índia), ultrapurificador de água da marca Milli-Q® modelo Elga Purelab (Molsheim, França), texturômetro TA. XT plus - Texture Analyser da Stable Micro Systems (Godalming, Reino

Unido), analisador de umidade com aquecimento por lâmpada de halogênio da marca Shimadzu modelo MOC63U (Kioto, Japão), estufa de incubação microbiológica da marca Fanen modelo 515 (São Paulo, Brasil), capela de fluxo laminar unidirecional da marca Quimis modelo Q216F20M (Diadema, São Paulo, Brasil), seladora manual da Tepron Equipamentos para Laboratórios (São Paulo, SP, Brasil), centrífuga de bancada da marca Eppendorf® modelo 5804R (Hamburgo, Alemanha), microscópio da marca Zeiss (Oberkochen, Alemanha), leitor de microplacas da marca Tecan modelo Infinite M200 Pro, software Magellan (Männedorf, Suíça), paquímetro manual da marca Kanon (Tóquio, Japão), autoclave marca Phoenix Lufenco modelo AV – 75 Plus (Araraquara, São Paulo, Brasil) e câmara climatizada marca American Lab modelo AI 5100 (Charqueada, São Paulo, Brasil). Também foram utilizados os equipamentos calorímetro diferencial de varredura da marca TA Instruments modelo MDSC 2910 (New Castle, EUA), espectrômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da marca Agilent modelo Cary 630 (USA), microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 250 (FEI Company, Hillsboro, EUA) com fonte de emissão de campo (FESEM), equipamento metalizador BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein), difrator de raios-X da marca Shimadzu modelo XRD 7000 (Kioto, Japão), pHmetro Analyzer modelo pH 300 S (São Paulo, Brasil) e bomba peristáltica da marca Ismatec modelo MP 13GJ-4 (Wertheim, Alemanha) do Instituto de Química da Unicamp.

3.3 Métodos

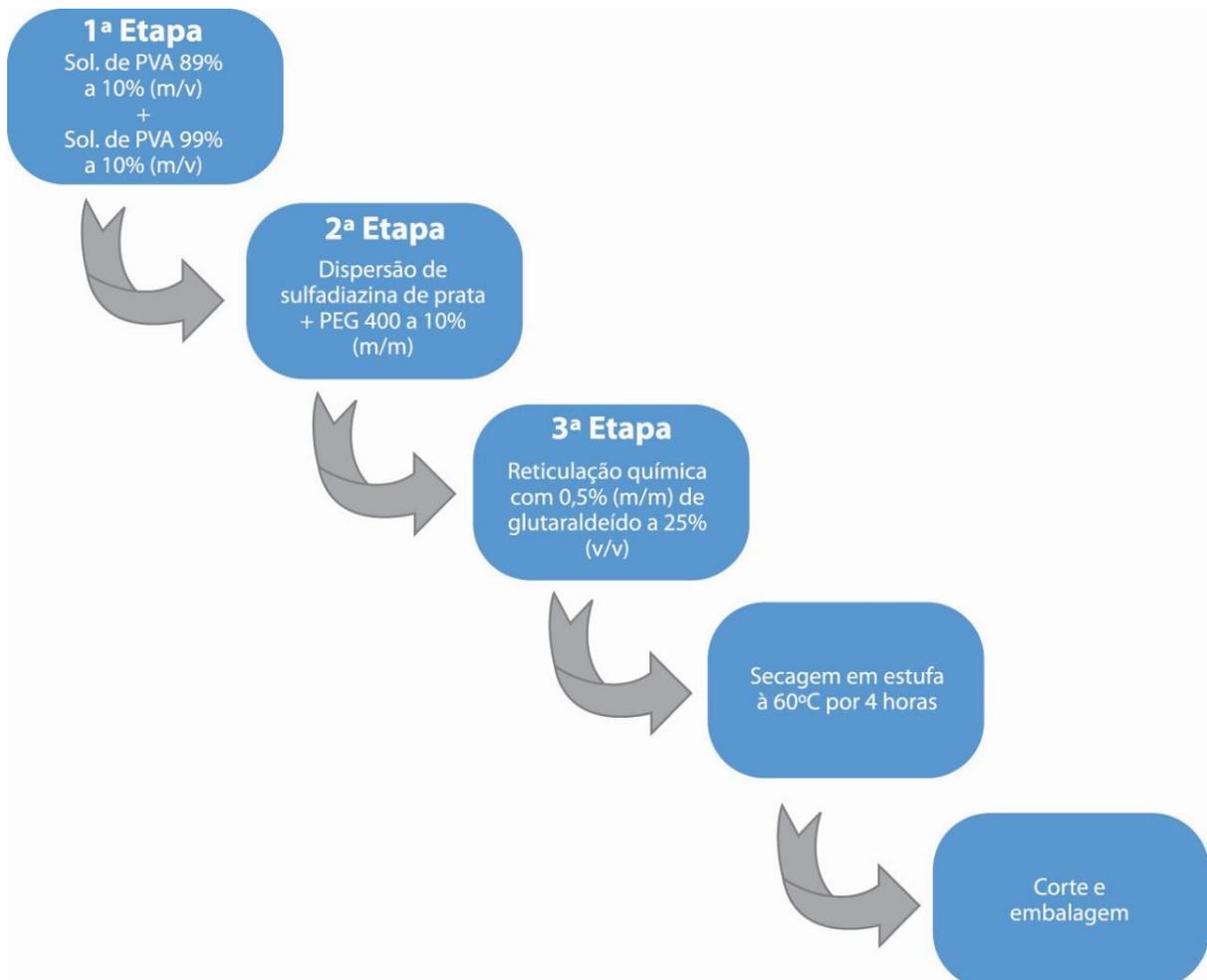
3.3.1 Preparo dos hidrogéis

Os hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata foram preparados de acordo com as especificações de Jodar (2014).

A primeira etapa para a preparação do hidrogel consistiu em obter dispersões aquosas de PVA a 10% (m/v). Utilizou-se PVA com graus de hidrólise de 89% e 99% (PVA 89 e PVA 99). Pesou-se 20 g de cada PVA, adicionou-se 200 mL de água e manteve-se sob agitação constante a 150 rpm a 80 °C até completa dissolução. A segunda etapa consistiu em preparar a dispersão de sulfadiazina de prata 1% (m/v). Adicionou-se 0,5 g de sulfadiazina de prata à solução de 50 mL de polietilenoglicol 400 (PEG 400) e, manteve-se agitação manual até completa dissolução. Realizou-se então, a fusão das dispersões de PVA junto à dispersão de sulfadiazina de prata, com agitação manual até homogeneização completa.

Na terceira etapa, para realizar a reticulação dos polímeros, adicionou-se 2,25 mL de glutaraldeído. Por fim, foram vertidos 8 mL de hidrogel em moldes plásticos. A seguir, os hidrogéis foram secos em estufa a 60 °C por aproximadamente 4 horas. Depois de secos, os hidrogéis foram cortados em retângulos de 2,5 por 3,0 cm, utilizando-se tesoura e embalados em sachês laminados. Os sachês contendo os filmes foram selados e mantidos a temperatura ambiente até o início dos experimentos. Esquemáticamente o processo de obtenção do hidrogel pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 5).

Figura 5. Esquema simplificado de preparo do hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata.



3.3.2 Citotoxicidade celular pelo método do MTS, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio).

Para o ensaio de citotoxicidade, inicialmente, se faz necessário o cultivo das células, para numa segunda etapa, avaliar a ação tóxica ou não do produto testado.

As células da linhagem de fibroblastos L929 foram incubadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM, 500mL, Low Glucose, Sigma, São Paulo, Brasil), pH 7,4 suplementado com soro fetal de bovino (FBS, Sigma, São Paulo, Brasil) (10%, m/m) e antibióticos (100 UI / mL de penicilina / 100 µL/ mL de sulfato de estreptomicina) (1%, m/m) (PEN/STREP, Sigma, São Paulo, Brasil). Os cultivos foram realizados em garrafas de cultura de células com volume de 25 cm³ e mantidos a 37°C em atmosfera contendo 5% (v/v) de CO₂ até que as células atingissem confluência de 80%, o que levou aproximadamente 48 horas. Após a formação de colônias em monocamada, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução de tampão fosfato, livre de magnésio e cálcio (PBS-MCF). Em seguida adicionou-se 1 mL de solução de tripsina EDTA 0,25% (Sigma, São Paulo, Brasil) por 3 a 5 min para a dissociação das células aderentes ao recipiente. Após a tripsinização, as células foram transferidas para um tubo cônico, lavadas com PBS-MCF, centrifugadas a 300 rpm, ressuspensas em meio de cultura (DMEM) e contadas em câmara de Neubauer e azul de Trypan (GIANNELLI *et al.*, 2008; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001).

Foram utilizadas aproximadamente 3 x 10⁴ células por poço em placa de 24 poços. Em cada poço, foram adicionados 150 µL de meio de cultura DMEM completo e amostras de hidrogel com aproximadamente 7,0 mm de diâmetro, contendo sulfadiazina de prata. As placas, então, foram incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5% (v/v) CO₂. A viabilidade celular foi avaliada em 24, 48 e 72 horas. Os controles da determinação foram realizados utilizando 50 µL de PBS e DMEM. A viabilidade celular foi determinada pela atividade mitocondrial da cultura celular por ensaio colorimétrico utilizando MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-4-(sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. As leituras de absorbância foram realizadas a 490 nm, utilizando um leitor de microplacas ELISA após 2 horas de incubação das células com o reagente MTS (PERTILE, 2007).

A análise dos resultados foi efetuada assumindo como 100% de viabilidade celular a média dos valores de absorbância obtidos para o controle não tratado. Os cálculos de

viabilidade celular (%) relativamente ao controle negativo foram realizados para cada concentração de amostra.

Todas as etapas foram realizadas em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para manutenção de esterilidade dos materiais, meios de cultura e suplementos adotados pelo Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox) da Universidade de Sorocaba.

3.3.3 Ensaio de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram realizados durante seis meses, com análises em 0 (24 horas), 30, 60 e 90 e 180 dias, obedecendo às diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2005). As amostras foram mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR e a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de UR. Os parâmetros analisados foram relativos às características organolépticas, teor de umidade, intumescimento, atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, resistência mecânica (perfuração, resiliência e relaxação), espectrofotometria de infravermelho, difração de raios X, análise térmica por calorimetria diferencial de varredura, avaliação do comportamento de liberação de ativo (prata) por potenciometria e avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura de acordo com os procedimentos abaixo descritos.

3.3.4 Atividade antimicrobiana

A eficácia antimicrobiana dos hidrogéis foi determinada através do teste de sensibilidade a antimicrobianos, pela técnica de disco-difusão segundo o padrão do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003; JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 1999). Foram avaliadas as atividades antimicrobianas do hidrogel contendo sulfadiazina de prata 1% (m/v) (amostras), do hidrogel de PVA (controle negativo) e da solução de sulfadiazina de prata dissolvida em PEG 400 e diluída em água até a concentração de 1% (m/v) (controle positivo). Os ensaios foram realizados utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 10390 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721 doadas pela Fundação FIOCRUZ e mantidas a -80°C em meio de cultura com 40% (v/v) de glicerol.

Para reativação dos microrganismos, os mesmos foram, individualmente, suspensos em 50 mL de meio de cultura TSB (*tryptone soy broth*) e incubados em agitador rotacional a

100 rpm, 37°C por 24 horas. Após este período realizou-se incubação dos microrganismos em placas de Petri contendo soft-agar TSB (caldo TSB com 0,8% (m/v) de agar bacteriológico) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) pelo método Pour-plate. Obteve-se uma suspensão contendo 1×10^6 UFC/mL, a qual foi homogeneizada em 100 mL de soft-agar TSB e invertida em placas de Petri (± 20 ml em cada placa). Os hidrogéis com e sem sulfadiazina de prata foram dispostos uniformemente nas placas e medidos os halos de inibição com auxílio de paquímetro da marca Kanon (Tóquio, Japão). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período de tempo os diâmetros dos halos de inibição do crescimento foram medidos e a média dos diâmetros dos halos relacionados com o potencial de ação antimicrobiana dos hidrogéis (CORREIA et al., 2015). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Como padrão positivo para comparação da atividade antimicrobiana do fármaco liberado dos hidrogéis, foram utilizados discos de papel filtro embebidos em solução de sulfadiazina de prata dissolvida em PEG 400 e diluída em água até a concentração de 1% (m/v) Para o controle negativo, utilizaram-se hidrogéis sem sulfadiazina de prata. As amostras e controles foram cortados com a ajuda de um cortador especialmente desenvolvido para este propósito, para que cada amostra e controle apresentassem o mesmo diâmetro de 7 mm (Figura 6). O cortador foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Figura 6. Cortador utilizado para obtenção de amostras de hidrogel utilizadas nos ensaios microbiológicos.



Fonte: Elaboração própria.

3.3.5 Características organolépticas

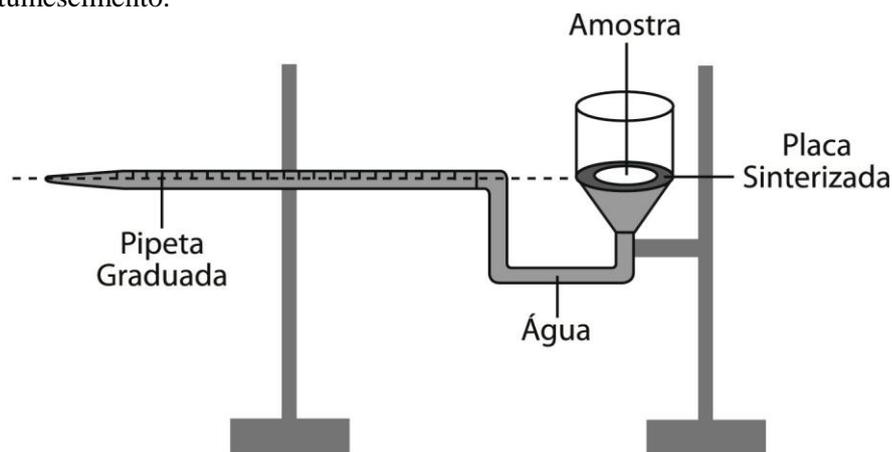
As características organolépticas foram observadas em relação à cor, odor, homogeneidade e presença ou ausência de rachaduras e bolhas através de análise visual e com auxílio de lupa.

3.3.6 Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água ou grau de intumescimento do hidrogel foi determinada segundo metodologia proposta por Enslin-Neff em 1933. O teste é incluído em Norma Industrial Alemã denominada DIN 18 132 de 1995, sendo conhecido como teste de absorção de água Enslin-Neff (PETKOVSEK; MACEK; MAJES, 2009).

Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se o dispositivo ilustrado na figura abaixo (Figura 7). As amostras com cerca de 0,05 g de massa foram colocadas em funil de vidro sinterizado com auxílio de uma pinça e deixadas em contato com água purificada por 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, medindo-se o volume de líquido absorvido pelas amostras.

Figura 7. Esquema ilustrativo do dispositivo de Enslin-Neff para determinação do perfil de intumescimento.



Fonte: CARBINATTO, 2010.

Os resultados foram expressos em % de absorção de água em relação à massa inicial da amostra, de acordo com a equação 1.

$$\text{absorção de água} = \frac{P}{M} \times 100 = \frac{V \times d}{M} \times 100$$

Onde: P (g) = a massa de volume de meio absorvido; M (g) = a massa inicial da amostra; V (mL) = o volume de meio absorvido; d= densidade da água (g.cm⁻³).

Fonte: KIVIRANTA; KUMPULAINEN, 2011.

3.3.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata foram avaliadas utilizando texturômetro, modelo TA-TX Plus, marca Stable Micro Systems (Godalming, Reino Unido).

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas através dos ensaios de perfuração, relaxação e resiliência, utilizando-se amostras livres de imperfeições físicas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os parâmetros utilizados foram de 5 mm de distância para o ensaio de perfuração e de 2 mm para os ensaios de resiliência e relaxação com calibração utilizando força máxima de 5kgf (quilograma- força) para todos os ensaios.

As amostras de hidrogel utilizadas para os testes de perfuração apresentaram: espessura média de 0,70 ± 0,05 mm; peso médio de 245,00 ± 2,45 mg e área média de 25 mm x 30 mm. Para os ensaios de relaxação as amostra apresentaram: espessura média de 0,65 ± 0,07 mm; peso médio de 268,50 ± 2,98 mg e área média de 25 mm x 30 mm. Para os testes de resiliência os hidrogéis utilizados tinham: espessura média de 0,68 ± 0,06 mm; peso médio de 233,30 ± 2,52 mg e área média de 25 mm x 30 mm.

3.3.8 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura

Para a caracterização térmica dos hidrogéis foi realizada a análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC) empregando-se um calorímetro diferencial de varredura da marca TA Instruments modelo MDSC 2910 (New Castle, EUA). As curvas de DSC foram obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 30 mL min⁻¹, razão ou velocidade

de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, faixa de aquecimento de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Empregou-se cadinho de alumínio e massa de amostra em torno de 2 mg.

3.3.9 Teor de umidade

As análises de umidade foram realizadas em triplicata utilizando-se uma balança de umidade da marca Shimadzu modelo OC63U (Kioto, Japão) com aquecimento através de lâmpada de halogênio com capacidade mínima 0,02g e máxima de 30g, utilizando amostras de hidrogéis com peso médio de $183,33\text{ mg} \pm 0,068$ e temperatura de 60°C modo *slow*. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.10 Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier

Para obtenção dos espectros de infravermelho utilizou-se um Espectrômetro de Absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da marca Agilent (modelo Cary 630, USA), na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} e resolução de 2 cm^{-1} . As amostras foram analisadas sem qualquer preparação prévia.

3.3.11 Avaliação do perfil de liberação de sulfadiazina de prata no hidrogel por potenciometria

A determinação do perfil de liberação de prata pelo hidrogel foi realizada por potenciometria. O método baseia-se no princípio que o potencial eletroquímico entre dois eletrodos ou semi-células pode ser associado à concentração de uma espécie iônica (SKOOG et al., 2006).

Os experimentos foram realizados utilizando eletrodo de prata combinado acoplado em pHmetro da marca Analyzer modelo pH 300 (São Paulo, Brasil) conforme ilustrado na Figura 8. Inicialmente tentou-se agitação magnética, uma vez que medidas envolvendo eletrodos exigem homogeneização do meio reacional para evitar o desenvolvimento de gradientes de concentração. No entanto, houve dissolução completa do hidrogel após poucos minutos de agitação. Assim, optou-se por anexar uma bomba peristáltica com retirada e

reposição contínua do meio. A bomba peristáltica utilizada foi da marca Ismatec (modelo MP 13GJ-4, Wertheim, Alemanha) com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Utilizou-se cerca de 0,100 g de amostras de hidrogel em 20 mL de água ultrapura a temperatura de cerca de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$. As medidas foram em mV por tempo de contato (min).

Figura 8. Montagem do sistema utilizado para determinação da liberação de prata por potenciometria.



Fonte: Elaboração própria.

3.3.12 Difração de raios X

Os hidrogéis (tempo 0 e após 180 dias de armazenamento) foram analisados por difratometria de raios X (DRX) à temperatura ambiente, utilizando-se difratômetro Shimadzu modelo XRD 7000 (Kioto, Japão) com lâmpada de cobre de radiação $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e velocidade de varredura de 2°min^{-1} , com 2θ variando de 10° a 90° . As amostras não passaram por processo de preparação prévia.

3.3.13 Microscopia eletrônica de varredura

A superfície e a morfologia da fratura criogênica dos hidrogéis com sulfadiazina de prata foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca QUANTA FEG 250 (FEI Company, Hillsboro, EUA) com fonte de emissão de campo (FESEM - *field emission scanning electron microscopy*). As amostras foram imersas em nitrogênio líquido com o auxílio de pinças e após cerca de 5 min, as amostras congeladas foram partidas. As amostras fraturadas criogenicamente foram metalizadas por revestimento com filme de ouro/paládio (80%/20%) por pulverização catódica sobre uma camada de carbono

depositada por evaporação utilizando o equipamento metalizador BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein).

3.4 Análise estatística

Empregou-se o teste ANOVA e posterior análise de teste *post hoc* Tukey. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa Statistica® v 8.0 (TX, USA) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.5 Estudo cinético da liberação da sulfadiazina de prata a partir do hidrogel desenvolvido

Os dados obtidos a partir do perfil de liberação da sulfadiazina de prata dos hidrogéis em diferentes tempos de armazenamento foram submetidos a tratamentos matemáticos para a determinação da cinética de liberação do princípio ativo. Para isso foram aplicados três modelos matemáticos (COSTA, 2002; SHAIKH; KSHIRSAGAR; PATIL, 2015), sendo:

(i) cinética de primeira ordem, expresso pela equação 2.

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 \cdot t \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: Q_t é a quantidade de fármaco libertado ao tempo t ; Q_0 a quantidade inicial de fármaco; k é a constante de liberação; e t é o tempo.

(ii) modelo de Higuchi, expresso pela equação 3.

$$Q_t = k_H \times \sqrt{t} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: Q_t é a quantidade de fármaco liberado ao tempo t ; K_H é a constante de Higuchi; e t é o tempo.

(iii) modelo Korsmeyer-Peppas, expresso pela equação 4.

$$Q_t / Q_\infty = k_{KP} \times t^n \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde: Q_t é a quantidade de fármaco libertado ao tempo t ; Q_∞ é a quantidade total de fármaco dissolvido, quando a forma de dosagem (hidrogel) é exaurida; K_{KP} é a constante cinética Korsmeyer-Peppas; n é o expoente de difusão; e t é o tempo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa desenvolvida envolveu vários ensaios com o objetivo de determinar a estabilidade e a segurança do produto, sendo os resultados obtidos apresentados na sequência.

4.1 Preparo dos hidrogéis

Os hidrogéis apresentaram-se sem rachaduras, bolhas de ar e com coloração uniformemente esbranquiçada, conforme mostra a Figura 9. As amostras produzidas foram então, separadas e embaladas para a realização dos ensaios de estabilidade acelerada com armazenamento em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR e a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de UR e também para os ensaios de viabilidade celular. Como material de embalagem foi escolhido um sachê laminado. Os sachês, por serem compostos de camadas de poliéster e alumínio, foram escolhidos por, a princípio, terem a capacidade de proteção da luz e da umidade.

Figura 9. Imagem do hidrogel no tempo zero.



Fonte: Elaboração própria.

Para os ensaios de citotoxicidade foram preparadas amostras contendo 0; 1,0; 2,5; 5,0; e 10% (m/m) de sulfadiazina de prata envolvendo o mesmo procedimento. O uso de concentrações mais elevadas de prata nos hidrogéis teve como objetivo verificar a capacidade do hidrogel em suportar maior volume de prata, e sua possível utilização como curativo tópico. GIRATA (2011) desenvolveu um curativo com teor de 10% (m/m) de prata e, segundo sua avaliação, com elevado potencial no tratamento de queimaduras e outras lesões de pele. Assim, avaliou-se a possibilidade de utilizar concentrações mais elevadas de prata nos hidrogéis visando maior gama de concentrações a serem utilizadas em função de necessidades

diferenciadas dos pacientes. Em relação ao preparo dos hidrogéis, observou-se que a fórmula foi capaz de suportar até 10% (m/m) de sulfadiazina de prata sem alterações significativas nas características visuais dos mesmos.

4.2 Citotoxicidade celular pelo método do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

Quando há o desenvolvimento de qualquer produto novo com fins profiláticos ou curativos, preconiza-se, antes mesmo da realização dos ensaios clínicos, a avaliação de sua toxicidade, por meio de estudos *in vitro* e/ou *in vivo* com uso de animais. Neste sentido, os testes de citotoxicidade *in vitro* são os primeiros testes indicados para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Vários métodos *in vitro*, com o objetivo de determinar a toxicidade de bio e nanomateriais, foram padronizados, nestas últimas décadas, utilizando diferentes culturas celulares (NOGUEIRA et al., 2014). Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando-se as alterações celulares basais por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003). O objetivo dos ensaios de citotoxicidade com linhagens celulares é observar se o material é capaz de produzir efeitos letais ao sistema biológico em níveis celulares (MUNDSTOCK et al., 2012), sendo que, a toxicidade é determinada pela lise celular (morte celular) ou pela inibição da proliferação celular (WANG et al., 2013).

Nestes testes, existe a possibilidade de avaliar o comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações envolvidas nos organismos, sendo que os mesmos ainda oferecem rapidez analítica e relativa facilidade de execução (MARTINS et al., 2009). Os ensaios *in vitro* envolvendo culturas celulares para fins de avaliação de toxicidade, provavelmente, nunca irão substituir completamente os ensaios envolvendo animais, justamente pela complexidade das interações biológicas que ocorrem nos organismos vivos, no entanto, são importantes como parâmetros para os ensaios preliminares de toxicidade (NOGUEIRA et al., 2014).

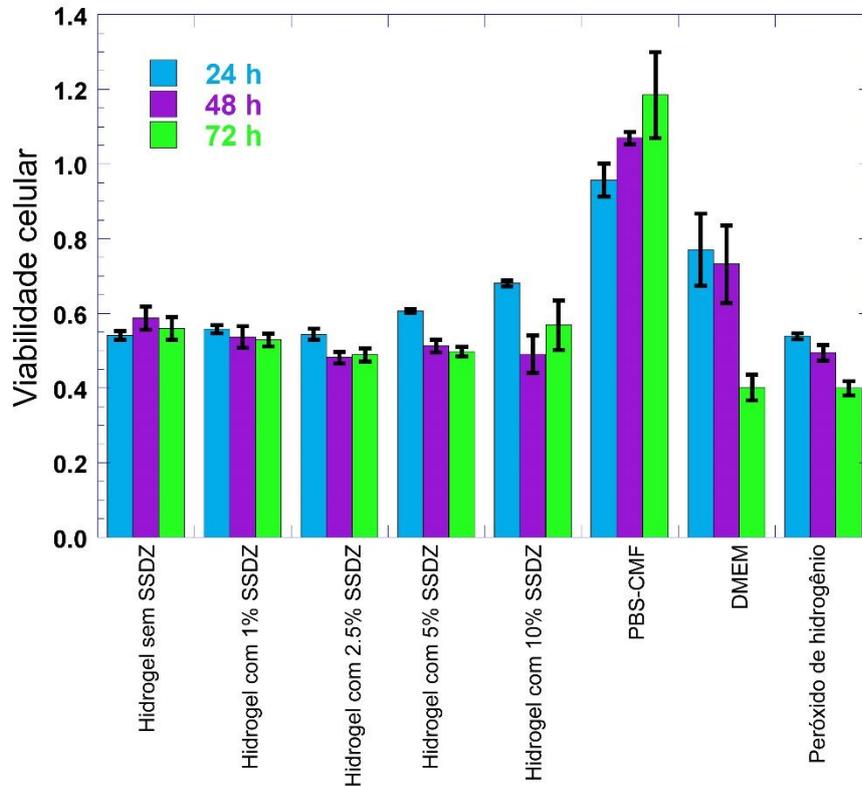
Existem vários ensaios disponíveis para a avaliação da citotoxicidade de celular. Entre eles podem-se destacar os que usam MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) e o vermelho neutro (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; NOZAKI et al., 2012). O

teste de MTT baseia-se na capacidade das células vivas reduzirem este composto, que passa da cor amarelada para azul em função da formação de cristais de formaz. A intensidade da cor é proporcional ao número de células presentes. O corante MTS é reduzido da mesma forma que o MTT, pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a formação de cristais de formazan. A diferença é que os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário (NOZAKI et al., 2012). Os métodos utilizando MTS têm se mostrado rápidos e sensíveis (DECHSAKULTHORN et al., 2007), sendo interessantes para o ensaio proposto.

Neste ensaio foram utilizadas amostras de hidrogéis com diferentes concentrações de sulfadiazina de prata (0,0; 1,0; 2,5; 5,0 10,0% (m/m)) com o objetivo de verificar a possível toxicidade celular com o aumento do teor de prata.

Os resultados obtidos indicaram que, inicialmente, houve decréscimo da atividade mitocondrial e conseqüente morte celular (24 horas de contato) com todas as amostras, inclusive com o hidrogel sem sulfadiazina de prata. Este resultado, a princípio, poderia indicar que o hidrogel por si só poderia ser tóxico para as células. No entanto, após 48 h, observou-se recuperação da atividade mitocondrial. A Figura 10 compara a atividade mitocondrial nos três tempos estudados.

Figura 10. Citotoxicidade em células de linhagem de fibroblastos L929 expostas a hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata por 24, 48 e 72 horas pelo método de MTS. Resultados expressos em % de viabilidade celular considerando como 100% as células expostas ao meio de cultura (controle).



SSDZ= sulfadiazina de prata; PBS-CMF = solução tampão fosfato, livre de magnésio e cálcio; DMEM= Meio Dulbecco MEM; PVA= álcool polivinílico; MTS= reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio.

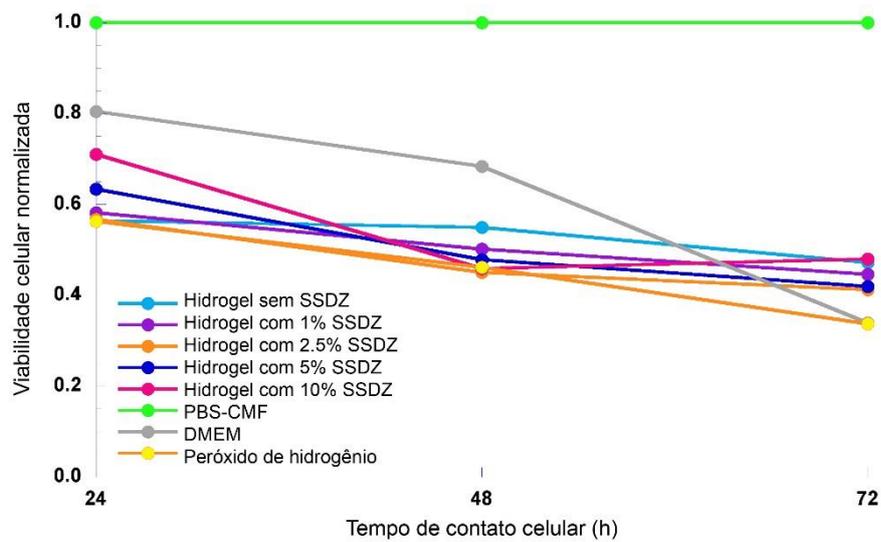
Fonte: Elaboração própria.

No experimento realizado, a taxa de viabilidade mitocondrial em 72 horas de contato foi superior àquela observada por Rigo et al. (2013). Os autores, trabalhando com nanopartículas de pratas veiculadas em curativos numa concentração de $821 \pm 20 \mu\text{g cm}^{-2}$, observaram viabilidade celular de cerca de 17% em 72 horas de contato. No entanto, os autores sugerem que a redução da atividade mitocondrial em função das partículas de prata, ocorreu temporariamente não prejudicando a viabilidade das células. Os estudos foram conduzidos por 9 dias e, concluíram que não foi tempo suficiente para verificar o renascimento da atividade mitocondrial, como sugerido por suas observações *in vivo* realizadas no mesmo ensaio.

A Figura 11, um gráfico da viabilidade celular normalizada em função do tempo de contato das células com os produtos em análise indicou que o hidrogel livre de sulfadiazina de

prata e o hidrogel com 1 % (m/m) de sulfadiazina de prata exibiram praticamente a mesma viabilidade celular.

Figura 11. Citotoxicidade em células de linhagem de fibroblastos L929 expostas a hidrogéis de PVA em 24, 48 e 72 horas de contato pelo método de MTS. Resultados expressos em % de viabilidade celular (considerando 100% as células expostas ao meio de cultura (controle)) normalizada em função do tempo de contato da célula.



SSDZ= sulfadiazina de prata; PBS-CMF = solução tampão fosfato, livre de magnésio e cálcio; DMEM= Meio Dulbecco MEM; PVA = álcool polivinílico; MTS= reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio.

Fonte: Elaboração própria.

Os melhores resultados obtidos em relação à citotoxicidade celular indicaram que o hidrogel com teor de 1% (m/m) de sulfadiazina de prata foi o mais adequado, avaliando desde as primeiras horas de contato. Assim, este teor foi confirmado para a preparação dos hidrogéis e mantido em todos os demais ensaios.

4.3 Ensaio de estabilidade acelerada

Para a comercialização de um novo medicamento, a indústria deve realizar ensaios para avaliar sua conformidade com as especificações físico-químicas e microbiológicas e determinar as condições de armazenamento compatíveis com a zona climática da região geográfica onde o produto será distribuído (MEIRELES, 2014). Em função desta exigência foram realizados ensaios de estabilidade acelerada mantendo as amostras em câmara climatizada em $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR.

Após 30 dias de armazenamento das amostras mantidas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR observou-se o escurecimento das amostras de hidrogel, como mostra a Figura 12. Em função da aparência não desejável, optou-se por descontinuar os ensaios nestas condições. Somente o estudo de estabilidade acelerado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR foi conduzido até o final (180 dias de armazenamento).

Figura 12. Hidrogel após 30 dias de armazenamento em câmara climatizada a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de UR.



Fonte: Elaboração própria.

O escurecimento do hidrogel, já no primeiro mês de armazenamento a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR indicou que produto não suportaria ser mantido em temperatura ambiente em um país como o Brasil, da zona climática IV (quente e úmida). A delimitação do mundo em quatro zonas climáticas é feita de acordo com a prevalência anual das condições climáticas, sendo em função de critérios de temperatura cinética média e umidade relativa, possuindo particular relevância em estudos de estabilidade e definição de *shelf life* para qual o produto é destinado.

O Brasil é considerado um país de zona climática IV com temperatura cinética média de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e porcentagem de umidade relativa de $70 \pm 5\%$ (ORIQUI et al., 2011).

A sulfadiazina de prata sofre processo de degradação em condições rotineiras de estresse (40°C) em preparações farmacêuticas, conforme verificou Lopes e Moreno (2014) quando desenvolveram cremes dermatológicos (aniônicos e não-aniônicos) incorporados de sulfadiazina de prata a 1% (m/m). Assim, o resultado obtido no ensaio de estabilidade acelerada com as amostras de hidrogel a 40°C poderia ser esperado.

Na avaliação da estabilidade dos hidrogéis a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR os ensaios realizados foram relativos às características organolépticas, teor de umidade, intumescimento, atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, resistência mecânica (perfuração, resiliência e relaxação), espectrofotometria de infravermelho, difração de raios X, análise térmica por calorimetria diferencial de varredura, avaliação do comportamento de liberação de ativo (prata) por potenciometria e avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura.

4.3.1 Características organolépticas

Visualmente, as amostras de hidrogéis apresentaram escurecimento a partir dos 90 dias de armazenamento, como ilustra a Figura 13. Nenhuma outra alteração organoléptica foi observada. Assim, a partir dos 90 dias o produto não estaria visualmente adequado.

Figura 13. Características visuais dos hidrogéis armazenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR.



Fonte: Elaboração própria.

4.3.2 Atividade antimicrobiana

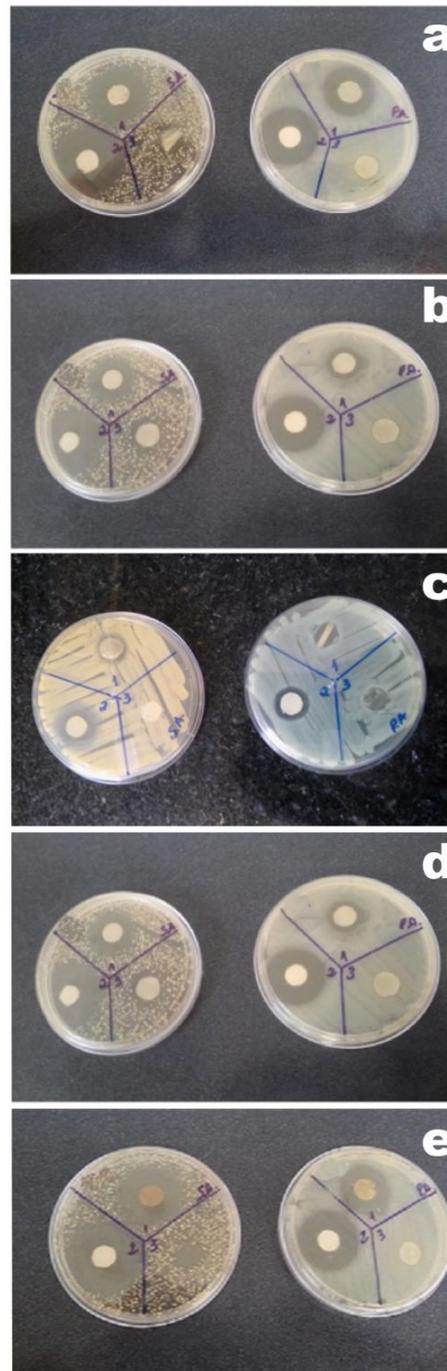
O teste de disco-difusão é um método comumente utilizado na determinação da sensibilidade de microrganismos frente a diferentes agentes antimicrobianos. A escolha deste método para a avaliação da eficiência antimicrobiana do hidrogel desenvolvido deu-se em função de sua praticidade. O método de disco-difusão é de fácil execução, tem padronização bem estabelecida, não exige equipamentos especiais e permite fácil interpretação dos resultados obtidos (JORGENSEN; FERRARO, 2009; BALOUIRI et al., 2016). O teste de difusão em ágar é um método físico, onde um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al., 2008). Contudo, pode haver reação da prata com o meio, não propiciando um resultado fidedigno (INTERNATIONAL CONSENSUS, 2012). No entanto, há a compensação pelo controle positivo e, desta forma, o método pode ser considerado adequado para esta proposta de pesquisa.

Os microrganismos empregados no teste foram *Staphylococcus aureus* ATCC 10390 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721 em função de serem agentes infectantes presentes em feridas cutâneas. A bactéria *Staphylococcus aureus* apresenta relevância clínica pela sua elevada incidência em infecções cutâneas e bom crescimento em meios de cultura, o que o torna um agente patogênico de pele adequado para o estudo. As infecções por *Pseudomonas aeruginosa* são também importantes causa de morbidade e mortalidade em vítimas de queimaduras (CHILLER; SELKIN; MURAKAWA, 2001). Em um trabalho realizado por Rempel, Tizzot e Vasco (2011) em um hospital universitário, os autores obtiveram, como agentes etiológicos de maior incidência nas infecções em pacientes queimados as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (38,7%), *Acinetobacter baumannii* (24,4%) e *Staphylococcus aureus* (19,3%). Isto corrobora para escolha dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no ensaio.

No teste para mensurar a eficácia antimicrobiana dos hidrogéis contendo sulfadiazina de prata foram utilizadas amostras de hidrogéis no tempo 0, 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR. Como controle positivo (C+) utilizou-se solução de sulfadiazina de prata a 1% (m/v) impregnada em disco de papel e como controle negativo (C-) um disco de hidrogel sem sulfadiazina de prata. Após o tempo de incubação de 24 horas a 37°C , observou-se a formação de halos de inibição microbiana com diâmetros próximos entre si e semelhantes ao padrão positivo que continha somente a sulfadiazina de

prata 1% (m/v), conforme pode ser observado na Figura 14. Pode-se concluir que houve a liberação do ativo dos hidrogéis em todos os tempos de armazenamento.

Figura 14. Resultados obtidos no teste de disco-difusão após 24 h de incubação em estufa a 37°C das amostras armazenadas em diferentes tempos de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR. As placas contendo meio de cultura TSB, da direita foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* e as da esquerda com *Pseudomonas aeruginosa*, sendo: a) tempo 0; b) 30 dias de armazenamento; c) 60 dias de armazenamento; d) 90 dias de armazenamento; e) 180 dias de armazenamento; 1 amostras, 2 controle positivo (solução de sulfadiazina de prata 1% (m/v)) e 3 controle negativo (hidrogel sem sulfadiazina de prata).



Fonte: Elaboração própria.

No teste de disco-difusão a avaliação da atividade antimicrobiana é feita por comparação dos halos de inibição de crescimento frente a um padrão de referência (controle positivo). Os resultados do teste de difusão em disco são qualitativos, em relação à suscetibilidade bacteriana, sendo os microrganismos classificados em sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes em relação ao controle positivo (JORGENSEN; FERRARO, 2009; OSTROSKY et al., 2008). Este método não permite a quantificação do agente antimicrobiano que difunde para o meio (BALOUIRI et al., 2016). No entanto, para o experimento proposto nesta pesquisa, o objetivo foi verificar a capacidade ou não de liberação do ativo dos hidrogéis, sendo assim, este método foi adequado para os ensaios realizados. A tabela ilustra os valores dos halos de inibição, em mm, obtidos após a incubação e sua relação com o halo de inibição obtido a partir do controle.

Tabela 5. Valores médios (n=3) para halos de inibição de crescimento microbiano (mm) empregando amostras de hidrogéis com sulfadiazina de prata em diferentes tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 180 dias).

| Amostras Tempo de armazenamento (dias) | Halo de inibição <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (mm) | Halo de inibição <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (mm) | % de inibição <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> | % de inibição <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> |
|---|--|---|--|---|
| 0 | 22,4 ± 6 | 25,1 ± 7 | 114,09 | 86,55 |
| 30 | 21,0 ± 7 | 23,8 ± 5 | 108,18 | 82,07 |
| 60 | 19,7 ± 6 | 21,7 ± 7 | 89,54 | 74,83 |
| 90 | 18,7 ± 4 | 20,2 ± 6 | 85,00 | 69,65 |
| 180 | 18,6 ± 6 | 19,7 ± 5 | 84,54 | 67,93 |
| Controle positivo (C+) | 22,0 ± 5 | 29,0 ± 7 | 100 | 100 |
| Controle negativo (C-) | 0 | 0 | 0 | 0 |

Controle positivo - solução de sulfadiazina de prata a 1% (p/v); controle negativo - hidrogel sem sulfadiazina de prata.

Fonte: Elaboração própria.

O hidrogel sem sulfadiazina de prata (padrão negativo de inibição) não inibiu o crescimento bacteriano. Por outro lado, o hidrogel com sulfadiazina de prata promoveu um halo de inibição do crescimento microbiano (diâmetro de 22,4 mm) ligeiramente maior (cerca de 1,02 x) do que a do padrão positivo de inibição (solução aquosa a 1% (m/v) de sulfadiazina de prata (m / v)) o qual apresentou um halo de inibição de diâmetro de 22,0 mm) (Tabela 5). Pelos resultados obtidos, constatou-se que o hidrogel impregnado com sulfadiazina de prata permitiu a liberação contínua do princípio antimicrobiano, em concentrações capazes de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados obtidos estão em concordância com os publicados por Jodar et al. (2015).

Utilizando o teste ANOVA e posterior análise de teste *post hoc* Tukey, conclui-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os halos de inibição de crescimento bacteriano tanto para *Pseudomonas aeruginosa* como para *Staphylococcus aureus* obtidos de amostras armazenadas em diferentes tempos de armazenamento, como pode ser visto nas Tabelas 6 e 7. Assim, o tempo de armazenamento (0 - 180 dias) não influenciou na eficácia do hidrogel quanto ao potencial antimicrobiano. Também não se observou diferença entre o hidrogel e o controle positivo, demonstrando que o hidrogel é tão eficaz quanto à sulfadiazina de prata em solução a 1% (m/v).

Tabela 6. Diferenças médias dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos em culturas de *Pseudomonas aeruginosa* empregando amostras de hidrogel armazenadas em diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 180 dias) pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

| Dias de armazenamento | Tratamentos | | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} | {6} |
| 0 {1} | | 0,999379 | 0,949964 | 0,812333 | 0,747905 | 0,999519 |
| 30 {2} | 0,999379 | | 0,993812 | 0,937302 | 0,897718 | 0,985564 |
| 60 {3} | 0,949964 | 0,993812 | | 0,998754 | 0,995058 | 0,843539 |
| 90 {4} | 0,812333 | 0,937302 | 0,998754 | | 0,999994 | 0,644609 |
| 180 {5} | 0,747905 | 0,897718 | 0,995058 | 0,999994 | | 0,572269 |
| C positivo {6} | 0,999519 | 0,985564 | 0,843539 | 0,644609 | 0,572269 | |

C positivo = controle positivo (disco de papel embebido com solução a 1% (m/v) de sulfadiazina de prata).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7. Diferenças médias dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos em culturas de *Staphylococcus aureus* empregando amostras de hidrogel armazenadas em diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 180 dias) pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

| Dias de armazenamento | Tratamentos | | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} | {6} |
| 0 {1} | | 0,990473 | 0,863137 | 0,649060 | 0,625192 | 0,999978 |
| 30 {2} | 0,990473 | | 0,993193 | 0,923332 | 0,910073 | 0,998017 |
| 60 {3} | 0,863137 | 0,993193 | | 0,998017 | 0,996894 | 0,923332 |
| 90 {4} | 0,649060 | 0,923332 | 0,998017 | | 1,000000 | 0,742103 |
| 180 {5} | 0,625192 | 0,910073 | 0,996894 | 1,000000 | | 0,719414 |
| C positivo {6} | 0,999978 | 0,998017 | 0,923332 | 0,742103 | 0,719414 | |

C positivo = controle positivo (disco de papel embebido com solução a 1% de sulfadiazina de prata).

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3 Capacidade de absorção de água

A capacidade de intumescimento ou inchamento de hidrogéis, quando colocados em contato com solvente compatível, é uma importante característica para uso dos hidrogéis como curativos (GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2010).

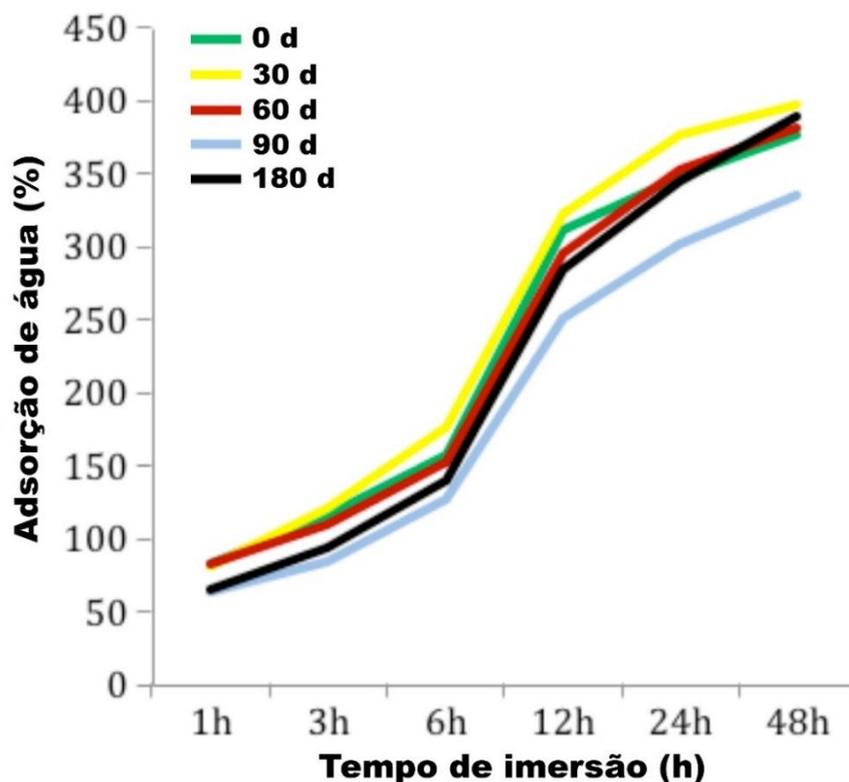
Os hidrogéis são capazes tanto de doar umidade para o tecido desidratado como absorver umidade a partir do exsudato, ajudando na manutenção de um microclima adequado sobre a superfície da ferida, de extrema importância para as reações biossintéticas necessárias para atividades celulares. Os hidrogéis são capazes de absorver e reter os exsudados da ferida, bem como quaisquer organismos contaminantes, tais como células bacterianas, dentro da sua estrutura de rede tridimensional. Adicionalmente, os hidrogéis em função da capacidade de manutenção do ambiente úmido são úteis na promoção da proliferação de fibroblastos e, também na proteção da ferida de fatores nocivos externos (PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009). Assim, curativos na forma de hidrogel são de valor inegável para utilização em

diferentes tipos de feridas, com potencial de serem utilizados em feridas agudas ou crônicas (RIPPON; WHITE; DAVIES, 2007; HWANG et al., 2010).

O fenômeno de extensão da absorção de água ou eventual desintegração da rede polimérica dos hidrogéis é dependente de fatores-chave que regulam estes processos ligados às interações polímero(s)-solvente(s), massa molecular do(s) polímero(s) e força das ligações moleculares (OOMMEN et al., 2013). A propriedade de intumescimento ou absorção também é dependente da presença de grupos hidrofílicos como OH, CONH, CONH₂ e SO₃H na rede tridimensional (LAFTAH; HASHIM; IBRAHIM, 2011).

A Figura 15 apresenta o comportamento dos hidrogéis de PVA com sulfadiazina de prata armazenados em 0, 30, 60, 90 e 180 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR em contato com o solvente (água ultrapura) em 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Observando os resultados obtidos, verificou-se uma máxima absorção ocorrendo durante as primeiras doze horas de contato com a água. Após este período, as amostras de hidrogel armazenados em diferentes tempos absorveram uma quantidade menor de água, provavelmente devido à saturação dos filmes. Verificou-se também que não houve alteração significativa em relação à capacidade de absorção de líquidos em função do tempo de armazenamento.

Figura 15. A capacidade de absorção de água das amostras de hidrogéis de PVA com sulfadiazina de prata armazenados em 0, 30, 60, 90 e 180 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR.



Fonte: Elaboração própria.

4.3.4 Propriedades mecânicas

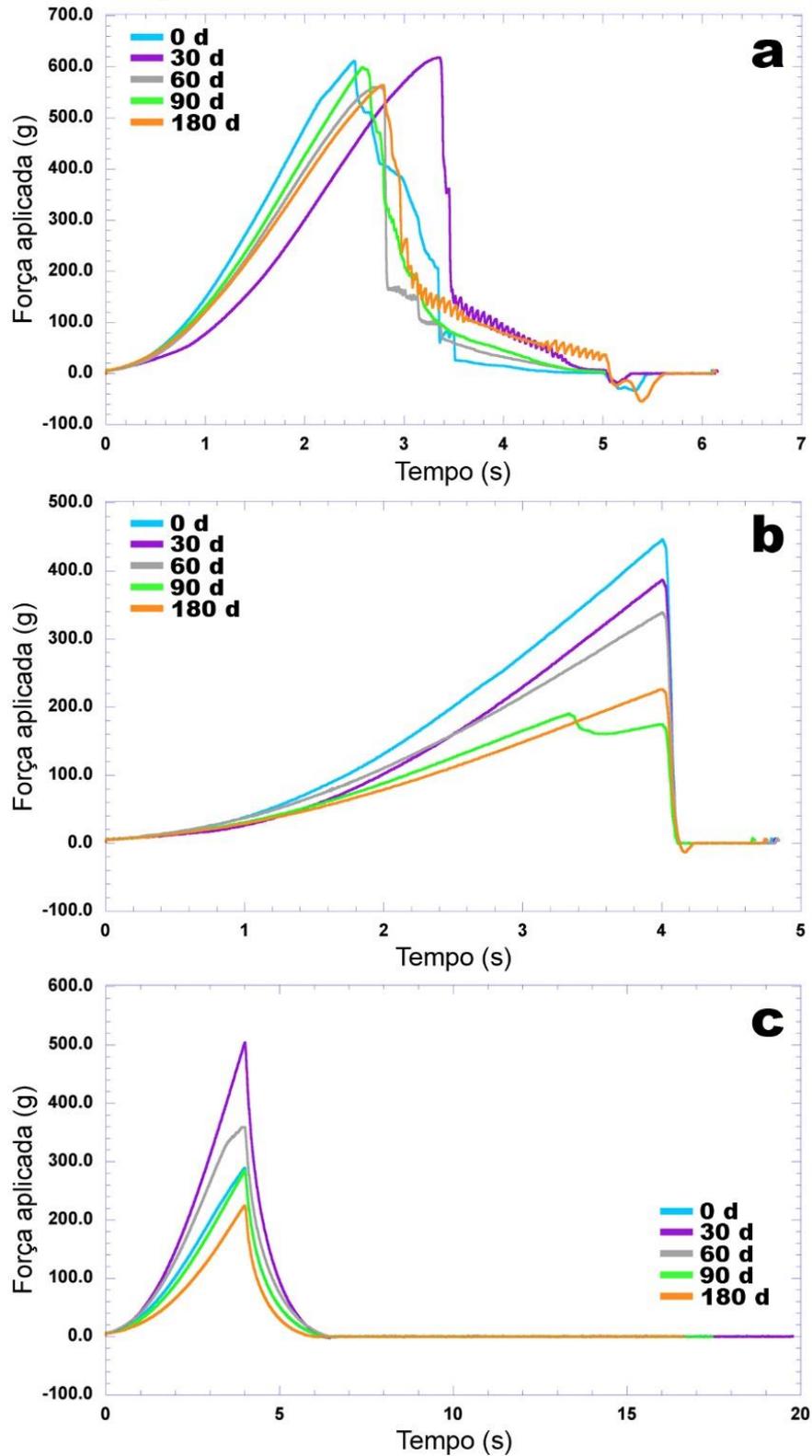
As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas em relação aos parâmetros resistência à perfuração, relaxação e resiliência.

As propriedades mecânicas do hidrogel estão principalmente relacionadas com a capacidade do polímero para formar ligações em cadeias de polímeros, dificultando a sua separação, quando sujeitos a forças mecânicas (YANG, 2012). Desta forma, os plastificantes usados nas formulações têm intensa influência nestas propriedades (BOURTOOM, 2008). Além disto, as características mecânicas macroscópicas dos hidrogéis têm forte ligação com sua microestrutura (GONG; HONG, 2012). Assim, determinar estas propriedades, ao longo do tempo, pode ser uma forma de avaliar a degradação de um produto.

O ensaio de perfuração sujeita o hidrogel a uma compressão em kgf (quilograma-força), em função do tempo, observando-se a resistência que o material apresenta. Pelo teste de relaxação obtêm-se informações sobre a conformação das macromoléculas. O fenômeno de relaxação molecular relaciona-se com a propriedade viscoelástica do material. Já a propriedade de resiliência indica a capacidade do filme em absorver energia quando nele se aplica uma tensão, a qual pode causar uma deformação permanente ou não, mas sem a ruptura do material (COWE; ARRIGHI, 2007).

Os resultados obtidos em relação à resistência mecânica estão apresentados na Figura 16, sendo a Figura 16a relacionada à perfuração; Figura 16b relacionada à relaxação e Figura 16c relacionada à resiliência.

Figura 16. Representação gráfica dos resultados de resistência mecânica dos hidrogéis obtidos por texturômetro nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR, sendo a) perfuração; b) relaxação; c) resiliência.



Fonte: Elaboração própria.

Na resistência mecânica em relação à perfuração (Figura 16a) pode-se perceber que houve diminuição gradual ao longo do tempo de armazenamento, após os primeiros 30 dias de armazenamento, mas mantendo ao mesmo tempo o comportamento.

Ao comparar a evolução da relaxação durante todo o período de armazenamento, pode-se ver, a partir de inspeção da Figura 16b, que houve diminuição em intensidade (força aplicada) de modo consistente ao longo do período de armazenamento.

No que diz respeito às características relativas à resiliência dos hidrogéis (Figura 16c) houve um aumento marcante após os primeiros 30 dias de armazenamento com decréscimo constante durante o restante do período de armazenamento. Assim, pode concluir-se que as características visco-elásticas de deformação e relaxamento molecular melhoram em relação aos primeiros 30 dias de armazenagem, com diminuição persistente (embora suave) destas propriedades durante o resto do período de armazenamento.

Os resultados aqui apresentados foram similares aos de Amaral et al. (2008). Os autores compararam a resistência mecânica de um hidrogel de PVA obtido por radiação ionizante, em amostras recém-preparadas e armazenadas por 5 (cinco) meses. Puderam constatar que o hidrogel recém-preparado mostrou ser mais resistente à tração que o hidrogel estocado. Por outro lado, o hidrogel estocado apresentou maior resistência à perfuração, provavelmente por apresentar maior alongação que o recém-preparado.

Alteração da cristalinidade ou da umidade podem ser fatores que colaborariam para alterações significativas das propriedades mecânicas dos hidrogéis. Transformações químicas que ocorrem com o decorrer do tempo, também representam um importante fator de degradação dos materiais, provocando alteração nas propriedades mecânicas (AMARAL et al., 2008). Neste ensaio, sugere-se que a diminuição da relaxação e da resiliência, com o passar do tempo, possam ser explicadas como resultado de uma modificação química, como aquela ocorrida pela reação de derivatização do glutaraldeído que provocou o escurecimento do hidrogel (Item 4.3.7).

4.3.5 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC - "Differential Scanning Calorimetry") é uma técnica de análise térmica na qual a temperatura de uma amostra, comparada com a temperatura de um material termicamente inerte, é registrada em função do fornecimento de temperatura à medida que a amostra é aquecida ou resfriada a uma razão constante. A DSC

mede a entalpia das amostras podendo indicar a temperatura de transição vítrea e os eventos endotérmicos e exotérmicos das amostras estudadas (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000; SKOOG et al., 2006).

Geralmente, as análises térmicas são ferramentas úteis para o processo de desenvolvimento de formulações, uma vez que permitem avaliar a compatibilidade entre os componentes de uma formulação, a estabilidade e a decomposição térmica de ativos. Os dados obtidos por análises térmicas estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto farmacêutico, permitindo inferir aspectos da eficácia terapêutica ou a estabilidade do produto durante todo o período de vida de prateleira (OLIVEIRA; YOSHIDA; LIMA GOMES, 2011).

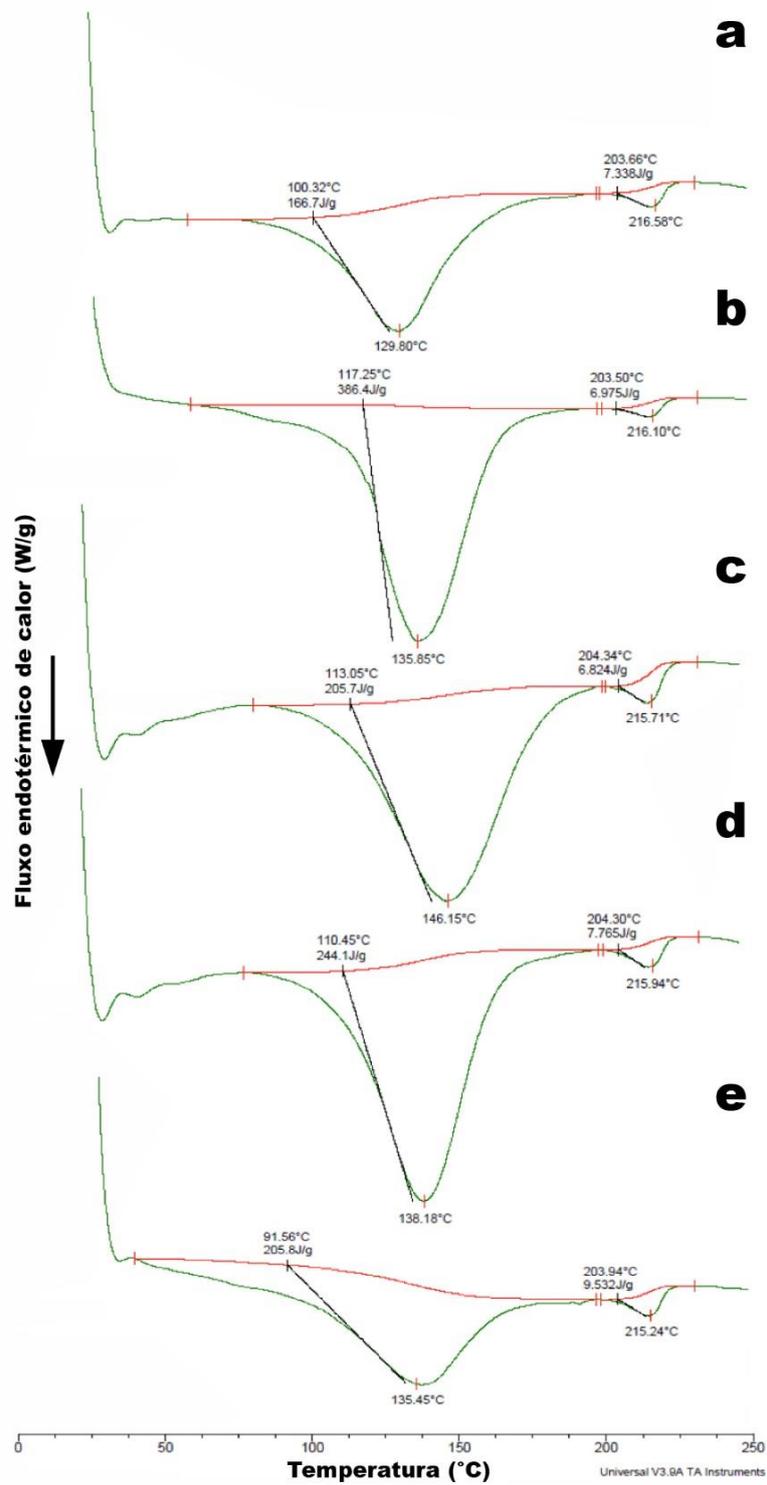
Os resultados da análise térmica dos hidrogel por DSC realizada em diferentes tempos de armazenamento podem ser encontrados na Figura 17 e na Tabela 8. De modo geral, os picos observados nas curvas de DSC das amostras indicaram perda de massa em dois picos endotérmicos, sendo as temperaturas de ponto de fusão apontadas na Tabela 8. A primeira perda de massa associada ao pico endotérmico pode ser atribuída à desidratação (IONASHIRO, 2004). Os segundos picos endotérmicos são referentes ao ponto de fusão. Segundo Peppas e Merrill (1976), em estudos avaliando hidrogéis de PVA, observaram pontos de fusão de hidrogéis de PVA variando de 208,2 °C a 216,5 °C dependendo da porcentagem do PVA e do tipo de reticulação.

Tabela 8. Temperaturas dos eventos térmicos observados nas análises de DSC dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata em 0, 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\% \text{UR}$.

| Tempo de armazenamento (dias) | Temperatura do 1º pico endotérmico (°C) | Temperatura do 2º pico endotérmico (°C) | ΔT (°C) |
|-------------------------------|---|---|-----------------|
| 0 | 129,80 | 216,58 | 86,78 |
| 30 | 135,85 | 216,19 | 80,34 |
| 60 | 146,15 | 215,71 | 69,56 |
| 90 | 138,15 | 215,94 | 77,79 |
| 180 | 135,34 | 215,24 | 79,90 |

Fonte: Elaboração própria.

Figura 17. Curvas de DSC dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata em 0 (a), 30 (b), 60 (c), 90 (d) e 180 (e) dias de armazenamento a 25 ± 2 °C e $60 \pm 5\%$ UR.



Fonte: Elaboração própria.

Pelos valores obtidos (Tabela 8) pode-se concluir que não houve diferença em relação aos eventos térmicos. Isto indica que não ocorreram alterações significativas na estrutura formada como polimerizações, oxidações, dessorção, etc., em função do tempo de armazenamento. No entanto, quando se observam as áreas das curvas de entalpia dos primeiros eventos endotérmicos foram verificadas diferenças. Provavelmente, estas alterações possam ser atribuídas à reação de derivatização entre o glutaraldeído e a sulfadiazina de prata.

Os segundos eventos endotérmicos, que aconteceram em torno de 216°C, foram provavelmente devidos a eventos de decomposição. Os resultados obtidos a partir das análises térmicas de DSC estão em estreita concordância com os obtidos a partir de estudos de difração de raios X (item 4.3.9.). A impregnação do PVA com moléculas menores (como PEG) levou a uma redução da cristalinidade com estreitamento do perfil de fusão. Os eventos térmicos descritos na Figura 17 e os difratogramas de raios-X (item 4.3.9., Figura 22) indicaram uma amorfização do sistema de hidrogel e sulfadiazina de prata, conduzindo assim ao aumento da estabilidade verificada.

4.3.6 Teor de umidade

As amostras de hidrogéis foram colocadas no analisador de umidade por infravermelho e o resultado foi dado em % (m/m) de umidade. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 9).

Tabela 9. Teores médios (n=3) de umidade obtidos em amostras de hidrogel de PVA e sulfadiazina de prata nos diferentes tempos de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\% \text{UR}$.

| Tempo de armazenamento (dias) | % de umidade (m/m) |
|-------------------------------|--------------------|
| 0 | $8,45 \pm 1,38$ |
| 30 | $7,92 \pm 2,04$ |
| 60 | $7,62 \pm 2,67$ |
| 90 | $7,45 \pm 1,53$ |
| 180 | $6,98 \pm 2,94$ |

Fonte: Elaboração própria.

O teor médio de umidade (% , m/m) obtido durante todo o período de armazenamento foi de $7,68\% \pm 0,48$. Os resultados foram considerados adequados para a conservação do produto, em função de uma porcentagem de umidade relativamente baixa, o que reduz a possibilidade de degradação dos ativos por hidrólise e dificulta a proliferação de microrganismos contaminantes. A reação de hidrólise é uma das reações de degradação química mais comum em extensa faixa de pH (BLESSY et al., 2014).

Utilizando o teste ANOVA e posterior análise de teste *post hoc* Tukey, conclui-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de umidade encontrados nos diferentes tempos de armazenamento, como pode ser visto (Tabela 10). Neste sentido, pode-se considerar que a embalagem foi adequada para a manutenção da qualidade, em relação ao teor de umidade, durante todo o ensaio de estabilidade.

Tabela 10. Diferenças médias de umidade entre os diferentes tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 180 dias) pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

| Dias de armazenamento | Tratamentos | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} |
| 0 {1} | | 0,998094 | 0,989220 | 0,978552 | 0,918942 |
| 30 {2} | 0,998094 | | 0,999802 | 0,998826 | 0,982885 |
| 60 {3} | 0,989220 | 0,999802 | | 0,999979 | 0,995991 |
| 90 {4} | 0,978552 | 0,998826 | 0,999979 | | 0,998826 |
| 180 {5} | 0,918942 | 0,982885 | 0,995991 | 0,998826 | |

Fonte: Elaboração própria.

4.3.7 Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier

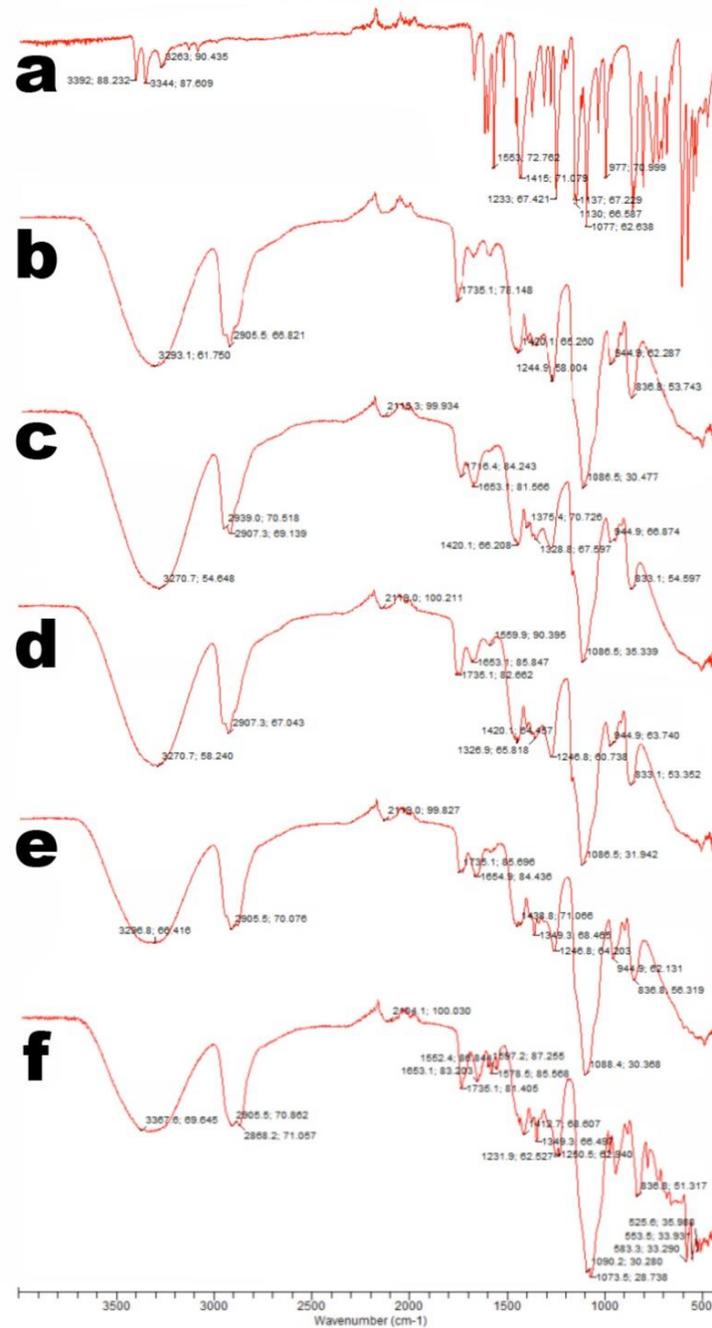
Para a caracterização dos hidrogéis submetidos ao ensaio de estabilidade acelerada utilizou-se também a Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR- *Fourier transform Infrared*).

A FTIR é uma técnica espectroscópica vibracional que tem sido bastante utilizada por apresentar alta resolução, rapidez analítica e não ser destrutiva. Além disso, esta técnica não exige o uso de solventes ou outros reagentes químicos (ROHMAN, 2012).

A absorção de luz na região do infravermelho (IV) causa alterações no estado de energia vibracional da molécula. Essas transições vibracionais são associadas a mudanças de rotação dos átomos das ligações químicas. Cada grupo funcional absorve em frequência característica de radiação no espectro de IV. Assim, a espectroscopia de infravermelho é útil para a detecção de grupos funcionais na molécula e, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, permite caracterizar os grupos funcionais das mesmas. Cada pico de um espectro de IV corresponde a um grupo funcional específico (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Assim, visando observar possíveis interações entre os componentes da formulação foram obtidos espectros de infravermelho de amostras de hidrogel com sulfadiazina de prata em todos os tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 180 dias). Pelos resultados obtidos pode-se afirmar que eles foram semelhantes entre si (Figura 18).

Figura 18. Espectros de infravermelho da sulfadiazina de prata e dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata em diferentes tempos de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\% \text{UR}$, sendo: a) sulfadiazina de prata; b) hidrogel em 0 dia de armazenamento; c) hidrogel em 30 dias de armazenamento; d) hidrogel em 60 dias de armazenamento; e) hidrogel em 90 dias de armazenamento; f) hidrogel em 180 dias de armazenamento.

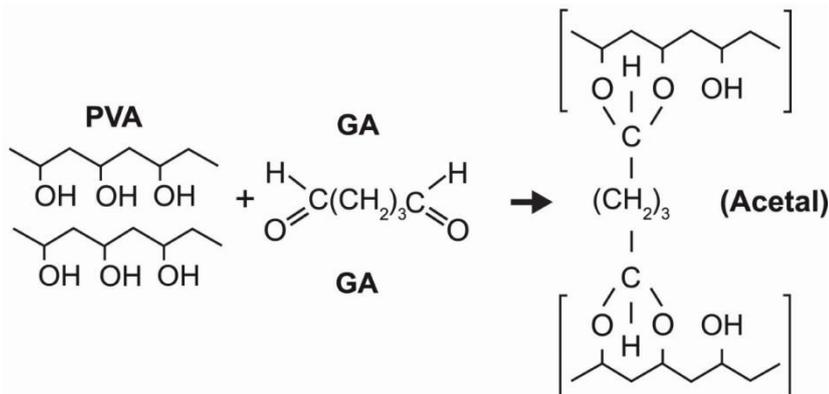


Fonte: Elaboração própria.

Os picos indicativos da sulfadiazina de prata estão entre $1390 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ para a ligação C-N; entre $1640 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ para grupamento N-H (vibrações de deformação); próximo de 1050 cm^{-1} correspondente a ligação S=O₂; entre $3500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ referente ao grupamento N-H (vibrações de estiramento) e entre $2950 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ referente ao grupamento C-H (METHA et al., 2013). A Figura 22a apresenta o espectro de infravermelho da sulfadiazina de prata.

O PVA reage com o glutaraldeído através de ligações de hidrogênio como visualizado na figura abaixo (Figura 19). Esta ligação pode ser observada em vibrações de estiramento entre $3330-3350 \text{ cm}^{-1}$ (REIS et al., 2006). Nos hidrogéis analisados verificam-se picos próximos a 3290 cm^{-1} , indicando a reação de reticulação.

Figura 19. Reação de reticulação entre álcool polivinílico (PVA) e glutaraldeído (GA).

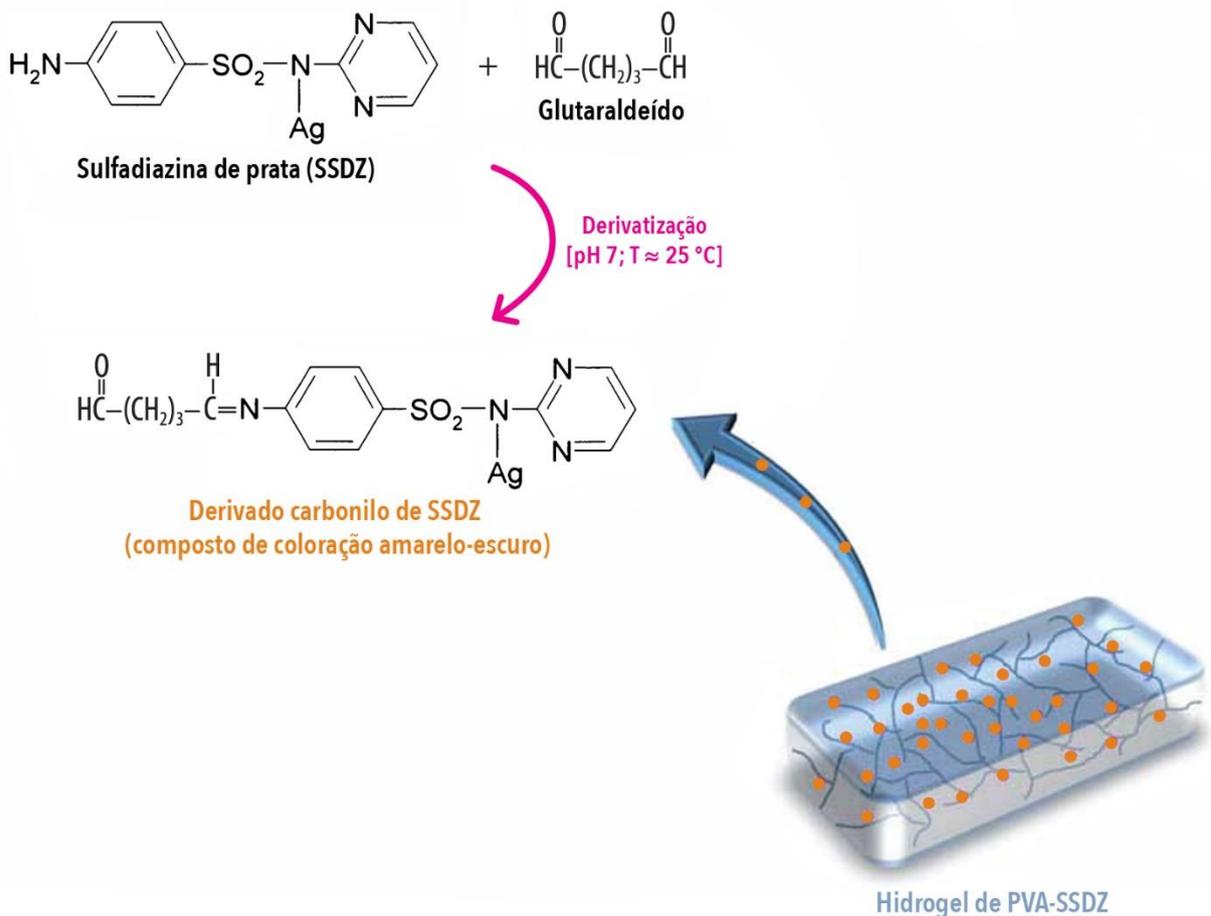


Fonte: REIS et al., 2006.

Ainda, segundo REIS et al. (2006) a presença de bandas próximas a 1720 cm^{-1} podem indicar grupos aldeídos do glutaraldeído livres, ou seja, que não reagiram com os grupos OH da cadeia de PVA. Valores próximos ao indicado são observados nos espectros obtidos (1735 cm^{-1}). No entanto, verifica-se menor intensidade após o tempo zero. Isto pode indicar que os grupos do glutaraldeído que não reagiram com o PVA reagiram, com o passar do tempo, com o grupo amina da sulfadiazina. O grupo amina da sulfadiazina é indicado por picos entre

2950-3000 cm^{-1} (METHA et al., 2013), conforme já citado acima. Pode-se observar que estes picos estão presentes em todos os espectros, diminuindo a intensidade com o passar do tempo. Grupos aldeído livres podem reagir com grupos aminas (oriundos da sulfadiazina de prata) promovendo uma reação de polimerização com escurecimento do hidrogel (BALCÃO et al., 2001a; BALCÃO et al., 2001b; LAMAS et al., 2001) como ilustrado na Figura 20. Desta forma, o escurecimento observado nos hidrogéis durante o período de armazenamento pode ser explicado por esta reação e não por degradação da sulfadiazina. Pode-se afirmar que a embalagem utilizada foi adequada para evitar a degradação da sulfadiazina por fotólise, mas não impediu a reação de derivatização do glutaraldeído.

Figura 20. Mecanismo de reação entre sulfadiazina de prata (SSDZ) e glutaraldeído (GA).



Fonte: Elaboração própria.

4.3.8 Perfil de liberação da sulfadiazina de prata no hidrogel

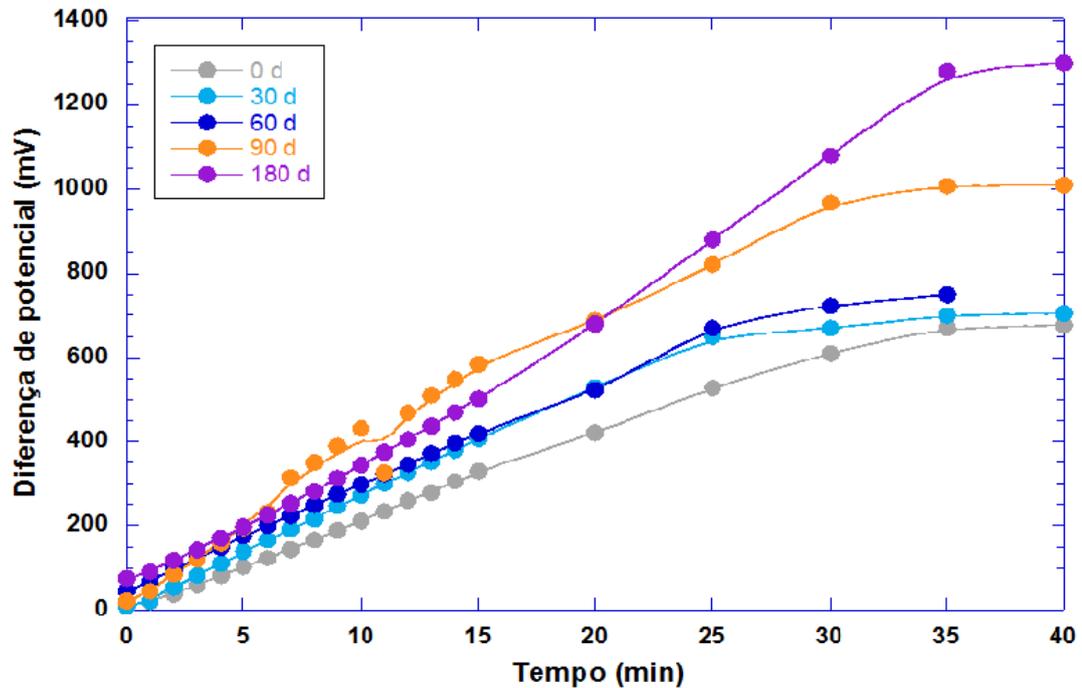
A liberação tópica de ativos pode ser definida como a aplicação de uma formulação diretamente sobre a pele para o tratamento de diversas desordens ou manifestações cutâneas advindas de outras patologias com a intenção de levar um ou mais ativos sobre ou para o interior da pele (GANESH; MANOHAR; BHANUDAS, 2013).

A liberação do ativo em sistemas poliméricos pode ocorrer por difusão do fármaco; por penetração de água (inchamento do hidrogel) ou por processo químico, em que o fármaco é liberado pela degradação do polímero ou ainda por uma combinação de processos. Assim, a determinação da capacidade de liberação do ativo é um importante parâmetro para conhecer a forma e constância de liberação durante o período de uso da forma farmacêutica pretendida (AMARAL, 2009; KALSHETTI et al., 2012).

A liberação por difusão envolve os princípios fundamentais da solubilidade e da difusividade do fármaco na matriz polimérica. Pelo mecanismo de inchamento, a liberação do ativo ocorre quando o hidrogel em contato com uma solução aquosa absorve moléculas de água, ocorrendo acréscimo do volume da estrutura polimérica, com aumento da flexibilidade das cadeias de polímero e, conseqüente, difusividade do fármaco. Por fim, a degradação da estrutura polimérica, a qual abriga o fármaco, seja por reações químicas ou enzimáticas permite a liberação do princípio ativo (FIGUEIREDO, 2011; COSTA, 2013).

Para avaliar a capacidade de liberação da sulfadiazina de prata do hidrogel ao longo do tempo do hidrogel, escolheu-se determinar a liberação de prata. A técnica escolhida foi a potenciometria empregando-se eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) em função da facilidade, baixo custo e rapidez analítica, embora este método seja, neste caso, preditivo em função de algumas variáveis não controláveis como a própria desintegração dos hidrogéis. Os resultados obtidos, e apresentados na Figura 21, indicaram que o perfil de liberação de ativo pouco se modificou em função do tempo de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 180 dias). Pode-se dizer que houve um ligeiro aumento da liberação do ativo com o passar do tempo. Inicialmente, e até 30 minutos, houve uma liberação contínua, indicando que provavelmente, houve liberação por inchamento do hidrogel. Após cerca de 10 a 15 minutos de imersão em água a liberação da prata elevava-se. Após este período a concentração da prata permanecia quase que constante, indicando, provavelmente, a degradação da estrutura química do hidrogel.

Figura 21. Liberação de prata dos hidrogéis armazenados em 0, 30, 60, 90, 180 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR obtidos por potenciometria.



Fonte: Elaboração própria.

A interpretação dos valores obtidos em ensaios de liberação de princípios ativos pode ser facilitada pela utilização de modelos matemáticos. Os sistemas de liberação que obedecem ao modelo de cinética de primeira ordem ($\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 \cdot t$ (onde: Q_t é a quantidade de fármaco libertado ao tempo t ; Q_0 a quantidade inicial de fármaco; k é a constante de liberação; e t é o tempo)) apresentam resposta linear em um gráfico do logaritmo decimal da quantidade liberada de fármaco *versus* o tempo decorrido de ensaio. As formas farmacêuticas que seguem este perfil de liberação liberam uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade restante no seu interior, por unidade de tempo, de modo que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo (COSTA, 2002).

O modelo matemático de Higuchi ($Q_t = k_H \times \sqrt{t}$ (onde: Q_t é a quantidade de fármaco liberado ao tempo t ; K_H é a constante de Higuchi; e t é o tempo)) é utilizado para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial, sendo obtido

pela construção de gráficos da raiz quadrada do tempo versus porcentagem dissolvida (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

O modelo matemático Korsmeyer-Peppas ($Q_t / Q_\infty = k_{KP} \times t^n$ (onde: Q_t é a quantidade de fármaco libertado ao tempo t ; Q_∞ é a quantidade total de fármaco dissolvido, quando a forma de dosagem (hidrogel) é exaurida; K_{KP} é a constante cinética Korsmeyer-Peppas; n é o expoente de difusão; e t é o tempo)) deriva de uma relação simples, que descreve a libertação de droga a partir de um sistema polimérico. O modelo de Korsmeyer-Peppas permite calcular o expoente de liberação do fármaco (n), sendo obtido a partir da construção de gráficos de log do tempo pelo log da porcentagem de fármaco não dissolvida e prevê uma avaliação mais detalhada sobre o mecanismo de transporte do fármaco (SHAIKH; KSHIRSAGAR; PATIL, 2015). Os modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais normalizados (concentração normalizada) e transformados de acordo com os referidos modelos. Pelos coeficientes de determinação (r^2) obtidos e apresentados na Tabela 11, podem-se observar menores valores de r^2 para os modelos de primeira ordem e para o modelo de Higuchi e, quase uma correlação perfeita para o modelo Korsmeyer-Peppas.

Tabela 11. Valores de r^2 (coeficiente de determinação) referentes à cinética de liberação de sulfadiazina de prata a partir do hidrogel, obtidos através da construção de gráficos para os modelos de primeira ordem, Higuchi e de Korsmeyer-Peppas.

| Tempo de armazenamento (dias) | r^2 Primeira ordem | r^2 Higuchi | r^2 Korsmeyer-Peppas |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|--|
| 0 | 0,69959 | 0,84236 | 0,99604 |
| 30 | 0,62130 | 0,88794 | 0,98352 |
| 60 | 0,76640 | 0,91610 | 0,99163 |
| 90 | 0,65341 | 0,89886 | 0,98265 |
| 180 | 0,88636 | 0,80012 | 0,96629 |

Fonte: Elaboração própria.

Além disto, calculou-se o coeficiente de liberação (n) no modelo Korsmeyer-Peppas. O cálculo de n é geralmente utilizado para interpretar a liberação do princípio ativo quando o

mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes, um devido ao transporte de fármaco que obedece às leis de Fick, e outro em consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento dos polímeros (expansão dinâmica), chamado transporte caso II (BICHERI et al., 2011). Valores de n entre $0,45 < n < 0,89$ indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de liberação (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Pelos resultados obtidos (Tabela 12) sugere-se que a liberação da sulfadiazina de prata a partir do hidrogel ocorreu, inicialmente, até 30 dias de armazenamento por erosão da cadeia polimérica do hidrogel e após o primeiro mês de armazenamento a liberação da sulfadiazina de prata do hidrogel ocorreu por difusão anômala ou difusão não Fickiana, devido ao endurecimento do hidrogel.

Tabela 12. Valores de n (coeficiente de liberação) para as amostras de hidrogel nos diferentes tempos de armazenamento.

| Tempo de armazenamento (dias) | Valor de n (coeficiente de liberação) |
|--------------------------------------|---|
| 0 | 0,9972 |
| 30 | 0,9478 |
| 60 | 0,7119 |
| 90 | 0,8775 |
| 180 | 0,7879 |

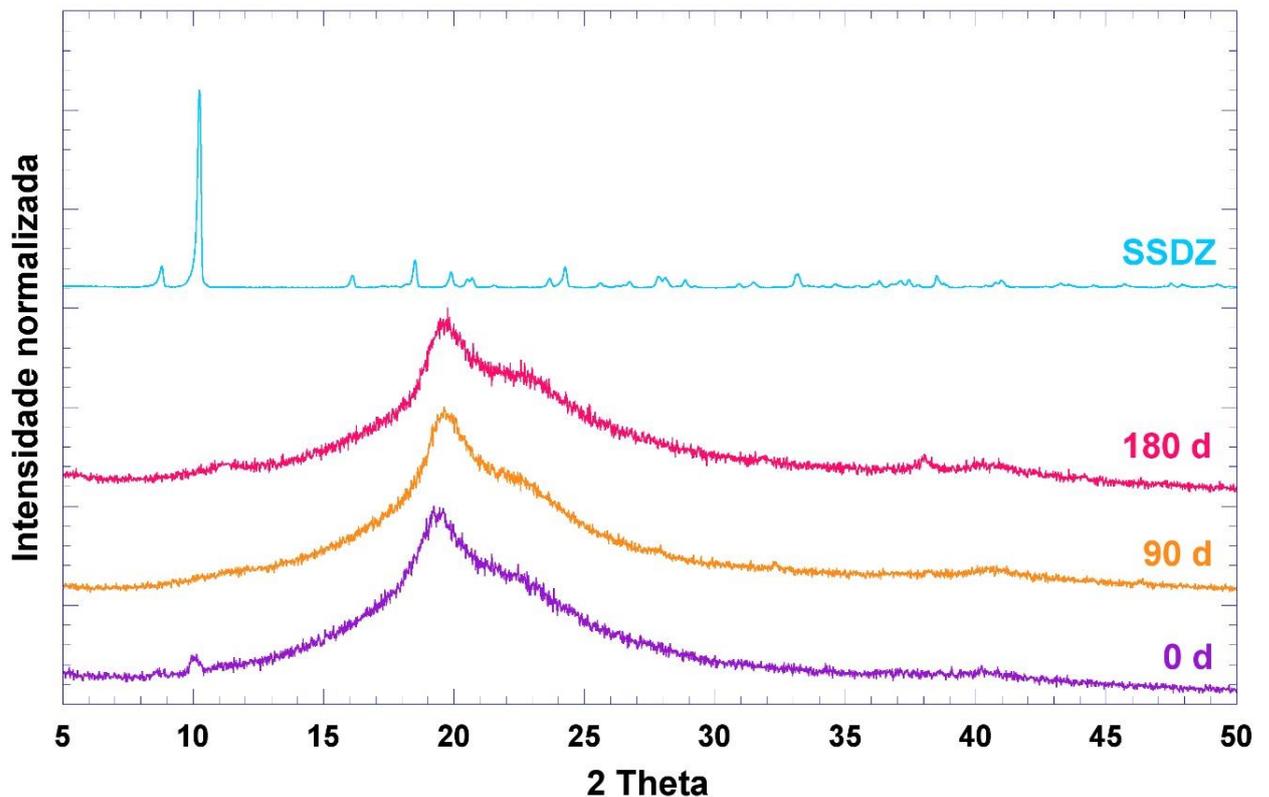
Fonte: Elaboração própria.

4.3.9 Difração de raios X

A difração de raios X (DRX) é uma técnica que emprega o fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre um feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material para a elucidação da natureza cristalina dos materiais. A grande vantagem da análise de difração de raios X sobre outras técnicas analíticas reside na unicidade dos padrões de difração de substâncias cristalinas, na capacidade para distinguir entre os elementos e os seus óxidos e na possibilidade de identificar compostos químicos através de análises não destrutivas (DAS; ALI; HAMID, 2014).

Os difratogramas dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata foram analisados nos tempos 0, 90 e 180 dias e são apresentados na Figura 22, sob a forma de difratogramas normalizados. A normalização da intensidade em todos os difratogramas foi feita dividindo-se os valores de intensidade pelo valor máximo da intensidade em cada difratograma, permitindo assim uma melhor comparação entre eles. Os difratogramas de raios X dos hidrogéis apresentaram o mesmo padrão de intensidade ao longo do tempo de armazenamento, mas com amplitudes diferentes em alguns picos, indicando que não houve alterações significativas na estrutura do hidrogel.

Figura 22. Difratogramas normalizados de raios X dos hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata (SSDZ) em 0, 90 e 180 dias de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR.



Fonte: Elaboração própria.

Costa Jr. e Mansur (2008) avaliando resultados de análises de difração de raios X de uma mistura de PVA/quitosana indicaram que o PVA apresenta uma forma amorfa. Os resultados obtidos com as análises de difração de raios X nos hidrogéis com sulfadiazina de prata durante diferentes períodos (0, 90 e 180 dias), ou seja, no início, no meio e no final do período de armazenamento permitiram observar uma ampla faixa de sinais de pequena

intensidade indicando a predominância da forma amorfa do material. Os pequenos picos em $2\theta \cong 41^\circ$ nos difratogramas dos hidrogéis com sulfadiazina de prata são relacionados com a presença de água residual nas amostras de hidrogéis. Os difratogramas de raios X revelaram picos característicos de cristalinidade em $2\theta \cong 19^\circ$ (intensidade mais elevada), $2\theta \cong 22^\circ$ (menos definido) e uma vasta gama de sinais de baixa intensidade, que indicaram o domínio do material amorfo no hidrogel. Os resultados obtidos nesta pesquisa foram muito semelhantes aos relatados por Parparita et al. (2014), avaliando hidrogéis de PVA e quitosana mostraram que o PVA produz picos de cristalinidade em $2\theta \cong 19,59^\circ$ e $2\theta \cong 22^\circ$.

Em difratogramas de raios X, a presença de picos com alta intensidade e largura da base estreita relaciona-se com materiais cristalinos, enquanto os picos de base larga estão relacionados com materiais amorfos. Uma vez que a intensidade dos picos nos padrões de difração de raios X também dependem da concentração do ativo, um aumento na intensidade de alguns picos era esperado para o hidrogel impregnado com sulfadiazina de prata (Figura 22, 0d).

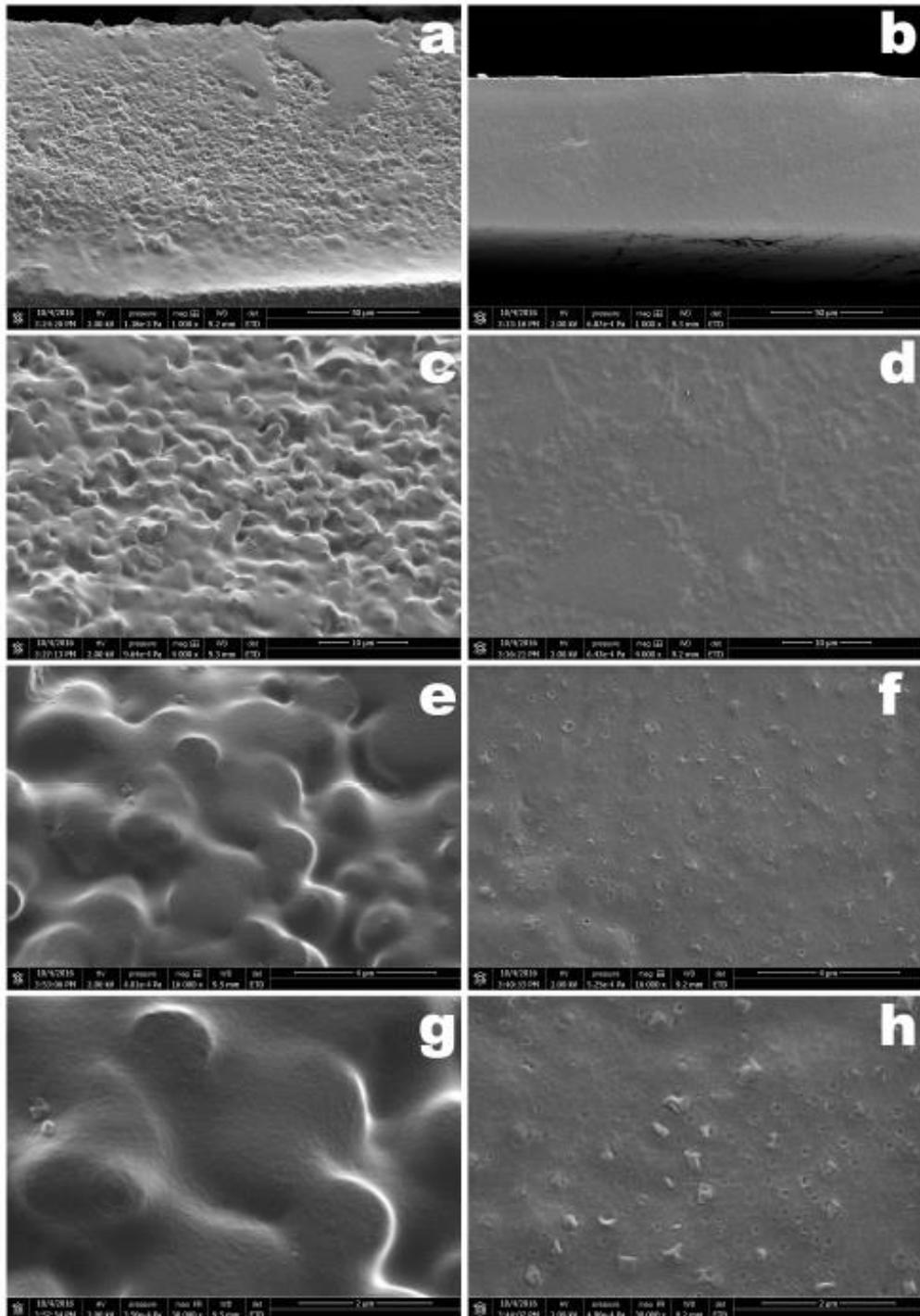
Comparando-se os difratogramas de sulfadiazina de prata e do hidrogel com sulfadiazina de prata no tempo 0, um pico característico atribuído a sulfadiazina de prata aparece em $2\theta \cong 10^\circ$. Este pico está ausente nos difratogramas das amostras de hidrogéis com sulfadiazina de prata com 90 e 180 dias de armazenamento. Isto é compatível com a provável reação entre o grupo aldeído das moléculas de glutaraldeído residuais com o grupo amina da sulfadiazina de prata que, provavelmente, causou o escurecimento do hidrogel durante o armazenamento.

4.3.10 Microscopia eletrônica de varredura

A partir dos resultados observados nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizadas nas amostras dos hidrogel no tempo zero (Figuras 23a (x1000), 23c (x4000), 23e (x16000), 23g (x30000)) e após 180 dias de armazenamento (Figuras 23b (x1000), 23d (x4000), 23f (x16000), 23h (x30000)) pode ser observada uma morfologia uniforme, com pontos de deposição de sulfadiazina de prata.

A diferença de estrutura interna entre os hidrogéis no tempo zero e após 180 dias de armazenamento pode ser observada nas imagens por microscopia eletrônica de varredura das fraturas das amostras (Figuras 23 a e 23 b).

Figura 23. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de hidrogéis de PVA e sulfadiazina de prata: a) imagem da zona de fratura do hidrogel no tempo zero; b) imagem da fratura com 180 dias de armazenamento; c) hidrogel no tempo zero com ampliação de 4000 vezes; d) hidrogel com 180 dias de armazenamento com ampliação de 4000 vezes; e) hidrogel no tempo zero com ampliação de 16000 vezes; f) hidrogel com 180 dias de armazenamento com ampliação de 16000 vezes; g) hidrogel no tempo zero com ampliação de 30000 vezes; h) hidrogel com 180 dias de armazenamento com ampliação de 30000 vezes.



Fonte: Elaboração própria.

O armazenamento por 180 dias conferiu ao hidrogel uma aparência estrutural mais compacta e, isto, provavelmente, pode tornar o hidrogel mais frágil. Estes resultados corroboram com os as características visco-elásticas de deformação e relaxamento molecular observadas nos ensaios de textura que indicaram diminuição destas propriedades em função do tempo de armazenamento.

4.4 Outras considerações

Atualmente, existe consenso dos efeitos positivos do uso de curativos contendo prata para o tratamento de feridas infectadas, quando usado adequadamente (INTERNATIONAL CONSENSUS, 2012). Neste sentido, vários curativos com prata têm sido desenvolvidos com o propósito de tratamento de feridas infectadas. Sabe-se também que para o desenvolvimento de um produto se faz necessário avaliar não só as características do ativo, mas também da formulação e da embalagem (AULTON, 2005). Assim, inicialmente, pelo fato da sulfadiazina de prata ser fotossensível pensou-se que a proteção por embalagem adequada seria suficiente para evitar reações de degradação.

A embalagem escolhida como embalagem primária dos hidrogéis foi um “sachê” aluminizado composto de várias camadas (poliéster/adesivo/alumínio/adesivo/polietileno). A embalagem eleita apresentou capacidade adequada de proteção para os hidrogéis, considerando vários parâmetros como, por exemplo, o teor de umidade. Este tipo de embalagem é de fácil aquisição, apresenta várias opções de tamanho, pode ser armazenada em diferentes temperaturas e aceitam *design* personalizado.

No entanto, após 30 dias de armazenamento a $40\text{ °C} \pm 2$ e umidade relativa (UR) de $75\% \pm 5\%$ UR observou-se escurecimento dos hidrogéis. Isto indicou, a princípio, que o produto não poderia ser comercializado sem controle de temperatura. O Brasil é um país enquadrado na zona climática IV e, deste modo, os medicamentos (que não exigem controle de temperatura) devem suportar a temperatura considerada ambiente no país ($15\text{ a }30\text{ °C}$) (BRASIL, 2005).

Considerou-se que o produto deveria ser mantido em temperatura de refrigeração (2 °C a 8 °C segundo a FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010)) e, deste modo, os estudos de estabilidade poderiam ser conduzidos a $25 \pm 2\text{ °C}$ e $60 \pm 5\%$ UR. Nestas condições os produtos mantiveram-se adequados em quase todas suas propriedades avaliadas. Contudo,

como mencionado, ainda houve um escurecimento com o passar do tempo. Este fato pode levar o produto a uma rejeição por parte do consumidor, com a não adesão ao tratamento.

Neste sentido, decidiu-se prepara um curativo sem glutaraldeído, uma vez que, pelas pesquisas realizadas, considerou-se que o escurecimento deu-se, provavelmente, em função da reação entre glutaraldeído e a sulfadiazina de prata. Isto foi feito, mesmo sabendo que haveria perda de propriedades mecânicas, uma vez que o glutaraldeído, como agente reticulante, é usado para aumentar a estabilidade química e a resistência mecânica (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Inicialmente, preparou-se o filme sem glutaraldeído (Figura 24) e, na sequência, avaliou-se sua eficácia através do ensaio de atividade antimicrobiana.

Figura 24. Imagem do filme formado de PVA e sulfadiazina de prata sem glutaraldeído.



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios. Houve a formação de um filme visualmente adequado (Figura 24), porém não se observou atividade antimicrobiana, como pode ser visto na Figura 25. Provavelmente, isto se deu pela não formação de um hidrogel. O hidrogel, como já citado, deve ter uma estrutura com característica estrutural em rede tridimensional formada pelas ligações cruzadas entre os polímeros (MELLO; CUNHA JR; FIALHO, 2012). A estrutura porosa de um hidrogel permite a liberação de fármacos mais facilmente e, deste modo, o ativo pode ser liberado e atuar no meio. No filme preparado sem glutaraldeído, não houve formação desta estrutura porosa e a sulfadiazina, provavelmente, permaneceu aprisionada no polímero.

Figura 25. Resultados obtidos no teste de disco-difusão após 24 h de incubação em estufa a 37°C do filme formado de PVA e sulfadiazina de prata sem glutaraldeído. As placas contendo meio de cultura TSB da direita foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* e as da esquerda com *Pseudomonas aeruginosa*, sendo 1 amostras, 2 controle positivo (solução de sulfadiazina de prata 1% (m/v)) e 3 controle negativo (hidrogel sem sulfadiazina de prata).



Fonte: Elaboração própria.

5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS PARA FUTUROS TRABALHOS

Pode-se concluir que o hidrogel preparado com PVA e 1% (m/v) de sulfadiazina de prata pode ser usado com segurança para o tratamento de infecções de pele. O hidrogel permitiu a liberação imediata e constante do princípio ativo, tendo eficiente atividade antimicrobiana. Exibiram também boas propriedades mecânicas, o que permite o seu emprego em diferentes partes do corpo.

Durante o ensaio de estabilidade conduzido a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $60\% \pm 5\%$ UR, o hidrogel apresentou escurecimento por volta dos 90 dias de armazenamento, provavelmente por reação da sulfadiazina de prata com glutaraldeído residual. Assim, o produto deverá ser mantido em temperatura de refrigeração (2°C a 8°C) e, de preferência, ser utilizado até 60 dias após seu preparo.

Pelos resultados obtidos o produto pode ser considerado adequado para uso como curativo em infecções da pele. No entanto, para viabilização comercial do produto será ainda necessária à realização do estudo de estabilidade de longa duração para obtenção do prazo de validade.

Além disto, propõe-se estudar a inclusão de mais uma fase na metodologia para a obtenção do hidrogel, com lavagem com água ultrapura, imediatamente após a reticulação. Poder-se-ia ainda avaliar o uso de corantes farmacêuticos no preparo dos hidrogéis, de modo a minimizar os efeitos do escurecimento. Também novos processos de reticulação poderiam ser estudados como, por exemplo, por fotoreticulação.

De modo geral, pode afirmar-se que o produto elaborado, pela sua simplicidade quanto aos componentes, facilidade de preparo e custo reduzido, quando comparado a outros curativos a base de prata, apresentou resultados promissores para seu emprego como curativo em peles infeccionadas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: a review. **Journal of Advanced Research** v. 6, p. 105-121, 2015.
- ALCÂNTARA, M. T. S. **Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações poliméricas**. Tese de Doutorado em Ciência na área de Tecnologia Nuclear – Materiais, IPEM, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013
- ALMEIDA, J.F.S.L. **Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Especialidade Processos Químicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2010.
- AMARAL, R. H. et al. **Avaliação das propriedades mecânicas do hidrogel de poli(vinil álcool) (PVAI)**. 18º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 24 a 28 de Novembro de 2008, Porto de Galinhas, PE, Brasil.
- ARAGÃO, J.A. et al. Estudo epidemiológico de crianças vítimas de queimaduras internadas na Unidade de Tratamento de Queimados do Hospital de Urgência de Sergipe. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica** v. 27, n. 3, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-51752012000300008> Acesso em: 14/06/2015.
- ARREDONDO A. et al. Matriz a partir de un hydrogel de alcohol polivinílico (PVA) com sulfadiazina de prata com potencial aplicacion en el manejo y control de la sepsis en heridas dermicas. **Revista Iberoamericana de Polímeros** v. 12, n. 4, p. 178-187, 2011.
- AUTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2 ed. São Paulo: Artemed, 2005
- BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability testing of pharmaceutical products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** v.2, n°3, p 129-138, 2012.
- BALCÃO, V. M. et al. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multi-subunit immobilization onto highly activated supports. **Biotechnology Progress** v.17, n. 3, p. 537-542, 2001a.
- BALCÃO, V. M. et al. Coimmobilization of L-asparaginase and glutamate dehydrogenase onto highly activated supports. **Enzyme and Microbial Technology** v. 28, n. 7-8, p. 696-704, 2001b.
- BALOUIRI, M. et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis** v. 6, n. 2, p. 71-70, 2016.
- BARCELLOS I.O. et al. Influência do comonômero e do método de polimerização na cinética de liberação de fenobarbitona a partir de hidrogéis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** v. 10, n. 2, p. 110-115, 2000.
- BHAGYASHREE, P. et al. Recent trends in stability testing of pharmaceutical products: a review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences** v. 6, n. 1, p. 1557- 1560, 2015.

BHOWMIK, D. et al. Recent advances in novel topical drug delivery system. **The Pharma Innovation** v.1, nº 9, p. 12 -31, 2012. Disponível em http://www.thepharmajournal.com/vol1Issue9/Issue_nov_2012/1.1.pdf
Acesso em 18/08/2016.

BICHERI, M.T.L. et al. Preparation and evaluation of modified release zidovudine tablets. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 8, p 1512- 1518, 2011.

BISCEGLI, T. S. et al. Perfil de crianças e adolescentes internados em Unidade de Tratamento de Queimados do interior do estado de São Paulo. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 32, n. 3, p. 177-182, 2014.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis** v.4, n.3, p. 159-165, 2014

BOURTOOM, T. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. **Songklanakarín Journal Science Technology** v. 30, Suppl.1, p. 149-165, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo**, p. 52, Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE n. 1, 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do **Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**, Brasil, 2005.

BRITO C.W.Q.; RODRIGUES F. H. A. Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamida-acrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. **Química Nova** v. 36, n. 1, p.40-45, 2013.

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

CARBINATTO, F.M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências, Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Editora Interciência: Rio de Janeiro, 2000.

CHAKAVALO, S.R. et al. Development and *in vivo* evaluation of silver sulfadiazine loaded hydrogel consisting polyvinyl alcohol and chitosan for severe burns. **Journal Pharmaceutical Bioallied Science** v.4, suppl 1: S54–S56, 2012.

CHIRANI, N. et al. History and applications of hydrogels. **Journal of Biomedical Sciences** v.4, n.2, p.1-23, 2015.

CHILLER, K.; SELKIN, B. A.; MURAKAWA, G.J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings** v. 6, n. 3, p. 170-174, 2001.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Versão traduzida. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicos/clinica/manuais/clsi/clsi_OPASM7A6.pdf. Acesso 18/03/2016.

CORREIA, R.C et al. Poly (lactic-co-glycolic acid) matrix incorporated with nisin as a novel antimicrobial biomaterial. **World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** (Dordrecht. Online) v.1, p. 1, 2015.

COSTA, R.A.S. **Síntese e teste de hidrogéis inteligentes para a libertação controlada de fármacos**. Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Bragança, Portugal, 2013.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas** v.38, n.2, p.141-153, 2002.

COSTA, E. S. Jr; MANSUR H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool polivinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para a aplicação em engenharia de tecidos. **Química Nova** v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

COWE, J. M.; ARRIGHI, V. **Polymers: Chemistry and Physics Modern Materials**. 3. Ed., USA: CRC Press, 2007.

DAI, T. et al., Topical antimicrobials for burn wound infections. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery** v.5, n. 2, p.124-51, 2010.

DAGA, H.; MORAIS, I.H.; PRESTES, M.A. Perfil dos acidentes por queimaduras em crianças atendidas no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. **Revista Brasileira de Queimaduras** v. 14, n. 4, p. 268-272, 2015.

DAS, N.; BERA, T.; MUKHERJEE, A. Biomaterial hydrogels for different biomedical applications. **International Journal Pharmaceutical Biological Science** v.3, n.3, p. 586-597, 2012.

DAS, R.; ALI, M.E.; HAMID, S.B.A. Current applications of X-Ray power diffraction: a review. **Reviews on Advanced Materials Science** v.38, p. 95-109 2014.

DECHSAKULTHORN, F. et al. In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. Proc. 6th **World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences**. AATEX 14, Special Issue, 397-400, 2007.

DELIGKARIS, K.; TADELE, T. S.; OLTHUIS, W.; van den BERG, A. Hydrogel-based devices for biomedical applications. **Sensors and Actuators B: Chemical B** v. 147, p. 765-774, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª ed., v. 1, Brasília, 2010.

FARIA F. O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova** v. 35, n. 3, p.487-492, 2012.

FERNANDES, F. M. F. A. et al. Queimaduras em crianças e adolescentes: caracterização clínica e epidemiológica. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 4, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-14472012000400017> Acesso em: 14/06/2015.

FERREIRA, E. et al. Curativo do pacientes queimado: uma revisão da literatura. **Revista Escola Enfermagem USP** v. 37, n.1, p. 44-51, 2003.

FIGUEIREDO, A. M. D. **Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos para libertação controlada de fármacos anticancerígenos no cólon.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters** v. 160, p. 171–177, 2006.

GAAZ, T.S. et al., Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites. **Molecules** v. 20, p. 22833–22847, 2015.

GANESH, T. A.; MANOHAR, S. D.; BHANUDAS, S.R. Hydrogel- a novel technique for preparation of topical gel. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 2, n. 6, p 4520-4541, 2013.

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

GIBAS, I.; JANIK, H. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. **Chemistry & Chemical Technology** v 4, n. 4, p. 297-304, 2010.

GIANNELLI, M. et al. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology in Vitro** v. 22, p. 308-317, 2008.

GIBAS, I.; JANIK, H. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. **Chemistry & Chemical Technology** v. 4, n. 4, p. 297-303, 2010.

GIRATA, A. K. **Desenvolvimento de curativo de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio sódio e prata.** Tese de Doutorado Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas SP, 2011.

GONG, J. P.; HONG, W. (Edit) Mechanics and physics of hydrogels **Soft Matter**, v.8, p. 8006-8007, 2012. Disponível em <http://www.public.iastate.edu/~whong/papers/40.pdf>. Acesso em 01/abril/2016.

GUPTA, S.; WEBSTER, T.J.; SINHA, A. Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine** v. 22, p.1763-1772, 2011.

HIDALGO, E., DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology in Vitro** v.5, p. 271-276, 2001.

HWANG, M.R. et al. Gentamicin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol/dextran hydrogel: gel characterization and *in vivo* healing evaluation. **AAPS Pharmaceutical Science & Technology** v.11, n.3, p. 1092-1103, 2010.

INTERNATIONAL CONSENSUS. APPROPRIATE USE OF SILVER DRESSINGS IN WOUNDS. An expert working group consensus. London: Wounds International, 2012. Disponível em: http://www.woundsinternational.com/media/issues/567/files/content_10381.pdf Acesso em 15/06/2016.

IONASHIRO, M. **Giolito: Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial.** São Paulo: Giz Editorial, 2004.

JODAR, K.S. et al. Development and characterization of a hydrogel containing silver sulfadiazine for antimicrobial topical applications. **Journal Pharmaceutical Science** v.104, n.7, p. 2241-2254, 2015.

JODAR, K. S. P. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel de PVA (álcool polivinílico) e dextrana com sulfadiazina de prata para aplicação tópica,** Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, 2014.

JONES A.; VAUGHAN D. Hydrogel dressing in the management of a variety of wound types: a review. **Journal of Orthopaedic Nursing** v.9, p. 1-11, 2005.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D., WASHINGTON, J. A. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, R.P. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 7. ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999. 1671p.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infection Disease** v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.

KALSHETTI, P.P. et al. Hydrogels as a drug delivery system and applications: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v.4, n. 1, p. 1-7, 2012.

- KAMOON, E. A et al. Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: a review of remarkably blended polymers. **Arabian Journal of Chemistry** v 8, p 1-14, 2015.
- KIM, J. K. et al. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. **Archives Pharmacol Research** v.37, p.60-68, 2014.
- KIVIRANTA, L.; KUMPULAINEN, S. Quality Control and Characterization of Bentonite Materials. **Working Report** 2011-84, 2011. Disponível em http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/43/108/43108887.pdf Acesso em 13/04/2016.
- LAFTAH, W.A.; HASHIM, S.; IBRAHIM, A.N. Polymer hydrogels: a review. **Polymer-Plastics Technology and Engineering** v. 50, p. 1475–1486, 2011.
- LANSDOWN, A. B. G. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology** v.33, p. 17-34, 2006.
- LANSDOWN, A.B.G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. **Advances in Pharmacological Sciences** v. 2010, p. 1-16, 2010.
- LAMAS, E. M. et al. Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. **Enzyme and Microbial Technology** v. 28, n.7-8, p. 642-652, 2001.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova** v. 32, n.3, p. 672-678, 2009.
- LEAPER, D.; DRAKE, R. Should one size fit all? An overview and critique of the VULCAN study on silver dressings. **International Wound Journal** v.8, n. 1, p.1-4, 2011.
- LEE, K. C.; JOORY, K.; MOIEMEN, N.S. History of burns: The past, present and the future. **Burns & Trauma** v 2, n. 4, p.169-178, 2014.
- LOPES J.; MORENO A.H. Avaliação de alguns parâmetros de estabilidade físicoquímica de preparações farmacêuticas contendo sulfadiazina de prata. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas** v 35 supl1, Jornada Farmacêutica Unesp, Resumo FM 21, 2014. Disponível em <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/jornada/pdf/FM21.pdf>. Acesso em 14/06/2016.
- LOPES, C. M.; LOBO, J.M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas** v.41, n.2, p.143-154, 2005
- MADAGHIELE, M. et al. Olymeric hydrogels for burn wound care: advanced skin wound dressings and regenerative templates. **Burns & Trauma** v.2, n. 4, p 153-161, 2014.
- MAITRA, J.; SHUKLA, V.K. Cross-linking in hydrogels - a review. **American Journal of Polymer Science** v.4, n.2, p 25-31, 2014.

- MALIK, A. et al. T. World Health Organization's Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products. **Journal of Chemical Pharmaceutical Research** v. 3, n.2, p. 892-898, 2011.
- MANDELBAUM S. H.; DI SANTIS E. P.; MANDELBAUM M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 78, p.525-542, 2003.
- MARTINS, M. D. et al. Citotoxicidade *in vitro* de extrato de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConsScientiae Saúde** v. 8, n. 1, p. 99-104, 2009.
- MEIRELES, L. M. A. Estabilidade de medicamentos: estado da arte. **Revista Eletrônica de Farmácia** v.XI, n. 4, p.6–26, 2014.
- MELLO, C. S.; CUNHA JUNIOR, A.S.; FIALHO, S.L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v.33, n. 4, p. 469-477, 2012.
- METHA, P. et al. Design, development and evaluation of lipid based topical formulations of silver sulfadiazine for treatment of burns and wounds. **Innovare Journal of Life Science** v. 1, n. 1, p. 38- 44, 2013.
- MONTES, S.F.; BARBOSA M.H.; SOUZA, A.L. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um Hospital de Ensino. **Revista Escola de Enfermagem-USP** v 45, n° 2, p. 369-73, 2011.
- MOSER, H.H., PEREIRA R.R., PEREIRA M.J.L., Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Revista Brasileira de Queimaduras** v. 12, n. 2, p. 60-7, 2013.
- MOSER, H. H. et al. Uso de curativos impregnados com prata no tratamento de crianças queimadas internadas no hospital infantil Joana de Gusmão. **Revista Brasileira de Queimaduras** v. 13, n.3, p. 147-53, 2014.
- MUNDSTOCK, K.B. et al. Avaliação da biocompatibilidade em vidro e vitrocerâmica do sistema SNCP. **Química Nova** v 35, n. 4, p. 665-70, 2012.
- NOGUEIRA, D.R. et al. Mechanisms underlying cytotoxicity induced by engineered nanomaterials: a review of *in vitro* studies. **Nanomaterials** v.4, p. 454-484, 2014.
- NOZAKI, A. C. M. et al. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. **Congresso Latino Americanos de Órgãos Artificiais e Biomateriais**. Natal, Rio Grande do Norte, 2012.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; LIMA GOMES, E. C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova** v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

OOMMEN, O. P. et al. Smart design of stable extracellular matrix mimetic hydrogel: synthesis, characterization, and in vitro and in vivo evaluation for tissue engineering. **Advanced Functional Materials** v. 23, p 1273–1280, 2013.

ORIQUI, L.R. et al., Definição de shelf life para produtos químicos – a importância de um guia de estabilidade específico para o segmento. **Química Nova** v. 34, n. 10, 1869-1874, 2011.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications - A mini review. **Designed Monomers and Polymers** v.12, p. 197-220, 2009

PARPARIÇA, E. et al. Polyvinyl alcohol/chitosan/montmorillonite nanocomposites preparation by freeze/thaw cycles and characterization. **Acta Chemica IASI** v. 22, n. 2, p. 75-96, 2014.

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

PEPPAS, N.A.; MERRILL, E.W. Differential scanning calorimetry of crystallized PVA hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 20, p.1457-1465, 1976.

PERTILE, R.A.P. **Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, p.75, Florianópolis, 2007.

PETKOVSEK, A.; MACEK, M.; MAJES, B. A laboratory characterization of soils and clay-bearing rocks using the Enslin-Neff water-adsorption test. **Acta Geotechnica Slovenica** v. 2, p. 5-13, 2009.

QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de matricaria (L.) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RAGONHA A.O.C. et al. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. **Revista Latino-Americana de Enfermagem** v. 13, n. 4, p. 514-21, 2005.

REMPEL, L. C. T.; TIZZOT, M. R. P. A.; VASCO, J. F. M. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Revista Brasileira de Queimaduras** v. 10, n. 1, p. 3-9, 2011.

REIS, E. F. et al. Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. **Materials Research** v. 9, n. 2, 185-191, 2006.

RIGO, C. et al. Active silver nanoparticles for wound healing. **International Journal of Molecular Sciences** v. 14, p. 4817- 4840, 2013.

RIPPON, M.; WHITE, R.; DAVIES, P. Skin adhesives and their role in wound dressings. **Wounds UK** v. 3, n.4, p 76-86, 2007.

RODRIGUES, N.O.L. **Estudo da liberação controlada de fármacos por hidrogéis de PVA/atapulgita**. Monografia de conclusão de curso. Faculdade de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

RODRIGUES M. A.; RUGGIERO R.; GUERRA W. **Compostos inorgânicos como fármacos**. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, n° 155, 2009. Disponível em <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/645/article/30001519/pdf>. Acesso em 29/11/2015.

ROHMAN, A. Application of fourier transform infrared spectroscopy for quality control of pharmaceutical products: a review. **Indonesian Journal Pharmaceutical** v. 23, n. 1, p. 1- 8, 2012.

ROGERO S.O. et al., Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research** v.6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAHA, N. et al. Polymeric biomaterial based hydrogels for biomedical. **Applications Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology** v. 2, p. 85-90, 2011.

SANTOS Jr, N.; MORETTO, L. D. **Estabilidade de fármacos e medicamentos**. São Paulo: Febrapharma (Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica), 2005.

SHAHZAD, M. N.; AHMED, N. Effectiveness of *Aloe Vera* gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. **Journal Pakistan Medical Association** v. 63, n.2, p. 225-230, 2013.

SHAIKH, H. K.; KSHIRSAGAR, R.V.; PATIL, S.G. Mathematical models for drug release characterization: a review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.4, n.4, p. 324-338, 2015.

SILVA, K.E.R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v.30, n.2, p.129-135, 2009.

SONG A.; RANE A.A; CHRISTMAN K.L. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing. **Acta Biomaterials** v. 8, n. 1, p. 41-50, 2012.

SOUZA, G. D. et al. Silver: brief history, properties and applications. **Educación Química** v. 24, n.1, 2013. Disponível em:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187893X2013000100003&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 15/06/2015.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica** 8ª ed., São Paulo: Thomson Editora, 2006.

STASKO J.; KALNINS M.; DZENE A.; TUPUREINA V. Poly (vinyl alcohol) hydrogels. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences** v. 58, p. 63-66, 2009.

TAVARES, W. S.; SILVA, R.S. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Queimaduras** v. 14, n.4, p. 300-330, 2015.

ULERY, B.D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C.T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics** v. 49, p. 832–864, 2011.

VASHIST A. et al. Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. **Journal Material Chemistry** v. 2, p.147-166, 2014.

VERMEULEN H. et al. Topical silver for treating infected wounds. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2007, Issue 1. Art. n.: CD005486.
doi:10.1002/14651858.CD005486.pub2.

VILLANOVA J.C.O. et al. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.

WANG, M.O. et al. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of crosslinked biomaterials. **Biomacromolecules** v.15, n. 5, p. 1321-1329, 2013.

WHITE, R. J.; COOPER, R. Silver sulphadiazine: A review of the evidence. **Wounds**, KS, 51-61, 2005 Disponível em:
<http://www.woundsinternational.com/media/issues/114/files/content78.pdf>
Acesso em: 08/06/2016.

WOODWARD, M. Dressings in wound healing: What is the evidence? **Primary Intention: The Australian Journal of Wound Management**, v. 13, n. 4, p.153-160, 2005 Disponível em: <<http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=611391720728213;res=IELHEA>
Acesso em: 08/06/2016.

YANG, T. **Mechanical and swelling properties of hydrogels**, KTH Ytbehandlingsteknik, Doctoral thesis, p. 77, 2012.