



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY

**FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM UM DERIVADO N-
ACILIDRAZÔNICO PARA TRATAR LESÕES CUTÂNEAS**

CAMPINA GRANDE

2019

DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY

**FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM UM DERIVADO N-
ACILIDRAZÔNICO PARA TRATAR LESÕES CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Bolívar Ponciano G. de Lima Damasceno

Coorientadora:

Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima

CAMPINA GRANDE

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

W245f Wanderley, Davidson Marrony Santos.
Filmes poliméricos de quitosana com um derivado N-acilidrazônico para tratar lesões cutâneas [manuscrito] / Davidson Marrony Santos Wanderley. - 2019.
95 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Bolívar Ponciano G. de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia - CCBS."
"Coorientação: Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Biopolímero. 2. Filmes poliméricos. 3. Inflamações tóxicas. 4. Citotoxicidade. I. Título
21. ed. CDD 615.1

DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY

**FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM UM DERIVADO N-
ACILIDRAZÔNICO PARA TRATAR LESÕES CUTÂNEAS**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
para obtenção do título de mestre.**

Aprovado em: 24/01/2019

BANCA EXAMINADORA



**Prof. Dr. Bolivar Ponciano Goulart de Lima Damasceno
Departamento de Farmácia/UEPB
Orientador**



**Profa. Dra. Lidiane Pinto Correia
Universidade Maurício de Nassau
Avaliadora**



**Prof. Dr. Solomon Kweku Sagoe Amoah
Universidade Federal de Campina Grande
Avaliador**

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por sua infinita graça e misericórdia.

Aos meus pais Cleide Santos Wanderley e Alexandre Wanderley Lins, pelo amor incondicional. Obrigado pelo apoio, compreensão e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram. Sem vocês esta caminhada jamais seria possível.

A minha namorada Ayalla Waleska, por todo amor, carinho, incentivo e paciência.

A meu orientador Bolívar Damasceno, pelas contribuições e auxílio ao amadurecimento profissional e científico. Principalmente pelos ensinamentos no nível acadêmico. Muito obrigado.

À minha coorientadora Rosemary Sousa Cunha Lima, por nunca me negar a mão estendida e por todos os ensinamentos profissionais e morais desde a graduação. Muito obrigado.

Ao professor Ricardo Moura por disponibilizar a molécula utilizada no estudo e pelas grandes contribuições ao longo da pesquisa.

Aos professores Lidiane Pinto Correia e Solomon Kweku Sagoe Amoah, membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições.

Aos meus amigos, Demis Ferreira, Laryssa Mirelle, Wesley Castro, Bruna Pereira, Malu Reis, Willian Moura, Thayse Silva, Joandra Maísa, Larissa Pereira e Amaro Assis. Vocês foram muito importantes nesta conquista.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF).

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (Certbio) da UEPB e UFCG, pela disponibilidade e acessibilidade.

E finalmente a CAPES/CNPQ pelo apoio financeiro e incentivo.

Meu muito obrigado!

RESUMO

A subunidade *N*-acilidrazona está presente em várias moléculas bioativas e em candidatos a protótipos de fármacos, porém ainda é um composto pouco explorado. A associação de um derivado *N*-acilidrazônico (JR19) que apresenta atividade anti-inflamatória já estudada, com a quitosana (QTS), um biopolímero com características farmacêuticas atrativas, pode representar uma proposta inovadora para o tratamento de inflamações tópicas, na forma de filmes. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e realizar estudo de citotoxicidade dos filmes de QTS com e sem a incorporação da molécula JR19. Os filmes foram desenvolvidos a partir do método sol-gel e as técnicas utilizadas para a devida caracterização e outros ensaios foram a de resistência ao dobramento, ensaio de tração, grau de intumescimento, molhabilidade por medidas do ângulo de contato, microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), rugosidade, cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria e sua derivada (TG/DTG), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX). Além disso, foi realizada a análise de difusão em ágar para o estudo de citotoxicidade *in vitro*. Os filmes apresentaram, a partir dos resultados da MO, MEV e através do ensaio de resistência, a presença de cristais da molécula isolada da JR19 quando incorporadas no filme de QTS. Além disso, apresentaram modificações de absorção de água e resistência mecânica destes filmes, quando comparado com os filmes de QTS sem a JR19 incorporada. Os filmes de QTS+JR19 apresentaram compatibilidade nas curvas de DSC da mistura física [QTS:JR19 (1:1)] e ausência de incompatibilidade química dos filmes de QTS com a JR19. O TG/DTG apresentou características semelhantes de perda de massa entre as amostras, prevalecendo às características da QTS isolada nos filmes com JR19, sendo a segunda etapa (151,77-495,28 °C, $\Delta m = 44,51\%$) das três etapas visualizadas, a principal. Os espectros de infravermelho da mistura física e do filme com a molécula exibiram bandas características dos grupos funcionais de JR19 na mesma região de absorção, a exemplo da detecção da banda do estiramento da nitrila ($C\equiv N$), que variou entre 2279 a 2264 cm^{-1} . As reflexões observadas nos difratogramas indicaram diminuição da cristalinidade dos filmes quando comparados à mistura física e omissão de algumas reflexões de JR19 nos filmes com a molécula incorporada. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* por meio do método de difusão em ágar revelou quantitativamente e qualitativamente que os filmes de QTS e QTS+JR19 apresenta um caráter atóxico, resultado este satisfatório para futuros testes *in vivo*. Portanto, as técnicas utilizadas permitiram caracterizar a formulação de QTS e JR19, mostrando-se bastante promissoras para o desenvolvimento destes filmes como nova proposta de tratamento farmacêutico em lesões cutâneas.

Palavras-chave: JR19, Biopolímero, Inflamações Tópicas, Caracterização Físico-Química, Citotoxicidade.

ABSTRACT

The *N*-acylhydrazone subunit is present in several bioactive molecules and in drug prototype candidates, but is still a poorly exploited compound. The association of an *N*-acylhydrazone derivative (JR19) with anti-inflammatory activity already studied with chitosan (CHI), a biopolymer with attractive pharmaceutical characteristics, may represent an innovative proposal for the treatment of topical inflammations in the form of films. The aim of this work was to develop, characterize physico-chemically and perform cytotoxicity study of CHI films with and without the incorporation of the molecule JR19. The films were developed from the sol-gel method and the techniques used for the proper characterization and other tests were of resistance to folding, traction test, swelling degree, wettability by contact angle measurements, optical microscopy (OM) scanning electron microscopy (SEM), roughness, analytical thin layer chromatography (ATLC), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry and its derivative (TG / DTG), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) X-ray diffraction (XRD). In addition, agar diffusion analysis was performed for the in vitro cytotoxicity study. The films presented, from the results of MO, MEV and through the resistance test, the presence of crystals of the isolated molecule of JR19 when incorporated in the CHI film. In addition, they showed modifications of water absorption and mechanical strength of these films, when compared to CHI films without the incorporated JR19. The CHI + JR19 films showed compatibility in the DSC curves of the physical mixture [QTS: JR19 (1: 1)] and absence of chemical incompatibility of QTS films with JR19. The TG / DTG presented similar characteristics of loss of mass between the samples, prevailing to the characteristics of the CHI isolated in the films with JR19, the second stage (151.77-495.28 °C, $\Delta m = 44.51\%$) of the three displayed steps, the main one. The infrared spectra of the physical mixture and the film with the molecule exhibited bands characteristic of the functional groups of JR19 in the same absorption region, for example the detection of the nitrile stretch band ($C\equiv N$), which ranged from 2279 to 2264 cm^{-1} . The reflections observed in the diffractograms indicated decreased crystallinity of the films when compared to the physical mixture and omission of some reflections of JR19 in the films with the incorporated molecule. The evaluation of in vitro cytotoxicity by means of the agar diffusion method revealed quantitatively and qualitatively that the CHI and CHI + JR19 films presented a nontoxic character, a result that is satisfactory for future in vivo tests. Therefore, the techniques used allowed to characterize the formulation of CHI and JR19, showing very promising for the development of these films as a new proposal of pharmaceutical treatment in cutaneous lesions.

Keywords: JR19. Biopolymer. Topical Inflammation. Physical-Chemical Characterization. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da JR19.	14
Figura 2 – Estrutura da pele.	16
Figura 3 – Estrutura da epiderme.	18
Figura 4 – Representação gráfica da resposta normal de pele a feridas, mostrando o número relativo das principais células durante as três fases do processo de cicatrização.	20
Figura 5 – Estrutura da (a) quitosana e (b) quitina.	25
Figura 6 – Absorção de proteínas em materiais poliméricos.	27
Figura 7 – Comparação dos perfis de liberação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de liberação convencional, por várias doses e de um sistema de liberação controlada, versus tempo.	28
Figura 8 – Classificação do SLC de fármacos e suas principais vidas de administração.	29
Figura 9 – Reação geral de formação de uma hidrazona.	31
Figura 10 – Estrutura básica da função N-acilidrazona e seus perfis de bioatividade.	32
Figura 11 – Síntese de derivados N- acilidrazonas indólicos, utilizando (i) AcOH (em algumas rotas) e EtOH em temperatura ambiente.	33
Figura 12 – Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície sólida.	38
Figura 13 – Registros fotográficos do filme de QTS e filme de QTS+JR19.	43
Figura 14 – Registros fotográficos do filme de QTS (com fissura) e filme de QTS+JR19 (sem fissura) após 300 dobragens.	44
Figura 15 – Gráfico com os valores referente à resistência a tração (Mpa) dos filmes de QTS e QTS+JR19.	45
Figura 16 – Gráfico com os valores referente à deformação (%) dos filmes de QTS e QTS+JR19.	46
Figura 17 – Gráfico com os valores referente ao GI (%) dos filmes de QTS e QTS+JR19, nos tempos de 1, 2, 3 e 24 horas.	47
Figura 18 – Gráfico com os valores referente à Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato das amostras analisadas.	48
Figura 19 – Microscopia óptica do filme de QTS, com aumento de 140x.	49
Figura 20 – Microscopia óptica do filme QTS+JR19, com aumento de 140x e 3500x.	50
Figura 21 – Microscopia óptica da molécula JR19, com aumento de 140x e 3500x.	50
Figura 22 – MEV do filme de QTS e QTS+JR19, com aumento 2000x.	51
Figura 23 – Imagens topográficas e perfil de rugosidade do filme de QTS.	52

Figura 24 – Imagens topográficas e perfil de rugosidade do filme de QTS+JR19.	53
Figura 25 – Registros fotográficos das placas de CCDA com marcas de filmes de QTS (1), filme de QTS+JR19 (2) e molécula da JR19 (3), utilizando diferentes fases móveis.	54
Figura 26 – Curvas de DSC das amostras.	56
Figura 27 – Curvas de TG/DTG das amostras	58
Figura 28 – Espectro de FTIR das amostras.	60
Figura 29 – Difractogramas das amostras.	61
Figura 30 – Fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x e 20x dos controles negativos e positivos, revelando a ausência de descoramento e descoramento ao redor e sob as amostras, respectivamente.	63
Figura 31 – Fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x e 20x dos filmes de QTS e QTS+JR19, revelando a ausência de descoramento ao redor e sob as amostras.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas dos filmes QTS e QTS+JR19 em termos de espessura e resistência de dobramento.	45
Tabela 2 – Resultados de decomposição térmica e eventos calorimétricos da JR19, QTS, QTS+JR19, Filme de QTS e de QTS+JR19.	57
Tabela 3 – Principais bandas observadas nos espectros de FTIR das amostras.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINE _s	Anti-inflamatórios não esteroides
CCDA	Cromatografia de Camada Delgada Analítica
Certbio	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
COX	Cicloxygenase
DRX	Difratometria de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EXO	Exotérmico
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação
GI	Grau de Intumescimento
IC	Inclinação da Curva
LD	Limite de Detecção
LDCPF	Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos
LQ	Limite de Quantificação
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular
MEC	Matriz extracelular
MEM	Meio Mínimo de Eagle
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Ótica
OTAN	Organização do Tratado do Atlântico Norte
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEAD	Polietileno de alta densidade
QTS	Quitosana
Ra	Rugosidade média
SLC	Sistema de Liberação Controlada
TG/DTG	Termogravimetria e sua Derivada
TGF- α	Fator de Crescimento transformante alfa

TGF- β	Fator de Crescimento transformante beta
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UV/VIS	Absorção Ultravioleta/Visível
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERÊNCIA TEÓRICO	15
2.1	Pele	15
2.1.1	Hipoderme	16
2.1.2	Derme	18
2.1.3	Hipoderme	19
2.2	Inflamação e cicatrização	19
2.3	Biomateriais	23
2.4	Quitosana	24
2.5	Filmes de Quitosana	26
2.6	Sistema de liberação controlada de fármacos	27
2.7	Derivados acilhidrazônicos	29
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Material	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	Desenvolvimento dos filmes de QTS E QTS+JR19	36
4.2.2	Caracterização físico-química dos constituintes e filmes formados	37
4.2.2.1	<i>Ensaio de Resistência ao dobramento</i>	37
4.2.2.2	<i>Ensaio de Tração</i>	37
4.2.2.3	<i>Grau de Intumescimento</i>	37
4.2.2.4	<i>Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato</i>	38
4.2.2.5	<i>Microscopia Óptica (MO)</i>	38
4.2.2.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	38

4.2.2.7	<i>Rugosidade</i>	39
4.2.2.8	<i>Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA)</i>	39
4.2.2.9	<i>Análise Térmica</i>	39
4.2.2.9.1	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	39
4.2.2.9.2	<i>Termogravimetria (TG) e sua Derivada (DTG)</i>	40
4.2.2.10	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	40
4.2.2.11	<i>Difração de raios-X (DRX)</i>	40
4.2.2.12	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro - Método de Difusão em Ágar</i>	40
4.2.2.12.1	<i>Avaliação da citotoxicidade in vitro – Método de Difusão em Ágar</i>	42
5	RESULTADOS	43
6	CONCLUSÃO	66
	PERSPECTIVAS FUTURAS	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	APÊNDICE I	80
	APÊNDICE II	92
	ANEXO I	94

1 INTRODUÇÃO

Considerada o maior órgão do corpo humano, a pele é responsável por diferentes funções, como proteção contra atrito, radiação ultravioleta, perda de água e invasão de microrganismo. Além de desempenhar o papel de barreira de ataque externo, a pele possui um papel importante na percepção do tato, bem como do processo de termorregulação corpórea pelo o ajuste do fluxo sanguíneo e da transpiração (SZWED; SANTOS, 2016).

Quando a pele é acometida por um rompimento tecidual, imediatamente inicia-se o processo de cicatrização da ferida, que é realizado de modo dinâmico, complexo, contínuo e independente que envolve fases sobrepostas, para regeneração do tecido (BARATIERI; SANGALETI; TRINCAUS, 2015). Apesar da variedade de curativos já comercializados, destinados para a regeneração de feridas, não há um produto existente que vai ao encontro de um curativo ideal, visto que a escolha do produto depende de vários fatores, como, condição do paciente, tipo da ferida e estágio da lesão (MOURA et al., 2013). Deste modo, existe uma necessidade real por materiais que possam acelerar o processo de cicatrização, além de propiciar uma maior segurança ao paciente (WIEGAND; HIPLER, 2010).

De acordo com os estudos de Muzzarelli (2009), os avanços mais recentes utilizados para tratar as lesões de pele, estão relacionados ao uso de materiais com atividade biológica que auxiliam o processo de cicatrização do tecido danificado, melhorando assim a aparência e funcionalidade do órgão. Neste contexto, a quitosana (QTS), um polímero natural formado por unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e produto do processo de desacetilação parcial da quitina, vem sendo utilizado no desenvolvimento destes novos curativos (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015; DIAS et al., 2013; YUDANOVA; RESHETOV, 2006).

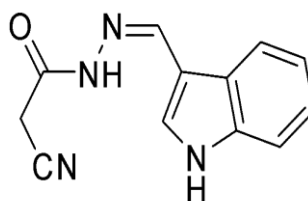
A QTS é um polímero natural que apresenta diversas características atrativas para indústria farmacêutica, tais como: abundância, ausência de toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, propriedades anticancerígenas, além de ser um substrato barato que podem ser produzidos a partir de componentes residuais, como crostas de fruto do mar (KALAYACIOGLU et al., 2017; YUAN; CHEN; LI, 2016). A QTS vem sendo empregada na preparação de micropartículas, filmes, microcápsulas e microesferas, sendo designadas para diversos fins em áreas tecnológicas, como por exemplo, biotecnologia, cosméticos, processamento de alimentos, produtos biomédicos como curativos cirúrgicos e principalmente em sistemas de liberação de

compostos ativos (MATTÉ; ROSA, 2013). Além disso, a QTS promove o processo de cicatrização, por possuir a propriedade de se associar ao tecido lesionado, visto que, alguns dos curativos já desenvolvidos com este biopolímero se mostraram eficazes (WIEGAND; HIPLER, 2010).

Devi e Dutta (2017) em seu estudo, reforçam a utilização de filmes de QTS para tratar feridas cutâneas, nas quais mostram as diversas vantagens que este polímero pode trazer, quando associado à bentonita, que é uma mistura de grãos finos de argila. Os autores revelaram que o filme formado pela associação dos componentes mostrou biocompatibilidade com o sangue, além de apresentarem propriedades necessárias para aplicações em lesões cutâneas como a melhora de propriedades físico-químicas do filme e por exibirem boa atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*).

Em virtude da necessidade de novas propostas farmacoterapêuticas por via tópica para tratar lesões cutâneas, os derivados *N*-acilidrazônico surgem como uma importante classe de compostos químicos sintéticos que apresentam pronunciadas propriedades biológicas anti-inflamatórias (MEIRA et al., 2018; AMARAL et al., 2017). Com isso, o sinergismo da atividade farmacológica da JR19 com as propriedades da QTS na forma de filme podem representar um sistema promissor no tratamento destas inflamações e potencializar a biodisponibilidade farmacológica, representando segurança e conforto de aplicação de futuros medicamentos na forma de curativos. Desta forma, o estudo teve como objetivo utilizar um derivado *N*-acilidrazônico, de nomenclatura *N'*-(1*H*-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19) (Figura 1), incorporado em filmes poliméricos de QTS, considerando os resultados preliminar de Apolinário (2016), em que a molécula isolada apresentou atoxicidade e atividade anti-inflamatória *in vivo*.

Figura 1 – Estrutura química da *N'*-(1*H*-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19).



Fonte: autoria própria.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pele

A pele é o primeiro sistema de defesa do ser humano, funcionando como uma barreira contra agentes físicos e patógenos, isolando e protegendo as estruturas internas do organismo. Este tecido corresponde a 16% do peso corpóreo e, em adultos, sua área superficial é de 1,5 a 2,0 m², podendo representar um peso de 8 a 10 Kg, caracterizando-o assim, como o maior órgão do corpo humano. Graças a sua estrutura complexa, composta por diferentes células que trabalham de forma harmônica, a pele pode exercer diferentes funções, como manutenção da sua própria integridade e da integridade do organismo e proteção contra agressões e agentes externos. A imunovigilância cutânea, por exemplo, é conferida pelas células de Langerhans que capturam alérgenos e os apresentam para linfócitos T, levando ao recrutamento das células imunoprotetoras da pele (HIRAO, 2017; HARRIS, 2018).

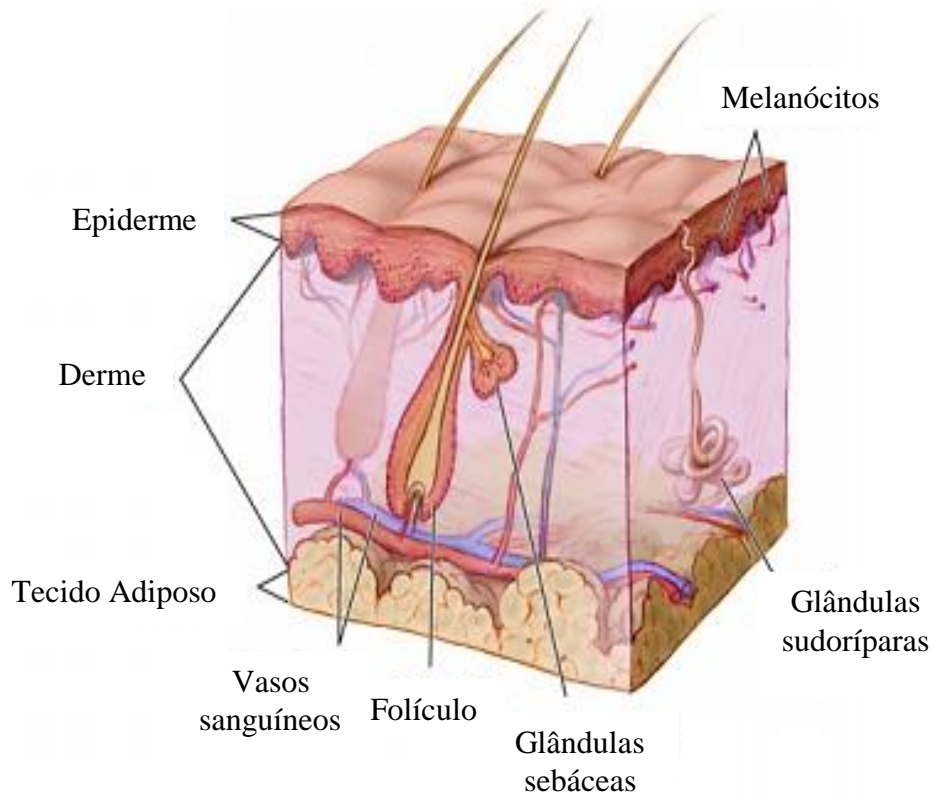
Além de apresentar funções estéticas e sensoriais, a pele também atua na absorção e secreção de líquidos, controle de temperatura, barreira à prova d'água, proteção física contra efeitos nocivos da luz ultravioleta e metabolismo da vitamina D. Toda a superfície da pele apresenta receptores que percebem o sentido do tato e transferem imediatamente este estímulo para o cérebro, tornando a sobrevivência e comunicação humana possível (CAETANO, 2012; CRUZ; CORDOVIL; BATISTA, 2012; QUEIROZ et al., 2014; HIRAO, 2017; HARRIS, 2018).

A pele (Figura 2) constitui-se de uma membrana de camada dupla que envolve toda superfície exterior do corpo e estende-se pelos vários orifícios naturais, por meio das membranas mucosas que os revestem. A camada epitelial mais externa é a epiderme, formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que se conecta através da membrana basal a derme, camada localizada sob a epiderme e formada por tecido conjuntivo frouxo e denso não modelado. Ainda, subjacente à pele encontra-se um tecido adiposo subcutâneo, definido como hipoderme. As respectivas camadas apresentam células especializadas e entre elas destacam-se os queratinócitos, que representam 80% das células encontrados na epiderme, os fibroblastos e macrófagos, encontrados na derme (SZWED; SANTOS, 2016; HIRAO, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; HARRIS, 2018).

Além das camadas teciduais da pele, outras estruturas fazem parte deste órgão e são chamadas de anexos cutâneos, os quais são compostos por: pelos, glândulas sebáceas, unhas e glândulas sudoríparas. Os pelos são responsáveis por manter a temperatura da pele; as

glândulas sebáceas evitam o ressecamento do pelo, deixam à pele macia e evitam a manifestação de certas bactérias, por meio da sudorese; as unhas auxiliam nos estímulos sensoriais e as glândulas sudoríparas são responsáveis pela produção e transporte do suor, agindo como reguladores térmicos (COSTA, 2009).

Figura 2 – Estrutura da pele.



Fonte: adaptado de CASTRO, 2018.

2.1.1 Epiderme

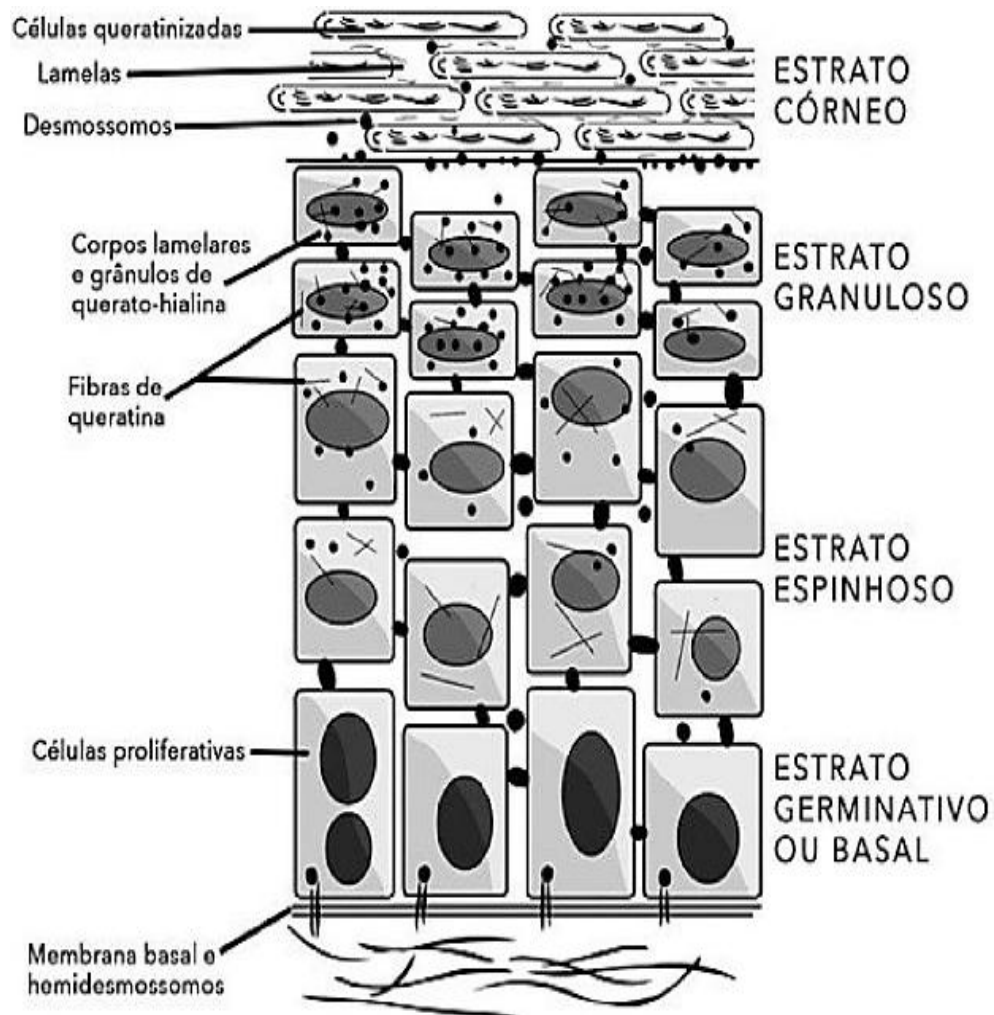
A epiderme apresenta espessura de 0,1 a 0,2 mm e estrutura organizada de forma compacta e impermeável, perfurada por poros dos folículos pilossebáceos e das glândulas sebáceas e sudoríparas, que são originadas na derme, mas são apêndices da epiderme. Os mesmos são unidos pela membrana basal, que é uma camada rica em células tronco e responsável, juntamente com a camada espinhosa, pela manutenção constante da epiderme (HIRAO, 2017; HARRIS, 2018).

A epiderme é a camada mais externa da pele e apresenta um pH discretamente ácido, aspecto este que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície.

Além disso, é recoberta por epitélio queratinizado, sustentada pela derme e pelo tecido conjuntivo subjacente e contém melanócitos, que conferem cor à pele, cabelos e pelos. Nesta camada, são encontradas as células de Langerhans suprabasais e as de Merkel basais, células neuroendócrinas que atuam na proliferação de queratinócitos e parecem ter papel importante na regulação de doenças cutâneas (BOULAIS et al., 2009; EULÁLIO, 2016).

Junqueira e Carneiro (2017) citam que a epiderme é constituída de quatro ou cinco camadas ou estratos (Figura 3), devido o estrato lúcido ser encontrado apenas nas regiões de pele espessa. Estes estratos são classificados em: (1) estrato germinativo ou basal, constituído por células prismáticas na base da membrana basal, limite entre a derme e a epiderme. É responsável pela renovação constante da epiderme, participando da substituição de células que são perdidas no estrato córneo (SOUTO et al., 2006; GOMES, 2016); (2) estrato espinhoso, constituído por células cuboides ligeiramente achatadas, com feixes de queratina em sua matriz citoplasmática que se unem às células vizinhas através dos desmossomos. Estas estruturas em conjunto, promovem coesão entre as células, aumentando a resistência da epiderme ao atrito (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006; GOMES, 2016); (3) estrato granuloso, constituído por células achatadas dispostas em 3 a 5 fileiras. A matriz citoplasmática dessas células é rica em grânulos de querato-hialina, que parecem estar associados com o fenômeno de queratinização dos epitélios e morte das células do estrato granuloso, pois à medida que aumentam de tamanho, o núcleo se desintegra. Essa disposição proteica contribui para tornar a pele impermeável a água, impedindo a desidratação corpórea (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006; GOMES, 2016; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017); (4) estrato lúcido, constituído por células achatadas sem núcleo e citoplasma abundante de filamentos de queratina e organelas citoplasmáticas. Atua como importante barreira entre o meio interno e o externo da epiderme, impedindo a saída de água e a entrada de substâncias exógenas (GOMES, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017); e, por fim, o (5) estrato córneo, constituído por células achatadas com citoplasma composto por filamentos queratina e outros seis polipeptídios. É nesse estrato que os filamentos de queratina se aglutinam com os grânulos de querato-hialina, formando uma cobertura ao redor de toda superfície corpórea, restringindo a perda de água e protegendo-a de agressões físicas, químicas e biológicas (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006; GOMES, 2016).

Figura 3 – Estrutura da epiderme.



Fonte: adaptado de HARRIS, 2018.

2.1.2 Derme

É uma espessa camada de tecido conjuntivo, de origem mesodérmica, sobre a qual a epiderme é sustentada e comunica-se com a hipoderme. É uma camada vascularizada, suprida por vasos linfáticos, terminações nervosas, glândulas especializadas e órgãos dos sentidos (GUIRRO; GUIRRO, 2004). A derme possui espessura de 1 a 4 mm e é essencialmente constituída por matrizes extracelulares, como colágenos e elastina. Esta última arquiteteta uma rede na derme que fornece propriedades físicas para recuperação da mesma após deformações da pele. Nas interfaces destas estruturas proteicas, são encontrados vários mucopolissacarídeos, como o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparano (HIRAO, 2017).

A derme encontra-se dividida em dois estratos: (1) papilar ou superficial, camada delgada constituída por tecido conjuntivo frouxo, composto por fibras colágenas, elásticas e por muitos vasos sanguíneos que fornecem nutrientes e oxigenação à epiderme. Além disso, remove produtos de excreção e auxilia na regulação da temperatura corporal (GUIRRO; GUIRRO, 2004; COSTA, 2009); e (2) reticular, camada profunda e espessa, constituída de feixes densos de fibras de colágenos, em várias direções, que lhe atribuem característica de tecido conjuntivo denso. Este estrato, como o papilar, também é composto de fibras elásticas, além de possuir vasos sanguíneos (em menor quantidade), linfáticos e células nervosas. São encontradas também, estruturas derivadas da epiderme, como folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

2.1.3 Hipoderme

A hipoderme ou tecido subcutâneo é uma camada de espessura variável, a qual a pele repousa. É formada por tecido conjuntivo frouxo ao denso, ou adiposo, dependente da localização e das características do indivíduo. Esta camada é constituída por lóbulos de adipócitos, delimitados por septos de colágenos com vasos sanguíneos e linfáticos. Funcionalmente, além de modelar a superfície corpórea, a hipoderme comporta-se como depósito de calor, participa no isolamento térmico, na proteção mecânica do organismo de traumas externos (GUIRRO; GUIRRO, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Por ser o tecido de camada mais profunda, a hipoderme é conectada com a fáscia dos músculos subjacentes, permitindo a contração dos mesmos sem repuxar a pele. É composto por dois estratos: (1) areolar, que possui um caráter mais superficial e é formado por adipócitos globulares e de grande volume em disposição vertical; e (2) lamelar, que é composto por células de menor porte, de características alongadas e no plano horizontal. É nesse estrato em que ocorre a maior susceptibilidade de aumentos da espessura da hipoderme, devido ao acúmulo de adipócitos (BORGES, 2006).

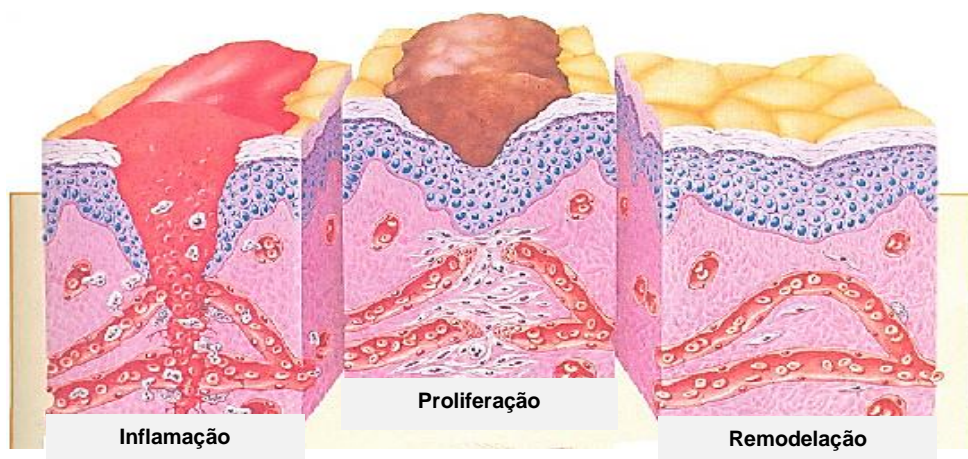
2.2 Inflamação e cicatrização

A inflamação é definida como uma resposta dos tecidos vascularizados, desencadeada por estímulos nocivos, incluindo infecções, reações imunológicas e lesões teciduais. A resposta inflamatória é caracterizada por acúmulo de fluidos e de leucócitos com a finalidade

de eliminar os agentes agressores (HERNÁNDEZ et al., 2013; ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2016). Neste contexto, quando se trata de lesões cutâneas, considerada uma interrupção da continuidade da pele, que caracteriza uma ferida, o conhecimento a respeito de tal processo se torna relevante para cicatrização e, conseqüentemente, para homeostasia do organismo e bem-estar do paciente (BARATIERI; SANGALETI; TRINCAUS, 2015; SILVA, 2015).

O processo de reparo tecidual é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é dado de forma sistêmica e dinâmica e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. A cicatrização de feridas é coordenada a partir de uma cascata de eventos celulares, bioquímicos e moleculares que interagem entre si para que ocorra a reconstituição do tecido danificado. Carrel, em 1910, descreveu o mecanismo de cicatrização, o qual foi dividido em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelação da ferida. Porém, foi reclassificado em três fases, que são usadas até os dias atuais, denominadas de: fase inflamatória, fase de proliferação ou granulação e a fase de remodelação ou de maturação, conforme a Figura 4 (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Figura 4 – Representação gráfica da resposta normal de pele a feridas, mostrando o número relativo das principais células durante as três fases do processo de cicatrização.



Fonte: adaptado de Isaac et al (2010).

A fase inflamatória ocorre logo após o rompimento tecidual, se prolongando normalmente por um período de 24 a 72 horas e tem como objetivo reparar o tecido e sua respectiva funcionalidade. Um coágulo sanguíneo é formado nesta etapa, a fim de estancar o sangramento e viabilizar uma matriz rica em fatores de crescimento e quimiocinas, dando suporte para a migração leucocitária e de células estromais. Os neutrófilos surgem após 24

horas, iniciando-se o processo de esterilização da ferida e degradação dos resíduos presentes na lesão (MITCHELL et al., 2012; ALMEIDA, 2017).

Nesta fase há liberação de mediadores químicos originados dos tecidos lesados e células migratórias, tais como metabólitos do ácido araquidônico (AA), histamina, interleucinas, óxido nítrico, proteases plasmáticas e radicais livres derivados do oxigênio. A cascata do metabolismo do AA é fundamental na inflamação a qual é metabolizada por três principais sistemas enzimáticos: a cicloxigenase (COX), lipoxigenase e citocromo P450. As prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos lipoxinas e metabólitos da via epoxigenases, derivados deste metabolismo possuem papel importante na indução e facilitação de patologias, especialmente de doenças inflamatórias (APOLINÁRIO, 2016).

A fase de granulação é estabelecida após dois dias da lesão, a partir da proliferação de fibroblastos e do endotélio, caracterizando a formação de um tecido conjuntivo frouxo vascularizado e marcando o início da reparação do tecido. Nesta fase, ainda existe a constituição de edema local, pois os vasos até este momento não possuem boa vedação, o que aumenta a deposição de proteínas e líquidos na lesão. Esta primeira etapa do processo de cicatrização deve ser finalizada em até três dias. A proliferação celular ocorre no quarto dia, onde os neutrófilos são substituídos pelos macrófagos, fundamentais na limpeza de resíduos, no direcionamento da angiogênese e na deposição da matriz extracelular (MEC). Posteriormente, a estrutura do tecido de granulação é convertida em uma cicatriz composta de fibroblastos e colágenos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; MITCHELL et al., 2012; ALMEIDA, 2017).

No progresso da cicatrização, os macrófagos são reconhecidos como um dos principais elementos para produção dos vários fatores cicatriciais, em especial o agente de crescimento transformador de fibrinogênio TGF- β , que promoverá a migração e proliferação de fibroblastos e produção da MEC. Após duas semanas, o tecido da lesão é convertido em uma cicatriz avascular, sem inflamação e coberta por epitélio íntegro. A contração da cicatriz ocorre em lesões maiores, devido à ação de miofibroblastos, aspecto sintético dos fibroblastos e capacidade contrátil das células da musculatura lisa, reduzindo a área da ferida (MITCHELL et al., 2012; ALMEIDA, 2017).

A remodelação é a última fase da cicatrização, iniciando-se na fase proliferativa, quando os fibroblastos sintetizam o colágeno e outros componentes da MEC, responsáveis pela formação de um tecido cicatricial maduro. As metaloproteínases que são produzidas pelos neutrófilos, macrófagos, células epiteliais e fibroblastos, orientam as fibras a serem ressintetizadas e organizadas de acordo com o sentido das fibras do tecido conjuntivo

adjacente, resultando na formação de fibras de colágenos maiores e uma cicatriz com caráter mais uniforme (WILGUS, 2008; SANTOS, 2016; ALMEIDA, 2017).

Na reparação tecidual os fatores de crescimento desempenham papel fundamental por estimularem e ativarem a proliferação celular, angiogênese, mitogênese e transcrição genética. Os principais moduladores do processo cicatricial são o fator de crescimento transformador alfa e beta (TGF- α e TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (SZWED; SANTOS, 2016). As células responsáveis pela secreção desses fatores e suas respectivas funções estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Fatores de crescimentos do processo cicatricial.

Fator de crescimento	Origem	Função
TGF- α	Plaquetas, macrófagos e células epidérmicas	Angiogênese e epitelização
TGF- β	Plaquetas e macrófagos	Mitogênicos para fibroblastos Formação de tecido de granulação
PDGF	Plaquetas, macrófagos e células endoteliais	Quimiotaxia para neutrófilos, monócito e fibroblastos e produção de fibroblastos e de matriz extracelular
VEGF	Fibroblastos e macrófagos	Angiogênese tumoral e proliferação de células endoteliais
EGF	Plaquetas, macrófagos e células epiteliais	Reepitelização

Fonte: adaptado de SZWED; SANTOS, 2016.

Portanto, as lesões de pele representam um grande desafio para os profissionais da saúde, visto que os curativos de caracteres mais modernos são, em sua maioria, importados e de alto custo. Neste contexto, o desenvolvimento de matrizes poliméricas como dispositivos inovadores que atuem como matérias primas renováveis e sejam obtidos por tecnologias

simples e de baixo custo, pode favorecer a liberação controlada de fármacos e a obtenção de curativos diferentes dos convencionais (SILVA, 2015; LINO et al., 2017).

2.3 Biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados como naturais ou sintéticos, capazes de tratar, aumentar ou substituir quaisquer tecidos e órgãos por um período de tempo limitado ou definitivo, objetivando desempenhar uma função comprometida no organismo (WILLIAMS, 2009). Devem ser atóxicos, anticarcinogênicos, antimutagênicos e não desencadear resposta imune, visto que deve apresentar biocompatibilidade com o tecido vivo (ALVARADO, 2012).

A escolha de um biomaterial deve ser fundamentada nas suas propriedades e aplicações no organismo, baseando-se em parâmetros científicos e considerando os diversos fatores físicos, biológicos, clínicos e tecnológicos desejáveis (OREFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). Dentre os biomateriais naturais, encontram-se a quitosana, celulose e colágeno, que são de origem polimérica, e a hidroxiapatita de osso animal, que é de origem cerâmica. Já os de caráter sintético, encontram-se os polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e os compósitos (ALVARADO, 2012; NERY, 2014).

Os biomateriais podem ser classificados em duas categorias: (I) composição química e (II) comportamento biológico. A primeira categoria é subdividida em quatro classes: (a) metais e ligas metálicas, que são utilizados em reconstituição de implantes dentários e na substituição óssea e de articulações; (b) cerâmicas, que são utilizadas no aumento, reconstituição e substituição de articulações e estrutura óssea; (c) polímeros, que são utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos, reconstituição dentária, substituição de articulações, além de poder ser utilizada em novas tecnologias a exemplo de fios de suturas, bioadesivos e filmes poliméricos, dentre outras tecnologias; (d) compósitos, que são utilizados na reconstituição dentária e óssea, substituição óssea e de articulações (ALVARADO, 2012; NERY, 2014; TOMAZ, 2017).

Com relação ao comportamento biológico, fundamentado na resposta do tecido hospedeiro, também há subdivisão em quatro condições: (a) bioinertes, que provocam reações mínimas no organismo e encontram-se diretamente ligados ao tecido receptor, a exemplo do titânio (b) biotolerados, que são moderadamente aceitos pelo tecido receptor, o que pode induzir a formação de uma fina cápsula fibrosa, a exemplo do aço inoxidável; (c) bioativos, que interagem diretamente com o tecido vivo, induzindo uma resposta positiva, a exemplo da

aceleração do processo cicatricial pelo polímero natural quitosana; (d) reabsorvíveis, que são lenta e gradualmente degradados e substituídos pelos tecidos onde são implantados (WILLIAMS; CAHN; BEVER, 1990; TOMAZ, 2017).

Desta forma, entende-se a ciência dos biomateriais como uma área multidisciplinar, por abranger não apenas o desenvolvimento de produtos a serem utilizados como substitutos de tecidos comprometidos, mas também, por ser relacionada ao processo de interação dos biomateriais com o organismo receptor, no qual deve possuir biocompatibilidade e biofuncionalidade (VERT, 2007).

No campo da regeneração tecidual, tem sido intensificada a produção de biomateriais que tragam propriedades de preencher temporariamente o tecido lesionado, até que o processo de cicatrização se concretize ou que oriente esse processo regenerativo, através do desenvolvimento de curativos com potenciais propriedades farmacoterapêuticas para tratar lesões cutâneas, aumentando a qualidade de vida do paciente. Dentre os diversos biomateriais, a quitosana, um polímero de origem natural, vem se destacando neste contexto de regeneração tecidual, além de poder atuar como uma excelente via de liberação controlada de fármaco, dependendo da forma farmacêutica inserida (NERY, 2014; TOMAZ, 2017).

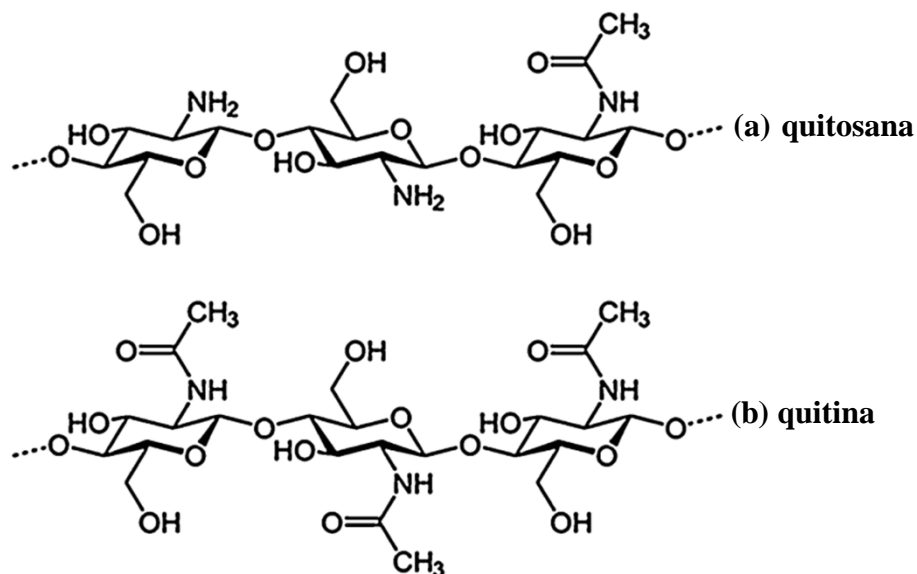
2.4 Quitosana

A quitosana (QTS) é um polímero natural formado por unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (Figura 5a) e constitui o produto do processo de desacetilação parcial da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose. A quitina (Figura 5b) é constituído de unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose, extraída de carapaças de crustáceos, do exoesqueleto de insetos e até mesmo da parede celular de alguns fungos (DIAS et al., 2013; SILVA; FIDELES; FOOK, 2015).

A quitina pode ser convertida em QTS por meios enzimáticos, pela ação de microrganismos e principalmente por meio da desacetilação alcalina, através de reações com o hidróxido de sódio (NaOH) ou por hidróxido de potássio (KOH) (MELO, 2014; BESSA; GONÇALVES, 2013). A total desacetilação da quitina em QTS raramente é realizada, pois são necessárias reações consecutivas, que possibilitem sua completa despolimerização, dada pela remoção/substituição dos radicais acetilas por um átomo de hidrogênio (BLANCO, 2011; LIMA, 2010). Desta forma, quando o grau de desacetilação se tornar maior que 50%, a quitina passa a ser solúvel em meio aquoso e o polímero passa a ser denominado QTS,

facilmente dissolvido em soluções de ácidos fracos (MATTÉ; ROSA, 2013; BLANCO, 2011).

Figura 5 – Estrutura da (a) quitosana e (b) quitina.



Fonte: adaptado de Van de Broek et al. (2015).

De acordo com Silva, Fideles e Fook (2015), pode-se entender que a QTS é caracterizada como termoplástico, por constituir cadeias poliméricas individuais conectadas por ligações fracas do tipo dipolo-dipolo e forças de Van der Waals. Devido a tais características, este polímero biodegradável pode ser facilmente processado por técnicas usuais e ser dissolvido em solventes levemente ácidos para formar filmes e outros dispositivos. Além disso, o estudo ressalva que a QTS pode apresentar formas variáveis quando relacionada com o grau de desacetilação e ao peso molecular. Tal diversidade em estrutura química e morfológica permite sua utilização em várias aplicações.

A QTS tem atraído interesses consideráveis em diversas áreas, devido a sua variedade de propriedades, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, hidrofiliabilidade favorável (CHEN et al., 2015), bioatividade, propriedades mucoadesivas (LINS et al., 2014), atividade anticoagulante (BALAN; VERESTIUC, 2014), atividade anti-inflamatória (SALEHI; DARAEI; SHAMSABADI, 2016), antimicrobiana (SILVA et al., 2015) e antifúngica (BANO et al., 2017), sendo estas duas últimas atividades relacionadas as ligações dos grupos catiônicos, presentes no esqueleto da QTS (VAN DE BROEK et al., 2015). O mecanismo pela qual a QTS atua como um composto antimicrobiano não é totalmente elucidado, porém, existem três hipóteses para tal atividade, sendo as duas primeiras explicadas por Benhabile et al. (2012) e Jing et al. (2007) e a terceira por Martinez-Camacho

et al. (2010), que são: (I) as cargas positivas, presentes na estrutura química da QTS, podem interagir com o metabolismo bacteriano através das cargas negativas (empilhamento eletrostático); (II) a QTS com baixo peso molecular pode entrar no núcleo da célula bacteriana e bloquear a transcrição de RNA em DNA; (III) a QTS pode atuar como agente quelante de minerais essenciais.

Neste contexto, a versatilidade da QTS desperta interesses de diversos pesquisadores que visam o desenvolvimento de novos produtos, nas mais diversas aplicações. Oliveira e Soldi (2009), por exemplo, desenvolveram filmes poliméricos de QTS para o recobrimento de sementes, de modo a diminuir os danos ambientais provocados por materiais sintéticos. Os autores também descrevem que os filmes de QTS atuam na proteção da semente, impedindo interferências externas, tais como a ação da umidade, dos gases e dos óleos. Além disso, a QTS é bastante utilizada na biomedicina, na indústria de cosméticos, na agricultura como fibra têxtil e no tratamento de água (WLADYMYR et al., 2013).

Balan e Verestiuc (2014) relatam, em sua revisão, que a QTS tem sido amplamente explorada no campo médico, em especial no processo anti-inflamatório e cicatrizante de feridas por possuírem características de quimioatração e por possibilitarem a ativação de macrófagos e neutrófilos, promovendo a regeneração tecidual. Além disso, os autores citam que várias formas hemostáticas à base de QTS, a exemplo de bandagens já são aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e certificados pela Organização do Tratado do Atlântico Norte (OTAN), onde foram usadas em campos de batalhas.

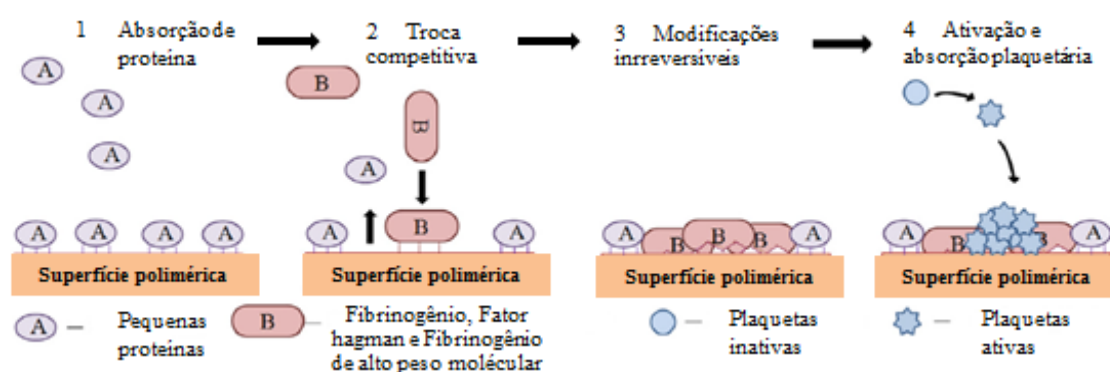
2.5 Filmes de Quitosana

Os filmes poliméricos têm sido bastante estudados na última década como potenciais dispositivos de liberação controlada de fármacos, por oferecer vantagens sobre outras formas farmacêuticas, tais como o aumento da biodisponibilidade de ativos em sistemas que sofrem metabolismos hepáticos, quando administrados por via oral, proporcionando a diminuição das múltiplas administrações diárias, devido à otimização da farmacoterapia por meio da regulação da concentração do composto no plasma. Além disso, a utilização de filmes poliméricos pode proporcionar o aumento da área superficial, adesão ao tecido danificado, devido a sua característica mucoadesiva e absorção de exsudatos que possibilitam a diminuição da proliferação microbiana, e termoregulação no local do rompimento tecidual (PEREIRINHA et al., 2014).

Na revisão de Bano et al. (2017) citam-se que as propriedades da QTS estão relacionados ao seu comportamento catiônico e ao tamanho da cadeia do polímero e que essas características o torna um vestuário ideal para tratar feridas. Nicolosi e Moraes (2005) reforçam a utilização de filmes de QTS como dispositivo que estimulam a proliferação celular e a organização dos tecidos, o que possibilita o crescimento celular e a presença de proteínas, que são essenciais para cicatrização da pele. Além disto, os respectivos filmes podem fortalecer o novo tecido, atuar como barreira de agentes infecciosos externos, tornar mínima a deformação cutânea, estimular a coagulação sanguínea, absorver os exsudatos da ferida e bloquear a terminações nervosas, reduzindo o sintoma de dor.

Neste contexto, Balan e Verestiuc (2014) construíram um esquema descrevendo o processo de absorção das proteínas com a superfície de materiais poliméricos, mostrando suas características de hemocompatibilidade e iniciação de uma resposta inflamatória, conforme a Figura 6.

Figura 6 – Absorção de proteínas em materiais poliméricos.



Fonte: adaptado de Balan e Verestiuc (2014).

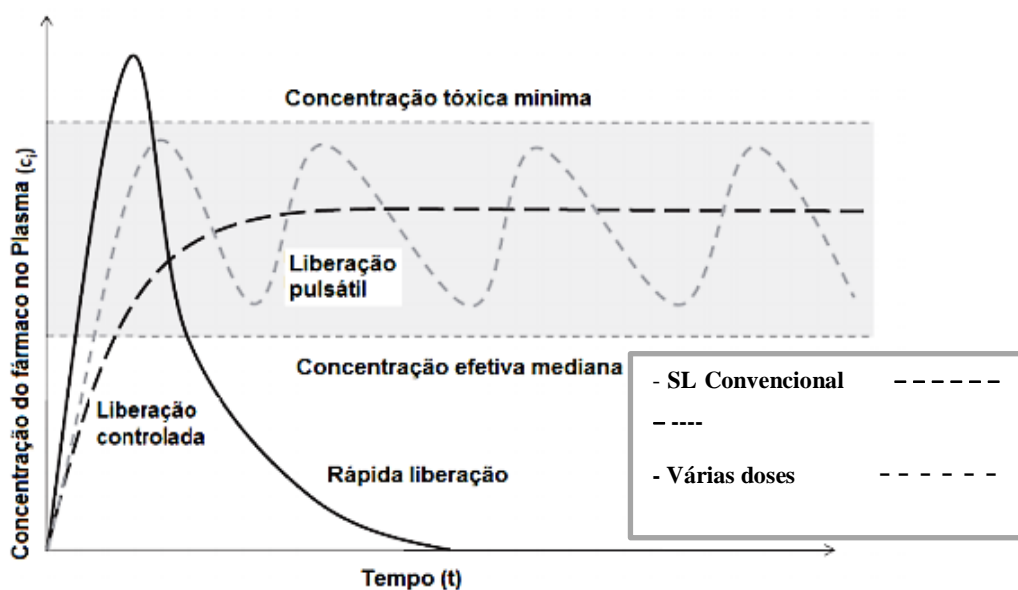
2.6 Sistema de liberação controlada de fármacos

Quando um fármaco é administrado no organismo por via oral, espera-se que o mesmo atinja concentrações plasmáticas ou níveis de concentrações adequadas nos tecidos e que seja seletivamente entregue a áreas específicas do corpo para maximizar o índice terapêutico (KINGSLEY et al., 2006). Porém, apenas uma fração da dose atinge o alvo terapêutico, devido à distribuição do fármaco a outros tecidos e pela sua metabolização ou excreção (COIMBRA, 2010).

A liberação de fármacos de alguns sistemas tradicionais ocorre de forma rápida e apresenta diversas limitações, as quais desfavorecem a entrega de ativos íntegros no local de ação e em tempo adequados com máxima eficácia. Podem-se citar: impossibilidade de manter uma concentração terapêutica do princípio ativo no sítio de ação correspondente, durante o tratamento; inevitável flutuação das concentrações do fármaco no local de ação que pode acarretar a submedicação; falha ou ineficiência terapêutica, devido à meia-vida biológica curta de certos fármacos, requerendo o uso frequente de doses para manter sua concentração plasmática dentro da faixa terapêutica (COLLET; MORETON, 2005; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; TOMAZ, 2017).

Os sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos objetivam prolongar e aperfeiçoar o controle de administração de ativos a fim de melhorar a ação terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais. Este sistema consiste em manter a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico, utilizando uma única dose, por período de tempo prolongado, conforme a Figura 7 (LANZILLOTTI, 2012).

Figura 7 – Comparação dos perfis de liberação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de liberação convencional, por várias doses e de um sistema de liberação controlada, versus tempo.



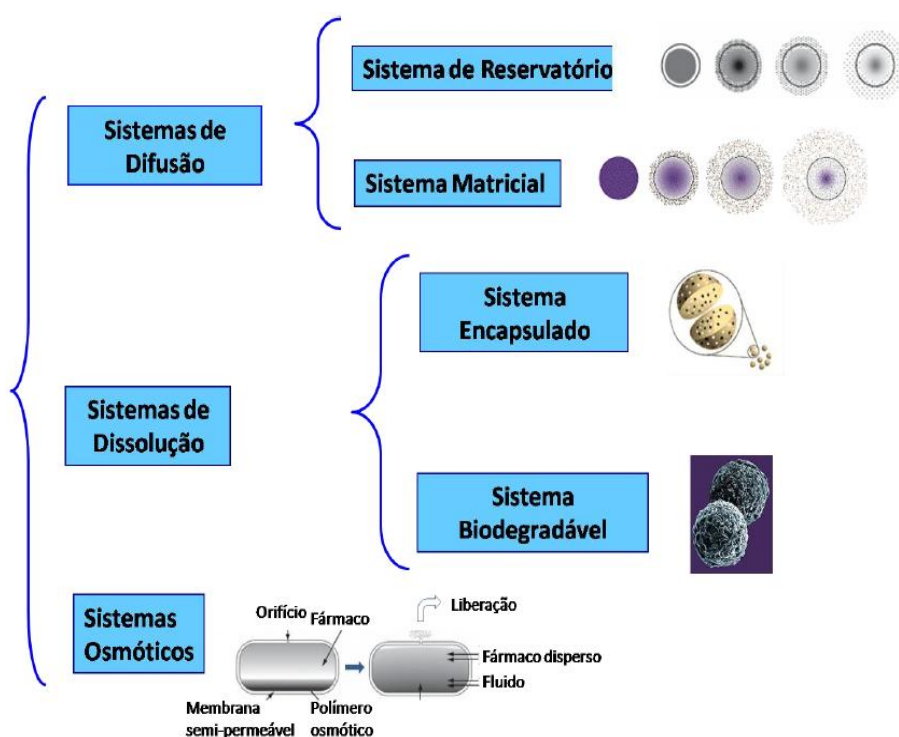
Fonte: adaptado de Lanzillotti (2012).

O SLC de fármaco em geral, utiliza como métodos de liberação (Figura 8) a difusão (subdividido em sistema reservatório e matricial), a dissolução (subdividido em sistema

encapsulado e biodegradável) e a osmose. Os mais usuais no âmbito farmacêutico o sistema matricial e de reservatório. No primeiro, o fármaco é distribuído uniformemente em toda matriz polimérica, na qual a liberação controlada ocorre através de uma série de interconexões tortuosas de canais, que pode ou não permitir a liberação de macromoléculas em um período de tempo prolongado. Após a exposição ao meio biológico, a matriz intumescer, promovendo um aumento da distância entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a liberação do fármaco é facilitada para o meio biológico por escoamento ou por degradação das cadeias do polímero, devido à ação dos fluidos corporais. No sistema de reservatório, a substância ativa se encontra envolvida por uma membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo e retardando a liberação do fármaco (SHALABY; BURG, 2005; LIMA, 2010).

No sistema de dissolução a liberação do fármaco na formulação encapsulada é regida pela espessura do polímero e pela formulação matricial, onde a liberação da droga é determinada pela taxa de dissolução do polímero. Além disso, se o sistema for biodegradável, o dispositivo oferece a vantagem de ser absorvido pelo organismo. Nos sistemas osmóticos, a liberação do ativo é determinada pela pressão osmótica que pode ser empregada como força de impulsão, e quando dada de forma constante, a liberação é controlada (LEE; ROBINSON, 2004; LIMA, 2010).

Figura 8 – Classificação do SLC de fármacos e suas principais vidas de administração.



Fonte: Lima (2010).

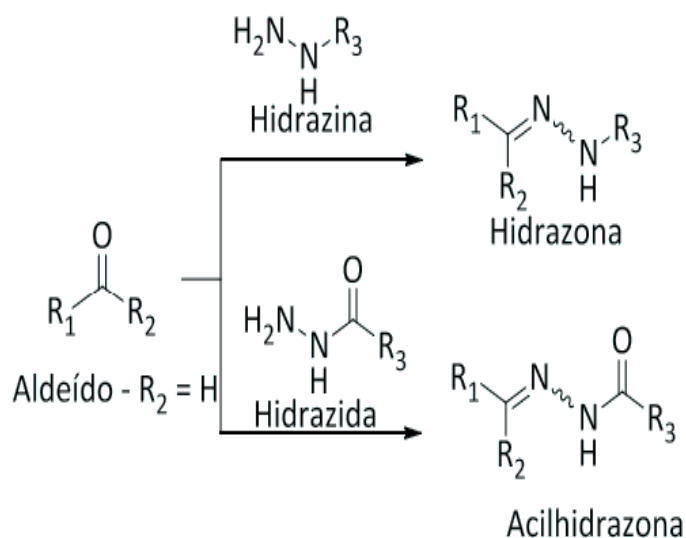
De acordo com Lopes, Lobo e Costa (2005) os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados na tecnologia farmacêutica, devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, em especial nas formas farmacêuticas de liberação controlada de fármacos. Neste contexto, a escolha do polímero ideal como componente de uma formulação para SLC de fármacos depende de diversos fatores, dentre eles os que correlacionam às propriedades do fármaco, a própria estrutura polimérica e aos demais componentes que compõem a formulação (OLIVEIRA; LIMA, 2006).

A quitosana tem sido produto de escolha como excipiente para o SLC de fármacos por ser um produto natural, de baixo custo de obtenção, ser renovável, biocompatível, biodegradável e atóxico. Também possui a capacidade de ficar carregada positivamente, atribuindo característica mucoadesiva, o que permite o aumento do tempo de contato do fármaco com o epitélio danificado (TAVARES, 2011; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). O aumento do tempo de residência da forma farmacêutica no local de ação, combinado com a liberação controlada, pode favorecer a manutenção ou absorção da concentração efetiva no sítio de ação, favorecendo a eficiência terapêutica e diminuição da quantidade de doses administradas (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

2.7 Derivado acilidrazônicos

A pesquisa por novas propostas farmacoterapêuticas, utilizando o planejamento molecular, pode ser empregada como alternativa daquelas já consolidadas no mercado, pois possibilita melhorias significativas na qualidade de vida da sociedade, através do aumento da biodisponibilidade farmacológica, segurança e conforto de aplicação (AMARAL et al., 2017). Neste contexto, moléculas contendo a função hidrazona ou grupo hidrazônico, de estrutura geral $-C=N-NH-$ têm se destacado nas ultimas décadas, por possuir um amplo espectro de aplicações e propriedades químicas, industriais, biológicas e terapêuticas. Esta última vem sendo amplamente estudada com o intuito de desenvolver novos e eficientes fármacos para as mais variadas doenças. O respectivo composto foi descoberto por Emil Fischer em 1883 e sua obtenção é dada pela reação de condensação de hidrazinas ou hidrazidas com aldeídos e cetonas, conforme a Figura 9. Uma vez que a hidrazina seja uma *N*-acilidrazina, o produto é uma *N*-acilidrazona (PARRILHA, 2012; APOLINÁRIO, 2016; GUIMARÃES et al., 2017).

Figura 9 – Reação geral de formação de uma hidrazona.

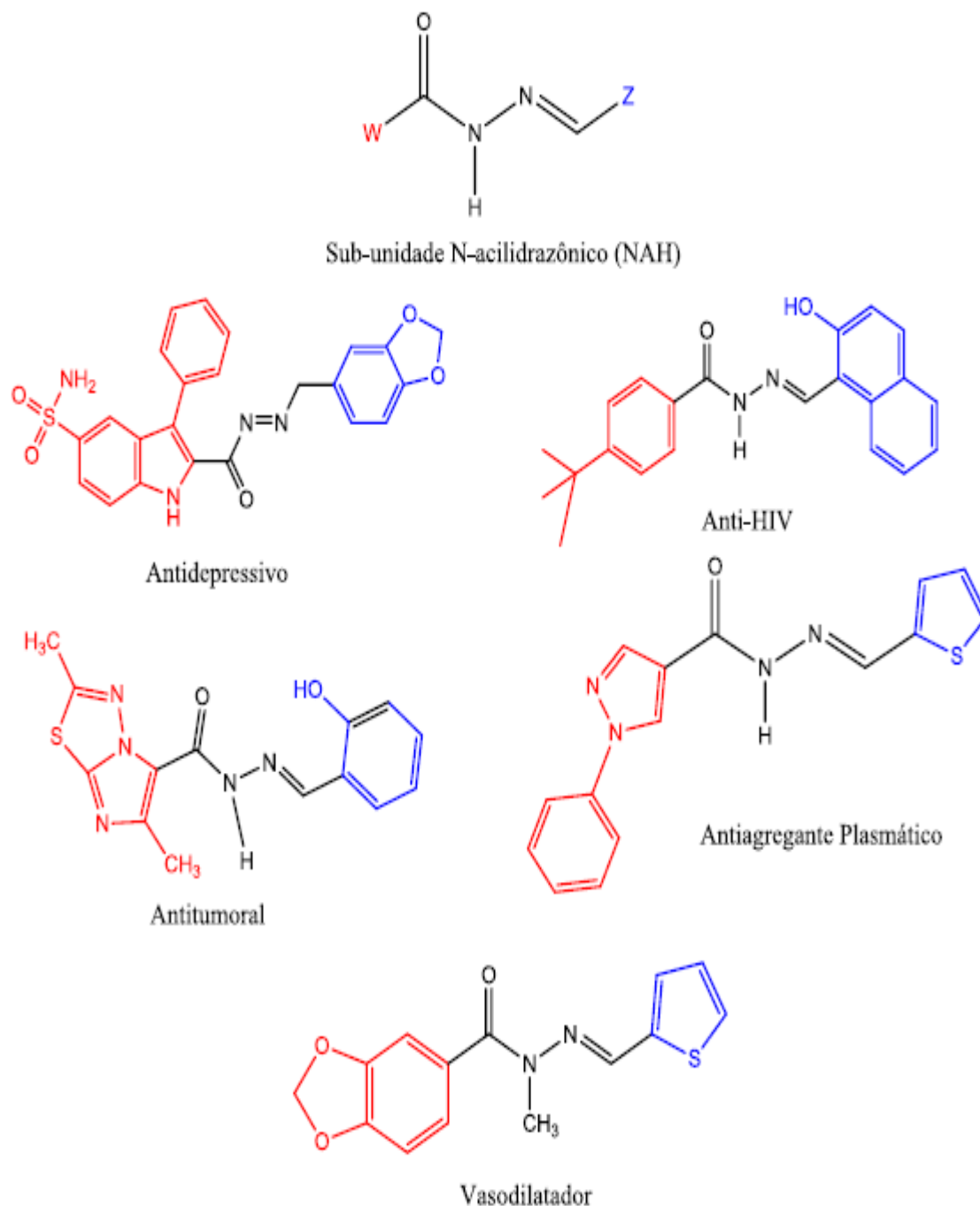


Fonte: adaptado de GUIMARÃES et al., 2017.

A subunidade *N*-acilhidrazona é considerada um fragmento privilegiado presente em várias moléculas bioativas e em candidatos a protótipos de fármacos desde a década de 70 (MAIA; TESCH; FRAGA, 2017). Seus derivados têm se destacado como uma importante classe de compostos químicos e sintéticos por apresentarem pronunciadas propriedades biológicas (REPICH et al., 2017), tais como: atividade antiparasitária (SERAFIM et al., 2014); antiviral (ROGOLINO et al., 2015); antibacteriana (NATASÃ et al., 2015); antifúngica (LAZZARINI et al., 2018); analgésica (SILVA et al., 2015); anti-inflamatória (MEIRA et al., 2018); antiagregante plaquetária (BARREIRO; FRAGA, 2009); antituberculosa (HOSNY; MORSY; SHERIF, 2015); antitumoral (RODRIGUES et al., 2016), entre outras. Além de suas aplicações na medicina, também são utilizados como reagentes analíticos e no desenvolvimento de materiais fluorescentes (JARCZYK-JEDRYKA et al., 2016).

Através de estratégias da Química Medicinal de modificação molecular, utilizando das técnicas de hibridação, de bioisoterismo, da homologação, restrição conformacional e simplificação molecular, que promovem a variação racional das subunidades estruturais da região amídica (W) e imínica (Z), as diferentes atividades biológicas dos derivados *N*-acilhidrazônicos podem ser apresentadas, conforme a Figura 10 (LIMA; BARREIRO, 2005; ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007; WERMUTH, 2008; BARREIRO; FRAGA, 2009; MOURA, 2016).

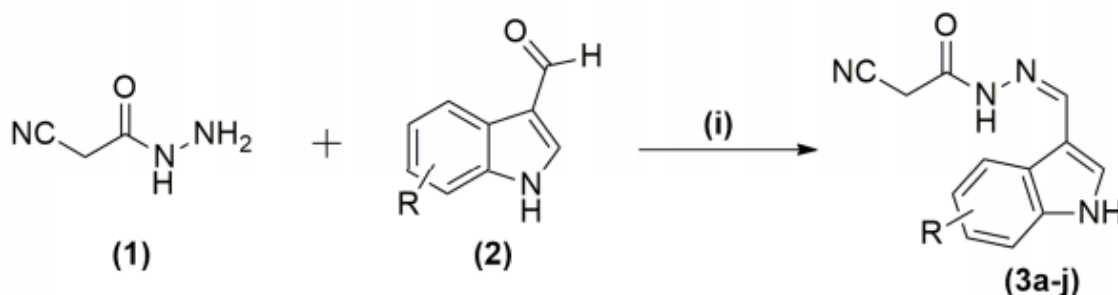
Figura 10 – Estrutura básica da função *N*-acilidrazona e seus perfis de bioatividade.



Fonte: Barreiro e Fraga (2009).

No estudo realizado por Moraes et al. (2018) foi empregada uma reação de condensação entre o composto cianoacetohidrazida e diferentes substituintes na região carboxialdeídos 3-indol. A reação ocorreu sob catálise ácida, para formar o carboxialdeído que em seguida sofreu ataque nucleofílico da função hidrazida, resultando na eliminação de água (H₂O) e formação de um *N*-acilidrazona, conforme a Figura 11.

Figura 11 – Síntese de derivados *N*- acilidrazonas indolicos, utilizando (i) ácido acético (AcOH) e etanol (EtOH) em temperatura ambiente.



3a 5-bromo-indol

3f benzo[*g*]-indol

3b indol

3g 7-metil-indol

3c 5-metil-indol

3h 5-ciano-indol

3d 4-nitro-indol

3i pirrol[2,3-*b*]piridina-indol

Fonte: adaptado de Moraes et al. (2018).

Moraes et al. (2018) citaram que os novos compostos contendo *N*-acilidrazona com unidades indol foram obtidos e sua atividade anti-inflamatória foi avaliada com sucesso. Testes de inibição da proliferação de linfócitos indicaram que estes compostos agem na fase celular do processo inflamatório. Ensaio *in vivo* corroboram com os *in vitro*, onde os valores máximos de supressão do edema de pata de camundongo foram observados na fase celular tardia, além disso, os resultados de inibição de COX-1 e COX-2 indicam que o composto com o substituinte indolico atua como inibidor seletivo de COX-2, resultado este reforçado pelos ensaios imunológicos, fornecendo um perfil uma molécula bem equilibrada, no contexto da farmacodinâmica e farmacocinética. Portanto, os autores consideram este derivado como um composto líder no desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

Neste contexto, Apolinário (2016) utilizou em sua pesquisa um derivado *N*-acilidrazônico denominado de *N'*-(1*H*-indol-3-yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), que foi obtido pela mesma rota sintética da Figura 10. A molécula apresentou atividade anti-inflamatória promissora nos modelos de peritonite induzida por carragenina, bolsão de ar subcutâneo e edema de pata induzida por carragenina, com redução significativa da migração leucocitária e do edema, respectivamente. Além de ter apresentado caráter ativo na fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina e no modelo de dor orofacial, o estudo indicou que o mesmo está envolvido com mecanismos periféricos, atuando na dor inflamatória. A autora também cita que a molécula JR19 não apresentou toxicidade aguda, visto que não houve morte nem alterações comportamentais ou fisiológicas dos animais em

estudo, utilizando uma dose de 20 mg/Kg. Desta forma, a JR19 revela-se como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos e eficazes fármacos, que em associação com polímeros naturais, a exemplo da QTS na forma de filmes, pode representar uma forma alternativa para liberação de novos compostos ativos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar filmes de QTS incorporados com *N'*-(1*H*-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19) para uso tópico em inflamações cutâneas.

3.2 Objetivos Específicos

A pesquisa visou realizar os seguintes objetivos específicos:

- a) desenvolver filmes poliméricos de QTS e QTS+JR19;
- b) analisar macroscopicamente e microscopicamente os filmes obtidos e utilizar o recurso topográfico tridimensional da Microscopia óptica (MO), a fim de avaliar a rugosidade da superfície dos filmes;
- c) avaliar as propriedades físico-químicas dos filmes a partir da análise de resistência ao dobramento, ensaio de tração e por ensaio de molhabilidade;
- d) verificar o perfil cromatográfico dos filmes e da molécula JR19, através da Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA);
- e) verificar o perfil termoanalítico das diferentes apresentações (pó e filme) dos componentes em estudo por Termogravimetria e sua derivada (TG/DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- f) identificar grupos funcionais e elementos químicos, que possam determinar a presença da QTS e da JR19 nos filmes desenvolvidos, através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- g) avaliar a cristalinidade dos pós e filmes obtidos, através da técnica de caracterização por difração de raios-X (DRX);
- h) realizar ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de Difusão em Ágar.

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Material

O material utilizado na pesquisa foi:

- a) quitosana comercial (Sigma Aldrich[®]) de baixo peso molecular (identificada pelo número do catálogo 448877-250G) e grau de desacetilação (GD) de 84,7%;
- b) ácido acético glacial (CH₃CO₂H) 99,7%, adquirido da Química Moderna[®];
- c) composto JR19 derivado do *N*-acilidrazônico, sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

4.2 Métodos

A obtenção dos filmes de QTS e QTS reticulada com moléculas de JR19 foi baseada nos estudos realizados por Lima (2010) e Silva (2015).

4.2.1 Desenvolvimento dos filmes de QTS e QTS+JR19

Os filmes de QTS foram desenvolvidos a partir da dissolução do polímero em solução de ácido acético (1% v/v), sob agitação magnética, por um período de 24 horas. Em seguida, a solução resultante foi vertida em placas de Petri com diâmetro de 5,5 cm, em um volume de 5 mL. Para o desenvolvimento dos filmes incorporados com a JR19, a quantidade adicionada da molécula foi baseada em cálculos utilizando a área de superfície da lesão (Equação 1) e o peso dos animais (utilizando uma regra de três), de forma que a dose final seja proporcional a de 20 mg/Kg, concentração esta, que apresentou atividade anti-inflamatória oral *in vivo* e atoxicidade aguda em camundongos, segundo os estudos realizados por Apolinário (2016). Através dos cálculos, foi definido 8,6 mg do fármaco para cada 5 mL de solução de quitosana, sob agitação magnética, para que ocorresse sua total homogeneização. Para ambas as soluções (com e sem incorporação da JR19) a secagem foi realizada na estufa com circulação de ar na temperatura de 50°C, por um período de 24 horas.

$$A = \pi \times r^2 \quad (1)$$

Onde: A= área da superfície da lesão; $\pi = 3,14$ e r = raio da superfície da lesão.

4.2.2 Caracterização físico-química dos constituintes e filmes formados

4.2.2.1 Ensaio de Resistência ao dobramento

A análise de resistência ao dobramento foi realizada para medir a flexibilidade dos filmes de QTS e QTS+JR19, que é necessário para determinar se a forma farmacêutica desenvolvida é confortável e segura para aplicar-se na superfície da ferida. A resistência dobrável é determinada manualmente, dobrando repetidamente o filme no mesmo ponto até este se romper ou ser dobrado até 300 vezes (DEVI; DUTTA, 2017). A quantidade de dobramentos sem qualquer ruptura dá o valor exato de sua resistência. A análise foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), em triplicata, a fim de obter um valor médio.

4.2.2.2 Ensaio de Tração

O ensaio de tração foi realizado com o objetivo de avaliar a deformação (%) e resistência à tração (Mpa) dos filmes desenvolvidos com e sem o JR19 em sua composição. Os filmes foram medidos com o micrômetro digital de modelo Colante Proof, série 293 (MITUTOYO[®], Suzano, Brasil) e a análise foi realizada na Máquina Universal de Ensaio, modelo 3366 (INSTRON[®], Norwood, EUA) de acordo com a norma ASTM D882-91 (ASTM, 1991). Foram utilizados os seguintes parâmetros: corpo de prova do tipo 4, com distância entre as garras de 12 cm; comprimento de 25 mm e largura de 4 mm. As análises foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (Certbio) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) em triplicata, a fim de obter um valor médio.

4.2.2.3 Grau de Intumescimento (GI)

Para a análise de GI os filmes de QTS com e sem JR19 com tamanhos padronizados em 25 mm x 25 mm, foram pré-pesados e individualmente imersos em 20 mL de solução salina a 0,9%. Os filmes foram retirados do meio aquoso e pesados nos intervalos de 1, 2, 3 e 24 horas. O peso dos filmes foi determinado após a remoção do excesso de água em sua

superfície, com o auxílio de papel de filtro e em seguida os filmes são recolocados na mesma solução salina. O percentual do GI dos filmes de QTS com e sem o JR19 foi calculado de acordo com a Equação 2 (DEVI; DUTTA, 2017). A análise foi realizada no Certbio da UEPB, em triplicata, a fim de obter um valor médio.

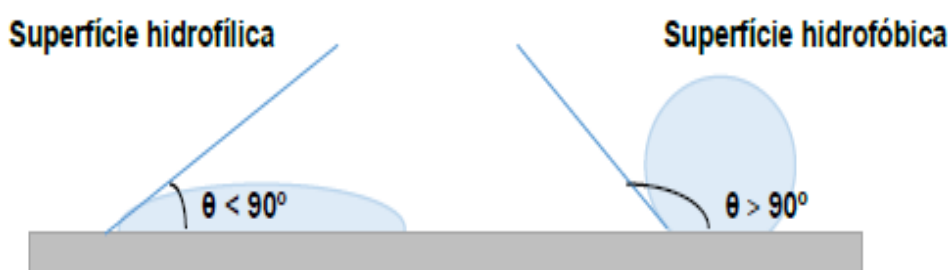
$$GI \% = \frac{Mf - Mo}{Mo} \times 100 \quad (2)$$

Onde: Mf = Peso do filme molhado; Mo = Peso inicial do filme

4.2.2.4 Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato

A realização do ensaio foi em triplicata, em que ocorreu o gotejamento com solução salina 0,9%, sendo realizadas imagens fotográficas de cada gota e estas enviadas para programa *Angle Calculator*, que calcula o ângulo formado, verificando se o material é hidrofílico ou hidrofóbico. Para o ensaio foi empregado um goniômetro. As análises foram realizadas no Certbio da UFCG, em triplicata.

Figura 12 – Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície sólida.



Fonte: Rosendo (2016).

4.2.2.5 Microscopia Óptica (MO)

A técnica de MO foi realizada em um Microscópio Óptico digital, modelo KH7700 (Hirox[®], Tóquio, Japão) de reflexão e transmissão com acessórios 3D e variação de 140X e 3500X, acoplado a uma estação de análise de imagens. As análises foram realizadas no Certbio da UEPB e consistiu em colocar os filmes de QTS com e sem o JR19 e analisar a imagem da sua projeção na tela de análise do microscópio.

4.2.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo VEGA3 (TSCAN[®], Brno, República Checa) com energia fixa de 8 KV, em que o filmes de QTS com e sem o JR19, sem recobrimento metálico, com aumento de 2000x e feita a análise da sua imagem. As análises foram realizadas no Campus V da UEPB.

4.2.2.7 Rugosidade

A rugosidade média (Ra) dos filmes de QTS com e sem JR19 foi verificada através da análise das fotomicrografias obtidas na MO com auxílio do software Gwyddion.

4.2.2.8 Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA)

As amostras do filme de QTS, filme de QTS+JR19 e da molécula JR19, foram dissolvidas em ácido acético a 3% e aplicadas em uma placa de CCDA de 5 cm de largura x 5 cm de comprimento, utilizando cerca de 2µL de cada amostra. Após a triagem de diferentes solventes, escolheu-se diclorometano:acetato de etila (9:1) como fase móvel. A avaliação da separação foi realizada com uma lâmpada ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 254 nm. A presença da molécula JR19 foi determinada pelo fator de retenção (RF), comparando o padrão com a amostra, conforme a Equação 3. A análise foi realizada no Certbio da UEPB.

$$Rf = \frac{\text{Distância percorrida pelo soluto}}{\text{Distância percorrida pelo solvente}} \quad (3)$$

4.2.2.9 Análise Térmica

4.2.2.9.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC do material citado foram obtidas em um módulo Calorimétrico Exploratório Diferencial, modelo Q20 (TA[®] - Instruments, New Castle, Delaware, EUA). Foram utilizadas amostras de $2,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinho de alumínio

hermeticamente fechados, analisadas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, com temperatura de $25\text{-}400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As análises foram realizadas no Certbio da UFCG.

4.2.2.9.2 Termogravimetria (TG) e sua Derivada (DTG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um módulo termogravimétrico modelo Pyris 1 TGA (Perkin Elmer[®], Boston Massachusetts, EUA). Foram utilizadas amostras de $5,00 \pm 0,05\text{ mg}$, acondicionadas em cadinhos de alumina para cada amostra, utilizando uma razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob uma atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As análises foram realizadas no Certbio da UFCG.

4.2.2.10 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Esta análise foi realizada utilizando um espectrômetro Spectrum TM 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer[®], Boston, Massachusetts, EUA) com resolução de 4 cm^{-1} , velocidade de varredura de $0,2\text{ cm}^{-1}$ e varredura de $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$. As análises foram realizadas no Certbio da UFCG.

4.2.2.11 Difração de raios-X (DRX)

Foi utilizado um Difratorômetro de raios-X, modelo XRD-6000 (Shimadzu[®] Kyoto, Japão) com varredura angular $5^{\circ} < 2\theta < 35^{\circ}$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando-se radiação de Cu ($\text{K}\alpha_1$) com varredura no passo de $0,02$ (2θ), com intervalo de $0,6$ segundo para cada amostra. As análises foram realizadas no Certbio da UFCG.

4.2.2.12 Ensaio de citotoxicidade in vitro - Método de Difusão em Ágar

Este método aplica-se à avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros, empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e

hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano.

As amostras foram esterilizadas por radiação ultravioleta em cabine de fluxo laminar de modelo vertical (BIOGREEN, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil) por 1 hora, em ciclo de 30 minutos para cada lado da amostra e padronizadas com uma área de aproximadamente 100 mm² (10 mm x 10 mm). Os controles positivos e negativos foram o látex para garrote (Látex tóxico) e papel de filtro Whatman n° 1 ou PEAD- Polietileno de alta densidade (Plástico atóxico), respectivamente.

Utilizou-se para o ensaio uma suspensão de células L-929 com concentração na faixa de 1,1 a 1,3 x 10⁵ células viáveis por mL em meio contendo uma mistura de sais enriquecidas com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, conhecida como RPMI 1640 e contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), que foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro e preservados no Certbio da UFCG. Posteriormente, foram inseridos um volume de 4 mL de suspensão celular obtida em cada orifício da microplaca plástica de cultura (3,5 cm de diâmetro) e, em seguida, foram preparadas as culturas em duplicata para as amostras (Filme de QTS e de QTS+JR19), controle negativo e positivo. As culturas foram incubadas em estufa a 37 ± 1 °C com 5% ± de dióxido de carbono (CO₂).

Aproximadamente 48 horas após o estabelecimento das culturas, utilizou-se para o ensaio aquelas que apresentaram uma monocamada celular uniforme e próxima à confluência de 80%. Dessa forma, o meio de cultura das microplacas foi aspirado e a monocamada de cada orifício da placa foi lavada com 2 mL de uma solução tampão fosfato que, em seguida, também foi aspirado. Adicionou-se 1 mL do meio de cobertura em cada poço, a qual é composto pelo ágar a 1,8%, adicionado do corante vermelho neutro a 0,01% no meio mínimo de Eagle (MEM) concentrado em quantidades iguais. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 10 min, aguardando a solidificação do ágar, à temperatura ambiente.

As placas foram incubadas em estufa a 37 ± 1 °C por 24 horas na posição invertida e embrulhadas em folha de papel alumínio para que não ocorresse o dano celular por fotoativação do vermelho neutro, de acordo com o protocolo descrito na ISO 10993-5 (ISO, 2009). Após este período de incubação, iniciou-se a avaliação da citotoxicidade.

4.2.2.12.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* – Método de Difusão em Ágar

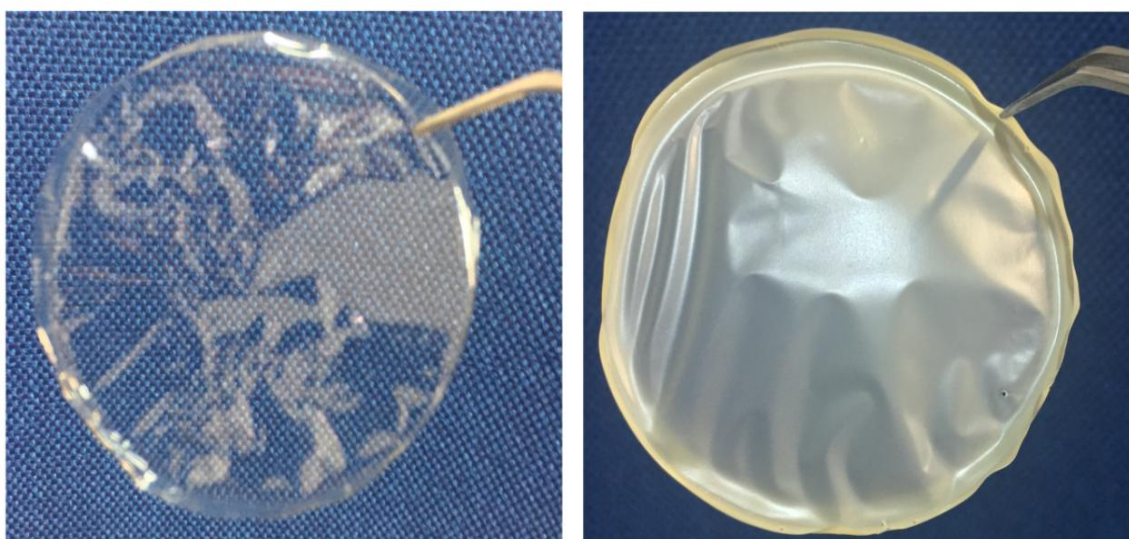
O grau de citotoxicidade das amostras foi avaliado a partir da observação microscópica da morfologia e coloração das células sob e ao redor das amostras, dos controles positivos e negativos testados. Após esta avaliação, foi realizada uma medição macroscópica com auxílio de um paquímetro, da formação ou não da extensão ou halo da área descorada, que representa as células mortas, dos quatro quadrantes da amostra em estudo. A média dos halos formados foi calculada com auxílio da planilha de cálculo do ensaio de citotoxicidade *in vitro* – Método de Difusão em Ágar, conforme o Anexo I.

O grau de citotoxicidade é quantificado em uma escala que varia de 0 a 4 e descrita qualitativamente o seu grau de toxicidade celular em ausência, leve, branda, moderada ou severa, de acordo com a ISO 10993-5 (ISO, 2009). O corante vital vermelho neutro adicionado ao meio de cobertura é captado pelos lisossomos, promovendo a coloração das células vivas em vermelho e durante o processo de necrose as células coradas liberam o corante produzindo regiões com células mortas descoradas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes (Figura 13) obtidos apresentaram macroscopicamente, aspecto homogêneo, características de elasticidade e flexibilidade. Os filmes de QTS mostraram-se incolor, enquanto que os que continham a molécula apresentaram coloração amarelada, o que faz disso um indicativo da incorporação da mesma na matriz polimérica, visto que a cor da molécula em pó assemelhou-se ao do filme.

Figura 13 – Registros fotográficos do filme de QTS e filme de QTS+JR19.



Fonte: dados da pesquisa.

5.1 Resistência ao Dobramento

A análise de resistência ao dobramento é uma técnica simples e rápida que objetiva verificar a flexibilidade dos filmes, a fim de promover uma aplicação mais segura e confortável destes na superfície da lesão cutânea. Na Figura 14, pode-se verificar que os filmes de QTS caracterizaram-se mais frágeis que o sistema polimérico que continham a JR19, visto que os filmes de QTS+JR19 apresentaram uma média de 293 dobragens, enquanto que os filmes de QTS apresentaram uma média de 120 dobragens, corroborando com os dados de Devi e Dutta (2017), que também comprovaram o aumento da resistência ao dobramento após a incorporação de uma substância, neste contexto a Bentonita que apresenta propriedades antimicrobianas. Portanto, a análise sugere que a JR19 influenciou de forma significativa nas propriedades físico-químicas da QTS, promovendo assim um sistema polimérico mais

resistente e flexível, características estas, atrativas para o desenvolvimento de novos curativos com mais conforto e segurança de aplicação.

Figura 14 – Registros fotográficos do filme de QTS (com fissura) e filme de QTS+JR19 (sem fissura) após 300 dobragens.



Fonte: dados da pesquisa.

5.2 Ensaio de Tração

Uma forma de avaliar a viabilidade de aplicação de filmes para o desenvolvimento de curativos é verificar sua flexibilidade, através das análises de resistência mecânica a tração (Mpa) e deformação (%) (SASIKALA; DURAI; RATHINAMOORTHY, 2013). De acordo com Kouchak, Handali e Boroujeni (2015) e Bano et al. (2014) filmes poliméricos que apresentam menor grau de deformação e valores razoáveis de resistência a tração, são sugestivos de terem elevado potencial em aplicações médicas.

Para obtenção do ensaio de tração é necessário à realização da análise da espessura dos filmes de QTS e QTS+JR19, a qual é mostrada na Tabela 1. Para obtenção da espessura uniforme dos filmes, foram usadas placas de Petri com os mesmos diâmetros e volumes de todas as soluções preparadas. A espessura média dos filmes de QTS é de 0,025 mm e dos filmes de QTS+JR19 de 0,033 mm. Verificou-se que para os filmes que continham a JR19, a espessura foi aumentada, resultado este que pode ser atribuído a maior viscosidade da solução que contém a molécula incorporada.

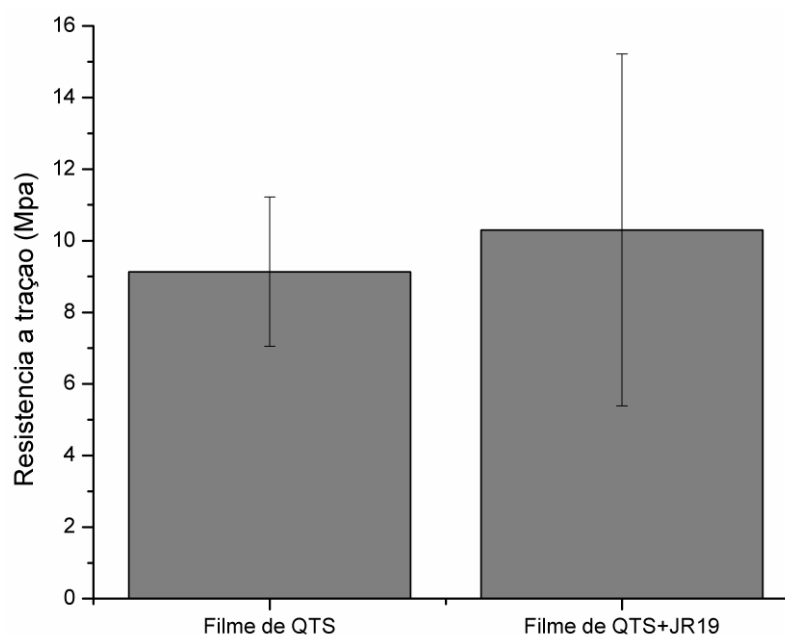
Tabela 1 – Propriedades físicas dos filmes QTS e QTS+JR19 em termos de espessura e resistência de dobramento.

Amostras	Espessura média (mm)
Filme QTS	0,025 ± 0,002
Filme QTS+JR19	0,033 ± 0,004

Fonte: dados da pesquisa.

Através da Figura 15, observa-se que com a adição da molécula, os filmes de QTS+JR19 apresentaram um leve aumento de resistência a tração ($10,30 \pm 4,91$ Mpa) o que corresponde a um material mais rígido, quando comparado aos filmes de QTS ($9,13 \pm 2,08$ Mpa), porém, não apresentam diferença estatística que comprove essa maior resistência. Este resultado é compatível com a análise de dobramento, em que os filmes de QTS+JR19 apresentaram uma média de dobragens maior do que os filmes sem JR19 incorporada.

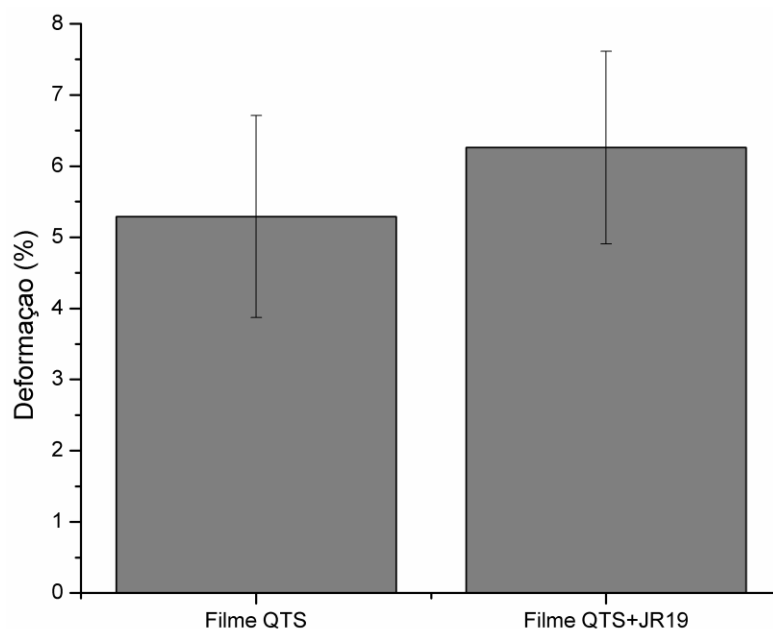
Figura 15 – Gráfico com os valores referente à resistência a tração (Mpa) dos filmes de QTS e QTS+JR19.



Fonte: dados da pesquisa.

A Figura 16 demonstra a análise de deformação, a qual a JR19 possibilitou uma pequena elevação do grau de deformação do sistema analisado. Isso sugere que o filme de QTS+JR19 ($6,26 \pm 1,35$ %) apresenta uma maior flexibilidade quando comparada com o filme sem a molécula ($5,29 \pm 1,42$ %). Assim como no ensaio de resistência a tração, o ensaio de deformação não apresenta diferença estatística que comprove essa distinção.

Figura 16 – Gráfico com os valores referente à deformação (%) dos filmes de QTS e QTS+JR19.



Fonte: dados da pesquisa.

Evans et al. (2013) relata que os biomateriais utilizados para a confecção de um curativo devem apresentar tensão na ruptura compatível com o da pele, a qual pode sofrer variação de 4 a 30 Mpa. Desta forma, os filmes desenvolvidos apresentaram uma resistência à tração dentro da escala sugerida pela literatura e os filmes de QTS+JR19 demonstraram um leve aumento de sua flexibilidade, tornando-se mais adequado para aplicação tecidual.

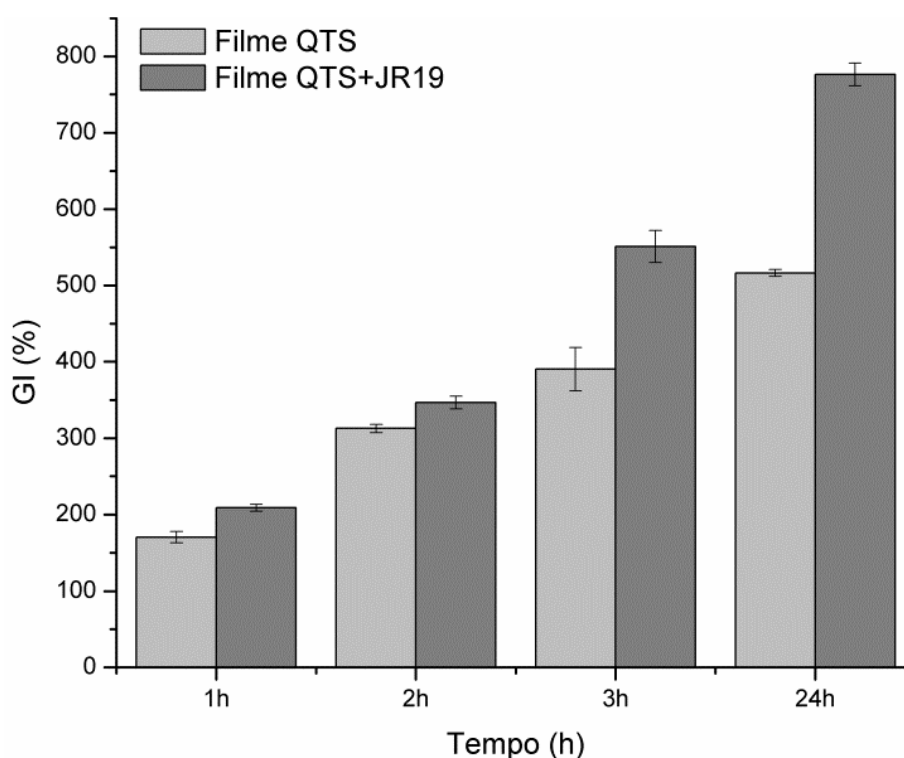
5.3 Grau de Intumescimento (GI)

Um curativo ideal deve absorver os fluídos biológicos presente na lesão cutânea enquanto o mesmo é aplicado, mantendo um ambiente úmido na região da ferida. A capacidade de absorção de água é um fator importante para determinação dos componentes

utilizados para o desenvolvimento do curativo, a qual possibilita a prevenção da desidratação tecidual, inibição do crescimento de microrganismos e proteção à maceração da ferida (PANDIMA DEVI et al., 2012).

A Figura 17 apresenta a média do GI dos filmes de QTS e QTS+JR19. Através dos resultados obtidos, verificou-se que para ambos os filmes há um aumento do GI ao longo do período de tempo. O filme com a molécula incorporada mostrou que tem a maior capacidade de absorção de água, quando comparado com o filme de QTS e isso ocorre devido à natureza higroscópica da JR19, corroborando com os resultados de Devi e Dutta (2017) ou pelo o aumento de concentração de soluto que a JR19 promove à matriz, proporcionando assim a maior absorção de água quando comparada com o filme sem a incorporação da molécula. Desta forma, de acordo os perfis de GI dos filmes analisados, sugere-se que a molécula forneceu o aumento da capacidade de absorção do líquido em estudo, tonando-se um material atrativo para o desenvolvimento de sistemas que venha a absorver fluidos biológicos, como é o caso da produção de futuros curativos.

Figura 17 – Gráfico com os valores referente ao GI (%) dos filmes de QTS e QTS+JR19, nos tempos de 1, 2, 3 e 24 horas.



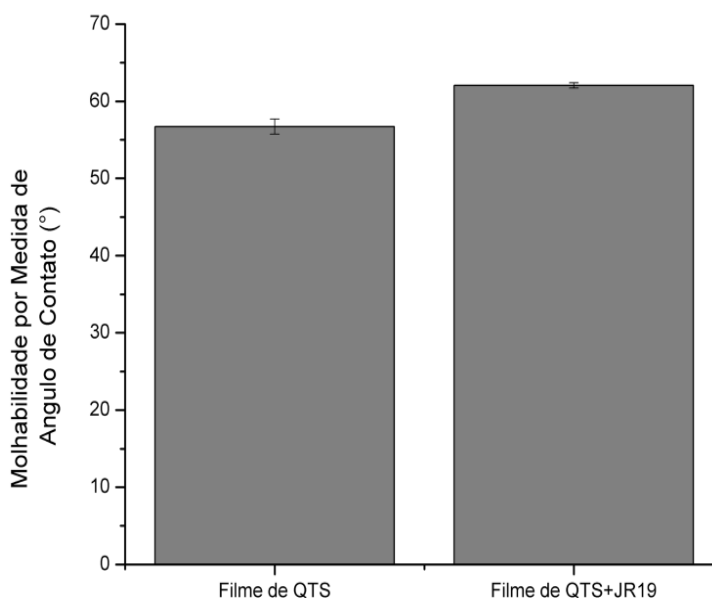
Fonte: dados da pesquisa.

5.4 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

A técnica é fundamentada na medida do ângulo de contato da gota, o qual avalia as características de hidrofiliicidade e hidrofobicidade do material em estudo. A Figura 18 ilustra os valores de molhabilidade dos filmes de QTS e QTS+JR19.

A partir dos valores obtidos, observa-se um aumento do ângulo de contato dos filmes após a incorporação da molécula JR19 ($62,05 \pm 0,33^\circ$), quando comparado com os filmes de QTS ($56,70 \pm 0,97^\circ$), resultado este que pode ser justificado pela maior cristalinidade da amostra, como visto no estudo de Araújo et al. (2017), em que o mesmo apresentou resultados semelhantes quando adicionou o hormônio etonogestrol em filmes poliméricos de QTS. Entretanto, os valores evidenciam que os filmes apresentam caráter hidrofílico, visto que os valores observados possuem ângulo de contato inferior a 90° , pressupondo-se que os biocompósitos tem comportamento receptível com o meio biológico.

Figura 18 – Gráfico com os valores referente à molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato das amostras analisadas.



Fonte: dados da pesquisa.

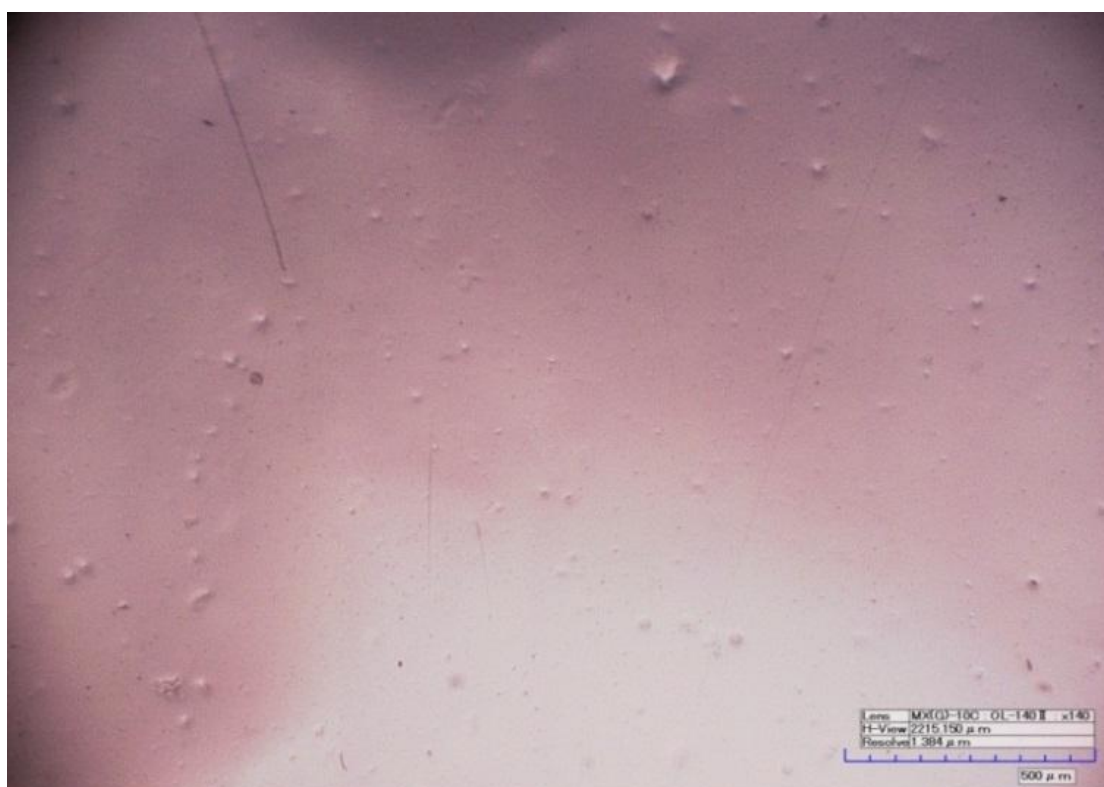
Tais resultados revelam que a molécula JR19 quando associada com a QTS na forma de filme, promove modificações benéficas nas características físico-químicas do compósito e consequentemente em suas propriedades mecânicas, tornando-as atrativas para indústria

farmacêutica no âmbito de desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, em especial para tratar lesões cutâneas.

5.5 Microscopia Óptica (MO)

Através da MO pôde-se analisar a morfologia da superfície dos filmes e verificar que os que continham apenas QTS apresentaram superfície lisa, sem poros e homogênea (Figura 19), corroborando com os achados de Brita et al. (2018) e com as imagens macroscópicas.

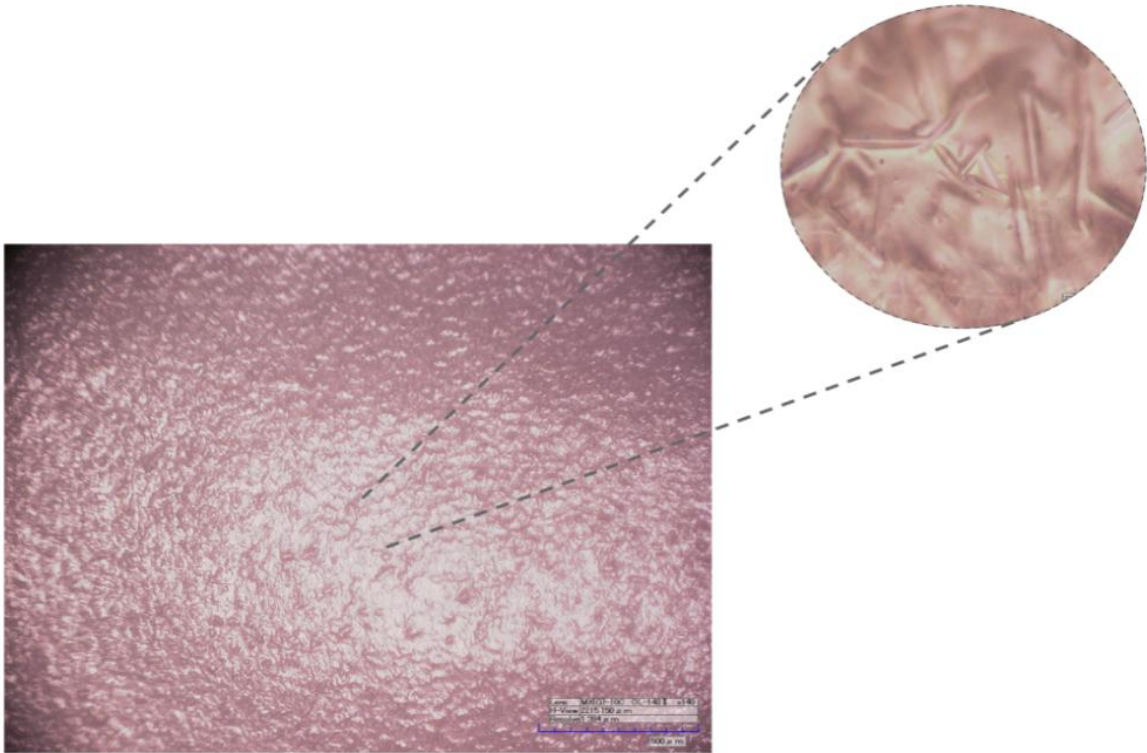
Figura 19 – Microscopia óptica do filme de QTS, com aumento de 140x.



Fonte: dados da pesquisa.

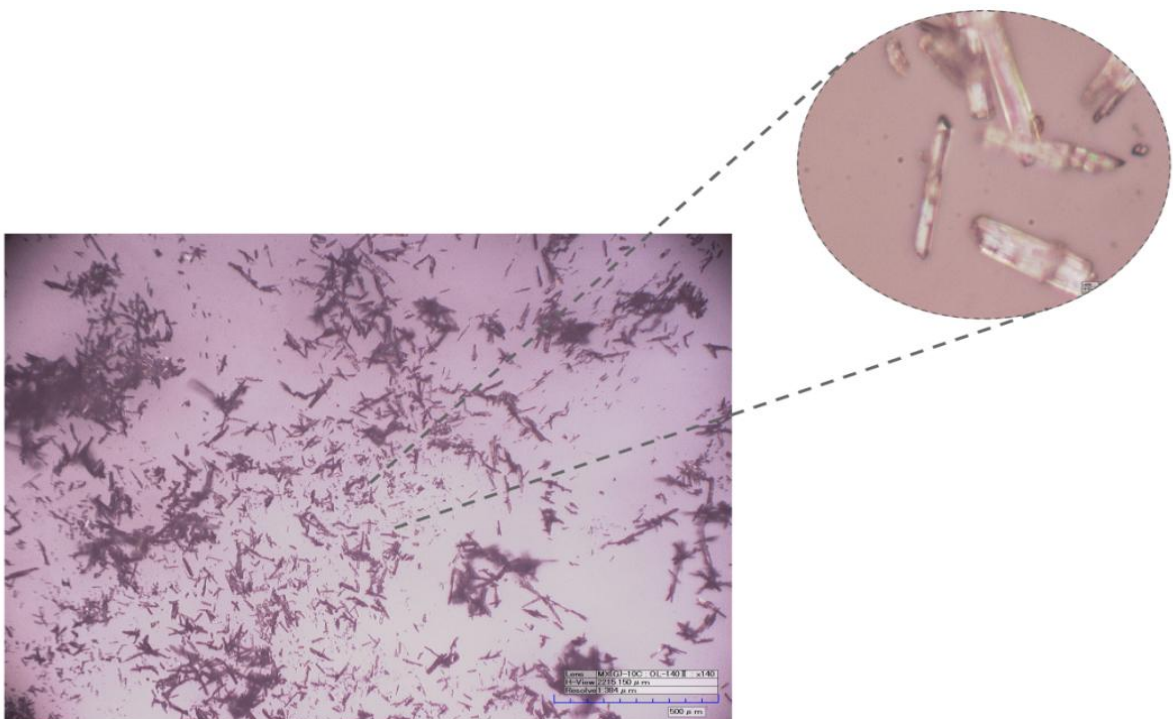
Observando-se as fotomicrografias dos filmes QTS+JR19 é possível verificar alterações morfológicas de sua superfície, como o surgimento de rugosidade, quando comparada aos filmes sem a incorporação da molécula, utilizando o mesmo aumento (Figura 20). A presença de cristais cilíndricos dispersos na superfície de todo filme, foi verificado a partir do aumento de 3500x em que apresentaram características cristalográficas semelhantes aos dos pós da molécula (Figura 21), evidenciando a incorporação da JR19 no filme, conforme a Figura 20.

Figura 20 – Microscopia óptica do filme QTS+JR19, com aumento de 140x e 3500x.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 21 – Microscopia óptica da molécula JR19, com aumento de 140x e 3500x.

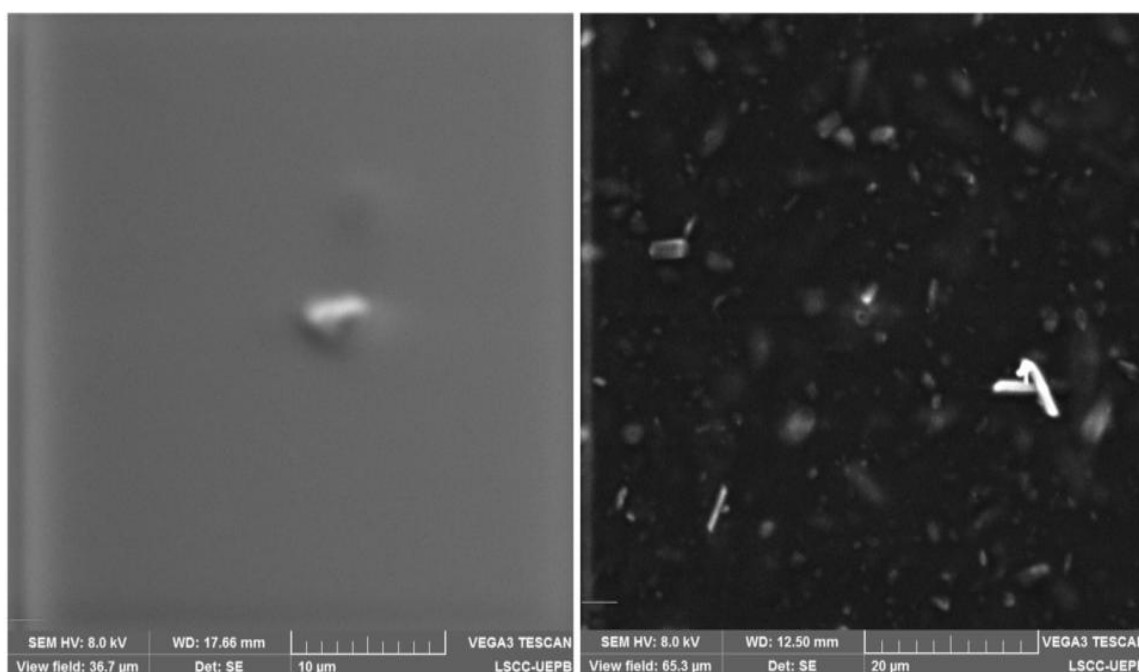


Fonte: dados da pesquisa.

5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises morfológicas realizadas por MEV (Figura 22) dos filmes de QTS apresentaram, superfície lisa, compacta e sem presença de poros, corroborando com os resultados de Akyuz et al. (2017). Em contrapartida, os filmes de QTS+JR19 revelou a presença de cristais, com característica semelhantes aos visto pela MO do pó da molécula e do filme incorporado com a JR19.

Figura 22 – MEV do filme de QTS e QTS+JR19, com aumento de 2000x.

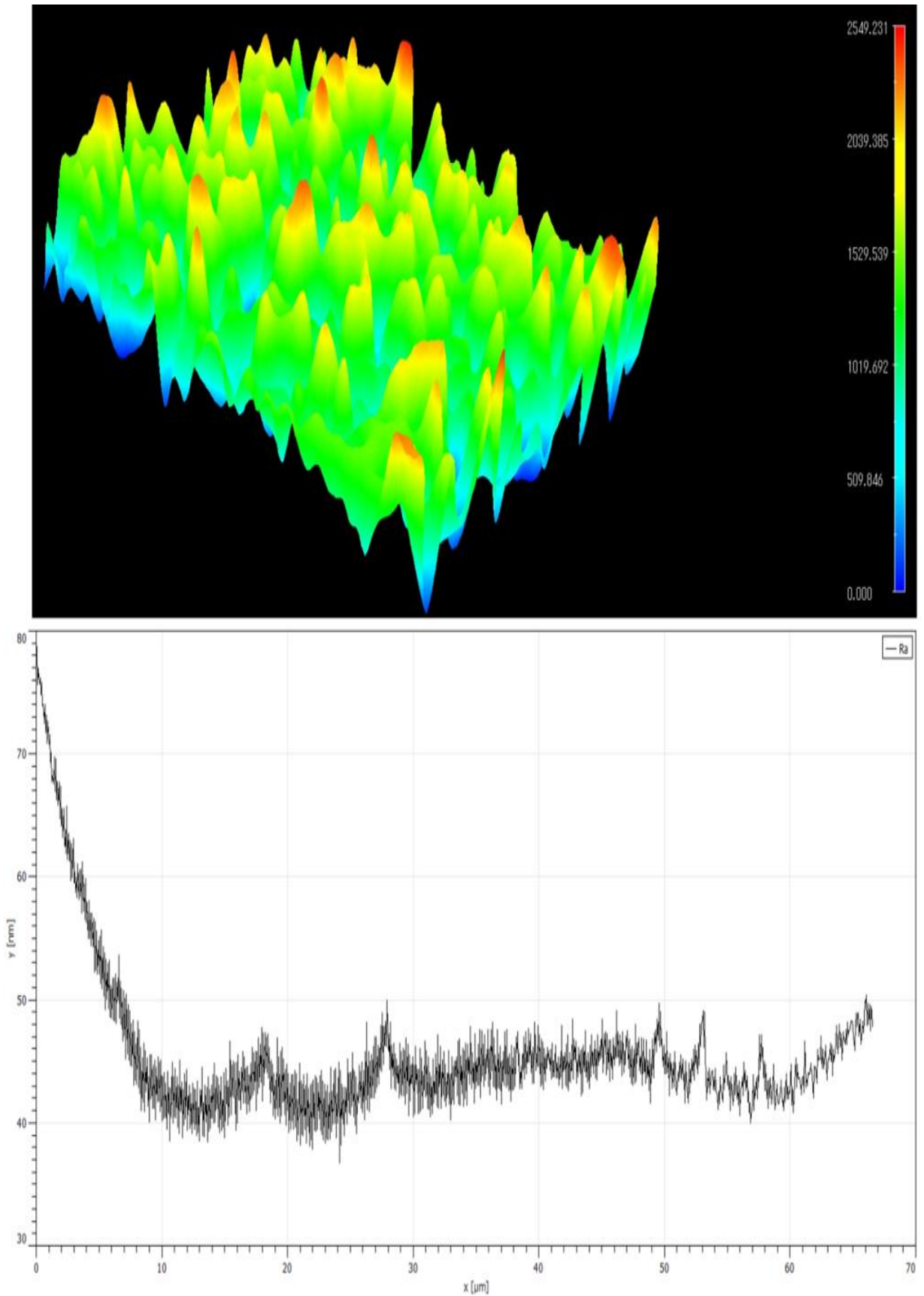


Fonte: dados da pesquisa.

5.7 Rugosidade

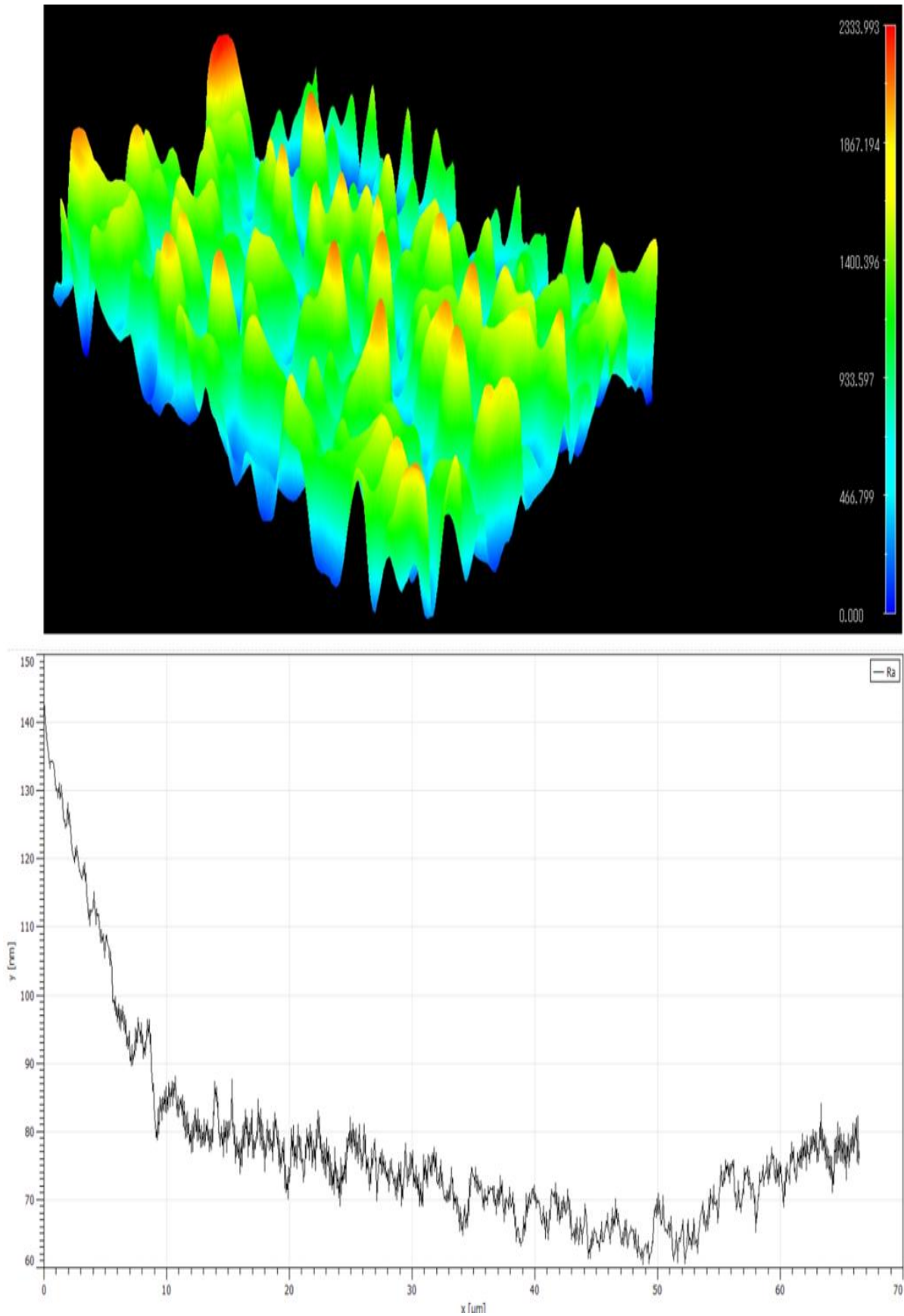
Nas Figuras 23 e 24 estão apresentadas as imagens topográficas tridimensionais obtidas pela imagem de MO da superfície dos filmes desenvolvidos e seus respectivos perfis de rugosidade. Pode-se observar que há alteração da superfície dos filmes em função da incorporação da JR19 e a adição da molécula quando comparada com o filme com apenas QTS, aumentou a rugosidade média (Ra) do mesmo de 3,71 nm para 9,9 nm, respectivamente.

Figura 23 – Imagens topográficas e perfil de rugosidade do filme de QTS.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 24 – Imagens topográficas e perfil de rugosidade do filme de QTS+JR19.



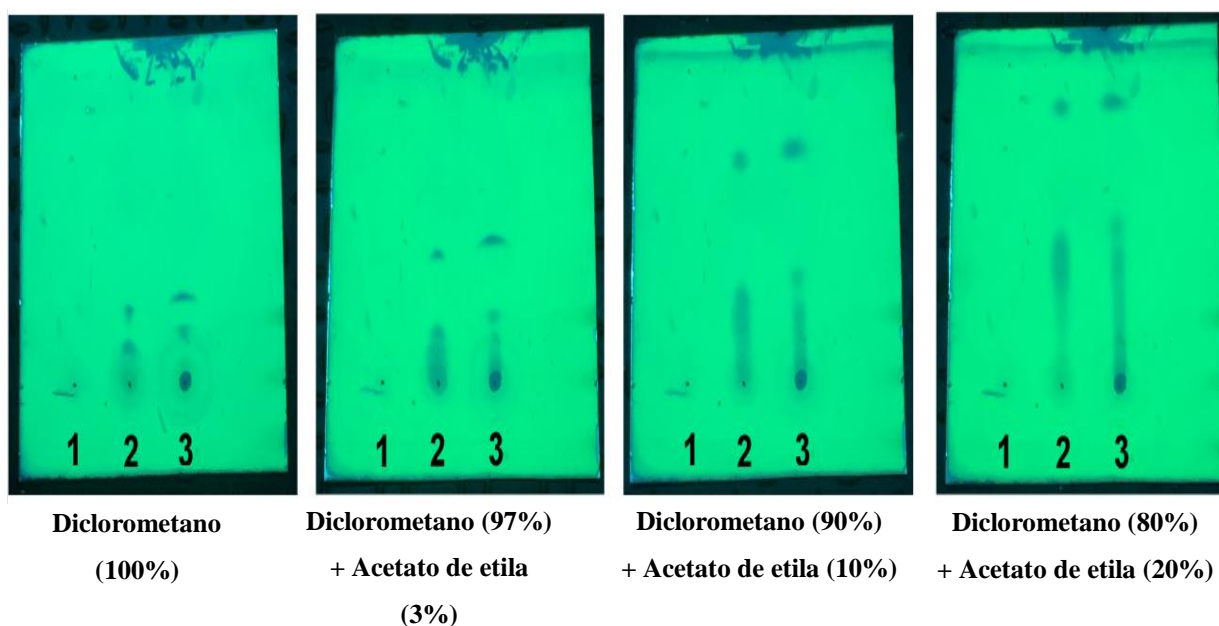
Fonte: dados da pesquisa.

Essa análise sugere a associação entre a QTS e JR19, uma vez que a adição da molécula originou filmes com diferentes superfícies e rugosidades, resposta esta, complementar dos resultados supracitados.

5.8 Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA)

A análise em CCDA (Figura 25) apresenta caráter qualitativo com finalidade de identificar a molécula JR19 no filme de QTS+JR19. O solvente diclorometano (100%) iniciou a eluição das amostras que apresentam a molécula JR19 em sua composição, como é observado na primeira placa utilizando diclorometano a 100%, através das marcações 2 e 3. A mistura dos solventes diclorometano e acetato de etila em diferentes concentrações se mostrou aptos a garantir uma separação eficiente das amostras. Na terceira placa, utilizando a fase móvel diclorometano/acetato de etila (9:1), as amostras do filme de QTS+JR19 e da JR19 apresentaram Rf de 0,55 sugerindo a incorporação da molécula no filme de QTS com a molécula, por apresentarem perfil cromatográfico semelhante quando comparada com a revelação da molécula isolada. O filme de QTS não apresentou a mancha de cor azulada em sua corrida cromatográfica, visto que o mesmo não continha a JR19 em sua composição.

Figura 25 – Registros fotográficos das placas de CCDA com marcas de filmes de QTS (1), filme de QTS+JR19 (2) e molécula da JR19 (3), utilizando diferentes fases móveis.

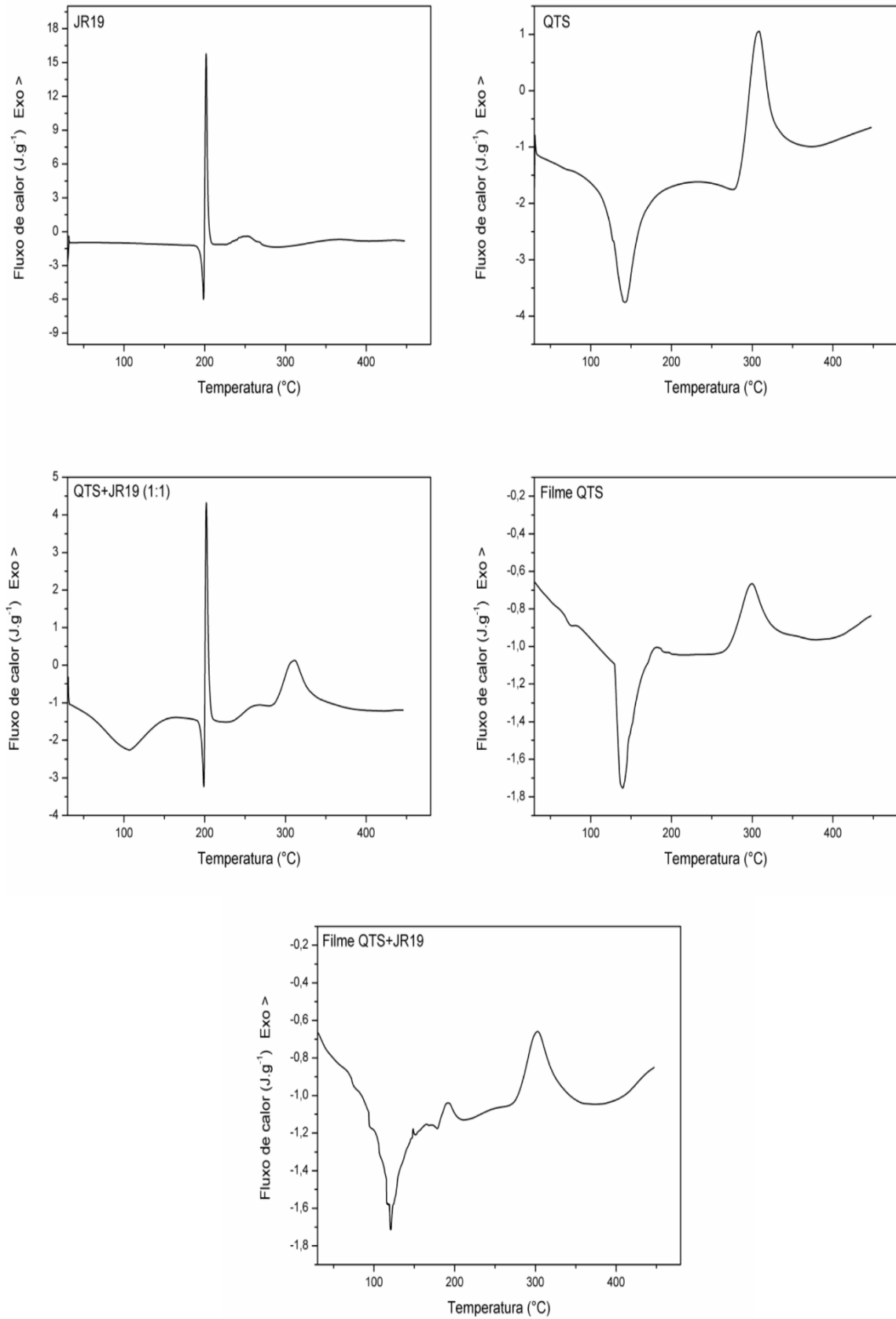


Fonte: dados da pesquisa.

5.9 Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria e sua derivada (TG/DTG)

As curvas de DSC das amostras e os eventos térmicos podem ser demonstrados na Figura 26 e Tabela 2, respectivamente. A amostra de QTS apresentou dois picos, um endotérmico ($T_{\text{pico}} = 142,02 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 211 \text{ J g}^{-1}$), decorrente da volatilização de substâncias e um exotérmico ($T_{\text{pico}} = 306,42 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 187,6 \text{ J g}^{-1}$), correspondente à degradação de QTS (SILVA et al., 2016). A curva referente a JR19 apresentou três picos, um endotérmico ($T_{\text{pico}} = 198,40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 41,92 \text{ J g}^{-1}$) e dois exotérmicos ($T_{\text{pico}} = 201,64 \text{ }^\circ\text{C}$ e $253,11 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 159,4$ e $59,88 \text{ J g}^{-1}$). A mistura física (QTS+JR19) apresentou dois picos exotérmicos e dois endotérmicos, com perfil característico dos componentes isolados. Observou-se a manutenção da temperatura de fusão da molécula ativa. O filme de QTS apresentou perfil térmico semelhante à amostra do pó, apresentando também um pico endotérmico e outro exotérmico. O filme de QTS+JR19 apresentou manutenção de todos os picos dos componentes isolados de QTS e JR19 (dois picos endotérmicos e dois exotérmicos). No entanto, observou-se um recuo da temperatura de fusão da JR19 de $198,40 \text{ }^\circ\text{C}$ para $173,72 \text{ }^\circ\text{C}$ e a diminuição da intensidade de pico, fato este, relacionado a menor massa da JR19 incorporada ao filme (1:7) e/ou a um novo rearranjo molecular da JR19 durante o processo de desenvolvimento do biomaterial. A presença dos picos na DSC do filme de QTS+JR19 indica que não houve interação química entre os componentes analisados.

Figura 26 – Curvas de DSC das amostras.



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 2 – Resultados de decomposição térmica e eventos calorimétricos da JR19, QTS, QTS+JR19, Filme de QTS e de QTS+JR19.

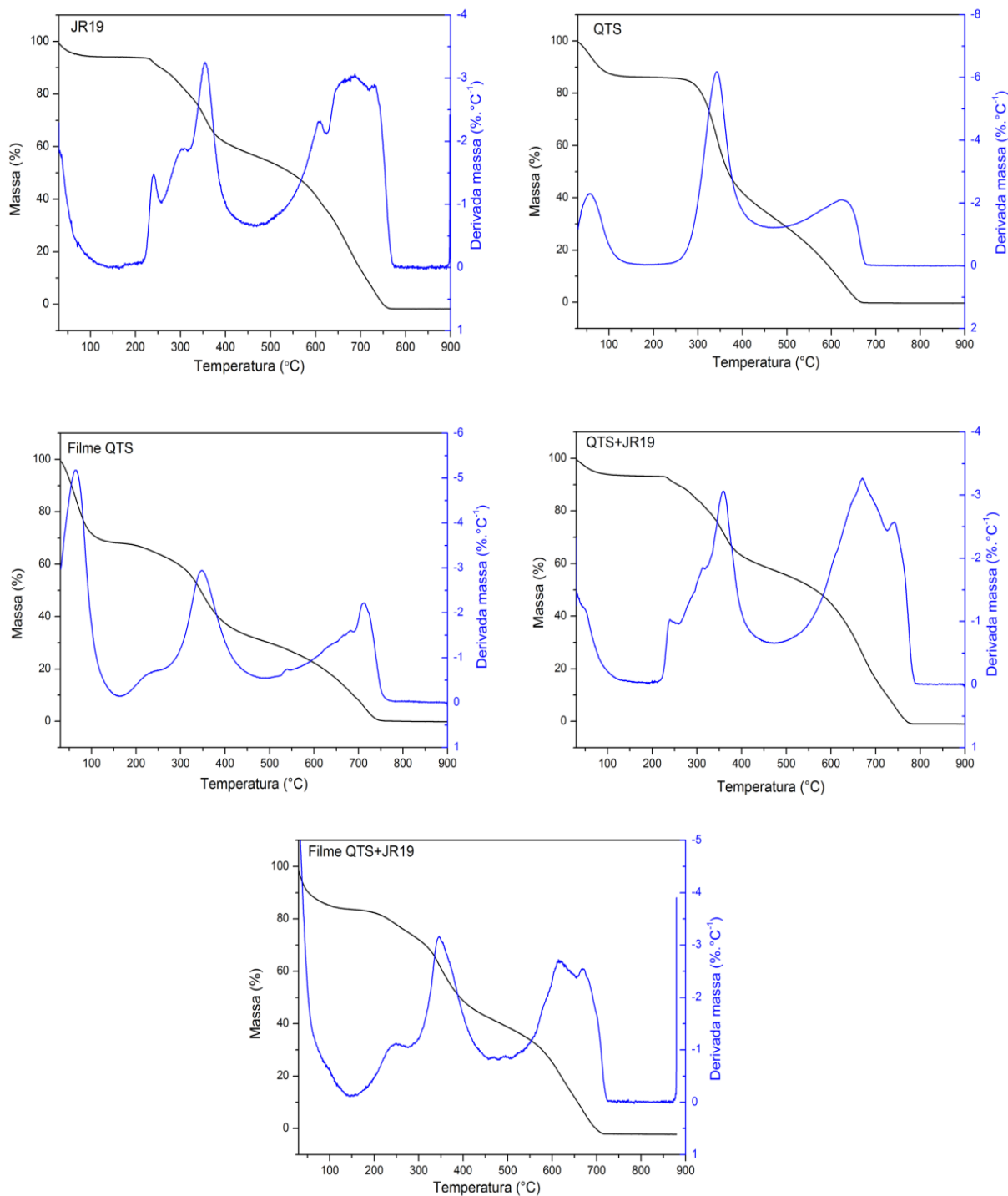
Amostras	DSC			TG		
	Eventos	T _{pico} (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	Etapas	Faixa de temperatura (°C)	Massa (%)
JR19	1	198,40	41,92	1	30,00-140,71	5,97
	2	201,64	159,40	2	140,71-253,74	3,81
	3	253,11	59,88	3	253,74-462,40	33,51
				4	462,40-748,31	56,30
QTS	1	142,02	211,00	1	30,00-164,67	13,83
	2	306,42	187,60	2	164,67-474,10	54,00
				3	474,10-664,41	31,70
QTS+JR19	1	106,14	166,80			
	2	198,85	23,06	1	30,00-58,24	6,68
	3	201,91	57,18	2	58,24-474,25	36,01
	4	259,39	13,00	3	474,25-727,79	57,07
	5	311,10	90,66			
Filme QTS	1	139,80	42,53	1	30,00-161,68	31,97
	2	299,28	29,69	2	161,68-476,63	36,85
				3	476,63-770,88	31,17
Filme QTS+JR19	1	120,46	51,07			
	2	173,72	0,41	1	30,00-151,77	16,40
	3	190,64	5,53	2	151,77-495,28	44,51
	4	245,45	0,81	3	495,28-694,67	38,51
	5	302,48	33,37			

Fonte: dados da pesquisa.

A Figura 27 mostra as curvas de TG/DTG e os resultados da decomposição termogravimétrica já demonstrada na Tabela 2. A amostra de QTS mostrou três etapas de perda de massa (30-164,67 °C, Δm = 13,83 %; 164,67-474,1 °C, Δm = 54 % e 474,1-664,41 °C, Δm = 31,70 %), sendo a segunda etapa (principal) correspondente à eliminação e decomposição de produtos voláteis após o início da quebra das ligações glicosídicas (OSÓRIO et al., 2018; LAL; ARORA; SILVA, 2016). A JR19 apresentou quatro etapas de perda de massa (30-140,71 °C, Δm = 5,97 %; 140,71-253,74 °C, Δm = 3,81 %; 253,74-462,4 °C, Δm = 33,51 %, e 462,4-748,3 °C, Δm = 56,30 %). Para a mistura física QTS+JR19 observou-se a presença de três etapas de degradação, com predominância das características da QTS (30,00-58,24 °C, Δm = 6,68%; 58,24-474,25 °C, Δm = 36,01% e 474,25-727,79 °C, Δm = 31,17%). O filme de QTS apresentou um perfil de perda de massa semelhante ao pó, com três etapas de perda de massa (30,00-161,68 °C, Δm = 31,97 %; 161,68-476,63 °C, Δm =

36,85 %; 476,63-770,88 °C, $\Delta m = 31,17$ %). O filme incorporado com JR19 apresentou também três etapas de perda de massa (30-151,77 °C, $\Delta m = 16,40$ %; 151,77-495,28 °C, $\Delta m = 44,51$ %, 495,28-694,67 °C, $\Delta m = 38,51$ %), sendo a segunda etapa a principal, com semelhanças às perdas do polímero isolado.

Figura 27 – Curvas de TG/DTG das amostras.



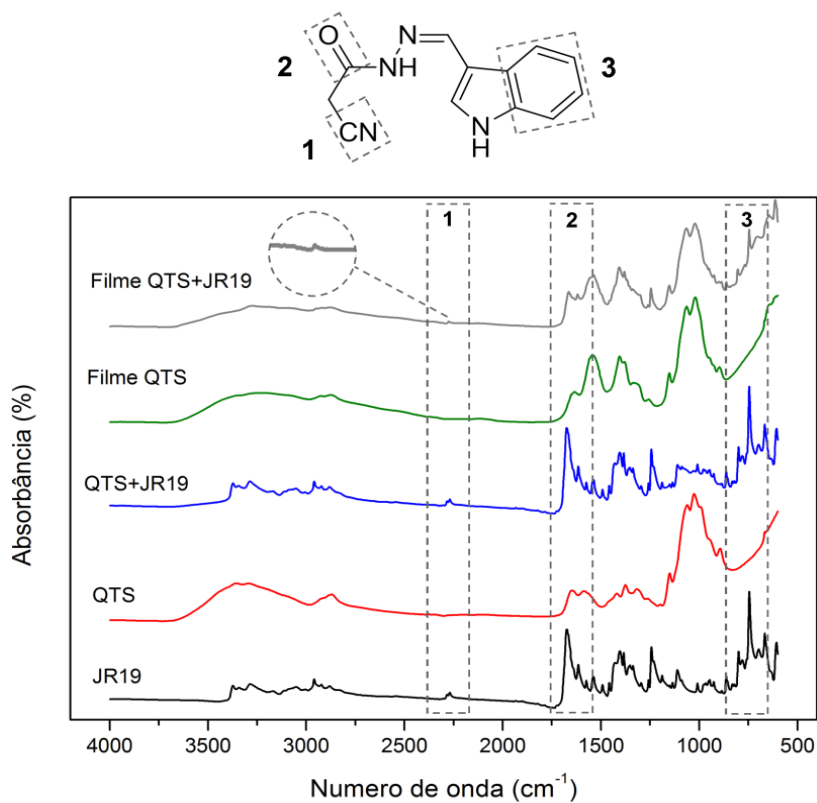
Fonte: dados da pesquisa.

5.10 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foi usada como técnica complementar para auxiliar na pesquisa de possíveis interações químicas entre a molécula JR19 e a QTS. A Figura 28 e Tabela 3 mostram os resultados das principais bandas observadas nos espectros de FTIR dos componentes estudados. Nas amostras que continham QTS, foi possível observar bandas de alongamento axial de O-H e de estiramento N-H (entre 3323 e 3265 cm^{-1}), sendo esta última sobreposta pelas vibrações de estiramento das bandas de O-H, com exceção da mistura física, em que apenas as características da molécula foram preservadas, que corresponde à ligação N-H do grupamento indólico da JR19. Na região em torno de 2962 a 2863 cm^{-1} foi observado bandas que podem ser atribuídas aos estiramentos de ligação C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila e metileno. Uma deformação axial de duplas ligações C=O de amida I foi observada entre 1677 e 1636 cm^{-1} e também uma deformação angular simétrica planar de NH_2 foi observada entre 1594 e 1539 cm^{-1} . A banda entre 1070 e 1058 cm^{-1} é referente as deformações axiais e angulares de ligações C-O de álcoois; e está presente um alongamento C-O-C entre 1020 e 1018 cm^{-1} (ALVES et al., 2018; BURITI et al., 2018; MAJKA; COKOT; PIELICHOWSKI, 2018; ROJEK; WESOLOWSKI, 2016).

Para as amostras com JR19, os espectros apresentaram bandas características dos principais grupos funcionais da molécula isolada, como é o caso da detecção da banda do estiramento da nitrila ($\text{C}\equiv\text{N}$), que variou entre 2279 a 2264 cm^{-1} , como exposto nos trabalhos de Moraes et al. (2018), Pavey, Khan e Saxena. (2017), Ke et al. (2016) e Konnola, Nair e Joseph (2015). Além disso, este resultado se mostrou semelhante na amostra isolada da JR19, na mistura física e, com menor intensidade, no filme com o fármaco, o que sugere a ligação entre o polímero e a molécula, através de uma possível interação com o grupamento $-\text{NH}_2$ da quitosana. Assim como no espectro da QTS, a JR19 apresentou absorção na região entre 1677 e 1636 cm^{-1} , o que corresponde à deformação axial de C=O de amida, a qual apresentou maior intensidade na amostra isolada da molécula e na mistura física em comparação ao filme com o fármaco incorporado. Este evento pode ser justificado pela influência do polímero no fármaco através do processo de formação do filme. Na região de 749 a 741 cm^{-1} foi possível verificar uma banda de absorbância de deformação angular de 4 H adjacentes (anéis aromáticos orto-substituídos), o que corresponde ao anel aromático do grupo indol.

Figura 28 – Espectro de FTIR das amostras.



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 3 – Principais bandas observadas nos espectros de FTIR das amostras.

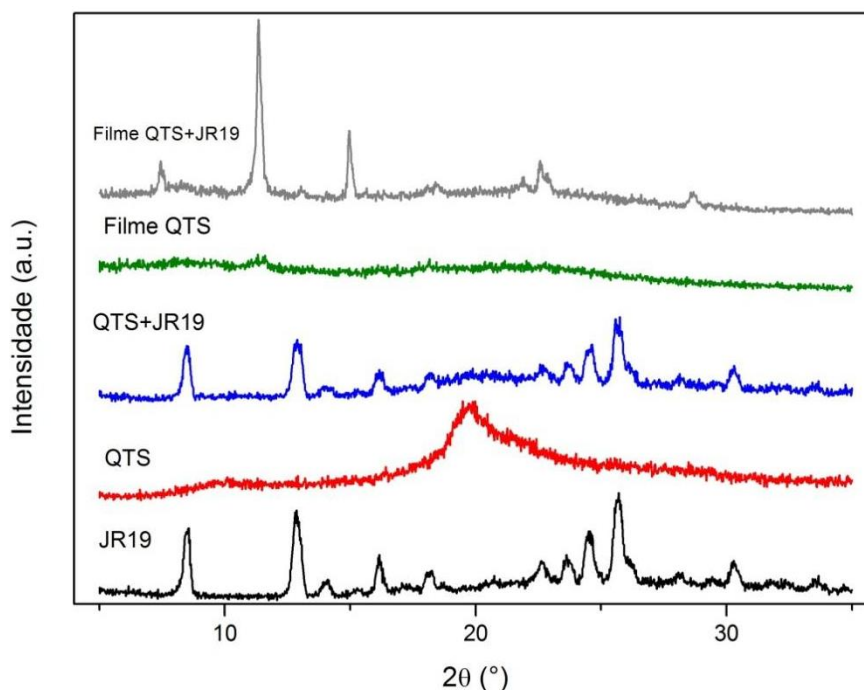
Amostras	O-H	N-H	CH	C≡N	C=O	NH ₂	C-OH	C-O-C	Aromático
JR19	-	3280	2959	2264	1667	-	-	-	741
QTS	3323	3323	2879	-	1650	1594	1062	1020	-
CHI+JR19	3281	3281	2962	2266	1677	-	-	-	749
Filme QTS	3272	3272	2863	-	1636	1541	1070	1018	-
Filme QTS+JR19	3265	3265	2904	2279	1667	1539	1058	1020	741

Fonte: dados da pesquisa.

5.11 Difração de raios-X (DRX)

A Figura 29 mostra os difratogramas das amostras. O espectro da JR19 exibiu reflexões cristalinas em $8,54^\circ$, $12,80^\circ$, $14,09^\circ$, $16,08^\circ$, $18,19^\circ$, $22,65^\circ$, $23,59^\circ$, $24,53^\circ$, $25,70^\circ$, $28,16^\circ$ e $30,27^\circ$ 2θ . Para a amostra de QTS, foram observadas duas reflexões características do polímero em $9,75^\circ$ e $19,83^\circ$ 2θ (WENG et al., 2017), que se referem ao perfil semicristalino do polímero, consequente das fortes interações inter e intramoleculares por pontes de hidrogênio entre os grupos amina, álcool e amida (SEGHIR; BENHAMZA, 2017). A mistura física apresentou características semelhantes ao fármaco isolado, porém com diminuição da intensidade das reflexões. O filme de QTS desenvolvido apresentou duas reflexões em $11,62^\circ$ e $18,19^\circ$ 2θ e uma maior amorficidade quando comparado ao pó isolado. O filme de QTS com a molécula incorporada apresentou omissão de algumas reflexões da JR19 isolada e aumento da intensidade da reflexão no ângulo de $11,58^\circ$ 2θ . Isto ocorreu devido a uma possível ausência de uniformidade na amostra analisada, corroborando com os achados de Reis et al. (2017). Outro fator que pode ter relação com esse achado é a presença de uma nova forma cristalina do fármaco obtida no decorrer da formação dos filmes, o que modificou a característica cristalina desse, explicada pelas novas reflexões vistas no difratograma do filme de QTS+JR19.

Figura 29 – Difratogramas das amostras.



Fonte: dados da pesquisa.

5.12 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* – Método de Difusão em Ágar

Após o período de incubação das amostras em estudo, descrita no item 4.2.2.12, observou-se a formação de um nítido halo ao redor dos controles positivos, relativos à citotoxicidade do espécime, com características de grau 4 (severa), visto que o tamanho da zona de descoloramento ao redor da amostra foi maior que 1 cm. Nas amostras que continham o filme de QTS e QTS+JR19, os mesmos não apresentaram a formação de halos, resultado este, semelhante ao do controle negativo, o que corresponde a uma ausência de citotoxicidade por não apresentar uma zona de descoloramento ao redor ou sob a amostra, conforme a descrição dos graus de citotoxicidade mostradas no Quadro 2.

Quadro 2 – Descrição dos graus de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar.

Grau	Citotoxicidade	Descrição da zona de citotoxicidade
0	Ausência	Ausência de descoloramento ao redor ou sob a amostra
1	Leve	Zona de descoloramento limitada à área sob a amostra
2	Branda	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra menor que 0,45 cm
3	Moderada	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra compreendida entre 0,45 cm a 1,0 cm
4	Severa	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira

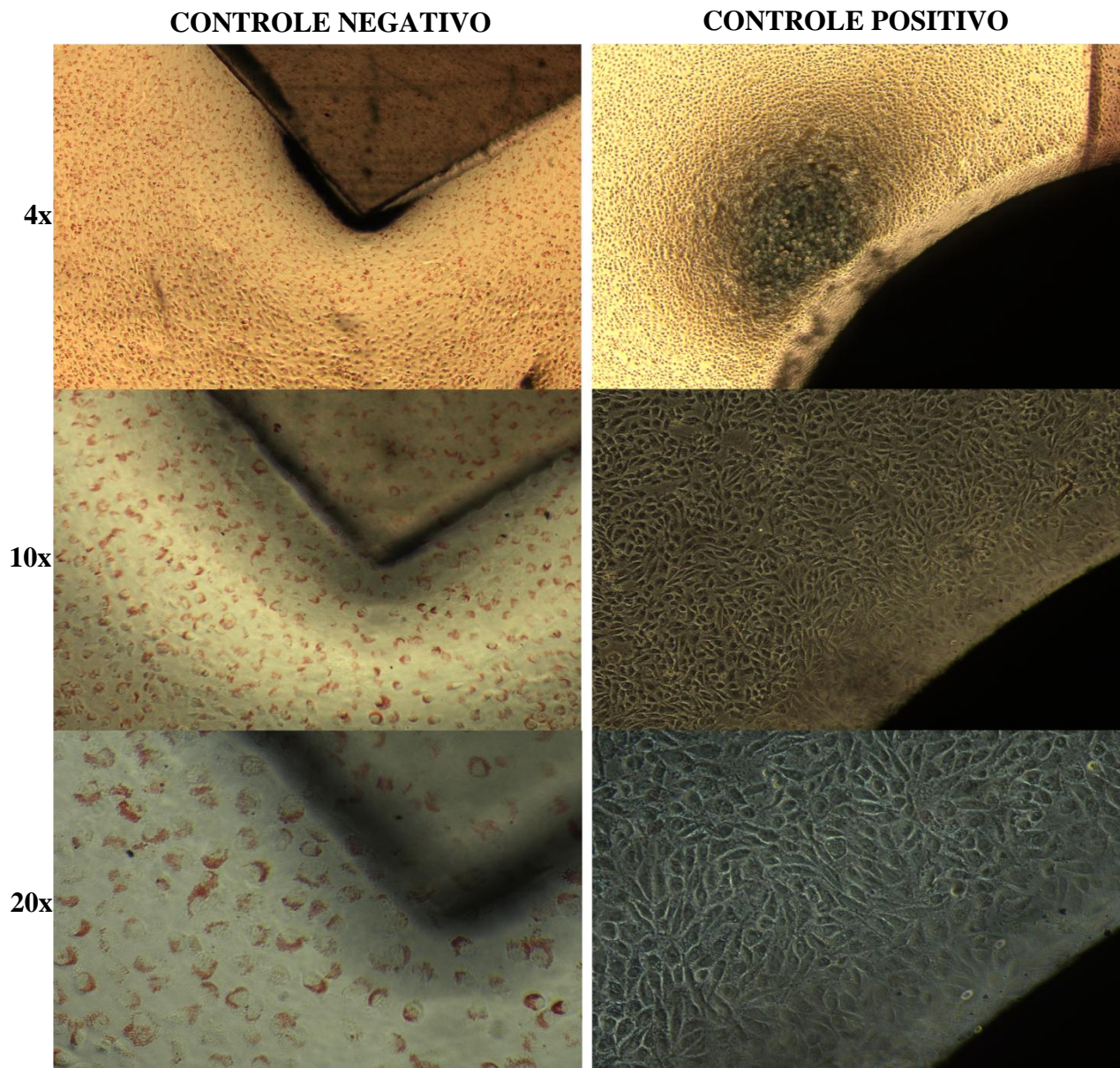
Fonte: ISO (2009).

A partir da constatação da ausência de halos nas amostras dos filmes de QTS e QTS+JR19, buscou-se uma forma de ampliar a visualização macroscópica das mesmas e dos controles negativos e positivos, a fim de comparar os resultados obtidos por cada amostra. Desta forma, através de fotomicrografias dos poços de difusão em ágar, foi possível identificar com melhor nitidez os limites das áreas em estudo e assim visualizar a presença ou ausência de coração das células com o vermelho neutro, realizado através do microscópio

invertido em diferentes aumentos.

A Figura 30 mostra a região analisada do controle negativo (Plástico atóxico) e positivo (Látex tóxico) nos aumentos de 4x, 10x e 20x, a qual foi possível constatar a ausência de descoramento das células ao redor e sob as amostras do controle negativo e descolorimento das células do controle positivo, parâmetros esses, fundamentais para determinação posterior de caráter qualitativo da existência ou inexistência de citotoxicidade do sistema em estudo.

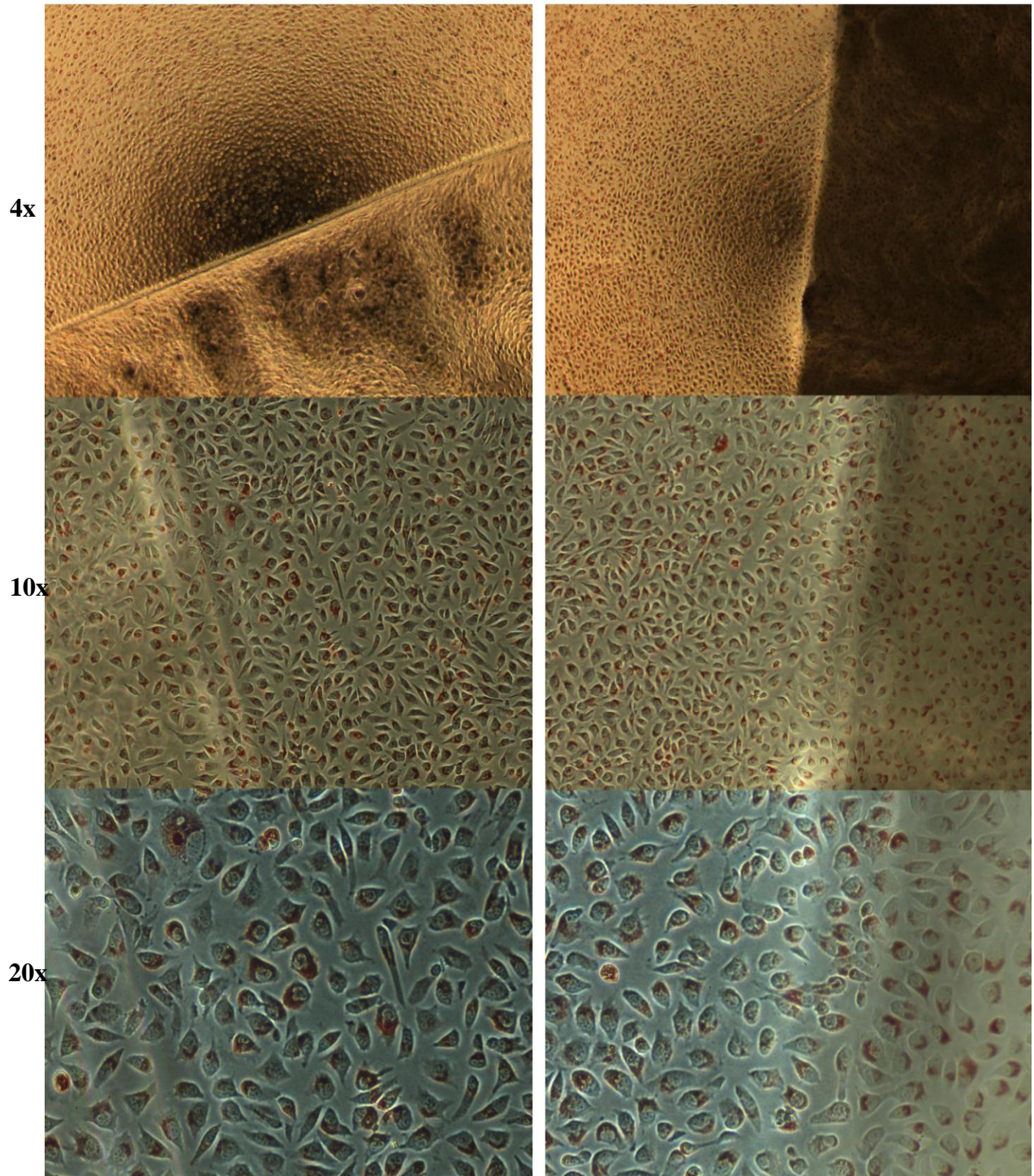
Figura 30 – Fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x e 20x dos controles negativos e positivos, revelando a ausência de descolorimento e descolorimento ao redor e sob as amostras, respectivamente.



Fonte: dados da pesquisa.

Assim, como no controle negativo os filmes de QTS e QTS+JR19 apresentaram ausência de descoramento celular, ou seja, as amostras não possuem caráter citotóxico, conforme a Figura 31.

Figura 31 – Fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x e 20x dos filmes de QTS e QTS+JR19, revelando a ausência de descoramento ao redor e sob as amostras.



Fonte: dados da pesquisa.

Portanto, a metodologia empregada nesta análise promoveu uma avaliação quantitativa, através da medição da extensão em milímetros do halo formado e uma análise qualitativa por meio da verificação da presença ou ausência da coração celular pela ação do vermelho neutro. Através das análises realizadas neste estudo *in vitro* pôde-se constatar a atoxicidade celular dos filmes de QTS e QTS+JR19, visto que, os filmes desenvolvidos apresentaram viabilidade celular, respaldando assim, biocompatibilidade e segurança do mesmo em futuros estudos *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

- A obtenção dos filmes de QTS e QTS+JR19 através do método sol-gel mostrou-se eficaz;
- A molécula JR19 promoveu ao filme de QTS+JR19 a melhora das propriedades físico-químicas e consequentemente na otimização das propriedades mecânicas, visto que estes filmes apresentaram respostas satisfatórias na análise ao dobramento e aos ensaios de tração e molhabilidade, quando comparado com os filmes com apenas QTS;
- Observou-se através da análise morfológica realizada pela MO e sua topografia em 3D e através da MEV, que os filmes de QTS+JR19 apresentaram características de superfície homogênea e rugosa com a presença de cristais característicos da molécula isolada, sugerindo a interação entre a QTS e JR19, uma vez que a adição da molécula originou filmes com diferentes superfícies e rugosidades;
- Através da técnica de CCDA sugere-se a incorporação da molécula no filme de QTS, por apresentarem perfil cromatográfico semelhante quando comparada com a revelação da molécula isolada;
- As técnicas termoanalíticas (DSC e TG/DTG) e espectroscópicas (FTIR e DRX) utilizadas permitiram avaliar a formulação em diferentes apresentações (pó e filme). Os resultados revelam que combinação de JR19 e QTS na forma de filme, torna-se uma proposta inovadora e alternativa para o tratamento de inflamações tópicas.
- A avaliação da citotoxicidade *in vitro* por meio da difusão em ágar revelou quantitativamente e qualitativamente que os filmes de QTS e QTS+JR19 apresenta um caráter atóxico, resultado este, satisfatório para futuros testes *in vivo*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Através da obtenção de todos os resultados da pesquisa, pode-se concluir que os filmes de QTS+JR19 apresenta grandes perspectivas no âmbito de novos sistemas de liberação de fármacos, devido a todas as características atrativas verificadas ao longo da pesquisa. O estudo visa realizar e concluir os seguintes ensaios: avaliar a cinética de liberação *in vitro* dos filmes produzidos, utilizando células do tipo Franz e avaliar a ação anti-inflamatória e cicatrizante *in vivo* dos filmes obtidos, a fim de promover uma nova proposta farmacoterapêutica para tratar lesões cutâneas, visto que o fármaco incorporado apresenta caráter inédito, que em associação com a QTS, na forma de filme, pode representar um novo sistema de liberação controlada de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Conran – Patologia: Bases patológicas das doenças**. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 2016.
- AKYUZ, L.; KAYA, M.; KOC, B.; MUJTABA, M.; ILK, S.; LABIDI, J.; SALABERRIA, A. M.; CAKMAK, Y. S.; YILDIZ, A. Diatomite as novel composite ingrediente for chitosan film with enhanced physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, New York, v. 105, part 2, p. 1401-1411, 2017.
- ALMEIDA, L. A. **Membrana de quitosana incorporada com extrato de uva jacquez para tratamento de feridas cutâneas**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2017.
- ALVARADO, L. G. **Membrana transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas**. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia Médica). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2012.
- ALVES, T. V. G.; COSTA, R. S.; GOMES, A. T. A.; COSTA, C. E. F.; PEREGO, P.; JÚNIOR, J. O. C. S.; CONVERTI, A.; COSTA, R. M. R. Quality control of Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products and microencapsulated extract by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, p. 1-8, 2018.
- AMARAL, A. T.; ANDRADE, C. H.; KÜMMERLE, A. E.; GUIDO, R. V. C. The evolution of medicinal chemistry in Brazil: advances in the 40 years of the Brazilian society of chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 694-700, 2017.
- APOLINÁRIO, N. M. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilhidrazônicos**. 2016. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- ARAÚJO, P. B.; GARCIA, T. G. C.; BEZERRA JUNIOR, A. G.; COLAÇO, R. M. R.; SOUSA, W. J. B.; BARBOSA, R. C.; FOOK, M. V. L. Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de Etnogestrel. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 12, n. 2, p. 138-145, 2017.
- BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal**, Oxford, v. 53, p. 171-188, 2014.
- BANO, I.; ARSHAD, M.; YASIN, T.; GHOURI, M. A.; YOUNUS, M. Chitosan: a potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, New York, v. 102, p. 380-383, 2017. No prelo.
- BANO, I.; GHOURI, M. A.; YASIN, T.; HUANG, O.; PALAPARTHI, A. S. Characterization and potential applications of gamma irradiated chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol). **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 65. p. 81-88, 2014.

- BARATIERI, T.; SANGALETI, C. T.; TRINCAUS, M. R. Conhecimento de acadêmicos de enfermagem sobre avaliação e tratamento de feridas. **Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde**, Uberaba, v. 4, n.1, p. 2-15, 2015. Disponível em: <<http://seer.uftm.edu.br/revistaeletronica/index.php/enfer/article/view/1259>>. Acesso em: 28 jun. 2017.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: As bases moleculares da ação dos fármacos. São Paulo: Artmed, 2009.
- BENHABILE, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUCHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 29, n. 1, p. 48-56, 2012.
- BESSA, J.A.P.; GONÇALVES, A.A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, Aracaju, v. 1, n. 1, p. 13-28, 2013.
- BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Instituto Alberto Luiz Coimbra, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.
- BORGES, F. S. **Dermato-funcional**: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. São Paulo: Phorte, 2006.
- BOULAIS, N.; PEREIRA, U.; LEBONVALLET, N.; GOBIN, E.; DORANGE, G.; ROUGIER, N.; CHESNE, C.; MISERY, L. Merkel Cells as Putative Regulatory Cells in Skin Disorders: An In Vitro Study. **Plos one**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-9, 2009.
- BRITA, F. P.; GARCIA, T. G. C.; BEZERRA JUNIOR, A. G.; SOUSA, W. J. B.; BARBOSA, R. C.; TOMAZ, A. F.; FOOK, M. V. L. Obtenção e avaliação de Filmes de Gelatina/Quitosana para liberação Sublingual de Midazolam. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v. 13, n. 1, p. 42-48, 2018.
- BURITI, J. S.; BARRETO, M. E. V.; SANTOS, K. O.; FOOK, M. V. L. Thermal, morphological, spectroscopic and biological study of chitosan, hydroxyapatite and wollastonite biocomposites. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, p. 1-10, 2018.
- CAETANO, G. F. **Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos**. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestivas**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos – Propriedades, Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, São Carlos, v. 24, n. 2, p. 203-2013, 2014.

CASTRO, P. A. A. **Especetroscopia de absorção no infravermelho em pele queimada: avaliação de potenciais biomarcadores para o reparo tecidual**. 2018. 56f. Dissertação (Mestrado em de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, SP, 2018.

CHEN, L.; LIU, K.; YE, J.; SHEN, Q. Controlled formation of surface hydrophilicity enhanced chitosan film bylayer-by-layer electro-assembly. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 56, p. 518-521, 2015.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 268f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COLLET, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

COSTA, E. R. R. **Lipodistrofiaginóide: tratamento da celulite**. 1. ed. Rio de Janeiro: Thieme Revinter, 2009.

CRUZ, B. F.; CORDOVIL, P. B. L.; BATISTA, K. N. M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 246-250, 2012.

DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan bentonitenanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, New York, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016326873>>. Acesso em: 25 maio 2017.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Quitina e quitosana: características, utilizações e perspectivas atuais de produção. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 184-191, 2013.

EULÁLIO, E. J. C. **Membranas de quitosana e quercetina para aplicação em ulcerações epiteliais: desenvolvimento e caracterização**. 158 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2016.

EVANS, N. D. et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, Amsterdam, v. 28, p. 397-409, 2013.

GOMES, D. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de alginato incorporados com extratos de *Anadenanthera colubriana* (VELL.) Brenan visando o desenvolvimento de substituto temporário de pele**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

GUIMARÃES, D. G.; ROLIM, L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década

(2006-2016): Uma Revisão Sistemática. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 9, n. 6, p. 2551-2592, 2017.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional**: fundamentos, recursos e patologias. 3. ed. São Paulo: Manoele, 2004.

HARRIS, M. I. **Pele**: do nascimento à maturidade. 1. ed. São Paulo: Senac, 2018.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 7, n. 59, p. 64-74. 2013.

HIRAO, T. Chapter 40 - Structure and Function of Skin From a Cosmetic Aspect. **Cosmetic Science and Technology**: Theoretical Principles and Applications, Amsterdam, p. 673-683, 2017.

HOSNY, N. M.; EL MORSY, E. S. A.; SHERIF, Y. E. Synthesis, spectral, optical and anti-inflammatory activity of complexes derived from 2-aminobenzohydrazide with some rare earths. **Journal of Rare Earths**, Amsterdam, v. 33, n. 7, p. 758-764, 2015.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista Médica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 89, n. 4, p. 125-131, 2010.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993- 5. **Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

JARCZYK-JEDRYKA, A.; FILAPEK, M.; MALECKI, G.; KULA, S.; JANECZEK, H. BOHAREWICZ, B.; IWAN, A.; SCHAB-BALCERZAK, E. Symmetrical *N*-acylsubstituted dihydrazones containing bithiophene core-Photophysical, electrochemical and thermal characterization. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, New York, v. 159, p. 169-176, 2016.

JING, Y. J.; HAO, Y. J.; QU, H.; SHAN, Y.; DU, D. S. LI AND R. Q. Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. **Acta Biologica Hungarica**, Akad. Kiadó, v. 58, n. 1, p. 75-86, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KALAYCIOGLU, Z.; TORLAK, E.; AKIN-EVINGUR, G.; OZEN, I.; BEDIA ERIM, F. Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 101, p. 882-888, 2017.

KE, H.; PANG, Z.; PENG, B.; WANG, J.; CAI, Y.; HUANG, F.; WEI, Q. Thermal energy storage and retrieval properties of form-stable phase change nanofibrous mats based on ternary fatty acid eutectics/polyacrylonitrile composite by magnetron sputtering of silver. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 123, p. 1293-1307, 2016.

KINGSLEY, J. D.; DOU, H.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H. E.; DESTACHE, C. J. Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, New York, v. 1, n. 3, p. 340-350, 2006.

KONNOLA, R.; NAIR, C. P. R.; JOSEPH, K. Cross-linking of carboxyl-terminated nitrile rubber with polyhedral oligomeric silsesquioxane. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 123, p. 1479-1489, 2015.

KOUCHAK, M.; HANDALI, S.; BOROUJENI, B. N. Evaluation of the Mechanical Properties and Drug Permeability of Chitosan/Eudragit RL Composite Film. **Public Health and Research Perspectives**, Burlington, v. 6, n. 1, p. 14-19, 2015.

LAL, S.; ARORA, S.; SHARMA, C. Synthesis, thermal and antimicrobial studies of some Schiff of chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 124, p. 909-916, 2016.

LANZILLOTTI, P. F. **Sistemas para liberação modificada de fármacos**. 2012. 117f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas) – Coordenação de Ensino e Capacitação, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

LAZZARINI, C.; HARANAHALLI, F.; RIEGER, R.; ANANTHULA, H. K.; DESAI, P. B.; ASHBAUGH, A.; LINKE, M. J.; CUSHION, M. T.; RUZSICKA, B.; HALEY, J.; OJIMA, I.; DEL POETA, M. Acylhydrazones as Antifungal Agents Targeting the Synthesis of Fungal **Sphingolipids**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 62, 2018. No prelo.

LEE, T. W. Y.; ROBINSON, J. R. Sistema de Liberação Controlada de Drogas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, ed. 20, 2004.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana / insulina**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

LINO, M. E. S.; RUELA, A. L. M.; TREVISAN, M. G.; PEREIRA, G. R. Influence of hydration and crosslinking in transdermal delivery of nicotine from chitosan-based gels by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [São Paulo], v. 130, n. 3, p. 1455-1461, 2017.

LINO, M. E. S.; RUELA, A. L. M.; TREVISAN, M. G.; PEREIRA, G. R. Influence of hydration and crosslinking in transdermal delivery of nicotine from chitosan-based gels by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 130, p. 1455-1461, 2017.

LINS, L. C.; BAZZO, G. C.; BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N. Composite PHB/chitosan microparticles obtained by spray drying: effect of chitosan concentration and crosslinking

agents on drug release. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 8, p. 1462-1471, 2014.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrófilos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MAIA, R. C.; TESCH, R.; FRAGA, C. A. M. Acylhydrazone derivatives: a patente review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, Londres, v. 24, n. 11, p. 1161-1170, 2017.

MAJKA, T. M.; COKOT, M.; PIELICHOWSKI, K. Studies on the thermal properties and flammability of polyamide 6 nanocomposites surface-modified via layer-by-layer deposition of chitosan and montmorillonite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 131, p. 405-416, 2018.

MARTINEZ-CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FELIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YEPIZ-GOMEZ, M. S.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, Orlando, v. 82, n. 2, p. 305-315, 2010.

MATTÉ, G. M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Bilbao, v. 14, n. 5, p. 206-218, 2013.

MEIRA, C.S.; FILHO, J.M.S.; SOUSA, C.C.; ANJOS, P.S.; CERQUEIRA, J.V.; NETO, H.A.D.; SILVEIRA, R.G.; RUSSO, H.M.; WOLFENDER, J.L.; QUEIROZ, E.F.; MOREIRA, D.R.M.; SOARES, M.B.P. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-*N*-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v. 26, n. 8, p. 1971-1985, 2018.

MELO, M.R.P. **Bioconversão do exoesqueleto do camarão para elaboração de filme biodegradável a base de quitosana**. 2014. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.

MELO, T. R. F.; CHELUCCI, R. C.; PIRES, M. E. L.; DUTRA, L. A.; BARBIERI, K. P.; BOSQUESI, P. L.; TROSSINI, G. H. G.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Pharmacological Evaluation and Preparation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an *N*-Acyl Hydrazone Subunit. **International Journal of Molecular Sciences**, Basael, v. 15, p. 5821-5837, 2014.

MITCHELL.; KUMAR.; ABBAS.; FAUSTER.; ASTER. **Robbins & Cotran – Fundamentos de Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MORAES, A. D. T. O.; MIRANDA, M. D. S.; JACOB, I. T. T.; AMORIM, C. A. C.; MOURA, R. O. M.; SILVA, S. A. S.; SOARES, M. B. P.; ALMEIDA, S. M. V.; SOUZA, T. R. C. L.; OLIVEIRA, J. F.; SILVA, T. G.; MELO, C. M. L.; MOREIRA, D. R. M.; LIMA, M. C. A. L. Synthesis and *in vivo* biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-*N*-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, 2018. No Prelo.

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

MOURA, W. C. S. **Planejamento, síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e derivados N-acildrazônicos substituídos**. 2016. 64 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, Orlando, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.

NATASĂ, C.; TIPERCIUC, B.; DURMA, M.; BENEDEC, D.; ONIGA, O. New Hydrazones Bearing Thiazole Scaffold: Synthesis, Characterization, Antimicrobial, and Antioxidant Investigation. **Molecules**, Farmington Hills, v. 20, p. 17325-17338, 2015.

NERY, J.C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NICOLOSI, J. G.; MORAES, A. M. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados, Campinas, jul. 2005. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, **Anais...** Disponível em: < <http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tBT42.pdf>>.

OLIVEIRA, A. F.; SOLDI, V. Preparação, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1845-1849, 2009.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de farmácia**, Goiás, v. 3, n. 2, p. 29-35, 2006.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. **Biomateriais – fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1.ed. 2012.

OSÓRIO, L. R.; MENEGUIN, A. B.; SILVA, H. B.; BARRETO, H. M.; OSAJIMA, J. A.; FILHO, E. C. S. Evaluation of physico-chemical properties and antimicrobial synergic effect of ceftazidime-modified chitosan. . **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, p. 1-8, 2018.

PANDEY, M. K.; KHAN, A. R.; SAXENA, A. K. Synthesis and thermal analysis of phosphonitrile-core-bearing aromatic nitriles for high-temperature applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 129, p. 1453-1462, 2017.

PANDIMA DEVI, M.; SEKAR, M.; CHAMUNDESWARI, M.; MOORTHY, A.; KRITHIGA, G.; SELVA MURUGANI, N.; SASTRY, T, P. A novel wound dressing material – fibrina – chitosan – sodium alginate composite sheet. **Bulletin Material Science**, [Amsterdam], v. 35, p. 1157-1163, 2012.

PARRILHA, G. L. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade**. 154 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PEREIRINHA, P. R. R. **Desenvolvimento de Sistemas Mucoadesivos para a Administração Controlada de Fármacos**. 2014. 30f. Monografia (Estágio curricular do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

Procedimento operacional padronizado/ Manual da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ POP 65.3330.010. **Ensaio de citotoxicidade *in vitro* – Método de difusão em ágar**.

QUEIROZ, A. C. C. M.; MOTA, D. D. C. F.; BACHION, M. M.; FERREIRA, A. C. M. Úlceras por pressão em pacientes em cuidados paliativos domiciliares: prevalência e características. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 64-71, 2014.

REHDER, J.; SOUTO, L. R. M.; ISSA, C. M. B. M.; PUZZI, M. B. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 122, n. 1, p. 22-25, 2004.

REIS, T. A.; MATOS, B. N.; LIMA, E. M.; CHAKER, J. A.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M. Oxaliplatin preformulation studies for the development of innovative topical drug delivery systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 130, p. 1671-1681, 2017.

REPICH, H. H.; ORYSYK, S. I.; ORYSYKY, V. V.; ZBOROVSKII, Y. U. L.; PEKHNYO, V. I.; VOVK, M. V. Synthesis, crystal structure and spectral characterization of the first Ag⁺ complex compounds involving O,N,O-coordinated N-acylhydrazones of salicylaldehyde. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1144, p. 225-236, 2017.

RODRIGUES, D. A.; FERREIRA-SILVA, G. A.; FERREIRA, A. C. S.; FERNANDES, R. A.; KWEE, J. K.; SANT'ANNA, C. M. R.; LONTA, M.; FRAGA, C. A. M. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. **Journal Medicinal Chemistry**, [Paris], v. 59, p. 655-670, 2016.

ROGOLINO, D.; CARCELLI, M.; BACCHI, A.; COMPARI, C.; CONTARDI, L.; FISICARO, E.; GATTI, A.; SECHI, M.; STEVAERT, A.; NAESENS, L. A versatile salicyl hydrazonic ligand and its metal complexes as antiviral agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 150, p. 9-17, 2015.

ROJEK, B.; WESOLOWSKI, M. Compatibility studies of hydrocortisone with excipients using thermogravimetric analysis supported by multivariate statistical analysis. **Journal of**

Thermal Analysis and Calorimetry, Amsterdam, v. 127, p. 543-553, 2017.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological activities of hydrazine derivatives. **Molecules**, Farmington Hills, v. 12, p. 1910-1939, 2007.

SALEHI, E.; DARAEI, P.; SHAMSABADI, A. A. A review on chitosan-based adsorptive membranes. **Carbohydrate Polymers**, Orlando, v. 152, p. 419-432, 2016.

SANTOS, T. C. C. **Spray de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

SASIKALA, L., DURAI, B., RATHINAMOORTHY, R. Manuka honey loaded chitosan hydrogel films for wound dressing applications. **International Journal of Pharm Tech Research**, Mumbai, v. 5, n. 4, p. 1774-1785, 2013.

SEGHIR, B. B.; BENHAMZA, M. H. Preparation, optimization and characterization of chitosan polymer from shrimp shells. **Food Measure**, New Yourk, v. 11, p. 1137-1147, 2017.

SERAFIM, R. A. M.; GONÇALVES, J. E.; SOUZA, F. P.; LOUREIRO, A. P. M.; STORPIRTIS, S.; KROGH, R.; ANDRICOPULO, A. D.; DIAS, L. C.; FERREIRA, E. L. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of *N*-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 82, p. 418-425, 2014.

SHALABY, W. S.; BURG K. **Absorbable biodegradable polymers**. Boca Raton: CRC PRESS, 2005.

SILVA, J. F. M.; PRADO, G.; MADEIRA, J. E. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; FARACO, A. A. G.; MALTA, C. M.; NICOLI, J. R.; PIMENTA, R. S. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 4, p. 467-475, 2015.

SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; FOOK, M.V. L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2015.

SILVA, N. E. S. **Filmes poliméricos de quitosana com sinvastatina para inflamações cutâneas**. 2015. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SILVA, P. C. D.; POERTELA, A. S.; LIMA, R. S. C.; SANTANA, C. P.; MEDEIROS, A. C. D.; SIMÕES, M. O. S. Compatibility study between lipoic acid with polymers used in controlled drug release systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 123, p. 965-971, 2016.

SILVA, T. F.; BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; COSTA, F. N.; MONTEIRO, C. E.; FERREIRA, F. F.; BARROSO, R. C.; NOËL, F.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Novel orally active analgesic and anti-inflammatory cyclohexyl-*N*-acylhydrazone derivatives. **Molecules**, Farmington Hills, v. 20, p. 3067-3088, 2015.

SOUTO, L. R. M.; REHDER, J., VASSALLO, J.; CINTRA, M. L.; KRAEMER, M. H. S.; PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 124, n. 2, p. 71-76, 2006.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cadernos da Escola de Saúde**, Tarumã v. 1, n. 15, p. 7-17, 2016.

TAVARES, I.S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 2011. 56f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

TOMAZ, A. F. **Desenvolvimento de membrana de quitosana/1,4 Naftoquinona para liberação controlada: curativo para feridas oncológicas**. 143 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Campina Grande, 2017.

VAN DE BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, K. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, Orlando, v. 116, n. 13, p. 237-242, 2015.

VERT, M. Polymeric biomaterials: strategies of the past VC strategies of the future. **Process in Polymer Science**, Pittsburgh, v. 32, n. 8, p. 755-761, 2007.

WENG, R.; CHEN, L.; LINS, S.; ZHANG, H.; WU, H.; LIU, K.; CAO, S.; HUANG, L. Preparation and Characterization of Antibacterial Cellulose/Chitosan Nanofiltration Membranes. **Polymers**, Washington, v. 9, n. 116, p. 1-13, 2017.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms in Medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 3. ed. v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 2008.

WIEGAND, C.; HIPLER, U. Polymer-based biomaterials as dressings for chronic stagnating wounds. **Macromolecular Symposia**, Weinheim, v. 294, n. 2, p. 1-13, 2010.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. **Pharmacology Research**, [New York], v. 58, p. 112-116, 2008.

WILLIAMS, D. F.; CAHN, R. W.; BEVER, M. B. **Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials**, Pergamon Press, 1990.

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

WLADYMYR, J. B. S; CARDOSO, M. J. B; ALMEIDA, K.V; NASCIMENTO, E. P; FARIAS, K. A. S; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de compósito a base de quitosana/fosfato de cálcio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 8.3, p. 136-140, 2013.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research**

International, Ottawa, v. 89, Part. 1, p. 117-128, 2016.

YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I. V. Drug synthesis methods and manufacturing technology. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 24-31, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE I

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE JR19 EM FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA

1 INTRODUÇÃO

A administração de medicamentos por via oral ainda é a preferida pela medicina tradicional. Entretanto, algumas limitações, como baixa solubilidade e problemas de liberação de ingredientes ativos, levam ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (ZHANG et al., 2018). Dessa forma, sistemas inovadores de administração de medicamentos apresentam-se como alternativa para incorporação de fármacos tradicionais e moléculas em fase de desenvolvimento, pois objetivam melhorar a ação terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais (ISMAIL et al., 2018; ARAÚJO; TEIXEIRA, FREITAS, 2010).

A subunidade *N*-acilidrazona tem sido relatada em várias moléculas bioativas com ampla variedade de propriedades biológicas, tais como antiviral, antibacteriana, antirapitória, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antituberculosa e antitumoral (ROLLAS, KÜÇÜKGÜZEL, 2007; SERAFIM et al., 2014; NATASĂ et al. 2012; ROGOLINO et al., 2015; REIS et al., 2017; MORAES, et al., 2018). Considerando o seu potencial clínico e visando a descoberta de novas terapias medicamentosas, podem ser desenvolvidos métodos alternativos para o tratamento de doenças cujos fármacos tradicionais apresentam limitações terapêuticas ou toxicológicas (AMARAL et al., 2017).

Filmes poliméricos tratam-se de um dos dispositivos para liberação de fármacos que se demonstram como um desafio de longa data (BLATTMANN, PRATSINIS, 2018). Por meio deste trabalho filmes de QTS incorporados com JR19, um derivado *N*-acilidrazônico, foram desenvolvidos e foi realizada a identificação desta molécula através da validação da metodologia analítica de espectroscopia de absorção ultravioleta/visível (UV/VIS) proposta, sendo avaliados os parâmetros de seletividade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), a fim de que os resultados obtidos no estudo fossem considerados confiáveis e reprodutíveis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Quitosana comercial (Sigma-Aldrich[®]) de baixo peso molecular (identificada pelo número do catálogo 448869-50G); Composto JR19 derivado do *N*-acilidrazônico, sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) da UEPB (campus V); acetonitrila (Êxodo[®] científica e Sigma-Aldrich[®]) e solução salina a 0,9%.

2.2 Desenvolvimento e validação do método analítico espectrofotométrico para doseamento da JR19

A molécula JR19 e os filmes poliméricos de quitosana com e sem o fármaco foram dissolvidas em acetonitrila/solução salina (60:40 v/v) formando a solução estoque com concentração inicial de 200 µg/mL. A validação do método analítico foi realizada conforme a RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA- RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). A molécula foi quantificada através do espectrofotômetro com detector UV/VIS MINI 1800 (Shimadzu[®]) seguindo os seguintes parâmetros: seletividade (especificidade), linearidade, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da precisão que foi feita em sextuplicata.

Para determinação do comprimento de onda (λ) de detecção da molécula JR19, foram realizadas varreduras da mesma, utilizando a faixa de 190 a 1100 nm da solução do fármaco em acetonitrila/solução salina (60:40 v/v) com concentração de 200 µg/mL, a fim de identificar o (λ) em que o fármaco apresentava o valor máximo de absorbância, visto que a molécula em estudo é de caráter inovador. O comprimento de onda selecionado para a quantificação do JR19, de acordo com a curva de maior absorbância, foi de 310 nm.

2.2.2 Seletividade e especificidade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das curvas espectrais da molécula JR19, dos sistemas desenvolvidos com e sem incorporação do fármaco, obtido pelas diluições em acetonitrila/solução salina (60:40 v/v) a uma concentração de 200 µg/mL, a fim

de verificar a banda de absorbância característica do fármaco.

2.2.3 Linearidade

A curva analítica foi construída a partir de uma solução estoque de JR19 a uma concentração de 200 µg/mL, na qual, por meio de diluições seriadas em acetonitrila/solução salina (60:40 v/v), foram obtidas 12 concentrações diferentes (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110 e 120 µg/mL) em triplicata. Os resultados foram tratados estatisticamente para determinação do coeficiente de correlação (r) e obtenção da equação da reta.

2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada a partir de três diferentes níveis de concentração: baixa (10 µg/mL), média (60 µg/mL) e alta (120 µg/mL), com três réplicas em cada nível, expressa pela concentração média experimental e a concentração teórica, conforme a Equação 1.

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad (1)$$

2.2.5 Precisão

A precisão foi determinada utilizando seis réplicas na concentração do ponto médio (60 µg/mL). A precisão foi expressa por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, a qual foi obtida pela análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, realizada por operadores distintos e analisadas em dias diferentes, sendo representada em coeficiente de variação expressa em porcentagem (CV%), com nível de significância inferior a 5%, conforme a RESOLUÇÃO RE 166/2017.

2.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada em triplicata na concentração do ponto médio (60 µg/mL), a partir da solução de JR19, utilizando acetonitrila de diferentes fabricantes (Êxodo[®] científica e Sigma-Aldrich[®]) e em uma solução com pH acidificado com 20 µl de ácido acético, passando de um pH de 5,8 para 3,8.

2.2.7 Limite de Detecção (LD)

O LD foi obtido a partir da divisão do desvio padrão (DP) com o coeficiente linear das curvas de calibração do ensaio de linearidade, expressa em triplicata, pela média da inclinação da curva (IC) de calibração das mesmas, multiplicados por 3,3, conforme a Equação 2:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (2)$$

2.2.8 Limite de Quantificação (LQ)

O LQ foi determinado de forma semelhante ao LD, porém, multiplicando-se os valores por 10, conforme a Equação 3.

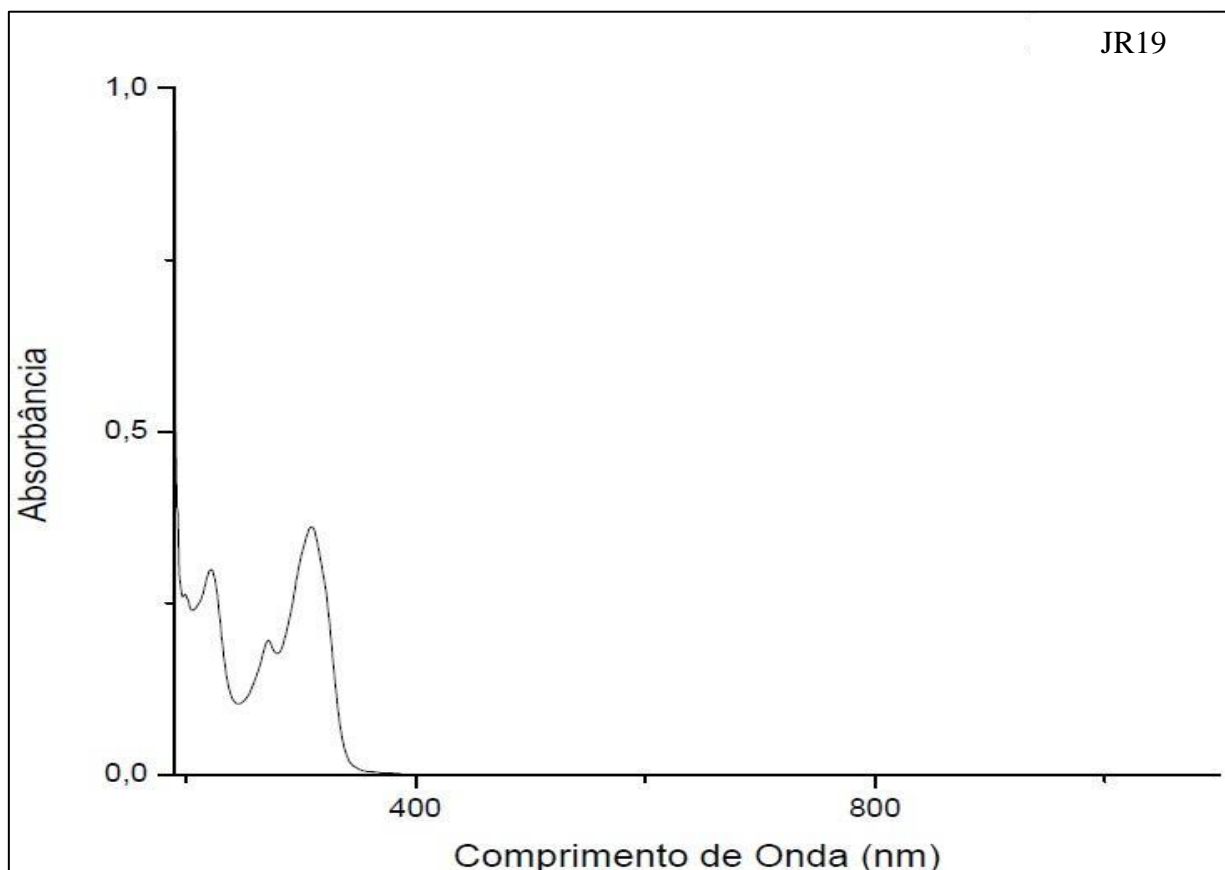
$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (3)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do comprimento de onda da JR19

Através dessa varredura espectrofotométrica na faixa de 190 a 1100 nm, utilizando uma solução de JR19, verificou-se a presença de quatro bandas no espectro de absorção entre 190 e 350 nm, sendo a de maior absorbância presente no (λ) de 310 nm e correspondente ao grupo cromóforo indol (Figura 1). Este valor de λ foi considerado adequado para detecção do fármaco, utilizando um espectrofotômetro com detector UV/VIS no desenvolvimento e validação do método analítico. A determinação do comprimento de onda da JR19 foi fundamental para que os parâmetros da validação fossem avaliados, tendo em vista que tais informações não são encontradas na literatura.

Figura 1 – Espectro de varredura do JR19 no (λ) de 190 a 1100, apresentando quatro picos de absorção, sendo o comprimento de onda de 310 nm correspondente à absorção máxima do fármaco.



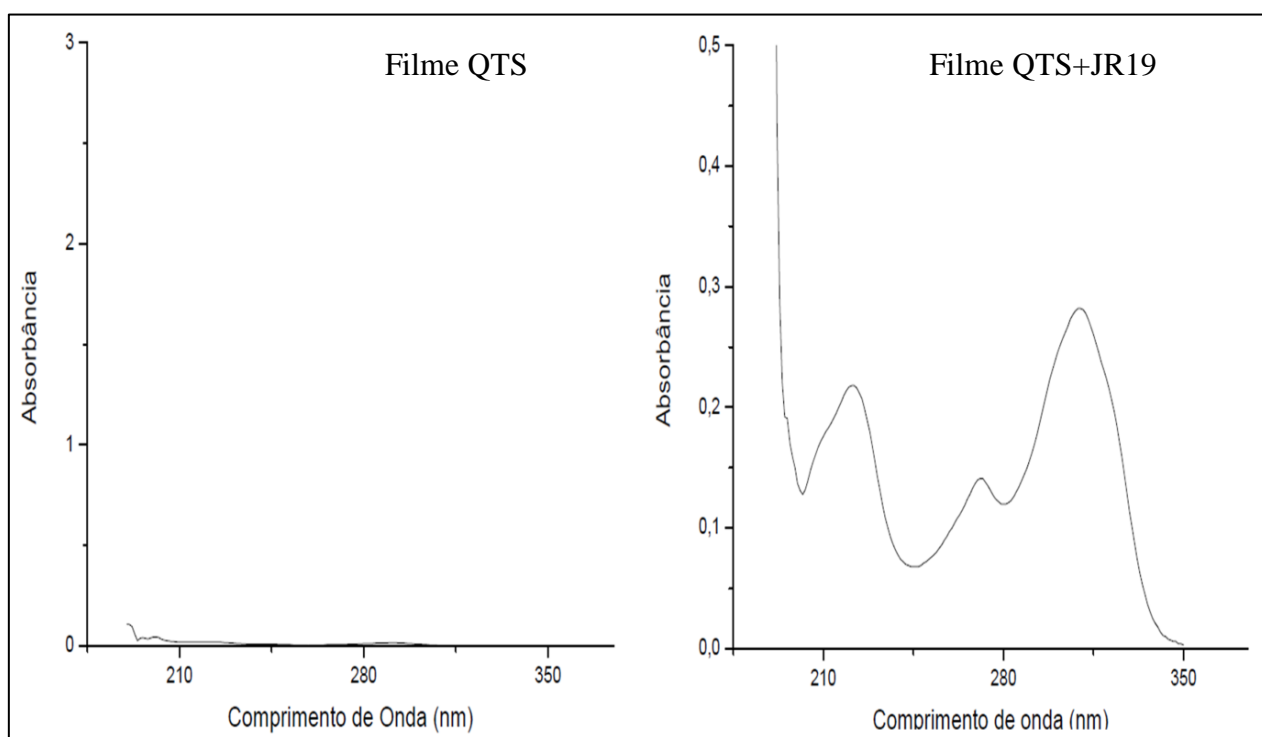
Fonte: dados da pesquisa.

3.2 Parâmetros avaliados no desenvolvimento do método

3.2.1 Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência provocado pela presença de outros compostos na amostra, garantindo que o sinal analítico gerado, corresponde ao composto de interesse. A metodologia desenvolvida demonstrou ser seletiva, uma vez que no comprimento de onda determinado para a molécula (310 nm), não foi evidenciado picos interferentes relacionados aos componentes da formulação, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Espectro de varredura do filme de QTS e do filme de QTS+JR19 no (λ) de 190 a 350 nm.



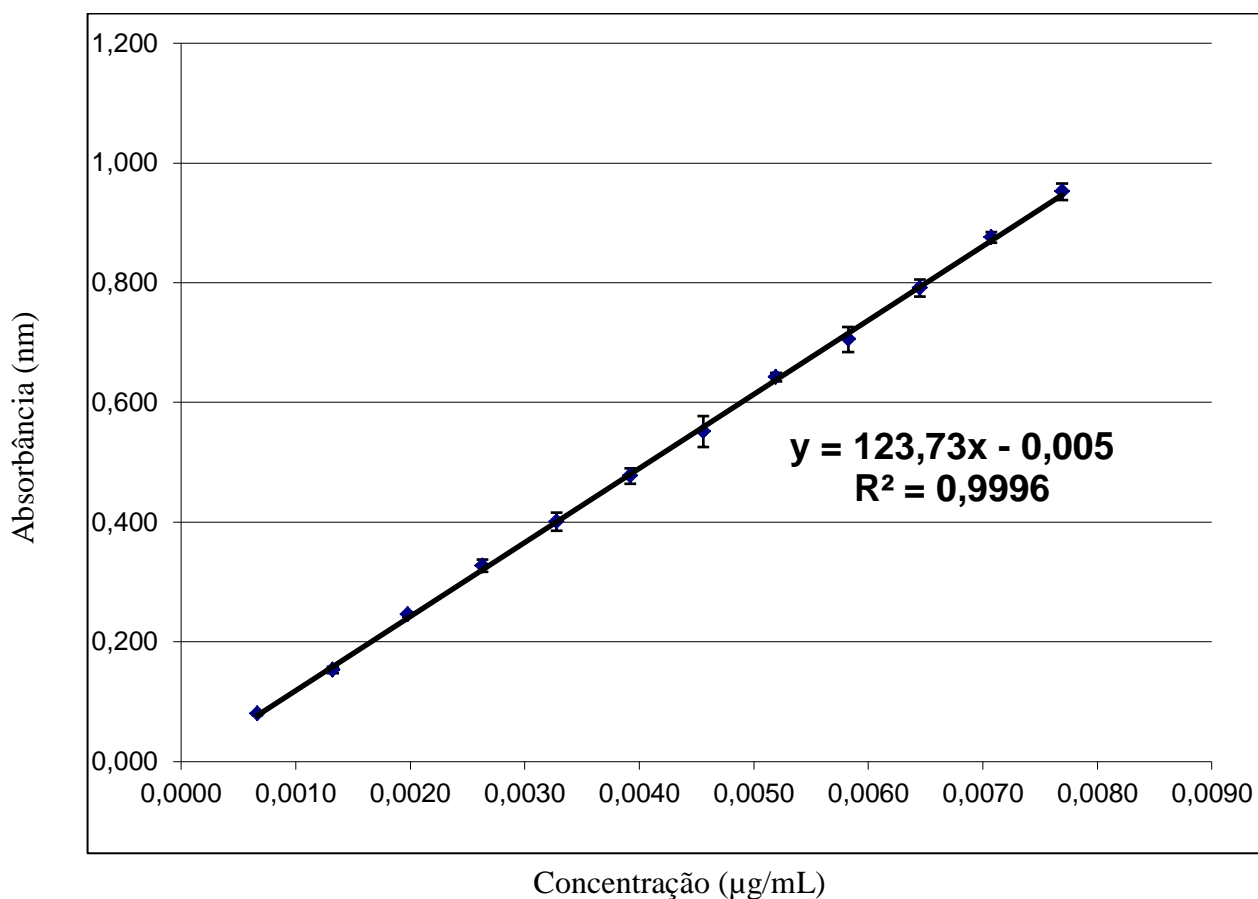
Fonte: dados da pesquisa.

3.1.2 Linearidade

O método exposto apresentou-se na faixa de linearidade e sua curva analítica foi descrita pela equação $y = 123,73x - 0,005$ obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9996, de acordo com a Figura 3.

De acordo com a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva de calibração deve estar acima de 0,990, assegurando então a linearidade do método analítico.

Figura 3 – Curva de calibração da molécula JR19 (média; n=3).



Fonte: dados da pesquisa.

3.1.3 Exatidão

Após a contemplação do intervalo linear do método analítico em triplicata dos valores de absorbância, a partir dos três níveis de concentrações: baixa (10 µg/mL), média (60 µg/mL) e alta (120 µg/mL), pode-se observar coeficientes de variações (CV %) menores que 5%, valor este aceitável pela legislação vigente para determinar o método exato, conforme a Tabela 1, variando de 0,73 a 3,79%.

Tabela 1 – Resultado analítico para análise da exatidão do método proposto.

Nível de concentração (µg/mL)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	DP	CV (%)
Baixo (10)	0,083	0,088	0,089	0,087	0,003	3,71
Médio (60)	0,446	0,478	0,475	0,466	0,018	3,79
Alto (120)	0,920	0,933	0,930	0,928	0,007	0,73

Fonte: dados da pesquisa.

3.1.4 Precisão

Os dados da Tabela 2 apresentam os valores obtidos durante a determinação da precisão do método, que foi expressa por meio da repetibilidade em sextuplicata do nível médio de concentração (60 µg/mL) e pela precisão intermediária em dias distintos e por analistas diferentes, conforme a legislação vigente (BRASIL, 2017). Assim como na exatidão, os coeficientes de variações foram inferiores a 5% o que determina o método analítico exposto é preciso, variando entre 0,6 a 1,5%

Tabela 2 – Resultado analítico da precisão do método proposto.

Analista	Dia	Concentração teórica (µg/mL)	Média da concentração obtida (µg/mL)	Média	DP	CV (%)
Analista 1	Dia 1	0,477	0,473	0,475	0,003	0,60
	Dia 2	0,477	0,468	0,473	0,006	1,35
Analista 2	Dia 1	0,477	0,474	0,476	0,002	0,45
	Dia 2	0,477	0,467	0,472	0,007	1,50

Fonte: dados da pesquisa.

3.1.5 Robustez

A Tabela 3 mostra que o método apresentou robustez, uma vez que as diferentes

amostras (solvente 1 e 2; pH) em triplicata do nível médio de concentração (60 µg/mL), apresentaram-se dentro das especificações exigidas pela legislação, que é o coeficiente de variação menor que 5%.

Tabela 3 – Resultado analítico da robustez do método proposto.

Modificações	Concentração teórica (µg/ML)	Média da concentração obtida (µg/ML)	Média	DP	CV (%)
Solvente 1	0,477	0,470	0,474	0,005	1,05
Solvente 2	0,477	0,447	0,462	0,021	4,59
Ph	0,477	0,468	0,473	0,006	1,35

Fonte: dados da pesquisa.

3.1.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores estimados para o limite de detecção e quantificação foram de 0,282 µg/mL e 0,856 µg/mL, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

A validação do método analítico por espectrofotometria UV, para quantificação da JR19 revelou-se específico, exato, preciso, robusto e rápido. Este método desenvolvido é importante para outras etapas do trabalho, além de ser específico para identificação e quantificação da molécula nos filmes poliméricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, A. T.; ANDRADE, C. H.; KÜMMERLE, A. E., GUIDO, R. V. C. The evolution of medicinal chemistry in Brazil: advances in the 40 years of the Brazilian society of chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, p. 694-697, 2017.
- ARAÚJO, R. R.; TEIXEIRA, C. C. C.; FREITAS, L. A. P. The preparation of ternary solid dispersions of an herbal drug via spray drying of liquid feed. **Drying Technology**, Weinheim, v. 28, n. 3, p. 412-421, 2010.
- BLATTMANN, C. O.; PRATSINIS, S. E. Single-Step Fabrication of Polymer Nanocomposite Films. **Materials**, São Paulo, v. 11, n. 1177, p. 1-9, 2018.
- BRASIL, RE N° 166 de 24 de julho de 2017. O adjunto da diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece o **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 24 jul. 2017.
- ISMAIL, M.; IBRAHIM, S.; EL-AMIR A.; EL-RAFEI, A. M.; ALLAM, N. K.; ABDELLATIF, A. Genistein Loaded Nanofibers Protect Spinal Cord Tissue Following Experimental Injury in Rats. **Biomedicines**, Basel, v. 6., n. 96, p. 1-15, 2018.
- MORAES, A. D. T. O.; MIRANDA, M. D. S.; JACOB, I. T. T.; AMORIM, C. A. C.; MOURA, R. O. M.; SILVA, S. A. S.; SOARES, M. B. P.; ALMEIDA, S. M. V.; SOUZA, T. R. C. L.; OLIVEIRA, J. F.; SILVA, T. G.; MELO, C. M. L.; MOREIRA, D. R. M.; LIMA, M. C. A. L. Synthesis and *in vivo* biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of índole-*N*-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, 2018. No Prelo.
- NASTASĂ, C.; TIPERCIUC, B.; DURMA, M.; BENEDEC, D.; ONIGA, O. New Hydrazones Bearing Thiazole Scaffold: Synthesis, Characterization, Antimicrobial, and Antioxidant Investigation. **Molecules**, Farmington Hills, v. 20, p. 17325-17338, 2015.
- REIS, T. A.; MATOS, B. N.; LIMA, E. M.; CHAKER, J. A.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M. Oxaliplatin preformulation studies for the development of innovative topical drug delivery systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Amsterdam, v. 130, p. 1671-1681, 2017.
- ROGOLINO, D.; CARCELLI, M.; BACCHI, A.; COMPARI, C.; CONTARDI, L.; FISICARO, E.; GATTI, A.; SECHI, M.; STEVAERT, A.; NAESENS, L. A versatile salicyl hydrazonic ligand and its metal complexes as antiviral agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 150, 9-17, 2015.
- ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. **Molecules**, Farmington Hills, v. 12, p. 1910-1939, 2007, 2007.
- SERAFIM, R. A. M.; GONÇALVES, J. E.; SOUZA, F. P.; LOUREIRO, A. P. M.; STORPIRTIS, S.; KROGH, R., ANDRICOPULO, A. D.; DIAS, L. C.; FERREIRA, E. I. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of *N*-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi*

activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 82, p. 418-425, 2014.

ZHANG, J.; ZHANG, J.; WANG, S.; YI, T. Development of an Oral Compound Pickering Emulsion Composed of Nanocrystals of Poorly Soluble Ingredient and Volatile Oils from Traditional Chinese Medicine. **Pharmaceutics**, Basael, v. 10, n. 170, p.1-13, 2018.

APÊNDICE II**ARTIGO SUBMETIDO AO JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND
CALORIMETRY (JTAC)****Physical-chemical characterization of *N*-acylhydrazone derivative chitosan films using
spectroscopic and thermoanalytical techniques**

Davidson M. S. Wanderley^{1,3} · Demis F. Melo² · Laryssa M. Silva² · Wesley C. Silva² ·
Lidiane P. Correia² · João A. O. Junior^{1,3} · Marcos V. L. Fook⁵ · Ricardo O. Moura^{1,4} ·
Rosemary S. C. Lima² · Bolívar P. G. L. Damasceno^{1,3*}

¹ Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Center for Biological and Health Sciences, State University of Paraíba (UEPB), Campina Grande, Brazil.

² Department of Pharmacy, State University of Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba, Brazil.

³ Laboratory of Development and Characterization of Pharmaceutical Products, Department of Pharmacy, Center for Biological and Health Sciences, State University of Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba, Brazil.

⁴ Laboratory of Molecular Synthesis and Vectorization, State University of Paraíba (UEPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil.

⁵ Laboratory of Evaluation and Development of Northeastern Biomaterials, Federal University of Campina Grande (UFCG), Campina Grande, Paraíba, Brazil.

Corresponding author:

* Bolívar P. G. L. Damasceno

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-0747-0297>


Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Center for Biological and Health Sciences, Department of Pharmacy, State University of Paraíba (UEPB), Campina Grande, Brazil, Av. Juvêncio Arruda, s/n, Bairro Universitário, Campina Grande/ PB – Brasil, ZIP CODE: 58429-600. Phone number: +55-83-3315-3300, extension number 3516. *E-mail address: bolivarpgld@pq.cnpq.br (B.P.G.L. Damasceno).

Abstract

The *N*-acylhydrazone subunit is present in several bioactive molecules and drug-prototype candidates, yet it remains under-explored. The association of an *N*-acylhydrazone derivative (JR19) with chitosan (CHI), a biopolymer with attractive pharmaceutical characteristics, may represent an innovative proposal for the treatment of topical inflammation. The aim of this work was to perform a physical-chemical characterization of chitosan films containing JR19 using differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry and its derivative (TG/DTG), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and X-ray diffraction (XRD) techniques. The films were developed using the sol–gel process and, according to the DSC curves, demonstrated the compatibility of the physical mixture (CHI + JR19) and the absence of chemical incompatibility of the polymer films incorporated with JR19. The TG/DTG presented similar characteristics of loss of mass between the samples, the prevailing characteristics of CHI. The infrared spectra of the physical mixture and the film with the molecule exhibited bands characteristic of the functional groups of JR19 in the same absorption region. The reflections observed in the diffractograms indicated a decrease in the crystallinity of the films when compared to the physical mixture and omission of some reflections of JR19 in the films. Therefore, the techniques used enabled the characterization of the formulation of CHI and JR19, proving very promising for the development of these films/dressings as an innovative proposal for pharmaceutical treatment, considering their low cost, biocompatibility, and the biological properties of JR19 against different diseases (parasitic, viral, bacterial, fungal, analgesic, anti-inflammatory and antitumor).

Keywords Compatibility · Fourier transform infrared spectroscopy · Polymer film · X-ray diffraction · Thermal behavior

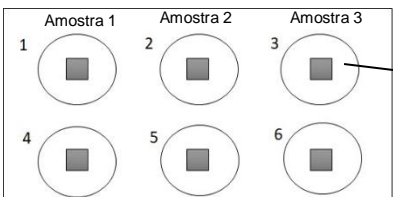
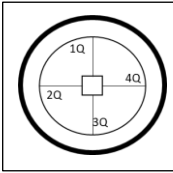
ANEXO I

	RESULTADOS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> - MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR		CÓDIGO: F101 REVISÃO: 00 PÁGINA:1/1

ANALISTA	Hermano de Vasconcelos Pina				
PEDIDO	423/18	INICIO	39/11/2018	TÉRMINO	02/12/218
CÉLULAS	L-929	CONTROLE POSITIVO	Látex tóxico	CONTROLE NEGATIVO	Plástico atóxico
AMOSTRAS	<ul style="list-style-type: none"> • Quitosana, (AMOSTRA 1) • Quitosana + 3R19 (AMOSTRA 2) 				

DADOS DOS EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS			
ESTUFA	LOVEN 11.04.12	LOTES DAS PLACAS DE CULTURA	TPP 20150151
BANHO-MARIA	KACIL 11.04.40	FLUXO LAMINAR	BIOGREEN 11.04.29
MICROSCÓPIO	NIKON TS100 11.05.85	PIPETADOR AUTOMÁTICO	CAPP AIA

METODOLOGIA					
SUSPENSÃO DE CÉLULAS L-929 (1,1 A 1,3 X10⁵ CELS VIÁVEIS/mL)					
Nº DE PLACAS	2	Nº DE ORIFÍCIOS	12	mL/Orifício	4 mL
PREPARO DO MEIO DE COBERTURA DAS CÉLULAS					
Volume Meio MEM 2XC	6 mL	Volume Ágar 1,8% com 0,01% de Vermelho Neutro	6 mL		
Volume do meio em cada orifício	1 mL	Volume total de meio de cobertura/ensaio	12 mL		
OBS:					

DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NA PLACA	
	

LEITURA DAS PLACAS - AMOSTRAS								
	Orifício/Q*	1°Q (mm)	2Q (mm)	3Q (mm)	4Q (mm)	M**(cm)	MG*** (cm):	Resultado
Amostra 1	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Amostra 2	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Amostra 3	3							<input type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	6							
LEITURA DAS PLACAS - CONTROLES								
	Orifício/Q*	1Q (mm)	2Q (mm)	3Q (mm)	4Q (mm)	M**(cm)	MG*** (cm):	Resultado

Controle Positivo	1	10	10	11	11	1,05	1,03125	<input type="checkbox"/> Satisfatório <input checked="" type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	4	10,5	9	10	11	1,0125		
Controle Negativo	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Branco	3							<input type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	6							

*Quadrante **Média ***Média Geral