



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

DEMIS FERREIRA DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE
QUITOSANA/ÁLCOOL POLIVINÍLICO CONTENDO SULFADIAZINA DE PRATA
E UM DERIVADO *N*-ACILIDRAZÔNICO**

CAMPINA GRANDE

2021

DEMIS FERREIRA DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE
QUITOSANA/ÁLCOOL POLIVINÍLICO CONTENDO SULFADIAZINA DE PRATA
E UM DERIVADO *N*-ACILIDRAZÔNICO**

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

Orientador: Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE

2021

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.

M528d Melo, Demis Ferreira de.
Desenvolvimento e caracterização de filmes de quitosana/álcool polivinílico contendo sulfadiazina de prata e um derivado *N*-acilidrazônico [manuscrito] / Demis Ferreira de Melo. - 2021.
94 p. : il. colorido.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno", Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Biomateriais. 2. Biopolímeros. 3. Curativos. 4. Antimicrobianos tópicos. I. Título

21. ed. CDD 615.1

DEMIS FERREIRA DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE
QUITOSANA/ÁLCOOL POLIVINÍLICO CONTENDO SULFADIAZINA DE PRATA
E UM DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO**

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

Aprovada em: 12 / 03 / 2021



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Universidade Estadual da Paraíba

Orientador



Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Universidade Federal de Pernambuco

Membro Externo



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior

Universidade Estadual da Paraíba

Membro Interno

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria José Ferreira, pelo apoio e amor incondicional. Obrigado pela compreensão e por tudo o que me ensinaste. Você sempre será minha referência de vida.

Ao meu pai Delmiro Fausto de Melo Neto (*in memoriam*), por sempre torcer pelo meu sucesso.

Às minhas irmãs Delma Melo e Janaina Barbosa, por todo o apoio e companhia nos momentos felizes e difíceis. Que nossa união só aumente ao longo do tempo.

À minha namorada Cinthia Maria, por todo o amor, companheirismo, paciência, carinho e incentivo nessa árdua jornada.

Ao meu orientador Bolívar Damasceno pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, por toda contribuição, competência, paciência e confiança. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof. João Oshiro pelos ensinamentos, conselhos e pela grande amizade, que com certeza levarei para toda a vida.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) por toda a amizade e suporte a pesquisa, aos colegas de laboratório Rafaella Barros, Larissa Pereira, Joandra Maísa, Amaro César, Thayse Medeiros, Lívia Carvalho e Gabryella Guedes, além dos demais colegas do mestrado, em especial a Mariana Dantas e Milena Nogueira.

Ao grupo I-Nano, coordenado pelo Prof. João Oshiro, pelas discussões construtivas, organizações de congresso e pelos momentos de descontração que deixam o ambiente acadêmico mais agradável e produtivo.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), em especial ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio, pela disponibilidade da JR19 utilizada no estudo.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Adley Antonini e Prof. Dr. Felipe Fernandes pela disponibilidade e grandes contribuições para o trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. José Lamartine e Prof. Dr. João Oshiro, por aceitarem o convite e por toda a contribuição para a melhoria do trabalho que foram de grande valia.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) da UEPB, Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) e Laboratório de Síntese e Caracterização de Filmes Finos (LabFilm) pelo suporte e disponibilidade para a realização das análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

Comorbidades de pele afetam mais de 600 milhões de pessoas por ano e gera mais de 1 bilhão de dólares em custos para os sistemas de saúde no mundo. No Brasil, foram responsáveis por mais de 700 mil internações e 550 milhões de reais em custos em 2020. Esses dados refletem a ausência de tratamentos com características adequadas como controle da oxigenação e temperatura, além da prevenção de infecções, por exemplo. Afim de garantir esses requisitos, os biopolímeros são amplamente utilizados em formulações curativas. Dentre esses, destaca-se a quitosana (QTS) que apesar da atividade antimicrobiana comprovada, nesses quadros clínicos, não são adequadas. Logo, a associação de um fármaco antimicrobiano como a sulfadiazina de prata (AgSD) e um anti-inflamatório *N*-acilidrazônico (JR19) nos filmes de QTS podem resultar em um curativo extremamente versátil, visto a capacidade de flexibilidade dos filmes, pela adição do álcool polivinílico (PVA), a atividade antimicrobiana da AgSD e anti-inflamatória da JR19. Assim, o trabalho tem como objetivo visa desenvolver filmes de QTS+PVA contendo AgSD e o derivado *N*-acilidrazônico JR19 como uma nova proposta para o tratamento de ferimentos cutâneos. Os filmes sem (F1), com AgSD 1 mg/JR19 8,6mg (F2) e AgSD/JR19 1 mg (F3) foram desenvolvidos pela técnica de evaporação de solvente e foram caracterizados pelo potencial hemolítico, microscopia ótica (MO), análise microestrutural, taxa de transmissão de vapor de água (TTVA), ensaio de fotoestabilidade, resistência dobrável, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), além da validação analítica de um método espectrofotométrico para quantificação da JR19 nos filmes e dos estudos preliminares de determinação da atividade antifúngica frente à *Candida albicans*. As características macroscópicas relevaram filmes com características de dispersão na presença dos fármacos. Os resultados da hemocompatibilidade demonstraram que todas as amostras são classificadas como não-hemolíticas (valores médios iguais ou menores a 4,78%). A MO indicou que os fármacos estão dispersos homogeneamente na matriz polimérica com tamanhos dos cristais de $4,265 \pm 3,402$ e $6,385 \pm 3,299$ μm para F2 e F3, respectivamente. O parâmetro de rugosidade média de superfície não sofreu alterações significativa na presença dos fármacos. A TTVA apresentou valores de $1411,07 \pm 61,69$, $1349,51 \pm 71,04$ e $1352,78 \pm 123,67$ $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ para os filmes F1, F2 e F3, respectivamente, que pode impedir o processo de maceração, o que representa um importante parâmetro no tratamento de ferimentos associados a infecções. O ensaio de fotoestabilidade confirmou a característica fotossensível da AgSD e a necessidade do uso de embalagens primárias com propriedades de barreira contra a luz solar nos filmes. A presença de uma maior quantidade de JR19 no filme F2 reduziu a sua resistência dobrável em relação ao F1 e F3. A ausência de

incompatibilidade química entre os componentes foi revelada pelo FTIR. O método espectrofotométrico para quantificação da JR19 se mostrou seletivo, linear, preciso, exato e robusto. O filme F2 apresentou boa atividade antifúngica com inibição do crescimento de *C. albicans* pela potencialização da atividade da AgSD e da QTS por uma maior quantidade de JR19 em relação ao filme F3. Os resultados preliminares demonstraram que foi possível desenvolver e caracterizar filmes contendo dois fármacos com atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, contudo, testes futuros do perfil de liberação e ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* de atividade biológica são necessários para comprovar a eficácia farmacológica.

Palavras-chave: Biomateriais. Biopolímeros. Curativos. Antimicrobianos tópicos. Derivados *N*-acilidrazônicos.

ABSTRACT

Skin comorbidities affect more than 600 million people each year and generate more than \$ 1 billion in costs for healthcare systems worldwide. In Brazil, they were responsible for more than 700 thousand hospitalizations and 550 million reais in costs in 2020. These data reflect the absence of treatments with adequate characteristics such as oxygenation and temperature control, in addition to preventing infections, for example. In order to guarantee these requirements, biopolymers are widely used in curative formulations. Among these, chitosan (CHI) stands out, which despite the proven antimicrobial activity, in these clinical conditions, are not adequate. Therefore, the combination of an antimicrobial drug such as silver sulfadiazine (AgSD) and an *N*-acylhydrazonic anti-inflammatory (JR19) in CHI films can result in an extremely versatile dressing, given the flexibility of the films, by adding the polyvinyl alcohol (PVA), the antimicrobial activity of AgSD and anti-inflammatory of JR19. Thus, the work aimed to develop CHI+PVA films containing AgSD and the *N*-acylhydrazonic derivative JR19 as a new proposal for the treatment of skin wounds. Films without (F1), with AgSD 1 mg/JR19 8.6 mg (F2) and AgSD/JR19 1 mg (F3) were developed by the solvent evaporation technique and were characterized by the hemolytic potential, optical microscopy (OM), analysis microstructural, water vapor transmission rate (WVTR), photostability assay, foldable resistance, infrared spectroscopy (FTIR), in addition to the analytical validation of a spectrophotometric method for quantifying JR19 in films and preliminary studies to determine the antifungal activity against *Candida albicans*. The macroscopic characteristics revealed films with dispersion characteristics in the presence of drugs. The hemocompatibility results showed that all samples are classified as non-hemolytic (mean values equal to or less than 4.78%). The OM indicated that the drugs are homogeneously dispersed in the polymeric matrix with crystal sizes of 4.265 ± 3.402 and 6.385 ± 3.299 μm for F2 and F3, respectively. The mean surface roughness parameter did not change significantly in the presence of drugs. TTVA showed values of 1411.07 ± 61.69 , 1349.51 ± 71.04 and 1352.78 ± 123.67 $\text{g m}^{-2} \text{day}^{-1}$ for the F1, F2 and F3 films, respectively, which can prevent the maceration process, which represents an important parameter in the treatment of injuries associated with infections. The photostability test confirmed the photosensitive characteristic of AgSD and the need to use primary packaging with barrier properties against sunlight in the films. The presence of a greater amount of JR19 in film F2 reduced its foldable resistance in relation to F1 and F3. The absence of chemical incompatibility between the components was revealed by the FTIR. The spectrophotometric method for quantifying JR19 proved to be selective, linear, precise,

accurate and robust. The F2 film showed good antifungal activity with inhibition of the growth of *C. albicans* by potentiating the activity of AgSD and CHI by a greater amount of JR19 compared to the F3 film. The preliminary results demonstrated that it was possible to develop and characterize films containing two drugs with antimicrobial and anti-inflammatory activities, however, future tests of the release profile and preclinical *in vitro* and *in vivo* tests of biological activity are necessary to prove the pharmacological efficacy.

Keywords: Biomaterials. Biopolymers. Dressings. Topical antimicrobials. *N*-acylhydrazone derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Camadas interfaciais da pele e seus componentes.	19
Figura 2 – Estágios do processo de cicatrização e principais componentes celulares.	22
Figura 3 – Número de publicações de trabalhos científicos na temática dos biomateriais no tratamento de ferimentos indexados no <i>Web of Science</i> nos últimos 20 anos (acessado em 04 de março de 2021).....	28
Figura 4 – Estruturas químicas da quitina (A) e da QTS (B).	30
Figura 5 – Estrutura química do PVA parcialmente (A) e totalmente (B) hidrolisado.	32
Figura 6 – Estrutura química da AgSD.	33
Figura 7 – Rota de síntese comum para a obtenção de <i>N</i> -acilidrazonas.....	36
Figura 8 – Síntese de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos indólicos.....	36
Figura 9 – Estrutura química da JR19.	37
Figura 10 – Frascos contendo água destilada no seu interior e os filmes na abertura.	43
Figura 13 – Esquema da disposição dos tratamentos e controles na placa de 96 poços.	47
Figura 11 – Imagens dos filmes F1 (A), F2 (B) e F3 (C).	49
Figura 12 – Taxa de hemólise dos filmes. Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$).....	51
Figura 13 – Fotomicrografias dos filmes F1 (A), F2 (B) e F3 (C) (barra de escala = 500 μm).	52
Figura 14 – Fotomicrografias dos filmes F2 (A) e F3 (B) no aumento de 1400x (barra de escala = 50 μm).	53
Figura 15 – Fotomicrografias da AgSD (A) e JR19 (A) no aumento de 1400x (barra de escala = 50 μm).	53
Figura 16 – Taxa de transmissão de vapor de água das amostras. Símbolos iguais indicam que a diferença não foi significativa entre as amostras ($p > 0,05$).	56
Figura 17 – Amostras antes e após o ensaio de fotoestabilidade, com destaque para o escurecimento da AgSD (forma oval branca) e para os pontos de fotólise do Ag^+ (setas pretas) nos filmes F2 e F3.....	59

Figura 18 – Filme F2 apresentando rompimento após o ensaio de resistência dobrável.	60
Figura 19 – Espectros de infravermelho dos componentes (A), das misturas físicas 1:1 (B) e dos filmes (C).....	62
Figura 20 – Espectro de varredura da JR19 com destaque para o comprimento de onda de maior absorbância ($\lambda=311,5$ nm).	64
Figura 21 – Seletividade dos filmes sem e com JR19.	65
Figura 22 – Curva de calibração da JR19.....	66
Figura 23 – Gráfico de resíduos x concentração.	67
Figura 24 – Microplaca de 96 poços revelada com resazurina 0,01% com destaque para as cinco amostras sem crescimento aparente (círculos pretos).....	71
Figura 25 – Plaqueamento das amostras em ágar Sabouraud (A = AgSD (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B = AgSD (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C = JR19 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); D = AgSD+JR19 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); E = F2 e F3).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras utilizadas no estudo.	41
Tabela 2 – Tamanho dos cristais nas amostras.....	54
Tabela 3 – Rugosidade média de superfície (Ra) das amostras.	55
Tabela 4 – Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho das amostras.	63
Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para avaliação da linearidade do método.	67
Tabela 6 – Valores da precisão do método espectrofotométrico validado.	68
Tabela 7 – Valores da exatidão do método espectrofotométrico validado.....	69
Tabela 8 – Valores da robustez do método espectrofotométrico validado.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
a.C.	Antes de Cristo
Ag ⁺	Íon prata
Ag ⁰	Prata elementar
AgSD	Sulfadiazina de prata
ANOVA	Análise de variância
AS	Ágar Sabouraud
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CAS	Caldo ágar Sabouraud
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>The Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
COX	Cicloxigenase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
HaCat	Linhagem de queratinócitos imortalizados
ICH	<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IL	Interleucina
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JR19	N ⁷ -(1H-indol-3il) metileno)-2-cianoacetohidrazida
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil)-2,5-difenil tetrazólio
pH	Potencial hidrogeniônico
PVA	Álcool polivinílico
PVC	Cloreto de polivinila
QTS	Quitosana
Ra	Rugosidade média de superfície
SLC	Sistemas de liberação controlada
SLS	Sistemas de liberação sustentada
TGF	Fator de crescimento endotelial
TNF	Fator de necrose tumoral

TTVA	Taxa de transmissão de vapor de água
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Pele	19
2.1.1	<i>Epiderme</i>	20
2.1.2	<i>Derme</i>	20
2.1.3	<i>Hipoderme</i>	21
2.2	Lesões de pele	21
2.3	Histórico do uso de curativos	24
2.4	Tipos de curativos	26
2.5	Biomateriais em curativos	27
2.5.1	<i>Quitosana</i>	30
2.5.2	<i>Álcool polivinílico</i>	32
2.6	Sulfadiazina de prata	33
2.7	JR19	35
3.	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4.	METODOLOGIA	40
4.1	Materiais	40
4.2	Métodos	40
4.2.1	<i>Desenvolvimento dos filmes</i>	40
4.2.2	<i>Avaliação do potencial hemolítico</i>	41
4.2.3	<i>Caracterização físico-química dos filmes</i>	42
4.2.3.1	Microscopia óptica	42
4.2.3.2	Análise microestrutural.....	43
4.2.3.3	Taxa de transmissão de vapor de água	43

4.2.3.4	Ensaio de fotoestabilidade	44
4.2.3.5	Ensaio de resistência ao dobramento	44
4.2.3.6	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	44
4.2.4	<i>Validação de metodologia analítica para quantificação da JR19</i>	45
4.2.5	<i>Avaliação da atividade antifúngica</i>	46
4.2.5.1	Padronização do inóculo fúngico	46
4.2.5.2	Determinação da concentração fungicida mínima.....	46
4.2.6	<i>Análise estatística</i>	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Desenvolvimento dos filmes	49
5.2	Potencial hemolítico dos filmes	50
5.3	Microscopia óptica	51
5.4	Análise microestrutural	54
5.5	Taxa de transmissão de vapor de água	55
5.6	Ensaio de fotoestabilidade	57
5.7	Resistência dobrável	59
5.8	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	61
5.9	Validação de metodologia analítica para quantificação da JR19	64
5.9.1	<i>Seletividade</i>	65
5.9.2	<i>Linearidade</i>	65
5.9.3	<i>Precisão</i>	68
5.9.4	<i>Exatidão</i>	68
5.9.5	<i>Robustez</i>	69
5.10	Determinação da atividade antifúngica	70
6.	CONCLUSÕES	74
7.	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e a principal barreira contra as ameaças externas. Esse órgão fornece uma interface entre o organismo e os estímulos externos, protegendo-o de lesões, além de manter a hidratação e o controle térmico corporal (KABASHIMA et al., 2019; PARK et al., 2019; ZHAO et al., 2016). Doenças de pele, ferimentos e queimaduras afetam mais de 600 milhões de pessoas por ano, de acordo com dados da *Global Burden of Disease*, e gera mais de 1 bilhão de dólares em custos para os sistemas de saúde no mundo (MARGOLIS, 2013; MARTINENGO et al., 2019). No Brasil, por sua vez, ferimentos são responsáveis por mais de 700 mil internações e aproximadamente 850 milhões de reais em custo para o Sistema Único de Saúde (SUS) em 2020, de acordo com dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, 2020).

Essas comorbidades promovem alterações da estrutura e funções da pele, as quais promovem o início do processo de cicatrização, o qual compreende uma cascata de eventos sincronizados de células residentes do tecido afetado e migratórias (EL-ALEEM et al., 2020). Para assegurar um efetivo processo de cicatrização é essencial controlar diversas condições no local do ferimento, tais como oxigenação e temperatura (SIMÕES et al., 2018). Esses requisitos podem ser garantidos com a utilização de curativos que, segundo Merlusca et al. (2018), devem criar e manter um ambiente com umidade adequada e prevenir infecções, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis.

Para garantir esses requisitos, os biomateriais, especificamente os biopolímeros, são amplamente utilizados na regeneração tecidual por suas propriedades de bioatividade, biodegradabilidade e similaridade com a matriz extracelular (FELGUEIRAS; AMORIM, 2017; HORST; MOIEMEN; GROVER, 2019). Dentre os biopolímeros naturais, a quitosana (QTS), um derivado desacetilado da quitina é considerada uma excelente escolha no tratamento de feridas devido as suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil adesão ao tecido afetado e baixa imunogenicidade (AMALRAJ; JUDE; GOPI, 2020; KAMOUN et al., 2014). Devido a sua característica policatiônica, a QTS inibe o crescimento de uma grande variedade de bactérias e fungos (DRAGOSTIN et al., 2016), aspecto importante no tratamento de ferimentos, visto que a contaminação microbiana de feridas de pele é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade (SIMÕES et al., 2018).

No entanto, a QTS, assim como outros polímeros de origem natural, apresenta baixa resistência a umidade, rápida degradação e propriedades mecânicas insatisfatórias (ULLAH;

CHEN, 2020). Para contornar essa problemática, pode ser utilizado misturas ou blendas de polímeros, com associação de um polímero de origem natural com um de origem sintética, por exemplo. Dentre essas associações, a blenda de QTS e álcool polivinílico (PVA) é bastante utilizada para se obter materiais para aplicações biomédicas (AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020; LUO et al., 2020a; TOMMALIEH et al., 2020). O PVA é um polímero semicristalino, hidrofílico, com repetição de grupos hidroxila na sua estrutura (KOHLI et al., 2019). Suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência química, absorção de umidade e intumescimento são ideais para o desenvolvimento de formulações com finalidades curativas (JATOI et al., 2019).

Apesar da atividade antimicrobiana da QTS, somente esse polímero não consegue impedir completamente o crescimento de microrganismos, devido a mecanismos de resistência como a presença da enzima quitosanase em algumas espécies de relevância clínica como *Pseudomonas* sp., que possui como substrato específico a quitosana e promove a degradação da sua cadeia polimérica, além de sucessivas mutações dos microrganismos (HASSAN et al., 2018; SHAO et al., 2017; WEIKERT et al., 2017). Logo, a associação de um fármaco antimicrobiano com a QTS promove a potencialização dessa atividade, como a sulfadiazina de prata (AgSD). Este fármaco da classe das sulfonamidas utilizado na terapêutica de ferimentos e queimaduras foi introduzido por Charles L. Fox Jr. em 1973, possui um amplo espectro de ação contra diversas bactérias, tais como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus auerus* e pode atuar em sinergia com polímeros com finalidades curativas em várias formas farmacêuticas (EL-FEKY et al., 2017b; FELCIYA et al., 2021; HEYNEMAN et al., 2016).

Os derivados *N*-acilidrazônicos são considerados novas propostas terapêuticas para o tratamento de inflamações devido a sua pronunciada ação anti-inflamatória, descrita nos estudos de Meira et al. (2018) e Thota et al. (2018). Um dos derivados *N*-acilidrazônicos indólicos, o *N'*-(1H-indol-3il) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), foi estudado por Apolinário (2016) e apresentou atoxicidade e atividade anti-inflamatória em modelos *in vivo*. Ademais, com a finalidade de se desenvolver uma nova formulação curativa contendo os derivados *N*-acilidrazônicos, Wanderley et al. (2020) e Wanderley et al. (2019) desenvolveram filmes de QTS contendo JR19 e os mesmos apresentaram compatibilidade química entre os componentes, com propriedades mecânicas desejáveis e biocompatibilidade. A adição do PVA e da AgSD nessa essa formulação pode promover a melhoria das suas características físico-químicas e mecânicas pela inclusão de um polímero sintético sem comprometimento da biocompatibilidade, além de ampliar a utilização dessa formulação curativa com a incorporação de um agente antimicrobiano utilizado no tratamento de ferimentos e queimaduras.

A partir do exposto, o presente estudo visa desenvolver filmes de QTS+PVA contendo AgSD e o derivado *N*-acilidrazônico JR19 como uma nova proposta para o tratamento de ferimentos cutâneos.

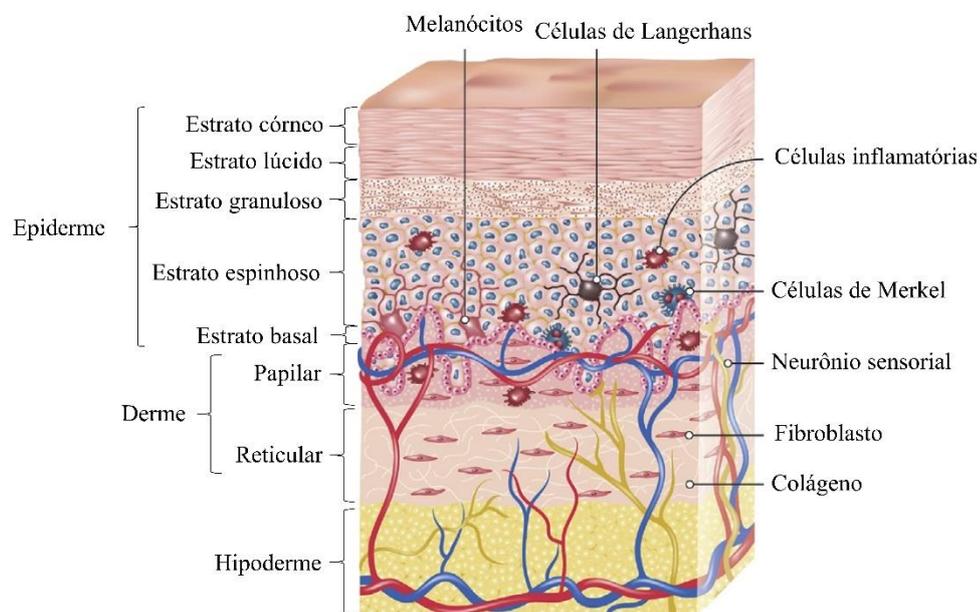
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, com aproximadamente 15% da massa corpórea e área de superfície de 1,5-2 m². Possui uma importante função de barreira física, química, microbiológica e imunológica contra agressões externas, além de exercer atividades no metabolismo, na regulação térmica e hídrica (KWIECIEN et al., 2019; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017). Para cumprir com todos esses propósitos, a pele requer a integração de três características estruturais: uma interface em camadas, apêndices epidérmicos e estabilidade mecânica (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020).

As interfaces em camadas da pele, assim como em outros órgãos, possuem uma estrutura padrão. Um epitélio celular avascular com regeneração espontânea, uma zona basal em membrana e um estroma ou tecido conectivo de suporte vascular que não há regeneração. No caso da pele, essas camadas correspondem a uma epiderme de epitélio escamoso estratificado, uma membrana basal e uma derme neurovascular fibrosa suportada por uma hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo, conforme demonstrado na Figura 1 (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020; MIKESH et al., 2013; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011).

Figura 1 – Camadas interfaciais da pele e seus componentes.



Fonte: adaptado de Rahmati et al. (2020).

2.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa e é composta principalmente de queratinócitos e melanócitos que formam um sistema binário. Além desses, a epiderme contém células apresentadoras de antígenos dendríticas conhecidas por células de Langerhans e células de Merkel, que possuem em seu interior grânulos secretores, os quais tem composição semelhantes a aqueles em outras células neuroendócrinas. Essa camada da pele é nutrida por difusão de fluidos intercelulares provenientes da vasculatura da derme (GILABERTE et al., 2016; LOSQUADRO, 2017).

A espessura e a estrutura da epiderme dependem do local do corpo, onde é mais espessa nas palmas das mãos e na planta dos pés. Em tais regiões, segundo Junqueira e Carneiro (2017), a epiderme é composta por cinco camadas: (1) camada basal, rica em células-tronco da epiderme (também chamada de camada germinativa), que são células cuboides, basófilas, repousam sobre a membrana basal e separa a epiderme da derme; (2) camada espinhosa, formada por células cuboides ou ligeiramente achatadas, de núcleo centralizado, citoplasma com expansões contendo feixes de queratina (tonofilamentos), os quais se aproximam e se unem com as células vizinhas por meio de desmossomos. Essas duas últimas estruturas tem uma importante função na manutenção da coesão dessas células e a resistência ao atrito; (3) camada granulosa, composta de células poligonais achatadas, núcleo central e citoplasma carregado de grânulos basófilos (grânulos de querato-hialina) contendo proteínas ricas em histidina fosforilada e cistina, além de grânulos lamelares contendo discos lamelares formados por bicamadas lipídicas. Esses últimos grânulos se fundem com a membrana das células e depositam no espaço intersticial o material lipídico, o qual se deposita e contribui para a formação de uma barreira contra penetração de substâncias, além de promover a impermeabilização da pele; (4) camada lúcida, composta de uma camada fina de células achatadas, eosinófilas e translúcidas, as quais núcleos e organelas sofreram digestão pelos lisossomos. O citoplasma possui numerosos filamentos de queratina; (5) camada córnea, constituída de células mortas, achatadas, sem núcleo e com citoplasma repleto de queratina.

2.1.2 Derme

A derme, por sua vez, reforça a epiderme e é composta de tecido elástico, colágeno e outros componentes extracelulares que incluem a vasculatura, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas. Essa camada é dividida em duas camadas: (1) a derme papilar, uma camada

mais superficial, anexa a epiderme, composta de tecido conjuntivo frouxo e altamente vascularizado; e (2) a camada reticular, uma camada mais profunda que forma uma espessa camada de tecido conjuntivo denso que constitui a maior parte da derme (BROWN; KRISHNAMURTHY, 2020).

Muitos tipos de células são encontrados na derme, tais como fibroblastos (principal tipo dessa camada), macrófagos, adipócitos, mastócitos, células de Schwann e células-tronco (BROWN; KRISHNAMURTHY, 2020). A matriz extracelular da derme tem um papel muito importante na coesão da pele. Em adultos, a derme tem o colágeno como principal componente que corresponde a 70-80% da massa da pele seca, uma rede de fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e água. Esse último componente interage com os glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico, e gera uma grande pressão osmótica de intumescimento que confere a pele dureza e resistência a deformação (HAYDONT; BERNARD; FORTUNEL, 2019).

2.1.3 Hipoderme

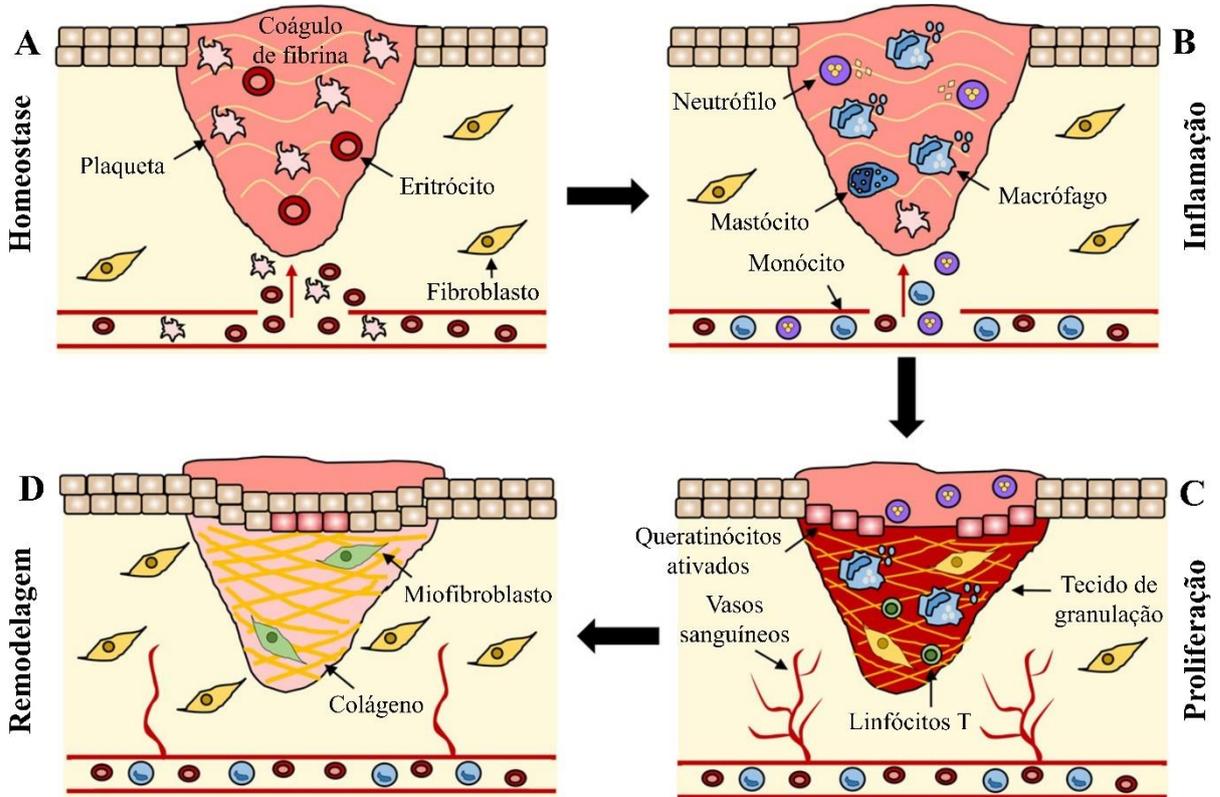
A hipoderme ou tecido subcutâneo é um tecido rico em adipócitos logo abaixo da derme, além de ser responsável pela ligação e o deslizamento da pele a estruturas anexas, como músculos, fâscias e periósteo. O tecido conjuntivo presente nessa camada facilita o movimento e promove suporte a densa vascularização e redes nervosas. Essa camada também absorve choques e, assim, evita danos a estruturas subjacentes, além de modelar as estruturas externas do corpo e regular a temperatura. A grande camada de lipídeos da hipoderme tem funções de proteção contra fatores mecânicos, na secreção e alvo de vários hormônios e citocinas. Essa composição lipídica da hipoderme, ao contrário das reservas adiposas viscerais, tem uma maior eficiência no processo de lipólise e tem maior menor capacidade de secreção de citocinas inflamatória e por esse motivo, é um alvo em potencial para doenças metabólicas, como a diabetes (AMISTEN et al., 2015; DIEGEL; DANILENKO; WOJCINSKI, 2018; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

2.2 Lesões de pele

Quando a integridade da pele é rompida, inicia-se um processo complexo, dinâmico e orquestrado de reparação tecidual, conhecido como cicatrização. Esse processo ocorre por meio de quatro fases contínuas e sobrepostas (Figura 2): homeostase, resposta inflamatória imediata,

proliferação e remodelagem (EL-ALEEM et al., 2020; EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

Figura 2 – Estágios do processo de cicatrização e principais componentes celulares.



Fonte: adaptado de Wilkinson e Hardman (2020).

A cicatrização se inicia na homeostase (Figura 2, A) e na formação da matriz provisória do ferimento, onde, após a injúria tecidual, ocorre ligação de componentes da matriz extracelular, vasoconstrição e ativação de plaquetas da circulação, as quais sofrem os processos de adesão e agregação. O dano tecidual e agregação plaquetária induzem a ativação das cascatas de coagulação extrínseca e intrínseca, respectivamente, que trabalham em conjunto para promover a estabilização do coágulo de fibrina e plaquetas. Com isso, ocorre a formação de arcabouço para a migração e proliferação das demais células envolvidas na cicatrização, além de servir como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento (ZHAO et al., 2016).

A inflamação (Figura 2, B) é um processo essencial, não-específico, mediado pela resposta imune inata que envolve a destruição tecidual e limpeza de detritos celulares e de patógenos. Sem a presença de um agente pró-inflamatório persistente, essa etapa dura cerca de duas semanas quando ocorre redução do infiltrado leucocitário no local do ferimento, além da

diminuição dos macrófagos e linfócitos teciduais para níveis fisiológicos (NAGARAJA et al., 2014).

Os leucócitos e as plaquetas liberam diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que promovem a quimiotaxia de leucócitos adicionais para a cascata de cicatrização. Dentre essas citocinas, pode-se destacar a interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF)- α , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento (TGF)- β , fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento endotelial vascular e fator estimulador de colônia de granulócitos macrófagos (HEO et al., 2011). A IL-1 α e o TNF- α desempenham papéis importantes nas fases iniciais da inflamação, pois iniciam a recrutamento de leucócitos, sua maturação e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos juntamente com a histamina liberada pelos mastócitos (CHIN et al., 2019).

A resposta leucocitária inicial é mediada nos primeiros 2-5 dias majoritariamente por neutrófilos, os quais possuem três funções principais: (1) gerar radicais livres por meio da via das mieloperoxidases para causar a morte de bactérias; (2) promover a debridação do ferimento pela secreção de enzimas proteolíticas (ex. metaloproteinases de matriz-2 e -9 que causam a degradação de colágeno e seus fragmentos) que causam a destruição de tecidos não viáveis; (3) fagocitar as bactérias mortas e a matriz que sofreu debridação (XUE; JACKSON, 2013). Após esse período, os monócitos que migraram para o ferimento sofrem maturação para macrófagos e dominam a resposta inflamatória celular, os quais promovem a fagocitose e remoção de células do hospedeiro não-funcionais, neutrófilos repletos de bactérias, matriz que sofreu danos e bactérias remanescentes. Os macrófagos ativados secretam citocinas, tais como o fator de crescimento endotelial vascular e o fator de crescimento fibroblástico, que recrutam células endoteliais e fibroblastos para iniciarem a próxima fase da cicatrização (DIEGELMANN; EVANS, 2004; ZHAO et al., 2016). No entanto, com a prolongação da fase inflamatória e, conseqüente, alta exposição às citocinas pró-inflamatórias, pode haver diferenciação prejudicada e acúmulo de células T efectoras, que são umas das causas de inflamações crônicas, conforme descrito por Seraphim et al. (2020).

Na fase proliferativa (Figura 2, C), a atividade celular prevalece devido ao aumento dos níveis de citocinas. O processo de reepitelização inicia com os queratinócitos e as células tronco epiteliais proliferando na matriz provisória formada principalmente por fibrina/fibronectina. No momento em que o processo inflamatório começa a cessar, as células endoteliais e fibroblastos se acumulam no local do ferimento para a síntese do tecido de granulação, onde ocorre simultaneamente os processos de angiogênese e fibroplasia, o que fornece oxigenação, nutrição e hidratação da matriz para suportar a intensa atividade celular (BELVEDERE et al., 2020;

REINKE; SORG, 2012). Em relação aos fibroblastos, esses possuem a importante função de sintetizar os componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurônico, os quais mediam migração, crescimento e diferenciação celular (BARKER, 2011; ECKES; NISCHT; KRIEG, 2010).

A contração e remodelagem são as últimas etapas da cicatrização (Figura 2, D). Em resposta a tensão mecânica e citocinas como o TGF- β , os fibroblastos aumentam a expressão da α -actina de músculo liso, que se transformam em miofibroblastos e promovem contração do ferimento por meio dos receptores de integrina que essas células possuem. Esses receptores interagem com os componentes da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina. A remodelagem ocorre através do aumento da regulação da expressão de colágeno tipo I e a quebra de colágeno tipo III por meio das metaloproteinases de matriz, o que resulta na formação da cicatriz, onde as fibras de colágeno, predominantemente o tipo I, são rearranjadas em feixes paralelos pequenos (ZHAO et al., 2016). O final da cicatrização é caracterizado pelo processo de apoptose das células vasculares e miofibroblastos, o que promove a conversão do tecido de granulação rico em células para a cicatriz rica em colágeno com poucas células (DESMOULIERE et al., 1995).

Afim de garantir um efetivo processo de cicatrização, é fundamental o controle de diversas condições no local do ferimento, como oxigenação, temperatura, vitaminas e minerais, conforme descrito por Simões et al. (2018). Tais condições podem ser alcançadas com o uso de curativos ou uma combinação desses, os quais são considerados ideais se garantirem uma boa cicatrização por permitir o isolamento térmico, permitir a troca gasosa, facilitar o debridamento, adaptar a superfície do ferimento, minimizar a formação de cicatriz, impermeabilizar contra bactérias estranhas, não ser tóxico e não aderir ao ferimento (VOWDEN; VOWDEN, 2017). O uso de curativos para o tratamento de feridas tem origens pré-históricas e acompanham, de certa forma, a história da humanidade.

2.3 Histórico do uso de curativos

O primeiro relato de uso de curativos para o tratamento de ferimentos data de 2500 antes de Cristo (a.C.) em tábuas de argila encontradas na Mesopotâmia, as quais relatam os “três gestos da cura”: lavar os ferimentos, fazer os emplastos e enfaixar esses ferimentos. Esses emplastos eram compostos de uma mistura de substâncias como lama, argila, plantas e ervas e eram aplicados nos ferimentos para protegê-los e absorver exsudatos. Além desses

componentes, óleos também eram utilizados nos emplastos para evitar infecções e prevenir que o curativo aderisse ao ferimento (FORREST, 1982; SHAH, 2011).

Os egípcios antigos acreditavam que um ferimento aberto seria uma possível porta de entrada para entidades maliciosas e, por isso, evitavam tal acontecimento cobrindo os ferimentos com fezes de macaco (JONES, 2015). Em cerca de 1500 a.C., no Papiro de Ebers, os egípcios também faziam uso de lama, esterco de vaca fermentado, cera de abelha, excrementos de cabra, cebolas e ervas no tratamento de ferimentos (FORTNER, 2012). Os egípcios também foram os primeiros a utilizarem o mel em ferimentos juntamente com os indianos (SHAH, 2011). Ademais, os egípcios também introduziram materiais minerais na terapêutica dos ferimentos, a partir do uso de um pigmento de cobre verde obtido a partir da mistura de crisocola e malaquita com potentes atividades adstringentes e antissépticas. Hipócrates, na Grécia antiga (460-370 a.C.), estimulava o uso de água previamente fervida, vinagre e vinho para a limpeza de ferimentos seguida da aplicação de mel, óleo e vinho (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; FORREST, 1982). Cláudio Galeno (129-200), cirurgião dos gladiadores em Pérgamo e membro da corte do imperador romano Marcos Aurélio, utilizava gazes como bandagens para ferimentos, as quais foram estabelecidas como curativos no século V (DAUNTON et al., 2012).

Durante a Primeira Guerra Mundial foi desenvolvido o primeiro curativo absorvente a partir da combinação de algodão e gaze, chamado de “*gamgee*” por conta do seu criador, o cirurgião inglês Joseph Sampson Gamgee (1828-1886). Também durante esse período, houve o desenvolvimento de um curativo não aderente pelo francês Auguste Lumière (1862-1954) composto de um tecido telado coberto por parafina e 1,25% de bálsamo do Peru (JONES, 2015).

A Segunda Guerra Mundial desencadeou o avanço nas formulações curativas com o desenvolvimento da primeira formulação curativa alternativa à gaze pelo capitão H. Bloom, pertencente ao Corpo Médico do Exército Real da Inglaterra, o qual utilizou embalagens de celofane, um derivado da celulose, de equipamentos de transfusão de sangue como curativos em prisioneiros de guerra. Ele observou que os ferimentos tratados com esse material apresentavam maiores taxas de cicatrização, imediata redução da dor após aplicação e que o curativo era permeável a água (DAUNTON et al., 2012).

Em 1962, George Winter publicou sua teoria sobre a cicatrização de feridas úmidas, a qual descreve que células epiteliais migram mais rapidamente no leito do ferimento mais rapidamente em um ambiente úmido em comparação a um ambiente seco. Essa teoria levou ao desenvolvimento de uma nova geração de curativos a partir da década de 80, os hidrocoloides, os quais são formados por polissacarídeos e outros polímeros que em contato com o ferimento,

absorvem água e formam um gel (JONES, 2015). Esses hidrocoloides por permitirem a alteração do ambiente do ferimento e, dessa forma, promover melhorias no processo de cicatrização em relação aos curativos tradicionais/passivos/inertes, compõem os curativos interativos ou bioativos.

2.4 Tipos de curativos

Em virtude das características heterogêneas dos ferimentos, as quais dependem de vários fatores como etiologia, condição do paciente, localização e presença de infecções, por exemplo, há uma dificuldade inerente no desenvolvimento de um único curativo que se adeque a todos os tipos de ferimentos (BIANCHERA et al., 2020). Baseado na finalidade curativa requerida, os curativos podem ser classificados, de forma geral, em curativos passivos/inertes e interativos/bioativos (GUPTA; EDWARDS, 2009).

Os passivos/inertes são compostos principalmente por gazes, fiapos, emplastos, ataduras e algodão e utilizados como curativos primários ou secundários com função de proteger o ferimento de contaminações microbianas. No entanto, esse tipo de curativo promove grande absorção de exsudatos dos ferimentos e tendem a aderir aos mesmos, tornando-o dolorida a sua remoção, além de requerer que esse curativo seja trocado com frequência para evitar o processo de maceração no local do ferimento. Por esse motivo, esse tipo de curativo é indicado para ferimentos limpos e secos com moderados níveis de exsudato ou para a utilização como curativos secundários (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

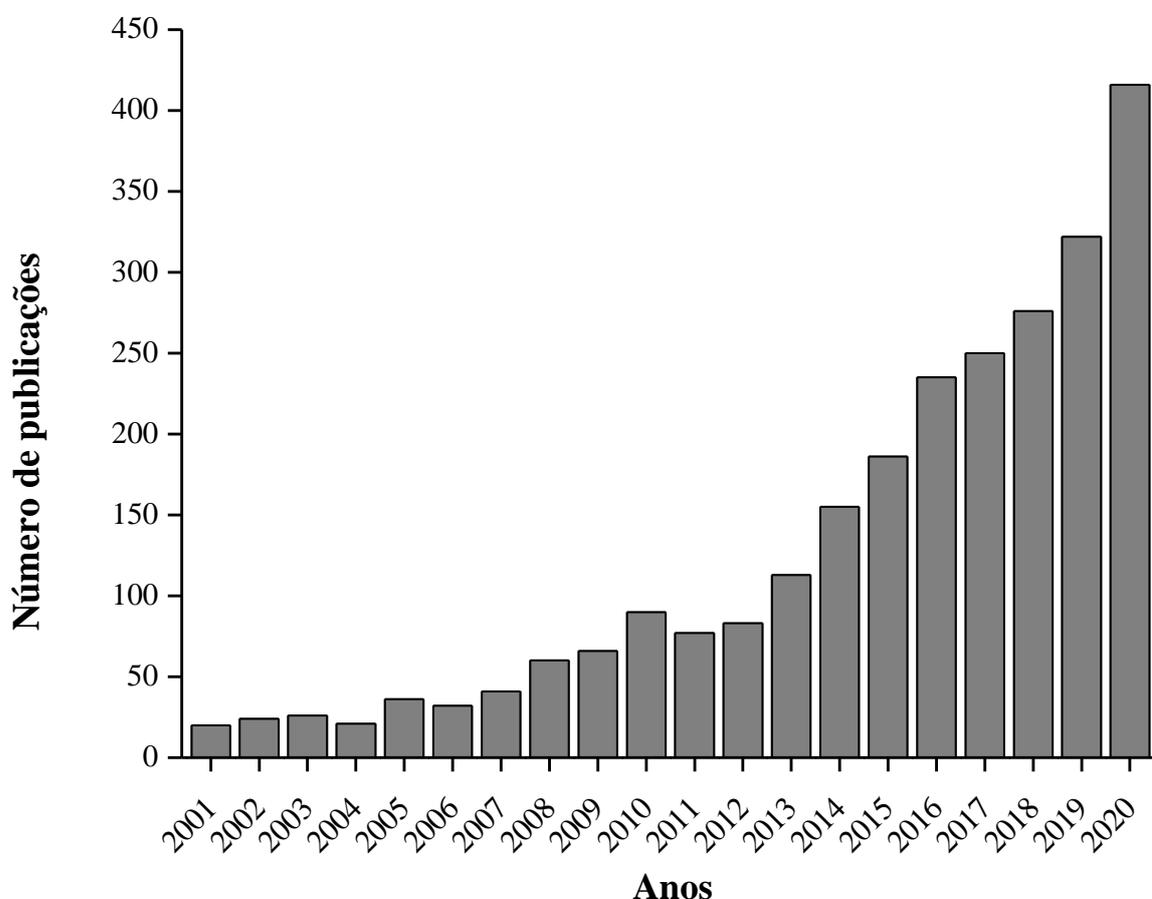
Os curativos interativos/bioativos, por sua vez, surgiram para contornar e/ou minimizar as problemáticas dos passivos/inertes para garantir um efetivo processo de cicatrização. Esses curativos interativos facilitam o processo de cicatrização por alterar o ambiente e interagir com a superfície do ferimento, além de trabalhar ativamente com propriedades dos ferimentos como exsudato, tecidos, células e fatores de crescimento. Para garantir todas essas vantagens, esses tipos de curativo são desenvolvidos a partir de vários materiais de origem sintética e natural. Dentre esses materiais, os biomateriais se destacam, os quais são considerados uma das melhores escolhas nas últimas décadas para o tratamento de ferimentos (RAHMATI et al., 2020).

2.5 Biomateriais em curativos

Segundo o Instituto Americano de Saúde, biomateriais podem ser definidos como “qualquer substância ou combinação de substâncias, que não sejam fármacos, de origem sintética ou natural, que pode ser usado por qualquer período de tempo, que aumenta ou substitui parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo” (BERGMANN; STUMPF, 2013). Os primeiros relatos do uso de biomateriais em humanos datam milhares de anos a.C. com o uso de vidros, metais e marfim como implantes dentários pelos egípcios (HASIRCI; HASIRCI, 2018).

Esses biomateriais são um campo de estudo em rápida expansão, principalmente pelo seu caráter multidisciplinar e direcionado para a aplicação, permitindo-o beneficiar dos avanços das outras áreas das ciências (SANTOS et al., 2020; VRANA, 2020). Esse fato é confirmado pelo crescimento da quantidade de publicações indexadas no *Web of Science* nos últimos 20 anos, a exemplo dos biomateriais utilizados no tratamento de ferimentos com a utilização dos descritores “biomaterials” e “wounds” para a pesquisa das publicações, como demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Número de publicações de trabalhos científicos na temática dos biomateriais no tratamento de ferimentos indexados no *Web of Science* nos últimos 20 anos (acessado em 04 de março de 2021).



Fonte: dados da pesquisa.

Conforme as características heterogêneas dos ferimentos, como explicado no tópico anterior, esse fato pode representar uma vantagem para os biomateriais no tratamento dos ferimentos devido a sua adaptabilidade e possibilidade de combinação a fim de se beneficiar das vantagens de cada componente (BIANCHERA et al., 2020).

Os requisitos de uma formulação curativa dependem do tipo de ferimento e muitos desses são características intrínsecas dos biomateriais, como biocompatibilidade, ter propriedades físicas comparáveis aos tecidos que vão substituir ou onde serão implantados, ter propriedades mecânicas adequadas, ter tempo de vida útil adequado, ter propriedades químicas semelhantes às dos tecidos, ser processado e esterilizado sem dificuldade, prevenir infecções e ser econômico e disponível (AHMAD RAUS; WAN NAWAWI; NASARUDDIN, 2020; HASIRCI; HASIRCI, 2018).

Esses biomateriais para uso em curativos derivam de origens sintéticas e naturais e são, na sua maioria, baseados em polímeros e proteínas (ARAMWIT, 2016). O Quadro 1 demonstra alguns exemplos de biomateriais de origem sintética e natural utilizados no desenvolvimento de curativos.

Quadro 1 – Exemplos de biomateriais de origem sintética e natural utilizados no desenvolvimento de formulações curativas.

Origem	Tipo	Exemplos				
Sintética	Polimérico	Poliuretanos e derivados Teflon Silicone Ácido poliláctico Polietilenoglicol Policaprolactona Ácido poliglicólico Álcool polivinílico				
		Natural	<table border="1"> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Natural</td> <td>Polimérico</td> <td>Celulose e derivados Amido β-glucanas Quitina, quitosana Alginato Glicosaminoglicanos Ácido hialurônico Pectinas</td> </tr> <tr> <td>Proteico</td> <td>Colágeno Gelatina Queratina Fibrina Fibroína Sericina Albumina sérica bovina</td> </tr> </tbody> </table>	Natural	Polimérico	Celulose e derivados Amido β -glucanas Quitina, quitosana Alginato Glicosaminoglicanos Ácido hialurônico Pectinas
Natural	Polimérico	Celulose e derivados Amido β -glucanas Quitina, quitosana Alginato Glicosaminoglicanos Ácido hialurônico Pectinas				
	Proteico	Colágeno Gelatina Queratina Fibrina Fibroína Sericina Albumina sérica bovina				

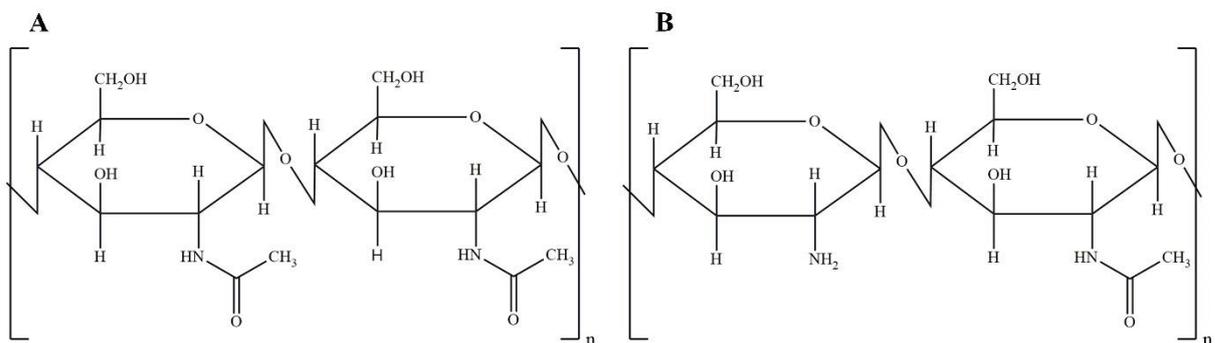
Fonte: adaptado de Bianchera et al. (2020) e Aramwit (2016).

Dentre esses, os biomateriais baseados em polímeros são os mais amplamente utilizados em formulações com finalidades curativas (HORST; MOIEMEN; GROVER, 2019). A multifuncionalidade desses polímeros, juntamente com suas propriedades de biocompatibilidade, degradação, versatilidade de suas estruturas químicas e a capacidade de modificação das suas propriedades mecânicas, por exemplo, explicam a grande utilização dessa classe de biomateriais (KOHLI et al., 2019; SIKKA; MIDHA, 2019). Entre os biopolímeros, a quitosana (QTS) e o álcool polivinílico (PVA), derivados de fontes naturais e sintéticas, respectivamente, representam alguns dos biopolímeros mais utilizados.

2.5.1 Quitosana

A QTS é o principal derivado da quitina e é produzido a partir do processo termoquímico de desacetilação da quitina em meio alcalino. A estrutura desse polímero é composta por monômeros de 2-amino-2-desoxi- β -D-glicose (D-glicosamina desacetilada) e *N*-acetil-D-glicosamina ligadas por ligações glicosídicas β -1,4 (NASERI-NOSAR; ZIORA, 2018). As estruturas químicas da quitina e da QTS estão demonstradas na Figura 4.

Figura 4 – Estruturas químicas da quitina (A) e da QTS (B).



Fonte: adaptado de Krayrova; Lopatin e Varlamov (2020).

Esse biopolímero é caracterizado, principalmente, pela massa molecular e pelo grau de desacetilação, esse último deve ser maior que 50% na QTS. Esses dois fatores influenciam majoritariamente muitas propriedades físico-químicas e biológicas da QTS, como solubilidade, cristalinidade e a resposta celular. Os grupos amina dos monômeros D-glicosamina podem adquirir cargas positivas (em soluções ácidas diluídas), que estão relacionadas com propriedades importantes desse polímero. Além disso, juntamente com os grupos carboxilas,

fornece flexibilidade e possibilidades de modificação química nesse polímero (AMALRAJ; JUDE; GOPI, 2020).

A QTS também apresenta propriedades adesivas e excelente capacidade de permeabilidade de oxigênio, além de efeito hemostático e bloqueador das terminações nervosas no local do ferimento, a partir da absorção de prótons e bradicinina liberados no local da lesão, o que ocasiona redução da dor (OKAMOTO et al., 2002). Ademais, esse polímero estimula a atividade dos macrófagos, acelerando a regeneração tecidual, previne a formação de cicatrizes e possui atividade antimicrobiana (SHOUEIR et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Essa última atividade está relacionada com vários fatores da QTS, como destacado por Li e Zhuang (2020), tais como tipo do microrganismo, massa molar, grau de desacetilação, concentração, pH, fonte da QTS, temperatura, fase de crescimento celular bacteriana e modificações químicas na cadeia polimérica. Um dos mecanismos antimicrobianos propostos para QTS está relacionado com a interação das cargas positivas da cadeia polimérica com grupos carregados negativamente na superfície das bactérias (ex. ácido teicóico), o que causa a ruptura da integridade do microrganismo, com posterior extravasamento do conteúdo intracelular e eventual morte do microrganismo (COSTA et al., 2012). Além desse mecanismo, a literatura relata a influência da QTS na expressão gênica por ligação com os ácidos nucleicos, que também possuem carga parcial negativa (GALVÁN MÁRQUEZ et al., 2013; PARK; NAH; PARK, 2011).

Esses mecanismos explicam a atividade desse biopolímero frente a muitos microrganismos, tais como *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Candida albicans* com valores de concentração inibitória mínima (MIC) entre 5 e 500 µg/mL (GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; SHANMUGAM; KATHIRESAN; NAYAK, 2016).

No entanto, a QTS, assim como outros polímeros de origem natural, apresenta baixa resistência a umidade, rápida degradação e propriedades mecânicas insatisfatórias, fatores esses que podem comprometer as suas aplicações biológicas (ULLAH; CHEN, 2020). Para contornar essa problemática, pode ser utilizado misturas ou blendas de polímeros, associando um polímero de origem natural com um de origem sintética, por exemplo. Dentre essas associações, a blenda de QTS+PVA é bastante utilizada para se obter materiais para aplicações biomédicas, como hidrogéis (LUO et al., 2020a), nanocompósitos (BOURAKADI et al., 2019; KHORASANI et al., 2018; MENAZEA; AHMED, 2020; TOMMALIEH et al., 2020; WANG; FAKHRI, 2020), nanofibras (ABEDI et al., 2021; NAEIMI et al., 2020; ZOU et al., 2020),

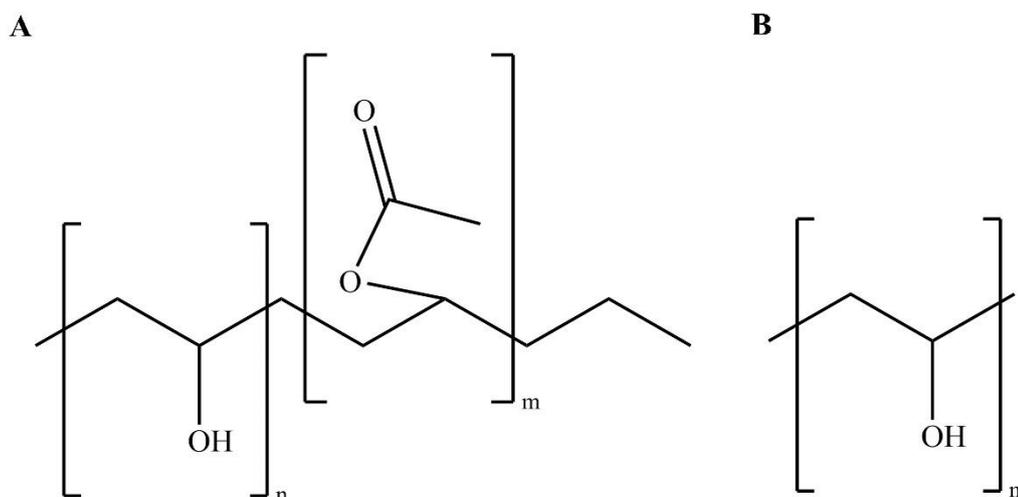
aerogeis (ZHANG et al., 2018) e filmes (AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020), com melhoria das propriedades físico-químicas e com diminuição dos custos de produção (AHMAD et al., 2020; KIM et al., 2019; MASSARELLI et al., 2021; RAFIQUE et al., 2016).

2.5.2 Álcool polivinílico

O PVA é um polímero semicristalino, hidrofílico, com repetição de grupos hidroxila na sua estrutura, formado a partir da polimerização de monômeros de acetato de vinila, para gerar o poli acetato de vinila, seguido de uma reação de saponificação, o que causa a hidrólise da ligação éster (KOHLI et al., 2019; SIKKA; MIDHA, 2019).

A solubilidade do PVA em água e a resistência aos solventes orgânicos são umas das suas mais importantes propriedades. No entanto, nem todos os tipos de PVA são solúveis em água. Essa solubilidade depende de vários fatores, tais como o tamanho das macromoléculas (normalmente, PVA de massas moleculares menores são mais solúveis em relação aos que possuem maiores massas), os números de grupos hidroxila que permaneceram livres, quantos grupos acetato estão ligados na cadeia (acima de 50% de grupos acetato na cadeia o torna insolúvel em água), por exemplo (JULINOVÁ; VAŇHAROVÁ; JURČA, 2018). As estruturas químicas do PVA parcialmente e totalmente hidrolisado estão demonstradas na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura química do PVA parcialmente (A) e totalmente (B) hidrolisado.



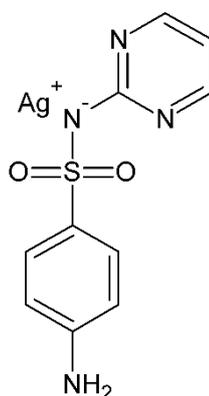
Fonte: adaptado de Julinová; Vaňharová; Jurča (2018).

As propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência química, absorção de umidade e intumescimento são ideais para o desenvolvimento de formulações com finalidades curativas contendo o PVA (JATOI et al., 2019; MA et al., 2019). Além disso, a capacidade plastificante do PVA, como também demonstrado pela glicerina e o sorbitol, fornece maior flexibilidade às formulações que contém esse polímero, especialmente os filmes (HIREMANI et al., 2020).

2.6 Sulfadiazina de prata

O uso da prata e seus derivados para o tratamento de ferimentos e queimaduras teve início nos séculos 17 e 18 com o uso de nitrato de prata em úlceras na pele. Na década de 60, a AgSD (Figura 6), produto derivado da combinação de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio por substituição do átomo de hidrogênio por um de prata na molécula da sulfadiazina, foi introduzida na terapêutica de queimaduras por Charles L. Fox Jr. e seu uso, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1973, apresentou melhoria na taxa de sobrevivência dos pacientes (HEYNEMAN et al., 2016; KLASSEN, 2000a; RAGONHA et al., 2005; SHECKTER et al., 2014).

Figura 6 – Estrutura química da AgSD.



Fonte: autoria própria.

O amplo sucesso da AgSD é devido ao seu mecanismo de ação. O íon prata (Ag^+) possui ação a partir de interações com a parede bacteriana, DNA, enzimas e proteínas de membrana, além da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ECKHARDT et al., 2013). Alguns mecanismos de interação do Ag^+ com o exterior das bactérias têm relacionado a interação desse

elemento com grupos carregados negativamente (ex. lipopolissacarídeos) da membrana plasmática dos microrganismos e a formação de “quebras” na parede celular, a partir do rompimento das ligações glicosídicas entre os monômeros de *N*-acetilglucosamina e *N*-acetilmurâmico dos peptídeoglicanos e formação de ligações cruzadas entre os aminoácidos D-alanina e L-lisina. Esses processos afetam a permeabilidade do microrganismo e extravasamento do conteúdo intracelular (FAYAZ et al., 2010; MIRZAJANI et al., 2011).

A interação do Ag^+ com as estruturas externas dos microrganismos também permite a entrada desse íon no interior da célula e o contato com estruturas como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e enzimas. Os Ag^+ promove interação com o DNA, preferencialmente, na posição N7 da guanina e adenina e aumentam a expressão e reorganização espacial de nucleoides similares a histonas, o que ocasiona compactação e condensação do DNA (ARAKAWA; NEAULT; TAJMIR-RIABI, 2001; KHADKA et al., 2018). Uma das enzimas dos microrganismos mais afetadas pelo Ag^+ é a desidrogenase, pertencente à cadeia respiratória. A sua inibição causa formação de ROS que atacam outras estruturas intracelulares (PRABHU; POULOSE, 2012). O Ag^+ também pode atuar impedindo a ligação de cofatores enzimáticos (ex. cobre, ferro) causando inibição da atividade enzimática pela formação de complexos com aminoácidos, em especial a cistina, por conter grupos tiois na sua estrutura. Esse grupo contém enxofre, uma base fraca, que tem uma grande afinidade pelo Ag^+ , um ácido fraco (CHEN; SCHLUESENER, 2008).

A sulfadiazina, apesar de ser um agente antibacteriano derivado das sulfonamidas, não atua de fato como tal na AgSD, mas apresenta um efeito sinérgico específico em combinação com níveis subinibitórios de prata (ATIYEH et al., 2007; FOX; MODAK, 1974; HEYNEMAN et al., 2016; KLASSEN, 2000b).

A literatura relata atividade da AgSD frente a vários microrganismos como *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, além de cepas multirresistentes como a *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), com valores de concentração inibitória mínima (MIC) entre 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$ pelo método de diluição seriada em tubos com posterior contagem de colônias em placas (WHITE; COOPER, 2005).

A associação da AgSD com polímeros com finalidades curativas tem sido bem estudada, como a associação com o alginato (XING et al., 2019), colágeno (GIL et al., 2019), gelatina (FELCIYA et al., 2021), ácido polilático (AHMADIAN; GHORBANI; MAHMOODZADEH, 2020), policaprolactona (MOHSENI et al., 2019; SALMORIA; PAGGI; KANIS, 2016), celulose de origem bacteriana (FAISUL ARIS et al., 2019; SHAO et al., 2015, 2016),

ciclodextrinas (AMIRI; NALBANDI, 2018), poliuretano ureia (OPREA; OPREA, 2017), amido (ZEPON et al., 2013), acetato de celulose (KHAN et al., 2019), poliacrilonitrila (ULLAH et al., 2019), álcool polivinílico (ALIPOUR et al., 2019; GAO et al., 2018) e quitosana (ELFEKY et al., 2017b; RASOOL; ATA; ISLAM, 2019; SHAO et al., 2017).

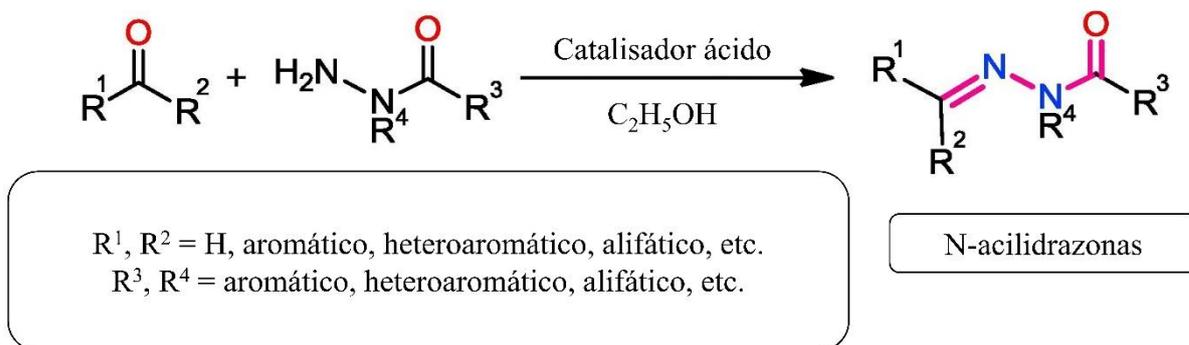
2.7 JR19

A descoberta de novas propostas terapêuticas é um processo complexo, dispendioso e com a integração de várias áreas da ciência e tecnologia. Essa integração permitiu a melhor compreensão do processo de reconhecimento molecular e das propriedades farmacocinéticas de moléculas candidatas à fármaco, o que possibilitou o desenvolvimento de ferramentas da química medicinal para a descoberta de tais moléculas (AMARAL et al., 2017).

Dentre essas, os derivados *N*-acilidrazônicos representam diversas moléculas e candidatos a fármacos desenvolvidos (ex. dantroleno) desde a década de 70, (MAIA; TESCH; FRAGA, 2014). O núcleo desses derivados, o *N*-acilidrazona, tem sido um dos grupos funcionais mais presentes na química medicinal e foi identificado vários compostos *hit* e *lead* que agem em vários alvos moleculares com diversas atividades (THOTA et al., 2018), como antiparasitários (COIMBRA et al., 2019; DUARTE; MOURA; SILVA, 2018), antivirais (MARRA et al., 2020; YONEDA et al., 2014), antibacterianos (AARJANE et al., 2020; ZHANG et al., 2020), antifúngicos (DASCALU et al., 2020; ROZADA et al., 2020), antitumorais (CURY et al., 2019; LI et al., 2020), analgésico (HERNÁNDEZ et al., 2012; SILVA et al., 2010) e anti-inflamatórios (CERQUEIRA et al., 2019; CORDEIRO et al., 2020).

A versatilidade dos derivados *N*-acilidrazônicos está relacionada com a facilidade de síntese, a qual é realizada a partir da condensação entre aldeídos ou cetonas com hidrazidas, como apresentado na Figura 7.

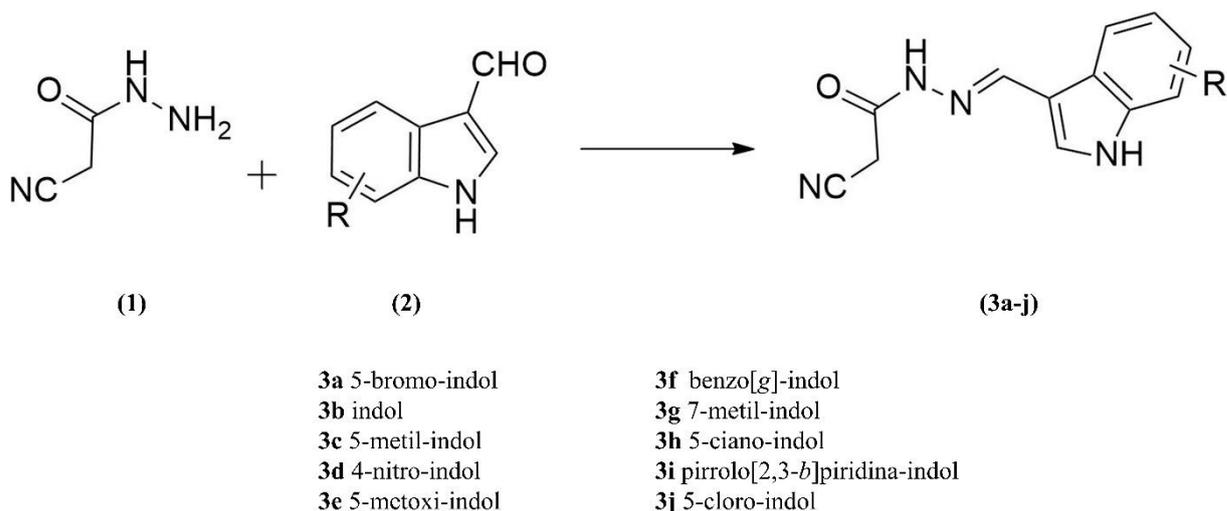
Figura 7 – Rota de síntese comum para a obtenção de *N*-acilidrazonas.



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

Nesse contexto, Moraes et al. (2018) em seu trabalho sintetizaram dez novos derivados *N*-acilidrazônicos com atividade anti-inflamatória a partir de uma reação de condensação entre quantidades equimolares de (1) cianoacetohidrazida e diferentes grupamentos (2) carboxialdeídos 3-indol sob catálise ácida, conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 – Síntese de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos.



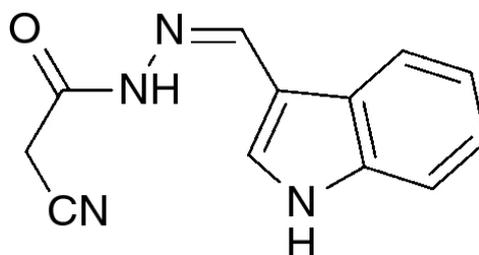
Fonte: adaptado de Moraes et al. (2018).

Dentre esses derivados, o 2-ciano-*N'*-((5-bromo-1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida (3a) e 2-ciano-*N'*-((1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida (3b) apresentaram as melhores atividades anti-inflamatórias a partir dos ensaios de inibição da proliferação de linfócitos, indução da produção de citocinas, inibição da cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2), ensaio *in vivo* de edema de pata induzida por carragenina, nas doses de 30 e 60 mg/kg

e estudos *in silico*, como o *docking* molecular, além de apresentar perfis farmacocinéticos teóricos adequados (ex. $\log P = 0,25$ e área de superfície polar = $81,04 \text{ \AA}$) (MORAES et al., 2018).

O mesmo derivado 3b foi utilizado por Apolinário (2016) em seu estudo, denominado de JR19 (Figura 9), para avaliação, e posterior confirmação, das suas propriedades anti-inflamatórias pelos métodos *in vivo* de peritonite e edema de pata induzidas por carragenina, além do bolsão de ar subcutâneo na dose de 10 mg/kg. A atividade nociceptiva da JR19 também foi avaliada pelos métodos de nocicepção induzida por formalina e dor orofacial, no entanto não apresentou efeitos analgésicos centrais com retenção da ação anti-inflamatória. A ausência de toxicidade aguda da JR19 foi também evidenciada (100 mg/kg). Assim como, não foi possível determinar a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão em concentrações entre 1000 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 9 – Estrutura química da JR19.



Fonte: Wanderley et al. (2019).

A partir disso, com a finalidade de se desenvolver uma nova formulação curativa contendo os derivados *N*-acilidrazônicos, Wanderley et al. (2020) e Wanderley et al. (2019) desenvolveram filmes de QTS contendo JR19 e realizaram a caracterização físico-química dos filmes, além da avaliação de propriedades mecânicas e biocompatibilidade. Os resultados demonstraram incorporação da JR19 nos filmes de QTS apesar da antecipação do ponto de fusão desse derivado *N*-acilidrazônico demonstrado pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), similaridades dos perfis de perda de massa com a QTS na termogravimetria (TG) e aumento da intensidade de um dos picos da JR19 na difração de raios-X (DRX). A incompatibilidade química foi descartada pela espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) devido a presença dos grupos funcionais característicos da JR19 (WANDERLEY et al., 2019). Além disso, os filmes de QTS que continham a JR19 apresentaram maior flexibilidade, capacidade de absorção de água, e rugosidade de superfície,

com menor ângulo de contato quando comparados aos filmes de QTS. Ademais, ambos os filmes mostraram ausência de citotoxicidade em fibroblastos nos ensaios de difusão em ágar e do brometo de 3-(4,5-dimetil)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (WANDERLEY et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar filmes de quitosana e álcool polivinílico com a incorporação de sulfadiazina de prata e 2-ciano-N'-((1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida (JR19).

3.2 Objetivos específicos

O trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- a) desenvolver filmes de QTS+PVA contendo AgSD e JR19 pelo método de evaporação de solvente;
- b) determinar o potencial hemolítico dos filmes desenvolvidos;
- c) analisar microscopicamente os filmes desenvolvidos por meio da microscopia óptica e determinar o parâmetro de rugosidade média de superfície pela análise microestrutural;
- d) determinar o parâmetro de taxa de transmissão de vapor de água dos filmes;
- e) determinar a influência da matriz polimérica na fotoestabilidade dos fármacos incorporados;
- f) analisar as características mecânicas dos filmes a partir da resistência dobrável;
- g) caracterizar físico-quimicamente os filmes desenvolvidos a partir das técnicas da técnica de espectroscopia na região do infravermelho;
- h) desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação da JR19 nos filmes;
- i) avaliar a atividade antifúngica dos filmes pelo método de microdiluição em caldo e determinar a concentração fungicida mínima.

4. METODOLOGIA

O trabalho utilizou os materiais e métodos descritos a seguir.

4.1 Materiais

O trabalho utilizou os seguintes materiais:

- a) quitosana de baixo peso molecular e médio grau de desacetilação (75-85%) (REATEC®);
- b) álcool polivinílico (VETEC®) com grau de hidrólise entre 86,5-89,5%;
- c) ácido acético glacial P.A. (Dinâmica®);
- d) sulfadiazina de prata (J.P.N. Pharma PVT Ltd, Lote SSD/12/11);
- e) composto *N'*-(1H-indol-3il) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), sintetizado pelo Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB);
- f) caldo ágar Sabouraud (Kasvi®);
- g) tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 (Dubelco®);
- h) dimetilsulfóxido P.A. (Dinâmica®)
- i) ágar Sabouraud (Kasvi®);
- j) resazurina sódica (Sigma Aldrich®);
- k) álcool etílico absoluto P.A. (Dinâmica®);
- l) metanol grau HPLC (Merck®).

4.2 Métodos

O desenvolvimento dos filmes de QTS+PVA e de QTS+PVA contendo AgSD e JR19 foi realizado de acordo com o método de secagem de solvente, conforme descrito por Wanderley et al. (2019).

4.2.1 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes foram desenvolvidos a partir da dissolução da QTS em solução de ácido acético 1% (v/v) com obtenção de uma concentração final de 1% (m/v), e do PVA em água

aquecida com obtenção de uma concentração final também de 1% (m/v). A partir dessas duas soluções poliméricas, produziu-se um filme de QTS+PVA na proporção de 1:1, nomeado F1, conforme descrito na Tabela 1. Para incorporação da AgSD e JR19 nas soluções poliméricas foi adicionado 1 mg da AgSD+8,6 mg da JR19 em 10 mL de QTS:PVA (1:1) sob agitação magnética por um período de 24 horas. Os filmes formados a partir dessa solução foram denominados de F2 (Tabela 1). Com o objetivo de otimizar a quantidade de JR19 nos filmes, utilizou-se 1 mg da AgSD+1 mg de JR19 em 10 mL da mesma solução de QTS:PVA (1:1) sob as mesmas condições descritas para F2.

Tabela 1 – Amostras utilizadas no estudo.

Amostra	Proporção QTS:PVA (m/m)	AgSD (mg)	JR19 (mg)
F1	1:1	-	-
F2	1:1	1	8,6
F3	1:1	1	1

Fonte: dados da pesquisa.

As soluções resultantes foram vertidas em placas de Petri de plástico com 5,5 cm de diâmetro, num volume de 10 mL, e foram inseridas em uma estufa de circulação de ar, na temperatura de 50 °C por um período de 24 horas para promover a secagem das soluções e a formação dos filmes. Esses foram desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da UEPB.

4.2.2 Avaliação do potencial hemolítico

O ensaio de potencial hemolítico foi realizado de acordo com adaptações da metodologia preconizada pela ASTM, na norma ASTM F756 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS, 2017).

Os filmes foram cortados em peças de 1 cm² e incubados em 7 mL de solução salina 0,9% por 24 horas. Posteriormente, a solução salina foi retirada e adicionado 50 µL do concentrado de hemácias e permaneceu em contato com os filmes por 15 min. Após esse período, 10 mL de salina foi adicionada e incubada por 3 horas. Após esse período de incubação, o fluido foi transferido para um tubo de ensaio e centrifugado a 1000 rpm por 15 min. A hemoglobina liberada pela hemólise foi medida para absorbância do sobrenadante com o auxílio

do espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu[®], modelo UV-1900, no comprimento de onda de 545 nm. Água destilada e solução salina foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e expressos em média \pm desvio padrão. A porcentagem de hemólise foi calculada pela Equação 1:

$$\%Hemólise = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{cont. neg.})}{(Abs_{cont. pos.} - Abs_{cont. neg.})} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$Abs_{amostra}$: Absorbância da amostra;

$Abs_{cont. neg.}$: Absorbância do controle negativo;

$Abs_{cont. pos.}$: Absorbância do controle positivo.

A norma da International Organization for Standardization (ISO) 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009) especifica três classificações para os materiais baseados na sua taxa de hemólise: são considerados (1) hemolíticos os materiais acima de 5%, (2) levemente hemolíticos entre 2-5% e (3) não-hemolíticos abaixo de 2%. Esse ensaio foi realizado no LDCPF da UEPB.

4.2.3 Caracterização físico-química dos filmes

Para a caracterização dos filmes foram utilizados os ensaios a seguir descritos.

4.2.3.1 Microscopia óptica

Para realização da análise foi utilizado o microscópio óptico digital Hirox[®] KH 7700 acoplado a uma estação de análises de imagens, com utilização dos aumentos de 140 \times e 1400 \times . Foi utilizado o software ImageJ para as medidas de microestruturas dos materiais. A microscopia foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) da UEPB.

4.2.3.2 Análise microestrutural

A análise microestrutural foi realizada com as imagens obtidas pela microscopia ótica. Com essas imagens, foi possível calcular o parâmetro de rugosidade média de superfície (Ra) pelo software Gwyddion.

4.2.3.3 Taxa de transmissão de vapor de água

O ensaio para determinação da taxa de transmissão de vapor de água (TTVA) foi realizado de acordo com a norma E96 da American Society for Testing and Materials – ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS, 1995) e executado no LDCPF da UEPB.

Os filmes foram postos na abertura de frascos de vidro de 1,3 cm de diâmetro. Esses frascos foram preenchidos com água destilada até a altura de 0,5 cm abaixo da abertura e fechados com filmes de cloreto de polivinila (PVC), como mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Frascos contendo água destilada no seu interior e os filmes na abertura.



Fonte: dados da pesquisa.

A massa de cada frasco foi aferida e depois foram mantidos em dissecador com umidade relativa de 75% a 25 °C por um período de 24 horas (1 dia). Após esse período, a massa de cada frasco foi aferida novamente e a taxa de transmissão de vapor de água foi calculada pela Equação 2:

$$TTVA = \frac{m_1 - m_2}{A \times t} \quad (2)$$

Onde:

m_1 : Massa inicial;

m_2 : Massa após o período de 1 dia;

A: Área da abertura do frasco de vidro;

t: Período de tempo do ensaio (1 dia).

4.2.3.4 Ensaio de fotoestabilidade

O ensaio foi realizado de acordo com a norma Q1B da *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (BAERTSCHI et al., 2015; THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1998) com adaptações. As amostras de AgSD, JR19 e os filmes F2 e F3 foram expostas a uma lâmpada D65 (6500 K) inserida em uma estufa, a qual irradiou 6278 lx de energia luminosa. As características macroscópicas das amostras foram avaliadas por um período de 191 h (\approx 8 dias), pois a norma ICH Q1B recomenda 1.200.000 lx de energia total irradiada. O ensaio foi realizado no LDCPF da UEPB.

4.2.3.5 Ensaio de resistência ao dobramento

A resistência ao dobramento foi realizada manualmente dobrando repetidamente o filme no mesmo ponto até este se romper ou ser dobrado até 300 vezes, conforme descrito por Devi e Dutta (2017) e Wanderley et al. (2020). A quantidade de dobramentos sem qualquer ruptura forneceu o valor exato de sua resistência. A análise foi realizada no LDCPF da UEPB e em triplicata.

4.2.3.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

O ensaio foi realizado com a utilização do espectrômetro IRTracer-100 FTIR (Shimadzu®) com varredura de 4000 a 600 cm^{-1} . As amostras sólidas (componentes e suas misturas físicas na proporção 1:1) foram analisadas com o auxílio de pastilhas de KBr e os filmes pelo acessório de reflexão total atenuada (ATR). As análises foram realizadas no

Laboratório de Síntese e Caracterização de Filmes Finos (LabFilm) do Centro de Energias Alternativas e Renováveis (CEAR) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2.4 Validação de metodologia analítica para quantificação da JR19

Foi desenvolvido e validado a metodologia para quantificação da JR19 nos filmes por espectroscopia na região do UV-Vis, de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez descritos na resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Os experimentos foram realizados no espectrômetro UV-Vis Shimadzu®, modelo UV-1900 localizado no LDCPF da UEPB.

Inicialmente foi preparada uma solução etanol:água (80:20 v/v) para a elaboração de uma solução mãe (SM) de JR19 na concentração de 100 µg/mL. Com o intuito de determinar o comprimento de onda (λ) de absorção máxima da JR19, realizou-se uma varredura espectrofotométrica na faixa de 200-500 nm de uma solução de JR19 10 µg/mL obtida a partir da SM.

A seletividade do método foi determinada a partir da comparação dos espectros da JR19 e dos filmes com e sem o fármaco obtidos pela leitura de diluições desses três em etanol:água (80:20 v/v) com concentração de 10 µg/mL com o objetivo de observar a banda de absorbância característica da JR19.

A linearidade foi alcançada com a elaboração de três curvas analíticas para obtenção de uma curva analítica média. Preparou-se três SM e, a partir de cada uma, seguiu-se diluições seriadas em etanol:água (80:20 v/v) com a obtenção de 6 concentrações (4, 6, 8, 10, 12, 14 µg/mL). Os resultados foram tratados estatisticamente, com equação da reta obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e avaliada por análise de variância simples (ANOVA) e posterior análise dos resíduos. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir da relação sinal/ruído com utilização do desvio padrão de dez leituras do branco.

Para o parâmetro de precisão, realizou-se a leitura em sextuplicata da solução de JR19 na concentração de 8 µg/mL, correspondente ao ponto médio da linearidade, e analisada pela repetibilidade e precisão intermediária por analistas distintos e em dias diferentes representados como coeficiente de variação (CV), com nível de significância inferior a 5%. A exatidão foi avaliada por meio da leitura de três níveis de concentrações: baixo (4 µg/mL), médio (8 µg/mL)

e alto (14 µg/mL), com triplicata de cada nível, expressa pela concentração média experimental e a concentração teórica, conforme Equação 3.

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

A robustez foi avaliada através da leitura em triplicata da concentração do ponto médio (8 µg/mL) com variação da composição do solvente (metanol:água (80:20 v/v)) e o pH da solução a partir do acréscimo de uma solução de ácido clorídrico 0,1 M na solução de etanol:água (80:20 v/v) com modificação do pH 5,80 para 5,00.

4.2.5 Avaliação da atividade antifúngica

4.2.5.1 Padronização do inóculo fúngico

As suspensões das cepas de *C. albicans* foram preparadas a partir de uma cultura de 24 h, em caldo ágar Sabouraud (CAS), com a adição de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e estéril, até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente entre 1 a 5×10^6 unidades formadoras de colônias (CFU)/mL). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 530 nm para confirmação da concentração. Posteriormente, a suspensão fúngica foi diluída 1:100 em PBS para utilização nos ensaios.

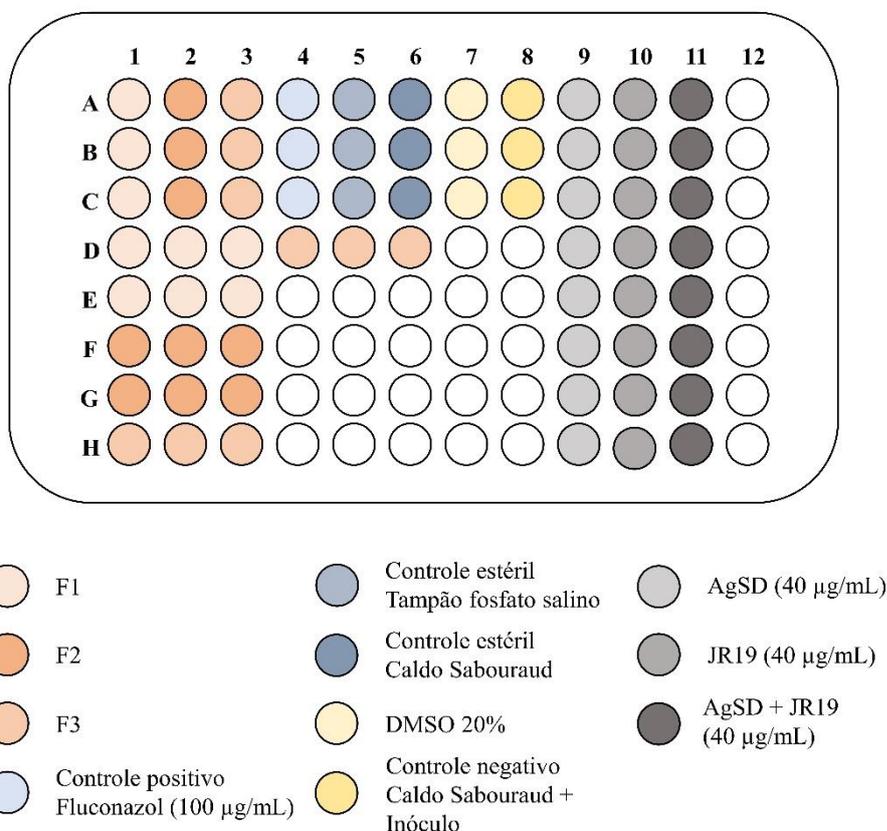
4.2.5.2 Determinação da concentração fungicida mínima

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços conforme as metodologias descritas na norma M27-A2 do *The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (THE CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2017)* com adaptações.

Os poços da placa foram preenchidos com 80 µL de CAS. Em seguida, foram adicionados 100 µL dos tratamentos (F1, F2, F3, dimetilsulfóxido (DMSO) 20%, AgSD 40 µg/mL, JR19 40 µg/mL e AgSD+JR19 40 µg/mL), com diluição seriada dos tratamentos AgSD, JR19 e AgSD+JR19. Adicionalmente foram adicionados 20 µL da suspensão fúngica 1:100 nos poços dos tratamentos. Como controles positivo e negativo foram utilizados fluconazol 100

$\mu\text{g/mL}$ e CAS, respectivamente. Para avaliar a esterilidade dos meios, foram utilizados os controles estéreis PBS e CAS. O esquema da distribuição dos tratamentos na placa de 96 poços está demonstrado na Figura 13. A placa foi incubada em estufa a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Figura 13 – Esquema da disposição dos tratamentos e controles na placa de 96 poços.



Fonte: dados da pesquisa.

Após esse período, o crescimento fúngico foi revelado com a adição de $30\text{ }\mu\text{L}$ de resazurina $0,01\%$ em cada poço dos tratamentos e incubado com por 30 min. No decorrer desse tempo, a presença da cor púrpura representou ausência de crescimento e da cor rosa, presença de crescimento fúngico. A avaliação com a resazurina se baseia na reação de redução desse corante (cor púrpura) para resofurina (cor rósea) por células viáveis (LYU; BLAUCH; TANG, 2018; MCGAW; ELGORASHI; ELOFF, 2014).

Após a incubação das placas, a mistura dos poços dos tratamentos em que não houveram crescimento foram replicadas em placas de ágar Sabouraud (AS) e foram incubadas a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h e avaliado o crescimento. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da UEPB.

4.2.6 Análise estatística

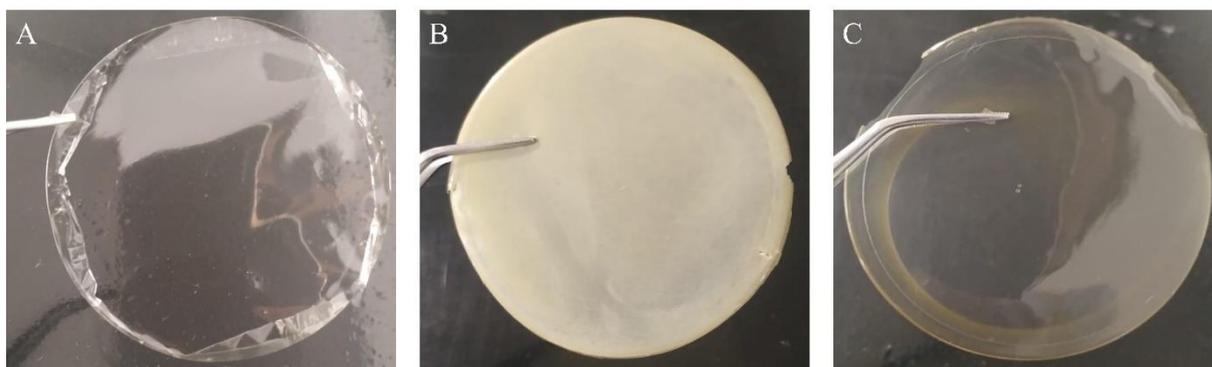
Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e para verificar a diferença estatística nas comparações dos dados foi utilizada a ANOVA com teste de comparação de médias de Tukey. As diferenças foram significativas se o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do Statistica versão 10 (StatSoft, Ulsa, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes desenvolvidos (Figura 11) apresentaram uniformidade com aparência macroscópica variável de acordo com composição. O filme F1 (Figura 11, A) apresentou-se transparente e uniforme, característico dos filmes compostos por QTS+PVA, conforme também apresentado por Yu et al. (2018), Yun et al. (2017) e Hajji et al. (2016). O filme F2 (Figura 11, B) apresentou uma característica opaca e coloração amarelada pela presença da AgSD e, principalmente, da JR19, na quantidade de 8,6 mg, com característica visual de dispersão desses fármacos. Esse achado é semelhante ao encontrado por Wanderley et al. (2020) que desenvolveu filmes de QTS contendo JR19 na mesma quantidade utilizada na amostra F2.

Figura 11 – Imagens dos filmes F1 (A), F2 (B) e F3 (C).



Fonte: dados da pesquisa.

O filme F3 (Figura 11, C), por sua vez, que continha 1 mg de AgSD e 1 mg de JR19, apresentou características semelhantes com o filme F1, com melhor homogeneidade de distribuição aparente dos dois fármacos no filme devido a menor quantidade de JR19. No entanto, a característica de dispersão foi mantida nesse filme. Essa dispersão nos filmes F2 e F3 possivelmente está relacionada com a dificuldade de solubilização desses dois agentes terapêuticos na solução polimérica de QTS:PVA (1:1 v/v) durante a preparação das soluções para posterior secagem.

A concentração de AgSD utilizada nesses filmes foi baseada nas formulações disponíveis no mercado contendo esse agente antimicrobiano, as quais também utilizam a AgSD na concentração de 1% (m/m). Além disso, esse agente possui uma baixa solubilidade

aquosa, o que impede uma maior incorporação em sistemas poliméricos com caráter hidrofílico. Outro fator que foi levado em consideração para a determinação da concentração da AgSD foi o seu potencial efeito de comprometimento do processo de reepitelização em concentrações acima de 1%, conforme relatado por Lee (2002) em seu estudo, o qual relatou citotoxicidade em linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat) e, conseqüentemente, comprometimento da reepitelização em um modelo de queimaduras de segundo grau *in vivo* em ratos sem pelos com a utilização de AgSD 2% (LEE et al., 2005). Esse comprometimento causado pela AgSD também foi relatado por Rosen et al. (2015) em modelo de queimaduras *in vivo* com a utilização de ratos, o qual descreveu uma possível desregulação na expressão de citocinas, o que causa o comprometimento na deposição de colágeno e do processo de reepitelização.

A concentração de JR19, por sua vez, para o filme F2 foi baseada em outros estudos do grupo de pesquisa (WANDERLEY, 2019; WANDERLEY et al., 2019, 2020), e para o filme F3, em formulações tópicas contendo agentes anti-inflamatórios, a exemplo dos sais de diclofenaco (diclofenaco sódico e dietilamônico).

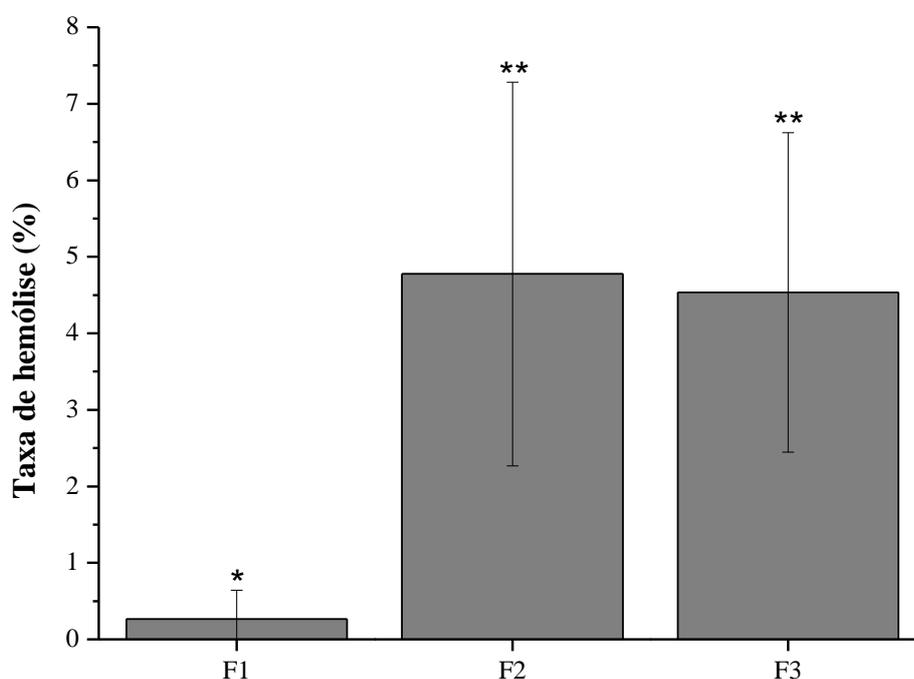
5.2 Potencial hemolítico dos filmes

Uma das principais propriedades a ser avaliada durante o desenvolvimento de formulações curativas é a biocompatibilidade, principalmente a hemocompatibilidade. Dependendo da composição desses curativos e concentração desses componentes, podem causar efeitos adversos, devido o tecido sanguíneo ser um dos primeiros em que os curativos entram em contato durante sua aplicação (RARIMA; ASALETHA; UNNIKRISHNAN, 2018). A resposta típica do hospedeiro desencadeada pelos curativos sintéticos está relacionada com a formação de trombos, inflamação e reação à corpos estranhos. Essa última resposta pode levar as hemácias a um estresse osmótico excessivo desencadeado pela incompatibilidade da superfície do material (BALAJI et al., 2015, 2016; YUAN et al., 2013).

As taxas de hemólise dos filmes estão mostradas na Figura 12. A amostra F1 apresentou taxa média de hemólise de 0,26% e é classificado como não-hemolítico segundo a norma 10993 da ISO (<2%), o que evidencia a sua hemocompatibilidade e a possibilidade do seu uso como formulações curativas. Esse resultado é semelhante ao encontrado nos filmes de CHI+PVA desenvolvidos por He e Xiong (2012) em seu estudo, onde os filmes também foram classificados como não-hemolíticos. Os filmes F2 e F3 apresentaram taxas de hemólise de $4,78 \pm 2,51$ e $4,53 \pm 2,09$ %, respectivamente, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao F1. O aumento da taxa de hemólise desses filmes pode estar relacionado com a

penetração dos cristais de AgSD e JR19 dispersos nos filmes na membrana das hemácias, conforme relatado por Singh; Singh e Bala (2020). Esse mecanismo está também associado com o aumento das interações eletrostáticas entre as hemácias e os fármacos dispersos na matriz, o que provavelmente promoveu o aumento da taxa de hemólise (ZHANG et al., 2012). Apesar desse aumento, ambos os filmes apresentam taxa de hemólise média menor que 5%, o que os caracteriza como adequados para utilização como curativos (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

Figura 12 – Taxa de hemólise dos filmes. Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$).



Fonte: dados da pesquisa.

5.3 Microscopia óptica

A microscopia dos filmes foi realizada para compreender o microambiente desses materiais. A fotomicrografia dos filmes no aumento de 140x está apresentada na Figura 13. Os filmes F1 (Figura 13, A) apresentaram característica homogênea e com ausência de poros. Os filmes F2 (Figura 13, B), por sua vez, apresentou rugosidade aparente pela presença da AgSD e da JR19, conforme também relatado por Wanderley et al. (2020) no desenvolvimento de

filmes de QTS contendo JR19. Os filmes F3 (Figura 13, C) possui uma aparente redução da rugosidade em comparação ao F2, provavelmente devido a uma menor quantidade de JR19.

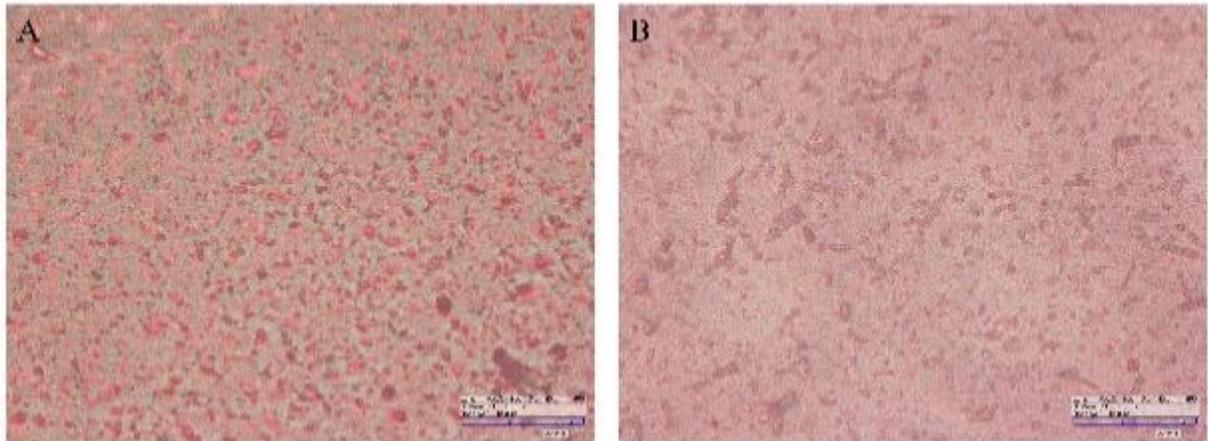
Figura 13 – Fotomicrografias dos filmes F1 (A), F2 (B) e F3 (C) (barra de escala = 500 μm).



Fonte: dados da pesquisa.

As fotomicrografias dos filmes F2 e F3 no aumento de 1400x revelaram detalhes da microestrutura desses materiais, conforme mostrado na Figura 14.

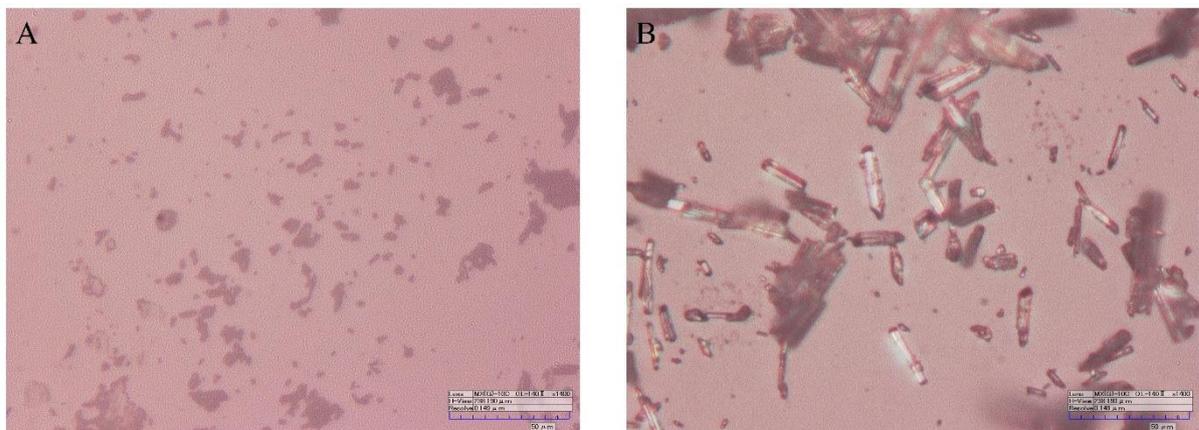
Figura 14 – Fotomicrografias dos filmes F2 (A) e F3 (B) no aumento de 1400x (barra de escala = 50 μm).



Fonte: dados da pesquisa.

Ambos os filmes apresentaram cristais dispersos por toda a matriz, o que indica a não solubilização da AgSD e da JR19. Esse achado foi confirmado pela microscopia da AgSD e da JR19 isoladas (Figura 15), a qual apresentou formatos de cristais semelhantes aos apresentados pelos filmes F2 e F3. A partir disso, foi realizada a medida de 50 cristais dispersos em cada filme para avaliar a influência da matriz no tamanho desses cristais.

Figura 15 – Fotomicrografias da AgSD (A) e JR19 (A) no aumento de 1400x (barra de escala = 50 μm).



Fonte: dados da pesquisa.

Os filmes F2 e F3 apresentaram cristais com tamanho médio de $4,265 \pm 3,402 \mu\text{m}$ e $6,385 \pm 3,299 \mu\text{m}$, respectivamente. Esses valores são menores que os cristais da JR19, que

apresentaram tamanho médio de $17,166 \pm 7,020 \mu\text{m}$, e semelhantes aos cristais de AgSD ($4,326 \pm 2,317 \mu\text{m}$). O teste de comparação de médias de Tukey (Tabela 2) demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tamanho dos cristais da JR19 e as amostras AgSD, F2 e F3.

Tabela 2 – Tamanho dos cristais nas amostras.

Amostras	Tamanho dos cristais (μm)
AgSD	$4,326 \pm 2,317^a$
JR19	$17,166 \pm 7,020^b$
F2	$4,265 \pm 3,402^a$
F3	$6,385 \pm 3,299^a$

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Letras diferentes indicam diferenças entre as amostras ($p < 0,05$).

Esse achado pode influenciar positivamente os parâmetros de solubilidade dos fármacos uma vez que o tamanho reduzido de cristais leva ao aumento da solubilidade por aumento da área superficial dessas estruturas (KHADKA et al., 2014; XU; LUO, 2014).

5.4 Análise microestrutural

A rugosidade média de superfície (Ra) é um parâmetro importante no desenvolvimento de biomateriais com finalidade curativas, pois está relacionado com outras propriedades essenciais, como molhabilidade, hemocompatibilidade e adesão (MANIKANDAN et al., 2017; SEGAN et al., 2020; SHARMA et al., 2016).

Os dados de Ra das amostras estão apresentados na Tabela 3. O filme F2 apresentou o maior valor de Ra em relação aos outros filmes estudados. Tal achado pode estar relacionado com a quantidade de AgSD e, principalmente, JR19 dispersa na matriz. Esse achado também foi relatado por Wanderley et al. (2020) no seu estudo em que filmes de QTS contendo JR19 apresentaram maior Ra em relação aos filmes de QTS. Apesar da diferença do F2 em relação a F1 e F3, essa não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Os valores de Ra dos filmes estão de acordo com os valores de Ra estabelecidos para a pele, que compreende a faixa entre 14,6-25 μm , conforme relatado por Bloemen et al. (2011).

Tabela 3 – Rugosidade média de superfície (Ra) das amostras.

Amostras	Ra (μm)
F1	16,43 \pm 2,77 ^a
F2	20,64 \pm 2,66 ^a
F3	16,32 \pm 1,43 ^a

Fonte: dados da pesquisa.

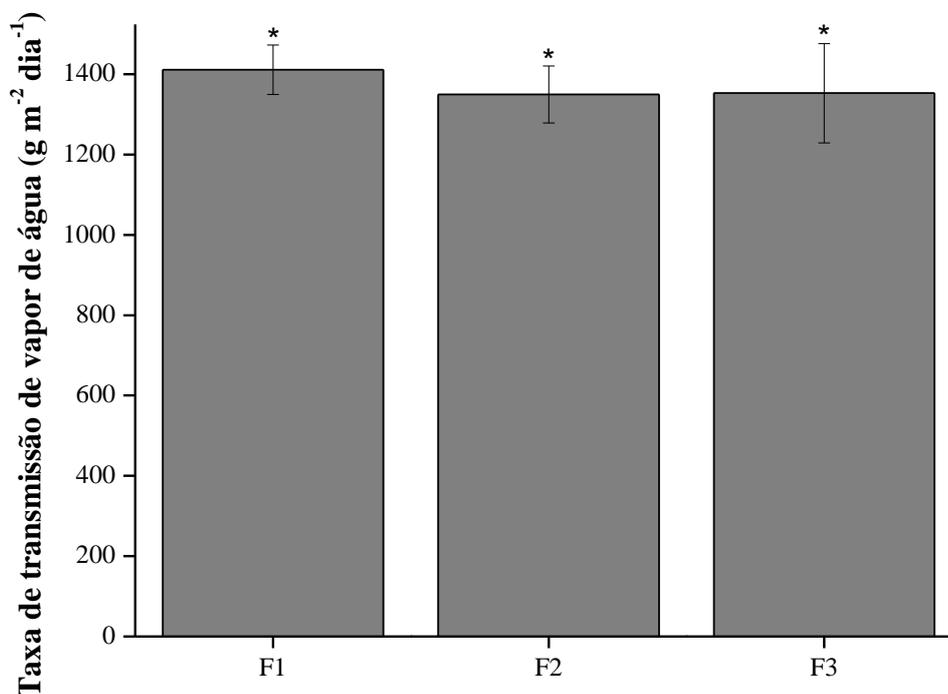
Nota: Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

5.5 Taxa de transmissão de vapor de água

A taxa de transmissão de vapor de água (TTVA) é uma das propriedades de barreira cruciais no desenvolvimento de formulações curativas. O TTVA é a medida da quantidade de vapor de água perdida do ferimento através de um curativo em um determinado período de tempo (DÍEZ-PASCUAL; DÍEZ-VICENTE, 2015; KOCAAGA et al., 2019).

A TTVA das amostras F1, F2 e F3 (Figura 16) foram de 1411,07 \pm 61,69, 1349,51 \pm 71,04 e 1352,78 \pm 123,67 g m⁻² dia⁻¹, respectivamente. Esses valores são semelhantes aos filmes de QTS+PVA desenvolvidos por Choo; Ching e Chuah (2017), os quais apresentaram TTVA de aproximadamente 1113,75 g m⁻² dia⁻¹. A presença da AgSD e JR19 promoveu pequenas reduções na TTVA, possivelmente devido a característica mais lipofílica desses dois fármacos em relação aos dois polímeros hidrofílicos.

Figura 16 – Taxa de transmissão de vapor de água das amostras. Símbolos iguais indicam que a diferença não foi significativa entre as amostras ($p > 0,05$).



Fonte: dados da pesquisa.

Baseado no estudo de Cussler et al. (1988) sobre membranas com função de barreira, pode-se pressupor que a diminuição da TTVA dos filmes F2 e F3 também está relacionada com a dispersão da AgSD e JR19 na matriz polimérica, as quais dificultam a passagem do vapor de água por criar um caminho mais tortuoso para transmissão desse vapor em comparação ao filme F1, que não possui sólidos dispersos na sua matriz. Esse comportamento também foi relatado por Rhim; Wang e Hong (2013) em filmes de ágar contendo nanopartículas de prata, as quais promoveram diminuição na TTVA. Apesar da diferença entre o filme F1 e os filmes F2 e F3, o teste de comparação de médias de Tukey revelou essa diferença como não significativa ($p > 0,05$).

De acordo com dados da Farmacopeia Britânica, um material pode ser considerado permeável ao vapor de água quando a TTVA excede $500 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ (MEDICINES AND HEALTHCARE PRODUCTS REGULATORY AGENCY, 1993; MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA et al., 2015). Os filmes desenvolvidos obedecem a essa condição. Esse achado representa uma vantagem em relação às formulações de AgSD no mercado, que são, na sua maioria, na forma farmacêutica de creme, a qual possui excipientes com propriedades oclusivas, como alguns éteres de polioxietileno alquílicos (ex. cetomacrogol 1000), de acordo com o

Handbook of Pharmaceuticals Excipients na sua sexta edição (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A oclusão de ferimentos pode levar ao processo de maceração, o qual promove acúmulo de fluidos e exsudatos inflamatórios, principalmente em ferimentos crônicos, o que causa retardamento da cicatrização por prolongamento do processo inflamatório. Ademais, pode favorecer a proliferação microbiana pelo excesso de fluidos, como a do *Staphylococcus aureus* (ALTOÉ et al., 2019; MUGITA et al., 2015; RODGERS; WATRET, 2003).

Rosen et al. (2015b) relatou no seu estudo, em um modelo de cicatrização *in vivo* com murinos, diminuição da contração da área do ferimento, aumento e persistência de tecido inflamatório de granulação com a utilização de AgSD em comparação ao grupo controle não tratado. Além disso, houve aumento do número de neutrófilos e diminuição da infiltração de macrófagos no grupo tratado pela AgSD. Todos esses achados provavelmente podem estar relacionados com a oclusão causada pela aplicação contínua de cremes contendo AgSD e que podem ser minimizados com a utilização de curativos que permitem a passagem do vapor de água.

5.6 Ensaio de fotoestabilidade

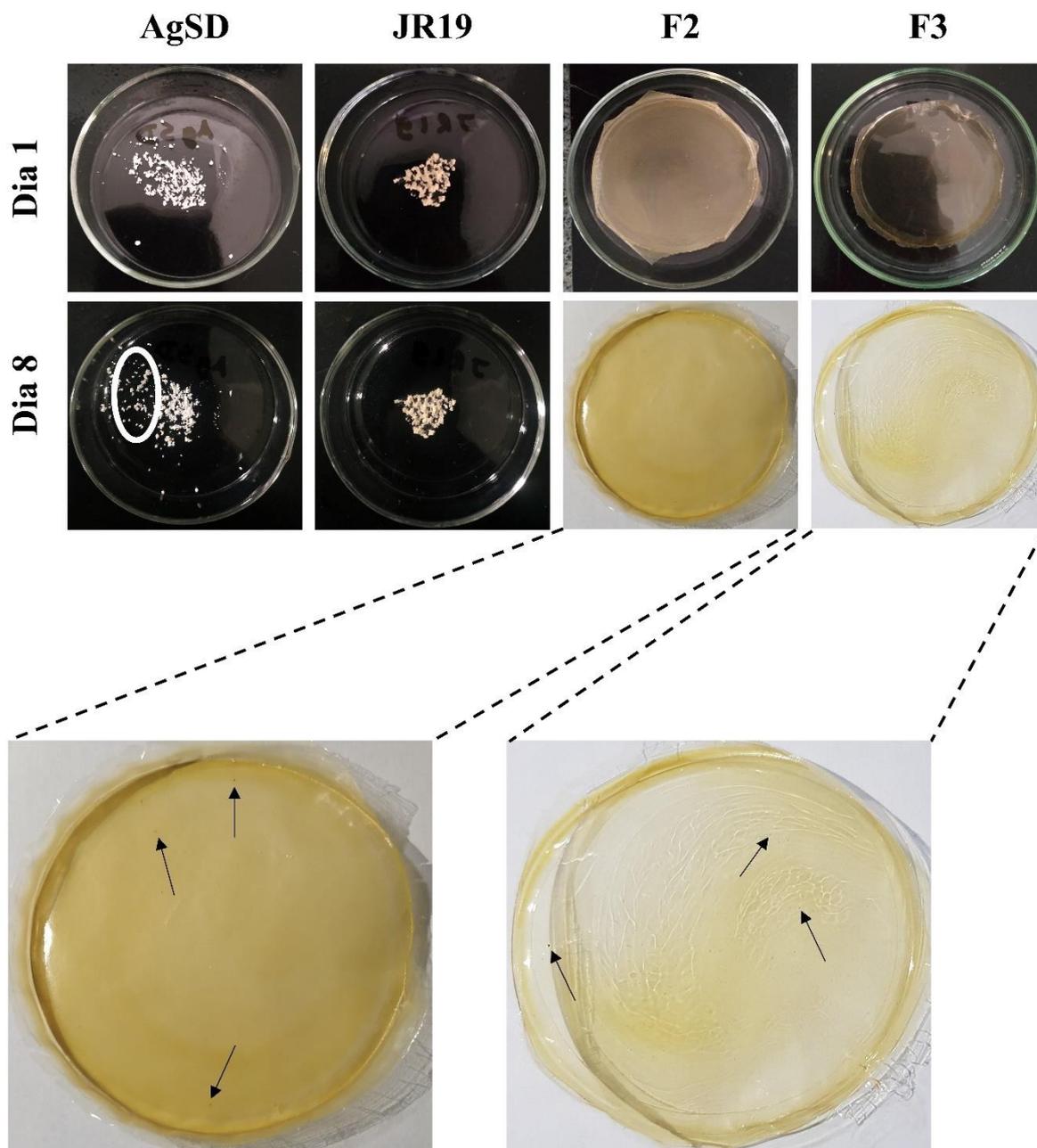
A fotoestabilidade de novos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e formulações deve ser avaliada para constatar que a exposição à luz não causa modificações significativas. Quando um IFA ou formulação é passível de fotodegradação, deve-se tomar cuidados especiais durante as etapas de desenvolvimento e armazenagem. As reações fotoquímicas, apesar de complexas, devem ser estudadas e compreendidas, visto que o conhecimento geral desses processos de fotodegradação é fundamental para a otimização da estabilidade de uma formulação (FACCI et al., 2020; KLEINMAN, 2013).

Após o período do ensaio as amostras de AgSD e os filmes F2 e F3 apresentaram características macroscópicas de fotodegradação, enquanto a JR19 permaneceu sem modificações. A AgSD sofreu escurecimento, como destacado na Figura 17, enquanto os filmes apresentaram pontos escurecidos mais intensos, quando comparados com a AgSD, em sua superfície. Os achados condizem com a característica fotossensível da AgSD, mais especificamente do íon prata (Ag^+). Na presença da luz, a AgSD sofre fotólise com posterior fotorredução do Ag^+ para prata elementar (Ag^0), o que pode explicar a argiria ou argirose (escurecimento da pele) quando a AgSD em contato com a pele humana é exposta a luz solar (JATOI; KIM; NI, 2019; KUNKELY; VOGLER, 2007). Além disso, esse mecanismo pode

causar redução da efetividade antimicrobiana da AgSD, devido a importância da carga positiva do Ag^+ nessa atividade.

Os filmes apresentaram pontos de escurecimento mais evidentes devido, provavelmente, a dispersão da AgSD na matriz polimérica, o que causou o aumento da superfície de contato desse agente antimicrobiano com a luz. A partir desses resultados, pode-se sugerir o uso de uma embalagem primária com propriedades de barreira contra a luz solar para armazenar os filmes antes da sua utilização, o que poderia garantir uma maior estabilidade da formulação final e, por consequência, uma maior efetividade antimicrobiana da mesma.

Figura 17 – Amostras antes e após o ensaio de fotoestabilidade, com destaque para o escurecimento da AgSD (forma oval branca) e para os pontos de fotólise do Ag^+ (setas pretas) nos filmes F2 e F3.



Fonte: dados da pesquisa.

5.7 Resistência dobrável

A resistência dobrável foi medida para demonstrar a flexibilidade dos filmes, visto que essa propriedade é importante no desenvolvimento de formulações curativas e essas devem ser

confortáveis para aplicação no local do ferimento (DEVI; DUTTA, 2017). Os filmes F1 não apresentaram quaisquer rompimentos ao final das 300 dobragens, apresentando-se mais resistentes que os filmes de QTS desenvolvidos por Wanderley et al. (2020) que apresentaram média de 120 dobragens. Essa diferença é devida provavelmente a presença do PVA e sua propriedade plastificante, como destacado por Chetouani et al. (2017) em seu trabalho, no qual houve aumento da flexibilidade pela adição do PVA em filmes de QTS. O mesmo comportamento foi observado no filme F3, o qual não apresentou rupturas após as 300 dobragens, mesmo contendo pequenas quantidades de AgSD e JR19.

No entanto, os filmes F2 (Figura 18) apresentaram drástica redução na resistência em comparação aos demais filmes, o qual apresentou média de 135 dobragens. Esses valores vão na contramão aos apresentados por Wanderley et al. (2020), que apresentou aumento da resistência dobrável em filmes de QTS+JR19 em relação aos filmes de QTS. Essa redução pode estar relacionada com dois fatores. A presença da AgSD pode levar a uma redução da flexibilidade dos filmes pela desestabilização da matriz polimérica, que promove o aumento da rigidez e, conseqüente, redução da flexibilidade (FAJARDO et al., 2013). Esse mecanismo de desestabilização da matriz polimérica pode estar relacionado com a interação do Ag^+ com os grupos de carga parcial negativa dos polímeros (ex. grupos acetato), o que reduz a formação de pontes de hidrogênio entre esses grupos na blenda e, por conseqüência, diminui a flexibilidade dos filmes.

Figura 18 – Filme F2 apresentando rompimento após o ensaio de resistência dobrável.



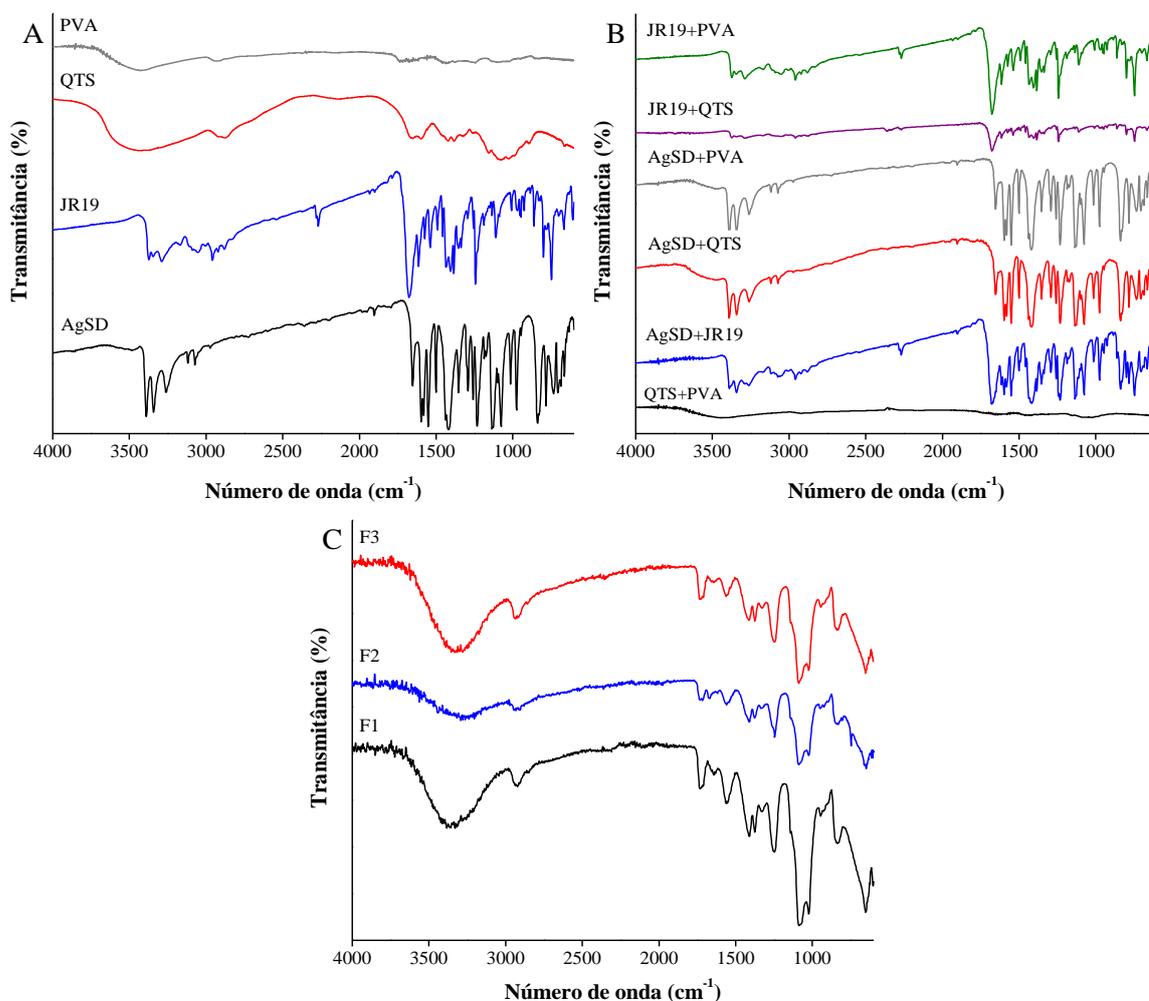
Fonte: dados da pesquisa.

Além disso, tal redução pode ter sido potencializada pela presença de uma grande quantidade de fármacos na forma sólida dispersos na matriz polimérica no filme F2, o que ocasiona em uma matriz mais quebradiça por aumentar o espaçamento entre as cadeias poliméricas, o que pode gerar problemas na formação de interações intermoleculares entre os polímeros, como apresentado por Sänglerlaub et al. (2019) em seu estudo, no qual houve redução da flexibilidade de filmes de polietileno de baixa densidade com o aumento da concentração de óxido de cálcio (CaO) dispersos nos filmes.

5.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

A técnica da espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para identificar a presença de possíveis interações químicas entre os componentes dos filmes a partir da detecção de bandas referentes aos grupamentos funcionais desses compostos (MOHAMED et al., 2017). A Figura 19 e a Tabela 5 demonstram os espectros de infravermelho das amostras e as principais bandas detectadas, respectivamente.

Figura 19 – Espectros de infravermelho dos componentes (A), das misturas físicas 1:1 (B) e dos filmes (C).



Fonte: dados da pesquisa.

A AgSD apresentou um doubleto em 3391 e 3343 cm^{-1} referente aos estiramentos do grupo -NH_2 , uma banda em 1599 cm^{-1} relativa a deformação angular simétrica do grupo -NH_2 e em 1552 cm^{-1} da deformação de N-H , além de bandas relacionadas ao esqueleto pirimidínico em 1420 cm^{-1} e bandas características do estiramento assimétrico do grupamento -SO_2 em 1235 e 1316 cm^{-1} . Esses achados são conformes aos relatados por Luo et al. (2020b) e El-Feky et al. (2017a).

A JR19, por sua vez, apresentou bandas em 2266 cm^{-1} com baixa intensidade referente ao grupamento nitrila ($\text{C}\equiv\text{N}$) de sua estrutura, em 1676 cm^{-1} com alta intensidade relativa à carbonila do grupamento amida e em 748 cm^{-1} relacionada com a deformação angular de 4 H

adjacentes de anéis aromáticos orto-substituídos, os quais correspondem ao anel aromático do grupo indol, conforme relatado por Wanderley et al. (2019).

O espectro da QTS mostrou bandas características em 3314 e 2874 cm^{-1} referentes a estiramentos de grupamentos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$, respectivamente, em 1659 cm^{-1} referente a banda de estiramento de carbonila de amida I e em 1082 cm^{-1} das ligações glicosídicas desse polímero (BRANCA et al., 2016; BURITI et al., 2018). O PVA, por sua vez, apresentou uma banda intensa em 3435 cm^{-1} relativa ao estiramento de grupamentos $-\text{OH}$, além de bandas em 2929 e 1718 cm^{-1} referentes aos estiramentos de grupamentos alquílicos e da carbonila de ésteres dos grupos acetatos remanescentes do processo de hidrólise do poli acetato de vinila, respectivamente. Foi possível detectar também a banda em 1100 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{O}$ e em 1438 cm^{-1} de deformações angulares dos grupamentos $-\text{CH}_2$ (AJITHA et al., 2016; SHARMA et al., 2020).

Tabela 4 – Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho das amostras.

Amostras	$-\text{OH}$	$-\text{NH}$	$\text{C}\equiv\text{N}$	$\text{C}=\text{O}$	$\text{C}-\text{O}-\text{C}$	$-\text{SO}_2$	4H indol
AgSD	-	3391 3343	-	-	-	1316 1235	-
JR19	-	3373	2266	1676	-	-	748
QTS	3314	3314	-	1659	1082	-	-
PVA	3435	-	-	1718	1100	-	-
QTS+PVA	3442	3442	-	1654	1076	-	-
AgSD+JR19	3393	3393 3346	2268	1678	-	1354 1234	748
AgSD+QTS	-	3390 3342	-	1652	1076	1354 1232	-
AgSD+PVA	-	3390 3342	-	1654	-	1354 1232	-
JR19+QTS	3375	3375	2270	1674	1110	-	748
JR19+PVA	3373	3373	2266	1676	1109	-	748
F1	3358	3358	-	1734	1087	-	-
F2	3296	3296	-	1734	1089	-	746
F3	3315	3315	-	1735	1085	-	-

Fonte: dados da pesquisa.

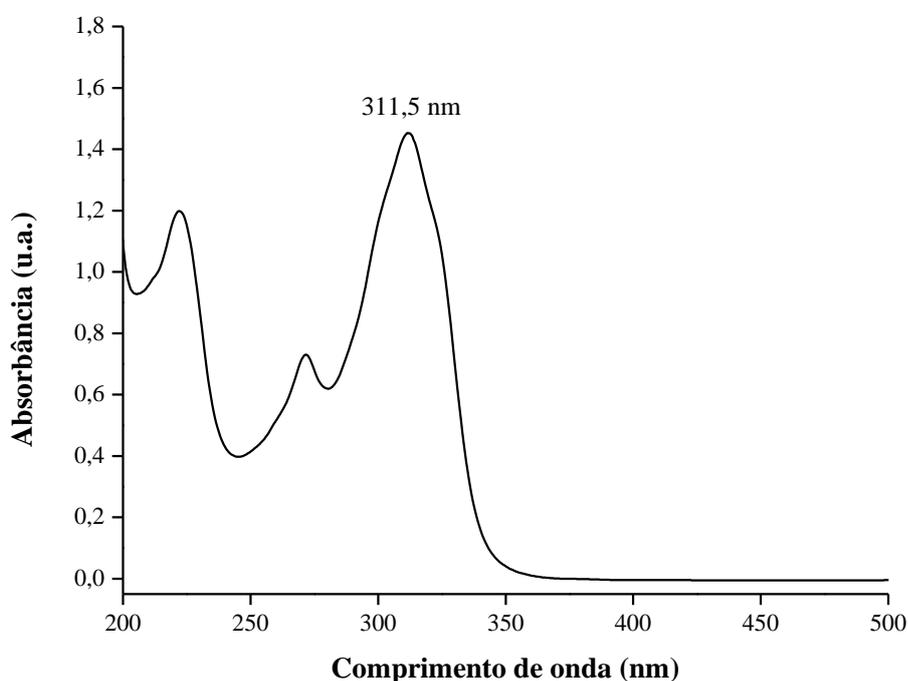
As misturas físicas (1:1) entre os componentes apresentaram manutenção das bandas características de cada componente isolado, especialmente as dos dois fármacos, o que sugere

compatibilidade química entre os componentes da formulação. Os espectros dos filmes, por sua vez, apresentaram manutenção de bandas características da QTS e do PVA, exceto o filme F2 que apresentou uma banda em 746 cm^{-1} referente a deformação dos hidrogênios do anel indólico da JR19, o qual está relacionado com a quantidade de JR19 (8,6 mg) nessa amostra em comparação com o filme F3. A predominância das características espectrais dos polímeros nos filmes pode estar relacionado com a homogeneidade na distribuição dos fármacos nos filmes F2 e F3, o que confirma os achados microscópicos, além da proporção fármaco:polímero nas amostras ($\approx 1:10$ em F2 e $1:50$ em F3).

5.9 Validação de metodologia analítica para quantificação da JR19

A varredura espectrofotométrica da JR19 na faixa entre 200 e 500 nm para a verificação do λ mais adequado (Figura 20) apresentou maior valor de absorvância em 311,5 nm, valor o qual foi utilizado no desenvolvimento e validação do método analítico. Esses dados estão de acordo com o estudo de Wanderley (2019), o qual desenvolveu e validou um método analítico para quantificação da JR19 em filmes de QTS por espectrofotometria UV-Vis.

Figura 20 – Espectro de varredura da JR19 com destaque para o comprimento de onda de maior absorvância ($\lambda=311,5\text{ nm}$).

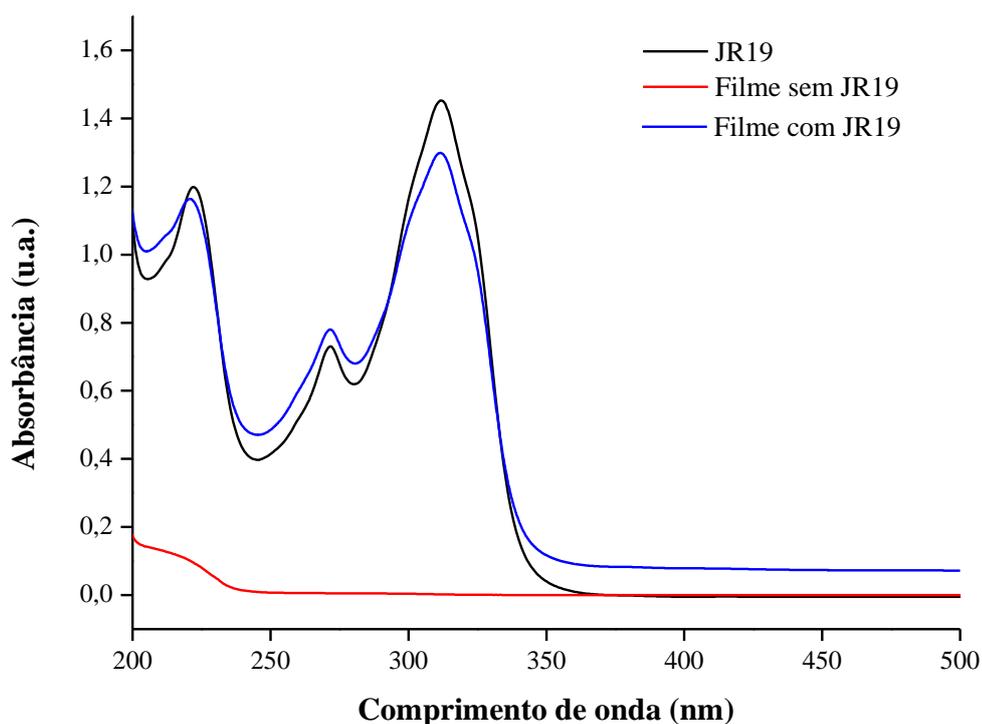


Fonte: dados da pesquisa.

5.9.1 Seletividade

Para verificar a seletividade do método foram obtidos os espectros de varredura da solução de JR19, dos filmes com e sem esse fármaco (Figura 21). A partir desses dados, o método analítico se mostrou seletivo com ausência de interferências da formulação na característica espectral da JR19, o que refletiu na manutenção do λ de maior absorbância em 311,5 nm.

Figura 21 – Seletividade dos filmes sem e com JR19.



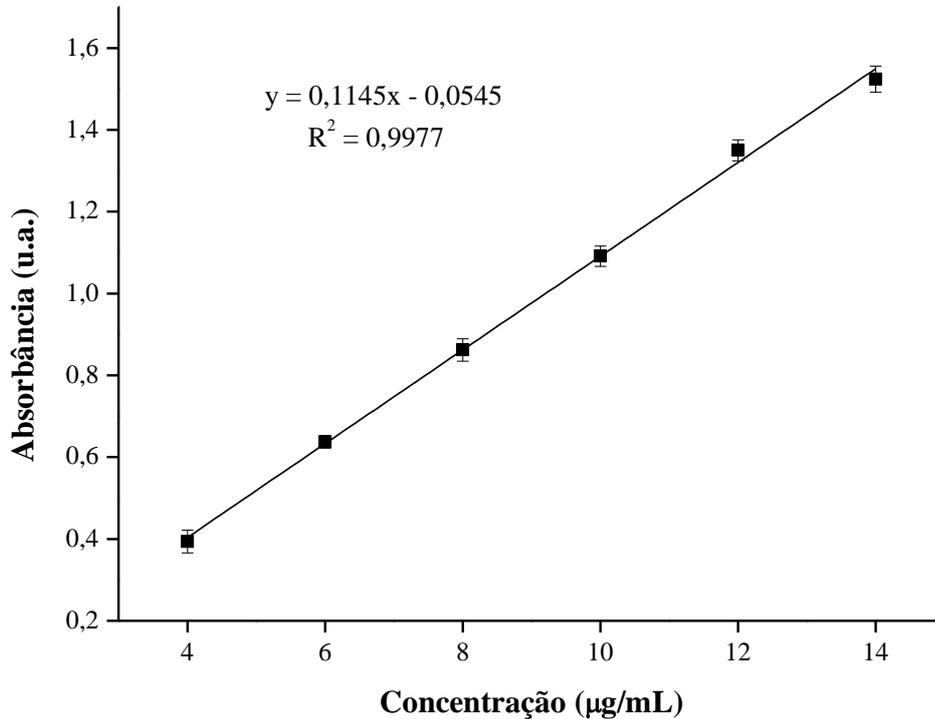
Fonte: dados da pesquisa.

5.9.2 Linearidade

Esse parâmetro foi avaliado na faixa de 4-14 $\mu\text{g/mL}$, com utilização de seis níveis de concentração de JR19. A curva analítica ou curva de calibração (Figura 22) foi alcançada por análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a qual apresentou a equação da reta $y=0,1145x - 0,0545$, coeficiente de determinação $R^2=0,9977$ e coeficiente de correlação $R=0,9989$. Esses resultados indicam linearidade do método dentro das concentrações estudadas

e de acordo com o critério mínimo aceitável pela RDC nº 166/17 da ANVISA (R acima de 0,990) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Figura 22 – Curva de calibração da JR19.



Fonte: dados da pesquisa.

Por meio da ANOVA, testou-se a significância estatística e a linearidade do método (Tabela 5). A validade da regressão (linearidade) foi analisada por meio da comparação dos valores de F tabelado e calculado de acordo com a distribuição de Snedecor no intervalo de confiança de 95%. O valor de F calculado (7047,7702) é aproximadamente 29 vezes maior que o F tabelado (245,9), o que indica que o método é linear no intervalo de confiança de 95%. Outro dado que confirmou a validade da linearidade foi a falta de ajuste, a qual apresentou F calculado (14,6130) menor que o F tabelado (19,43), o que indica que o ajuste do modelo está adequado.

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para avaliação da linearidade do método.

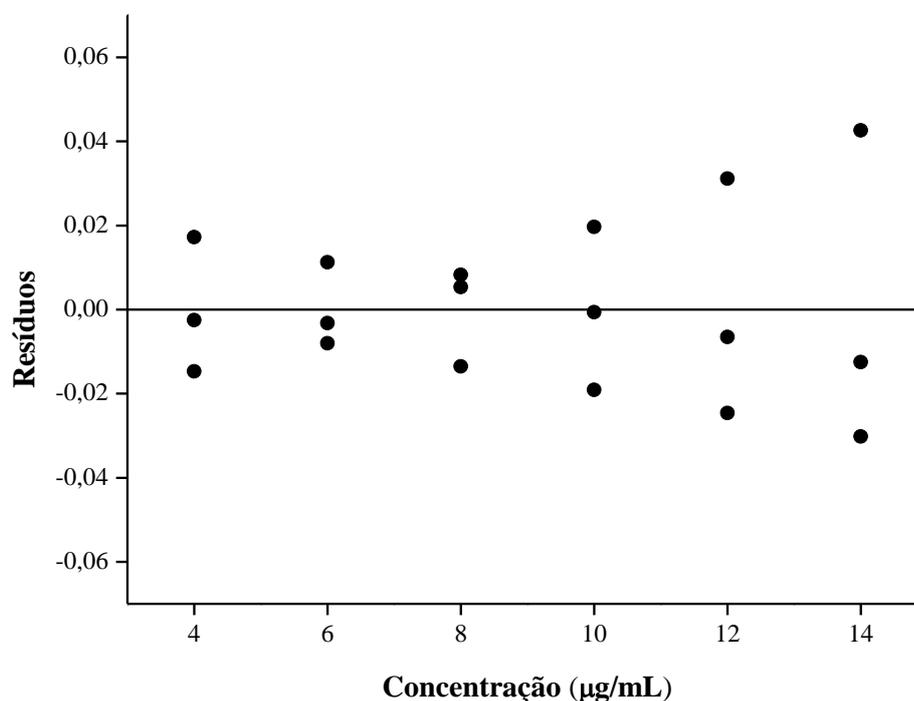
	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	F (1,16)	Faj (1,15)
Modelo	1	2,7563	2,7564	7047,7702	245,9	
Resíduo	16	0,0063	0,0004			
Falta de ajuste	1	0,2363	0,2362	14,6130		19,43
Erro puro	15	0,2425	0,0161			
TOTAL	17	2,7626				

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: Faj (F tabelado da falta de ajuste).

A Figura 23 apresenta o gráfico da análise dos resíduos (diferença entre os valores experimentais e os preditos pela equação do modelo) com relação das distribuições quanto à normalidade e à aleatoriedade. Os dados apresentam aleatoriedade na distribuição dos resíduos com valores próximos à reta de regressão do modelo (MONTGOMERY; PECK; VINING, 2021).

Figura 23 – Gráfico de resíduos x concentração.



Fonte: dados da pesquisa.

A partir da curva de calibração foram calculados os parâmetros de sensibilidade do método, o LD e o LQ, os quais apresentaram os valores de 0,0012 e 0,0035 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O valor de LQ se apresentou menor que a concentração mínima estabelecida no intervalo de quantificação (4 $\mu\text{g/mL}$), dessa forma o método proposto dispõe de excelente sensibilidade, o que assegura que o método proposto é capaz de detectar e quantificar uma ampla faixa de concentrações com segurança.

5.9.3 Precisão

Analisou-se esse parâmetro a partir dos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. O primeiro foi avaliado em sextuplicata com as condições de mesmo analista e mesma instrumentação, enquanto o segundo foi analisado em sextuplicata com um analista diferente. Ambas foram realizadas intradia e interdía. Os resultados (Tabela 6) apresentaram coeficiente de variação (CV) inferior a 5%, o qual está de acordo com o limite estabelecido pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Tabela 6 – Valores da precisão do método espectrofotométrico validado.

Analistas	Dia	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média das absorbâncias	DP	CV (%)
Analista 1	1	8	0,9004	0,0002	0,020
	2	8	0,9098	0,0004	0,046
Analista 2	1	8	0,9013	0,0002	0,020
	2	8	0,9102	0,0002	0,025

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: DP (desvio padrão) e CV (coeficiente de variação).

5.9.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da análise de três concentrações distintas: baixa (4 $\mu\text{g/mL}$), média (8 $\mu\text{g/mL}$) e alta (14 $\mu\text{g/mL}$). Os valores obtidos (Tabela 7) demonstram proximidade entre os valores de concentração obtidos experimentalmente pelo método e os seus valores teóricos, com valores de exatidão entre 101,25 e 102,06%, os quais estão de acordo com

os critérios de aceitação de exatidão da FDA (97-103%) para insumos farmacêuticos ativos (IFAs) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

Tabela 7 – Valores da exatidão do método espectrofotométrico validado.

Nível	Média das absorbâncias	DP	CV (%)	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	Exatidão (%)
Baixo	0,4091	0,0002	0,0489	4	4,0515	101,29
Médio	0,8804	0,0003	0,0301	8	8,1651	102,06
Alto	1,5685	0,0003	0,0205	14	14,1744	101,25

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: DP (desvio padrão) e CV (coeficiente de variação).

5.9.5 Robustez

A robustez indica a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. A solução utilizada na validação era composta com etanol:água (80:20 v/v), a qual apresentava pH de 5,80. Na determinação da robustez, houveram duas modificações nessa solução. A primeira foi a mudança do pH para 5,00 e a segunda foi a composição da solução, com a substituição do etanol pelo metanol. Os resultados (Tabela 8) demonstram que o método utilizado possui robustez devido aos valores de CV não ultrapassarem o valor de 5% e os valores de exatidão se manterem na faixa entre 97-103%, os quais estão em conforme com os preconizados pela ANVISA e pela FDA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

Tabela 8 – Valores da robustez do método espectrofotométrico validado.

Modificação		Média das absorbâncias ± DP	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
pH da solução	Etanol:água (80:20) pH 5,00	0,881 ± 0,0001	8	8,1703	0,0114	102,13
	Composição Metanol:água (80:20)	0,8840 ± 0,0003	8	8,1962	0,0285	102,45

Fonte: dados da pesquisa.

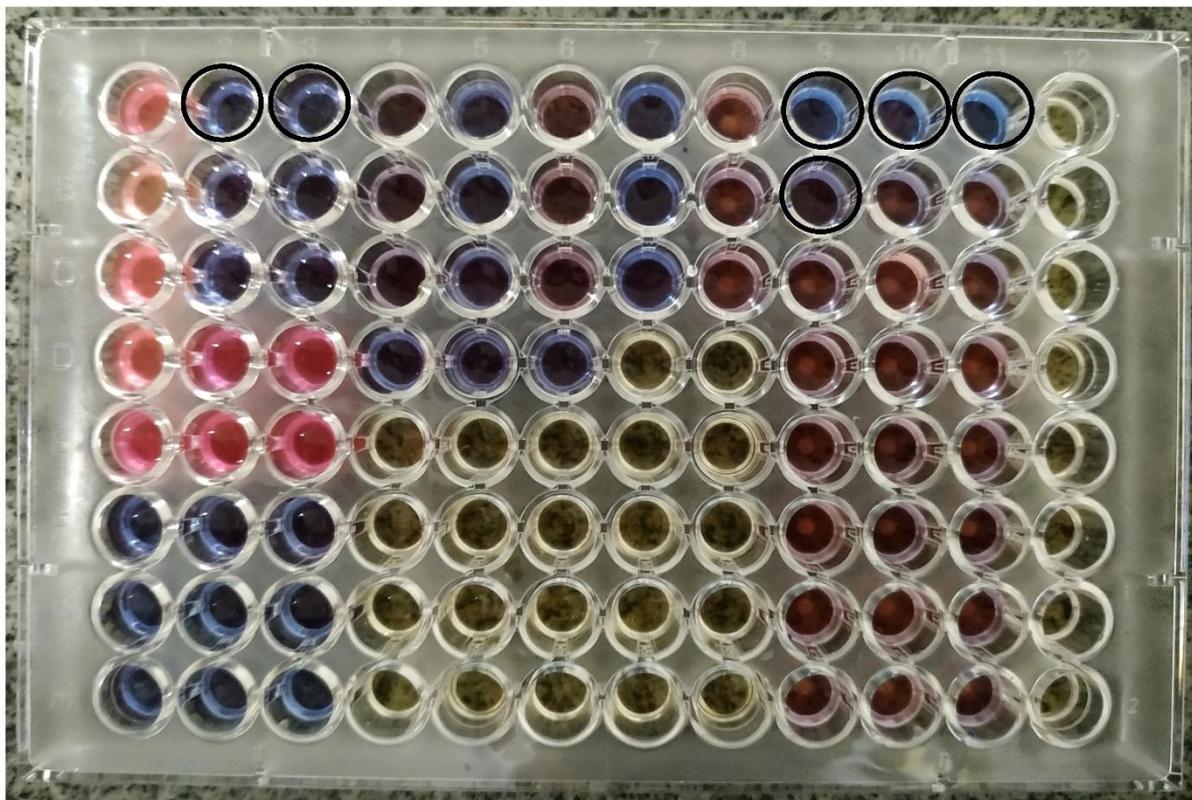
Legenda: DP (desvio padrão) e CV (coeficiente de variação).

5.10 Determinação da atividade antifúngica

Apesar dos fungos serem comumente indetectáveis em estudos de microbiomas de ferimentos, a determinação da atividade antifúngica de formulações curativas é importante devido aos fungos serem considerados agentes subestimados de complicações em ferimentos. Dentre esses, a *C. albicans* corresponde a 46% achados em ferimentos com crescimento fúngico positivo, de acordo com o estudo de Kalan e Grice (2018).

Os resultados da microdiluição em caldo (Figura 24) demonstraram cinco amostras com ausência aparente de crescimento (sem modificação da coloração da resazurina) além do controle positivo, as duas primeiras diluições da AgSD, as primeiras diluições de AgSD+JR19 e JR19, e os filmes F2 e F3. Essas amostras foram plaqueadas em ágar Sabouraud para avaliação do crescimento.

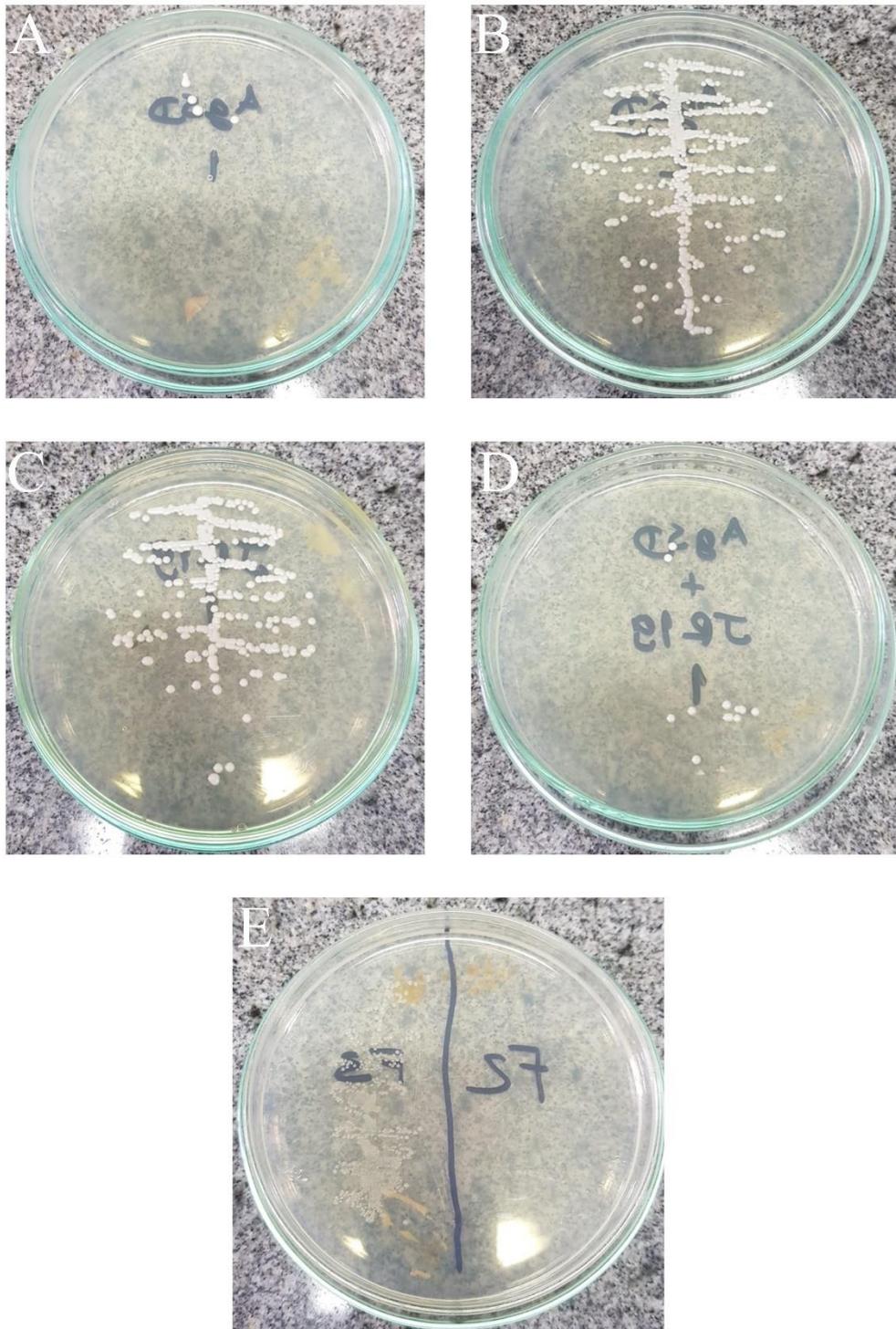
Figura 24 – Microplaca de 96 poços revelada com resazurina 0,01% com destaque para as cinco amostras sem crescimento aparente (círculos pretos).



Fonte: dados da pesquisa.

O plaqueamento das amostras em ágar Sabouraud (Figura 25) apresentou resultados distintos. A primeira diluição da AgSD (20 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 25, A) apresentou crescimento de poucas colônias, a qual nessa concentração pode ser classificada como fungicida. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Kalinowska-Lis et al. (2015) e Stryjska et al. (2021), os quais descrevem valores de CFM da AgSD frente a *C. albicans* de 19,99 $\mu\text{g/mL}$ e 15,60 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 25 – Plaqueamento das amostras em ágar Sabouraud (A = AgSD (20 µg/mL); B = AgSD (10 µg/mL); C = JR19 (20 µg/mL); D = AgSD+JR19 (20 µg/mL); E = F2 e F3).



Fonte: dados da pesquisa.

A atividade antifúngica desse agente está relacionada, assim como nas bactérias, com interações do Ag^+ com a parede celular fúngica em estruturas como proteínas, o que pode

ocasionar rápido efluxo de íons, como o potássio, com promoção de um distúrbio hidroeletrolítico na célula microbiana (HECEL et al., 2019). Wells et al. (1995) descreveu em seu estudo que a AgSD é responsável pela inativação irreversível da enzima fosfomanose isomerase, essencial na biossíntese da parede celular em fungos, em *C. albicans*, além da identificação do local de ligação da AgSD com a enzima em um resíduo de cisteína na posição 150.

A segunda diluição da AgSD (10 µg/mL) (Figura 25, B), por sua vez, não apresentou influência no crescimento fúngico, mesmo resultado apresentado pela JR19 (20 µg/mL) (Figura 25, C). A amostra AgSD+JR19 (20 µg/mL) (Figura 25, D) apresentou leve comprometimento da atividade antifúngica da AgSD na presença da JR19. Este fato pode estar relacionado com a interação do Ag⁺ em solução com grupos carregados negativamente na molécula da JR19, tais como a carbonila da subunidade *N*-acilidrazona, visto que, como explicado anteriormente, essa espécie iônica tem importante papel na atividade antifúngica da AgSD.

Os dois filmes apresentaram atividades distintas (Figura 25, E), o F3 não apresentou influência no crescimento enquanto o F2 promoveu inibição do crescimento. Esse último achado provavelmente está relacionado com dois fatores, a presença da QTS e, principalmente, a maior quantidade de JR19 em relação ao filme F3 (8,6 vezes maior). A JR19 contém na sua estrutura dois grupamentos que são correlacionados com atividades fúngicas, o grupo indol e a subunidade *N*-acilidrazona (KAUR et al., 2018; KLENC et al., 2009; LAZZARINI et al., 2018), o que poderia justificar a sua influência na inibição do crescimento da *C. albicans* na amostra F2, além de sua concentração.

Além disso, essa atividade da JR19 pode ter sido potencializada pela presença da QTS, uma vez que estudos relatam atividade desse biopolímero contra fungos, inclusive contra a *C. albicans*, por vários mecanismos, tais como interação com componentes carregados negativamente na parede e membrana celulares (ex. fosfolipídeos), inibição de complexos de expressão gênica (ex. Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferase (SAGA)) e inibição da síntese de material genético (LOPEZ-MOYA; SUAREZ-FERNANDEZ; LOPEZ-LLORCA, 2019; SHIH et al., 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017).

6. CONCLUSÕES

- Os filmes foram desenvolvidos com sucesso pela técnica de evaporação de solvente com incorporação da AgSD e JR19 e formação de uma dispersão desses fármacos no filme;
- A taxa de hemólise média dos filmes está de acordo com o especificado na ISO 10993, apesar do aumento significativo desse parâmetro na presença dos fármacos;
- A microscopia óptica confirmou a característica de dispersão dos fármacos nos filmes a partir da presença dos cristais desses, além da influência da matriz polimérica no tamanho dos cristais;
- A análise microestrutural revelou influências dos cristais dos fármacos no parâmetro de rugosidade média de superfície dos filmes;
- Os filmes apresentaram valores de TTVA semelhantes aos relatados na literatura com influência não significativa da AgSD e JR19 nesse parâmetro;
- O ensaio de fotoestabilidade confirmou a característica fotossensível da AgSD e a necessidade do uso de embalagens primárias com propriedades de barreira contra a luz solar nos filmes F2 e F3;
- A presença de uma maior quantidade de JR19 nos filmes F2 causou redução da resistência dobrável do filme F2 em relação aos F1 e F3;
- A espectroscopia na região do infravermelho revelou ausência de incompatibilidade química entre os componentes.
- O método analítico para quantificação da JR19 nos filmes por espectrofotometria UV-Vis se revelou seletivo, linear, preciso, exato e robusto;
- O filme F2 apresentou boa atividade antifúngica com inibição do crescimento de *C. albicans*;
- Os resultados demonstram a potencialidade dos filmes como uma formulação curativa e que pode representar uma nova proposta terapêutica. No entanto, alguns ensaios como a determinação da atividade antibacteriana e o perfil de liberação *in vitro* dos fármacos presentes na formulação são necessários para confirmar esse potencial.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar a validação de um método analítico de quantificação da AgSD presente nos filmes por espectrofotometria de fluorescência com posterior realização do ensaio de liberação *in vitro* dos fármacos da formulação;
- Determinar a atividade antimicrobiana da formulação frente a bactérias comuns em ferimentos cutâneos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

AARJANE, Mohammed; AOUIDATE, Adnane; SLASSI, Siham; AMINE, Amina. Synthesis, antibacterial evaluation, in silico ADMET and molecular docking studies of new N-acylhydrazone derivatives from acridone. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 6236–6245, 2020.

ABDO, Joseph M.; SOPKO, Nikolai A.; MILNER, Stephen M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. **Wound Medicine**, [S. l.], v. 28, n. January, 2020.

ABEDI, Ali; BAKHSHANDEH, Behnaz; BABAIE, Ali; MOHAMMADNEJAD, Javad; VAHDAT, Sadaf; MOMBEINY, Reza; MOOSAVI, Seyed Reza; AMINI, Javid; TAYEBI, Lobat. Concurrent application of conductive biopolymeric chitosan/ polyvinyl alcohol/ MWCNTs nanofibers, intracellular signaling manipulating molecules and electrical stimulation for more effective cardiac tissue engineering. **Materials Chemistry and Physics**, [S. l.], v. 258, n. July 2020, 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 166/2017. . 2017.

AHMAD, Awais et al. Recent advancement and development of chitin and chitosan-based nanocomposite for drug delivery: Critical approach to clinical research. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. l.], 2020.

AHMAD RAUS, Raha; WAN NAWAWI, Wan Mohd Fazli; NASARUDDIN, Ricca Rahman. Alginate and Alginate Composites for Biomedical Applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], 2020.

AHMADIAN, Shahram; GHORBANI, Marjan; MAHMOODZADEH, Farideh. Silver sulfadiazine-loaded electrospun ethyl cellulose / polylactic acid / collagen nano fibrous mats with antibacterial properties for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 162, p. 1555–1565, 2020.

AJITHA, B.; KUMAR REDDY, Y. Ashok; REDDY, P. Sreedhara; JEON, Hwan Jin; AHN, Chi Won. Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor. **RSC Advances**, [S. l.], v. 6, n. 42, p. 36171–36179, 2016.

ALIPOUR, Reza; KHORSHIDI, Alireza; SHOJAEI, Abdollah Fallah; MASHAYEKHI, Farhad; MOGHADDAM, Mohammad Javad Mehdipour. Silver Sulfadiazine-loaded PVA/CMC Nanofibers for the Treatment of Wounds Caused by Excision. **Fibers and Polymers**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 2461–2469, 2019.

ALTOÉ, Luciana Schulthais; ALVES, Raul Santos; SARANDY, Mariáurea Matias; MORAIS-SANTOS, Mônica; NOVAES, Rômulo Dias; GONÇALVES, Reggiani Vilela. Does antibiotic use accelerate or retard cutaneous repair? A systematic review in animal models. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 1–22, 2019.

AMALRAJ, Augustine; JUDE, Shintu; GOPI, Sreeraj. Polymer blends, composites and nanocomposites from chitin and chitosan; manufacturing, characterization and applications.

In: Handbook of Chitin and Chitosan. [s.l: s.n.]. p. 1–46.

AMARAL, Antônia Tavares; ANDRADE, Carolina Horta; KÜMMERLE, Arthur E.; GUIDO, Rafael V. C. A evolução da química medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da sociedade brasileira de química. **Química Nova**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 694–700, 2017.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. E96: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials 1995. p. 1–8.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. F756-17: Standard Practice For Assessment Of Hemolytic Properties Of Materials. 2017.

AMIRI, Sahar; NALBANDI, Bahareh. Improve Solubility and Bioavailability of Silver Sulfadiazine via Formation of Inclusion Complex by Cyclodextrin. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 1764–1774, 2018.

AMISTEN, Stefan; NEVILLE, Matt; HAWKES, Ross; PERSAUD, Shanta J.; KARPE, Fredrik; SALEHI, Albert. An atlas of G-protein coupled receptor expression and function in human subcutaneous adipose tissue. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 146, p. 61–93, 2015.

APOLINÁRIO, Nadjaele de Melo. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilidrazônicos**. 2016. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

ARAKAWA, H.; NEAULT, J. F.; TAJMIR-RIahi, H. A. Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 1580–1587, 2001.

ARAMWIT, P. Introduction to biomaterials for wound healing. *In: Wound Healing Biomaterials*. [s.l: s.n.]. v. 2p. 3–38.

ATIYEH, Bishara S.; COSTAGLIOLA, Michel; HAYEK, Shady N.; DIBO, Saad A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 139–148, 2007.

AYCAN, Didem; YAYLA, Neslihan Alemdar; AYDIN, Yasar Andelib. Chitosan polyvinyl alcohol blend films for ibuprofen encapsulation: Fabrication, characterization and kinetics. **Polymer Degradation and Stability**, [S. l.], v. 181, 2020.

BAERTSCHI, Steven W.; CLAPHAM, David; FOTI, Chris; KLEINMAN, Mark H.; KRISTENSEN, Solveig; REED, Robert A.; TEMPLETON, Allen C.; TØNNESEN, Hanne Hjorth. Implications of In-Use Photostability: Proposed Guidance for Photostability Testing and Labeling to Support the Administration of Photosensitive Pharmaceutical Products, Part 2: Topical Drug Product. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 104, n. 9, p. 2688–2701, 2015.

BALAJI, A.; JAGANATHAN, S. K.; VELLAYAPPAN, M. V.; JOHN, A. A.; SUBRAMANIAN, A. P.; SELVAKUMAR, M.; MOHANDAS, H.; SUNDAR RAJ, M.;

SUPRIYANTO, Eko. Prospects of common biomolecules as coating substances for polymeric biomaterials. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, n. 85, p. 69660–69679, 2015.

BALAJI, Arunpandian; JAGANATHAN, Saravana Kumar; ISMAIL, Ahmad Fauzi; RAJASEKAR, Rathanasamy. Fabrication and hemocompatibility assessment of novel polyurethane-based bio-nanofibrous dressing loaded with honey and Carica papaya extract for the management of burn injuries. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 11, p. 4339–4355, 2016.

BARKER, Thomas H. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. **Biomaterials**, [S. l.], v. 32, n. 18, p. 4211–4214, 2011.

BELVEDERE, Raffaella; PESSOLANO, Emanuela; PORTA, Amalia; TOSCO, Alessandra; PARENTE, Luca; PETRELLA, Francesco; PERRETTI, Mauro; PETRELLA, Antonello. Mesoglycan induces the secretion of microvesicles by keratinocytes able to activate human fibroblasts and endothelial cells: A novel mechanism in skin wound healing. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 869, n. October 2019, p. 1–10, 2020.

BERGMANN, Carlos P.; STUMPF, Aisha. Dental ceramics: Microstructure, properties and degradation. **Dental Ceramics: Microstructure, Properties and Degradation**, [S. l.], p. 1–84, 2013.

BIANCHERA, Annalisa; CATANZANO, Ovidio; BOATENG, Joshua; ELVIRI, Lisa. The Place of Biomaterials in Wound Healing. *In: Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications*. [s.l.: s.n.]. p. 337–366.

BLOEMEN, Monica C. T.; VAN GERVEN, Maaïke S.; VAN DER WAL, Martijn B. A.; VERHAEGEN, Pauline D. H. M.; MIDDELKOOP, Esther. An objective device for measuring surface roughness of skin and scars. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 64, n. 4, p. 706–715, 2011.

BOURAKADI, Khadija El; MERGHOUB, Nawal; FARDIOUI, Meriem; MEKHZOUM, Mohamed El Mehdi; KADMIRI, Issam Meftah; ESSASSI, El Mokhtar; QAISS, Abou el Kacem; BOUHFI, Rachid. Chitosan/polyvinyl alcohol/thiabendazole-montmorillonite bio-nanocomposite films: Mechanical, morphological and antimicrobial properties. **Composites Part B: Engineering**, [S. l.], v. 172, n. May, p. 103–110, 2019.

BRANCA, C.; D'ANGELO, G.; CRUPI, C.; KHOUZAMI, K.; RIFICI, S.; RUELLO, G.; WANDERLINGH, U. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. **Polymer**, [S. l.], v. 99, p. 614–622, 2016.

BROUGHTON, George; JANIS, Jeffrey E.; ATTINGER, Christopher E. A brief history of wound care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [S. l.], v. 117, n. 7 SUPPL., p. 6–11, 2006.

BROWN, Tomas M.; KRISHNAMURTHY, Karthik. **Histology, Dermis**. 2020.

BURITI, Josué da Silva; BARRETO, Maria Eduarda Vasconcelos; SANTOS, Kleilton Oliveira; FOOK, Marcus Vinicius Lia. Thermal, morphological, spectroscopic and biological study of chitosan, hydroxyapatite and wollastonite biocomposites. **Journal of Thermal**

Analysis and Calorimetry, [*S. l.*], v. 134, n. 3, p. 1521–1530, 2018.

CERQUEIRA, Jéssica Vieira et al. Anti-inflammatory activity of SintMed65, an N-acylhydrazone derivative, in a mouse model of allergic airway inflammation. **International Immunopharmacology**, [*S. l.*], v. 75, n. July, 2019.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, [*S. l.*], v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008.

CHETOUANI, Asma; ELKOLLI, Meriem; BOUNEKHEL, Mahmoud; BENACHOUR, Djafer. Chitosan/oxidized pectin/PVA blend film: mechanical and biological properties. **Polymer Bulletin**, [*S. l.*], v. 74, n. 10, p. 4297–4310, 2017.

CHIN, Jiah Shin; MADDEN, Leigh; CHEW, Sing Yian; BECKER, David L. Drug therapies and delivery mechanisms to treat perturbed skin wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [*S. l.*], v. 149–150, p. 2–18, 2019.

CHOO, K. W.; CHING, Y. C.; CHUAH, C. H. Physicochemical & barrier properties of polyvinyl alcohol/chitosan/TEMPO-oxidized cellulose nanofibers composite films. **Journal of Polymer Materials**, [*S. l.*], v. 34, n. 1, p. 223–233, 2017.

COIMBRA, Elaine Soares; NORA DE SOUZA, Marcus Vinícius; TERROR, Mariana Sequetto; PINHEIRO, Alessandra Campbell; DA TRINDADE GRANATO, Juliana. Synthesis, biological activity, and mechanism of action of new 2-pyrimidinyl hydrazone and N-acylhydrazone derivatives, a potent and new classes of antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*S. l.*], v. 184, p. 1–11, 2019.

CORDEIRO, Natalia de Moraes; FREITAS, Rosana H. C. N.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour; FERNANDES, Patricia Dias. New 2-amino-pyridinyl-N-acylhydrazones: Synthesis and identification of their mechanism of anti-inflammatory action. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [*S. l.*], v. 123, n. December 2019, 2020.

COSTA, E. M.; SILVA, S.; PINA, C.; TAVARIA, F. K.; PINTADO, M. M. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. **Anaerobe**, [*S. l.*], v. 18, n. 3, p. 305–309, 2012.

CURY, Nathália Moreno et al. Structural Basis of Colchicine-Site targeting Acylhydrazones active against Multidrug-Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia. **iScience**, [*S. l.*], v. 21, p. 95–109, 2019.

CUSSLER, E. L.; HUGHES, Stephanie E.; WARD, William J.; ARIS, Rutherford. Barrier membranes. **Journal of Membrane Science**, [*S. l.*], v. 38, p. 161–174, 1988.

DASCALU, Anca Elena; GHINET, Alina; LIPKA, Emmanuelle; FURMAN, Christophe; RIGO, Benoît; FAYEULLE, Antoine; BILLAMBOZ, Muriel. Design, synthesis and evaluation of hydrazine and acyl hydrazone derivatives of 5-pyrrolidin-2-one as antifungal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [*S. l.*], v. 30, n. 13, p. 28–31, 2020.

DAUNTON, C.; KOTHARI, S.; SMITH, L.; STEELE, D. A history of materials and practices for wound management. **Wound Practice & Research: Journal of the Australian**

Wound Management Association, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 174–176, 2012.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. **DATASUS**. 2020.

DESMOULIERE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 146, n. 1, p. 56–66, 1995.

DEVI, Nirmla; DUTTA, Joydeep. International Journal of Biological Macromolecules Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 104, p. 1897–1904, 2017.

DHIVYA, Selvaraj; PADMA, Viswanadha Vijaya; SANTHINI, Elango. Wound dressings - A review. **BioMedicine (Netherlands)**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 24–28, 2015.

DIEGEL, Kelly L.; DANILENKO, Dimitry M.; WOJCINSKI, Zbigniew W. **The Integumentary System**. [s.l.: s.n.].

DIEGELMANN, Robert F.; EVANS, Melissa C. Departments of Biochemistry, Anatomy, Emergency Medicine and Virginia Commonwealth University, Richmond Virginia. **Frontiers in Bioscience**, [S. l.], n. 4, p. 283–289, 2004.

DÍEZ-PASCUAL, Ana M.; DÍEZ-VICENTE, Angel L. Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 2631–2644, 2015.

DRAGOSTIN, Ana Maria et al. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 141, p. 28–40, 2016.

DUARTE, Sâmia Sousa; MOURA, Ricardo Olímpio De; SILVA, Patricia Mirella Da. Effect of antiprotozoal molecules on hypnospores of Perkinsus spp. parasite. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 192, n. March 2016, p. 25–35, 2018.

ECKES, Beate; NISCHT, Roswitha; KRIEG, Thomas. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. **Fibrogenesis and Tissue Repair**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–11, 2010.

ECKHARDT, Sonja; BRUNETTO, Priscilla S.; GAGNON, Jacinthe; PRIEBE, Magdalena; GIESE, Bernd; FROMM, Katharina M. Nanobio silver: Its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 113, n. 7, p. 4708–4754, 2013.

EL-ALEEM, Seham A. Abd; MOHAMMED, Hanaa Hassanein; SABER, Entesar Ali; EMBABY, Azza S.; DJOUHRI, Laiche. Mutual inter-regulation between iNOS and TGF- β 1: Possible molecular and cellular mechanisms of iNOS in wound healing. **BBA - Molecular Basis of Disease**, [S. l.], v. 1866, n. May, 2020.

EL-FEKY, Gina S.; EL-BANNA, Sally T.; EL-BAHY, G. S.; ABDELRAZEK, E. M.; KAMAL, Mustafa. Alginate coated chitosan nanogel for the controlled topical delivery of

Silver sulfadiazine. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 177, n. January, p. 194–202, 2017. a.

EL-FEKY, Gina S.; SHARAF, Samar S.; EL SHAFEI, Amira; HEGAZY, Aisha A. Using chitosan nanoparticles as drug carriers for the development of a silver sulfadiazine wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 158, p. 11–19, 2017. b.

EMING, Sabine A.; MARTIN, Paul; TOMIC-CANIC, Marjana. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 265, 2014.

FACCI, Julia; DINIZ, Luan F.; REIS, Naialy F. A.; FERNANDES, Christian. Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. **Química Nova**, [S. l.], v. 43, n. 7, p. 959–973, 2020.

FAISUL ARIS, Fathin Amila; MOHD FAUZI, Fatin Nur Ain; TONG, Woei Yenn; SYED ABDULLAH, Sharifah Sopliah. Interaction of silver sulfadiazine with bacterial cellulose via ex-situ modification method as an alternative diabetic wound healing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 21, n. August, p. 4–10, 2019.

FAJARDO, André R.; LOPES, Laís C.; CALEARE, Angelo O.; BRITTA, Elizandra A.; NAKAMURA, Celso V.; RUBIRA, Adley F.; MUNIZ, Edvani C. Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 588–595, 2013.

FAYAZ, Amanulla Mohammed; BALAJI, Kulandaivelu; GIRILAL, Morukattu; YADAV, Ruchi; KALAICHELVAN, Pudupalayam Thangavelu; VENKETESAN, Ramasamy. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 103–109, 2010.

FELCIYA, Sekar Jeyakumar Grace; DEVI, Mohan Vimala; RAMANATHAN, Giriprasath; POORNIMA, Velswamy; SIVAGNANAM, Uma Tiruchirapalli. Fabrication of polyhydroxy butyric acid–Gelatin blended nanofibrous matrix integrated with silver sulfadiazine as an alternate wound dressing for treating burns. **Materials Letters**, [S. l.], v. 282, p. 10–13, 2021.

FELGUEIRAS, Helena P.; AMORIM, M. Teresa P. Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 156, p. 133–148, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Methods, Method Verification and Validation. . 2020, p. 32.

FORREST, R. D. Early history of wound treatment. **Journal of the Royal Society of Medicine**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 198–205, 1982.

FORTNER, Patricia A. Review of Burn Treatment: Early Care to Current Practices. *In: Perioperative Nursing Clinics*. [s.l: s.n.]. v. 7p. 1–8.

FOX, C. L.; MODAK, S. M. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 582–588, 1974.

GALVÁN MÁRQUEZ, Imelda; AKUAKU, Jones; CRUZ, Isabel; CHEETHAM, James; GOLSHANI, Ashkan; SMITH, Myron L. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 164, n. 1, p. 108–112, 2013.

GAO, Daqian; ZHOU, Xinqin; GAO, Zhen Hua; SHI, Xincui; WANG, Zongliang; WANG, Yu; ZHANG, Peibiao. Preparation and characterization of silver sulfadiazine loaded polyvinyl alcohol hydrogels as an antibacterial wound dressing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 9, p. 2377–2384, 2018.

GIL, Viviane S. Brey; GIL, Camila S. Brey; GOULART, Gisele Assis Castro; ORÉFICE, Rodrigo L. Multi-drug hybrid delivery systems with distinct release profiles based on gelatin/collagen containing vesicles derived from block copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 139, p. 967–974, 2019.

GILABERTE, Yolanda; PRIETO-TORRES, Lucia; PASTUSHENKO, Ievgenia; JUARRANZ, Ángeles. Anatomy and Function of the Skin. In: **Nanoscience in Dermatology**. [s.l: s.n.]. p. 1–14.

GOY, Rejane C.; DE BRITTO, Douglas; ASSIS, Odilio B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polimeros**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.

GUPTA, Bhupender S.; EDWARDS, J. Vincent. Textile materials and structures for wound care products. In: **Advanced Textiles for Wound Care: A Volume in Woodhead Publishing Series in Textiles**. [s.l: s.n.]. p. 48–96.

HAJJI, Sawssen; CHAKER, Achraf; JRIDI, Mourad; MAALEJ, Hana; JELLOULI, Kemel; BOUFI, Sami; NASRI, Moncef. Structural analysis, and antioxidant and antibacterial properties of chitosan-poly (vinyl alcohol) biodegradable films. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 23, n. 15, p. 15310–15320, 2016.

HASIRCI, Vasif; HASIRCI, Nesrin. **Fundamentals of biomaterials**. [s.l: s.n.].

HASSAN, Mohamed A.; OMER, Ahmed M.; ABBAS, Eman; BASET, Walid M. A.; TAMER, Tamer M. Preparation, physicochemical characterization and antimicrobial activities of novel two phenolic chitosan Schiff base derivatives. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

HAYDONT, Valérie; BERNARD, Bruno A.; FORTUNEL, Nicolas O. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. **Mechanisms of Ageing and Development**, [S. l.], v. 177, n. February 2018, p. 150–156, 2019.

HE, Zeqiang; XIONG, Lizhi. Evaluation of physical and biological properties of polyvinyl alcohol/chitosan blend films. **Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics**, [S. l.], v. 51, n. 9, p. 1705–1714, 2012.

HECEL, Aleksandra; KOLKOWSKA, Paulina; KRZYWOSZYNSKA, Karolina; SZEBESCZYK, Agnieszka; ROWINSKA-ZYREK, Magdalena; KOZLOWSKI, Henryk. Ag+ Complexes as Potential Therapeutic Agents in Medicine and Pharmacy. **Current**

Medicinal Chemistry, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 624–647, 2019.

HEO, Soon Chul; JEON, Eun Su; LEE, Il Hwan; KIM, Hoon Soo; KIM, Moon Bum; KIM, Jae Ho. Tumor necrosis factor- α -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 131, n. 7, p. 1559–1567, 2011.

HERNÁNDEZ, Paola et al. Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 2158–2171, 2012.

HEYNEMAN, A.; HOEKSEMA, H.; VANDEKERCKHOVE, D.; PIRAYESH, A.; MONSTREY, S. The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. **Burns**, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 1377–1386, 2016.

HIREMANI, Vishram D.; GASTI, Tilak; SATARADDI, Sarala; VANJERI, Vinayak N.; GOUDAR, Naganagouda; MASTI, Saraswati P.; CHOUGALE, Ravindra B. Characterization of Mechanical and Thermal Properties of Glycerol Mixed Oxidized Maize Starch/Polyvinyl alcohol Blend Films. **Chemical Data Collections**, [S. l.], v. 28, 2020.

HORST, Britt Ter; MOIEMEN, Naiem S.; GROVER, Liam M. **Natural polymers: biomaterials for skin scaffolds**. [s.l.: s.n.].

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

JATOI, Abdul Wahab; KIM, Ick Soo; NI, Qing Qing. Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO₂ nanoparticles for long term excellent antibacterial applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 207, n. December 2018, p. 640–649, 2019.

JATOI, Abdul Wahab; OGASAWARA, Hiroshi; KIM, Ick Soo; NI, Qing Qing. Polyvinyl alcohol nanofiber based three phase wound dressings for sustained wound healing applications. **Materials Letters**, [S. l.], v. 241, p. 168–171, 2019.

JONES, Menna Lloyd. A short history of the development of wound care dressings. **British Journal of Healthcare Assistants**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 482–485, 2015.

JULINOVÁ, Markéta; VAŇHAROVÁ, Ludmila; JURČA, Martin. Water-soluble polymeric xenobiotics – Polyvinyl alcohol and polyvinylpyrrolidone – And potential solutions to environmental issues: A brief review. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 228, n. April, p. 213–222, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. [s.l.: s.n.]. v. 13
KABASHIMA, Kenji; HONDA, Tetsuya; GINHOUX, Florent; EGAWA, Gyohei. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 19–30, 2019.

KALAN, Lindsay; GRICE, Elizabeth A. Fungi in the wound microbiome. **Advances in Wound Care**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 247–255, 2018.

KALINOWSKA-LIS, Urszula; FELCZAK, Aleksandra; CHECIŃSKA, Lilianna; ZAWADZKA, Katarzyna; PATYNA, Emilia; LISOWSKA, Katarzyna; OCHOCKI, Justyn. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water-soluble silver(I) complexes of metronidazole drug and selected counter-ions. **Dalton Transactions**, [*S. l.*], v. 44, n. 17, p. 8178–8189, 2015.

KAMOUN, Elbadawy A.; CHEN, Xin; ELDIN, Mohamed S. Mohy; KENAWY, El-refaie S. Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications : A. **Arabian Journal of Chemistry**, [*S. l.*], n. January, p. 1–14, 2014.

KAUR, Jaskirat; UTREJA, Divya; EKTA; JAIN, Nisha; SHARMA, Shivali. Recent Developments in the Synthesis and Antimicrobial Activity of Indole and its Derivatives. **Current Organic Synthesis**, [*S. l.*], v. 16, n. 1, p. 17–37, 2018.

KHADKA, Prabhat; HAQUE, Mohammad; KRISHNAMURTHI, Venkata Rao; NIYONSHUTI, Isabelle; CHEN, Jingyi; WANG, Yong. Quantitative investigations reveal new antimicrobial mechanism of silver nanoparticles and ions. **Biophysical Journal**, [*S. l.*], v. 114, n. 3, p. 690, 2018.

KHADKA, Prakash; RO, Jieun; KIM, Hyeongmin; KIM, Iksoo; KIM, Jeong Tae; KIM, Hyunil; CHO, Jae Min; YUN, Gyiae; LEE, Jaehwi. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 9, n. 6, p. 304–316, 2014.

KHAN, Muhammad Qamar; KHARAGHANI, Davood; SANAULLAH; SHAHZAD, Amir; SAITO, Y.; YAMAMOTO, T.; OGASAWARA, Hiroshi; KIM, Ick Soo. Fabrication of antibacterial electrospun cellulose acetate/ silver-sulfadiazine nanofibers composites for wound dressings applications. **Polymer Testing**, [*S. l.*], v. 74, n. October 2018, p. 39–44, 2019.

KHORASANI, Mohammad Taghi; JOORABLOO, Alireza; MOGHADDAM, Armaghan; SHAMSI, Hamidreza; MANSOORIMOGHADAM, Zohreh. Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 114, p. 1203–1215, 2018.

KIM, Hye Sung; SUN, Xiaoyan; LEE, Jung Hwan; KIM, Hae Won; FU, Xiaobing; LEONG, Kam W. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [*S. l.*], v. 146, p. 209–239, 2019.

KLASEN, H. J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. **Burns**, [*S. l.*], v. 26, n. 2, p. 117–130, 2000. a.

KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, [*S. l.*], v. 26, n. 2, p. 131–138, 2000. b.

KLEINMAN, Mark H. Using photoreactivity studies to provide insight into the photosafety of pharmaceutical therapies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [*S. l.*], v. 49, p. 100–107, 2013.

KLENC, Jeffrey; RAUX, Elizabeth; BARNES, Samuel; SULLIVAN, Shannon; DUSZYNSKA, Beata; BOJARSKI, Andrzej J.; STREKOWSKI, Lucjan. Synthesis of 4-Substituted 2- (4-Methylpiperazino) pyrimidines and Quinazoline Analogs as Serotonin 5-HT 2A Receptor Ligands. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. November, p. 1259–1265, 2009.

KOCAAGA, Banu; KURKCUOGLU, Ozge; TATLIER, Melkon; BATIREL, Saime; GUNER, F. Seniha. Low-methoxyl pectin–zeolite hydrogels controlling drug release promote in vitro wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 136, n. 24, p. 1–16, 2019.

KOHLI, Nupur; SHARMA, Vaibhav; BROWN, Stuart J.; GARCÍA-GARETA, Elena. Synthetic polymers for skin biomaterials. **Biomaterials for Skin Repair and Regeneration**, [S. l.], p. 125–149, 2019.

KUNKELY, Horst; VOGLER, Arnd. Photoproperties of silver sulfadiazine. **Inorganic Chemistry Communications**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 226–228, 2007.

KWIECIEN, Kamila et al. Architecture of antimicrobial skin defense. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [S. l.], v. 49, n. August, p. 70–84, 2019.

LAI-CHEONG, Joey E.; MCGRATH, John A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (United Kingdom)**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 347–351, 2017.

LAZZARINI, Cristina et al. Acylhydrazones as antifungal agents targeting the synthesis of fungal sphingolipids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 5, p. 1–14, 2018.

LEE, Ae-Ri Cho. **Effect of Silver sulfadiazine on the Skin Cell Proliferation and Wound Healing Process in Hairless Mouse 2nd degree Burn Model** **Journal of Korean Pharmaceutical Sciences**, 2002.

LEE, Ae Ri Cho; LEEM, Hyunju; LEE, Jaegwan; PARK, Kyung Chan. Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor. **Biomaterials**, [S. l.], v. 26, n. 22, p. 4670–4676, 2005.

LI, Jianhui; ZHUANG, Shaoling. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 138, n. July, 2020.

LI, Xin yang; LI, Shuai; LU, Guo qing; WANG, De pu; LIU, Kai li; QIAN, Xin hua; XUE, Wen han; MENG, Fan hao. Design, synthesis and biological evaluation of novel (E)-N-phenyl-4-(pyridine-acylhydrazone) benzamide derivatives as potential antitumor agents for the treatment of multiple myeloma (MM). **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 103, n. July, 2020.

LOPEZ-MOYA, Federico; SUAREZ-FERNANDEZ, Marta; LOPEZ-LLORCA, Luis Vicente. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 2, 2019.

LOSQUADRO, William D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [S. l.], v. 25, p. 283–289, 2017.

LUO, Chunhui; ZHAO, Yufei; SUN, Xinxin; HU, Bin. Developing high strength, antiseptic and swelling-resistant polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for tissue engineering material. **Materials Letters**, [S. l.], v. 280, p. 1–5, 2020. a.

LUO, Ting et al. Co-delivery of superfine nano-silver and solubilized sulfadiazine for enhanced antibacterial functions. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 584, n. February, 2020. b.

LYU, Fengjiao; BLAUCH, Lucas R.; TANG, Sindy K. Y. Quantifying phenotypes in single cells using droplet microfluidics. In: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] : Academic Press Inc., 2018. v. 148p. 133–159.

MA, Rongxiu et al. Nanocomposite sponges of sodium alginate/graphene oxide/polyvinyl alcohol as potential wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. **Composites Part B: Engineering**, [S. l.], v. 167, n. February, p. 396–405, 2019.

MAIA, Rodolfo Do Couto; TESCH, Roberta; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. Acylhydrazone derivatives: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 1161–1170, 2014.

MANIKANDAN, A.; MANI, Mohan Prasath; JAGANATHAN, Saravana Kumar; RAJASEKAR, R.; JAGANNATH, M. Formation of functional nanofibrous electrospun polyurethane and murivenna oil with improved haemocompatibility for wound healing. **Polymer Testing**, [S. l.], v. 61, p. 106–113, 2017.

MARGOLIS, David J. Epidemiology of Wounds. In: **Measurements in Wound Healing**. [s.l.: s.n.]. p. 145–153.

MARRA, Roberta K. F.; KÜMMERLE, Arthur E.; GUEDES, Guilherme P.; BARROS, Caroline de S.; GOMES, Rafaela S. P.; CIRNE-SANTOS, Claudio C.; PAIXÃO, Izabel Christina N. P.; NEVES, Amanda P. Quinolone-N-acylhydrazone hybrids as potent Zika and Chikungunya virus inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 30, n. 2, 2020.

MARTINENGO, Laura; OLSSON, Maja; BAJPAI, Ram; SOLJAK, Michael; UPTON, Zee; SCHMIDTCHEN, Artur; CAR, Josip; JÄRBRINK, Krister. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Annals of Epidemiology**, [S. l.], v. 29, p. 8–15, 2019.

MASSARELLI, E.; SILVA, D.; PIMENTA, A. F. R.; FERNANDES, A. I.; MATA, J. L. G.; ARMÊS, H.; SALEMA-OOM, M.; SARAMAGO, B.; SERRO, A. P. Polyvinyl alcohol/chitosan wound dressings loaded with antiseptics. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 593, p. 120110, 2021.

MCGAW, Lyndy J.; ELGORASHI, Esameldin E.; ELOFF, Jacobus N. Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. In: **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2014. p. 181–233.

MEDICINES AND HEALTHCARE PRODUCTS REGULATORY AGENCY. British Pharmacopoeia: Appendix XX. . 1993, p. A214–A22.

MEIRA, Cássio S. et al. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1971–1985, 2018.

MENAZEZA, A. A.; AHMED, M. K. Wound healing activity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol embedded by gold nanoparticles prepared by nanosecond laser ablation. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1217, 2020.

MERLUSCA, Irina Paula; MATIUT, Doina Simona; LISA, Gabriela; SILION, Mihaela; GRADINARU, Luiza; OPREA, Stefan; POPA, Ionel Marcel. Preparation and characterization of chitosan–poly(vinyl alcohol)–neomycin sulfate films. **Polymer Bulletin**, [S. l.], v. 75, n. 9, p. 3971–3986, 2018.

MIKESH, Leann M.; ARAMADHAKA, Lavakumar Reddy; MOSKALUK, Christopher; ZIGRINO, Paola; MAUCH, Cornelia; FOX, Jay W. Proteomic anatomy of human skin. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 84, p. 190–200, 2013.

MIRZAJANI, Fateme; GHASSEMPOUR, Alireza; ALIAHMADI, Atousa; ESMAEILI, Mohammad Ali. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 162, n. 5, p. 542–549, 2011.

MOHAMED, M. A.; JAAFAR, J.; ISMAIL, A. F.; OTHMAN, M. H. D.; RAHMAN, M. A. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *In: Membrane Characterization*. [s.l: s.n.]. p. 3–29.

MOHSENI, Mina; SHAMLOO, Amir; AGHABABAIE, Zahra; AFJOUL, Homa; ABDI, Shabnam; MORAVVEJ, Hamideh; VOSSOUGH, Manouchehr. A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 564, n. November 2018, p. 350–358, 2019.

MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, Krystyna; JAMRÓGIEWICZ, Marzena; ZEBROWSKA, Maria; MIKOLASZEK, Barbara; SZNITOWSKA, Małgorzata. Double layer adhesive silicone dressing as a potential dermal drug delivery film in scar treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 481, n. 1–2, p. 18–26, 2015.

MONTGOMERY, Douglas C.; PECK, Elizabeth A.; VINING, G. Geoffrey. **Introduction to Linear Regression Analysis**. 6. ed. [s.l: s.n.].

MORAES, Ana Daura Travassos de Oliveira et al. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 20, p. 5388–5396, 2018.

MUGITA, Yuko et al. Histopathology of incontinence-associated skin lesions: Inner tissue damage due to invasion of proteolytic enzymes and bacteria in macerated rat skin. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.

NAEIMI, Atena; PAYANDEH, Maryam; GHARA, Abdollah Ramzani; GHADI, Fereshteh Ezzati. In vivo evaluation of the wound healing properties of bio-nanofiber chitosan/polyvinyl alcohol incorporating honey and *Nepeta dschuparensis*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 240, n. April, 2020.

NAGARAJA, Sridevi; WALLQVIST, Anders; REIFMAN, Jaques; MITROPHANOV, Alexander Y. Computational Approach To Characterize Causative Factors and Molecular Indicators of Chronic Wound Inflammation. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 192, n. 4, p. 1824–1834, 2014.

NASERI-NOSAR, Mahdi; ZIORA, Zyta Maria. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 189, n. November 2017, p. 379–398, 2018.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 249–252, 2002.

OPREA, Stefan; OPREA, Veronica. Comparative evaluation of different methods of inclusion of silver into sulfadiazine-based polyurethane urea composites. **Polymer Composites**, [S. l.], v. 38, n. 10, p. 2156–2165, 2017.

PARK, Kyungho; LEE, Sang Eun; SHIN, Kyong Oh; UCHIDA, Yoshikazu. Insights into the role of endoplasmic reticulum stress in skin function and associated diseases. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 286, n. 2, p. 413–425, 2019.

PARK, Seong Cheol; NAH, Jae Woon; PARK, Yoonkyung. PH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. **Macromolecular Research**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 853–860, 2011.

PRABHU, Sukumaran; POULOSE, Eldho K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial. **Int. Nano Lett.**, [S. l.], v. 2, p. 32–41, 2012.

RAFIQUE, Ammara; MAHMOOD ZIA, Khalid; ZUBER, Mohammad; TABASUM, Shazia; REHMAN, Saima. Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 87, p. 141–154, 2016.

RAGONHA, Alessandra Cristina Olhan; FERREIRA, Enéas; ANDRADE, Denise De; ROSSI, Lídia Aparecida. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 514–521, 2005.

RAHMATI, M.; BLAKER, J. J.; LYNGSTADAAS, S. P.; MANO, J. F.; HAUGEN, H. J. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. **Materials Today Advances**, [S. l.], v. 5, 2020.

RARIMA, R.; ASALETHA, R.; UNNIKRISHNAN, G. Schiff base-assisted surface patterning of polylactide–zinc oxide films: generation, characterization and biocompatibility evaluation. **Journal of Materials Science**, [S. l.], v. 53, n. 14, p. 9943–9957, 2018.

RASOOL, Atta; ATA, Sadia; ISLAM, Atif. Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 203, n. March 2018, p. 423–429, 2019.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RHIM, J. W.; WANG, L. F.; HONG, S. I. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 327–335, 2013.

RODGERS, Alison; WATRET, Lynne. Wound care Maceration and its effect on periwound margins. **Supplement to The Diabetic Foot**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 2–5, 2003.

ROSEN, Jamie; LANDRISCINA, Angelo; KUTNER, Allison; ADLER, Brandon L.; KRAUSZ, Aimee E.; NOSANCHUK, Joshua D.; FRIEDMAN, Adam J. Silver sulfadiazine retards wound healing in mice via alterations in cytokine expression. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 135, n. 5, p. 1459–1462, 2015. a.

ROSEN, Jamie M.; LANDRISCINA, Angelo; ADLER, Brandon L.; KRAUZ, Aimee E.; NOSANCHUK, Joshua D.; FRIEDMAN, Adam J. Topical silver sulfadiazine retards burn wound healing in a murine model. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 273, 2015. b.

ROWE, Raymond C.; SHESKEY, Paul J.; QUINN, Marian E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. [s.l: s.n.]. v. 6

ROZADA, Andrew M. F.; RODRIGUES-VENDRAMINI, Franciele A. V.; GONÇALVES, Davana S.; ROSA, Fernanda A.; BASSO, Ernani A.; SEIXAS, Flávio A. V.; KIOSHIMA, Érika S.; GAUZE, Gisele F. Synthesis and antifungal activity of new hybrids pyrimido[4,5-d]pyridazinone-N-acylhydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 30, p. 12244, 2020.

SALMORIA, Gean V.; PAGGI, Rodrigo A.; KANIS, Luiz A. Manufacturing of PCL/SAG tubes by melt-extrusion for nerve regeneration: Structure and mechanical properties. **Polymer Testing**, [S. l.], v. 55, p. 160–165, 2016.

SÄNGERLAUB, Sven; KUCUKPINAR, Esra; KIESE, Sandra; BAUER, Klaus Dieter; MÜLLER, Kajetan. Desiccant films made of low-density polyethylene with dispersed calcium oxide: Water vapor absorption, permeation and mechanical properties. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 136, n. 16, p. 1–11, 2019.

SANTOS, Jackson Wesley Silva Dos; DE FÁTIMA SILVA, Mariangela; CONCHA, Viktor Oswaldo Cárdenas; YOSHIDA, Cristiana Maria Pedroso. Diffusion process through biodegradable polymer films. **Biopolymer Membranes and Films**, [S. l.], p. 97–118, 2020.

SEGAN, Sören et al. Systematic Investigation of Polyurethane Biomaterial Surface Roughness on Human Immune Responses in vitro. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2020, 2020.

SERAPHIM, Patricia M.; LEAL, Ermelindo C.; MOURA, João; GONÇALVES, Pedro; GONÇALVES, Jenifer P.; CARVALHO, Eugénia. Lack of lymphocytes impairs macrophage polarization and angiogenesis in diabetic wound healing. **Life Sciences**, [S. l.], v. 254, n. May, 2020.

SHAH, Jayesh B. The history of wound care. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 65–66, 2011.

SHANMUGAM, Annaian; KATHIRESAN, Kandasamy; NAYAK, Lakshman. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobsiensis* (Hoyle, 1885). **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 9, p. 25–30, 2016.

SHAO, Wei; LIU, Hui; LIU, Xiufeng; WANG, Shuxia; WU, Jimin; ZHANG, Rui; MIN, Huihua; HUANG, Min. Development of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose/sodium alginate composite films with enhanced antibacterial property. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 132, p. 351–358, 2015.

SHAO, Wei; LIU, Hui; WU, Jimin; WANG, Shuxia; LIU, Xiufeng; HUANG, Min; XU, Peng. Preparation, antibacterial activity and pH-responsive release behavior of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose for wound dressing applications. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S. l.], v. 63, p. 404–410, 2016.

SHAO, Wei; WU, Jimin; WANG, Shuxia; HUANG, Min; LIU, Xiufeng; ZHANG, Rui. Construction of silver sulfadiazine loaded chitosan composite sponges as potential wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 157, p. 1963–1970, 2017.

SHARMA, Jitender Paul; KUMAR, Praveen; SHARMA, Kiran; KUMAR, Manoj; AMORA, Amit; SINGH, Pramod Kumar. Materials Today : Proceedings Optical and structural properties of drop-cast PVA / PEG polyblends. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], 2020.

SHARMA, Vaibhav; PATEL, Nimesha; KOHLI, Nupur; RAVINDRAN, Nivedita; HOOK, Lilian; MASON, Chris; GARCÍA-GARETA, Elena. Viscoelastic, physical, and biodegradable properties of dermal scaffolds and related cell behaviour. **Biomedical Materials (Bristol)**, [S. l.], v. 11, n. 5, 2016.

SHECKTER, Clifford C.; VAN VLIET, Michael M.; KRISHNAN, Naveen M.; GARNER, Warren L. Cost-effectiveness comparison between topical silver sulfadiazine and enclosed silver dressing for partial-thickness burn treatment. **Journal of Burn Care and Research**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 284–290, 2014.

SHIH, Pei Yu; LIAO, Yu Ting; TSENG, Yi Kai; DENG, Fu Sheng; LIN, Ching Hsuan. A potential antifungal effect of chitosan against *Candida albicans* mediated via the inhibition of SAGA complex component expression and the subsequent alteration of cell surface integrity. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. MAR, p. 1–14, 2019.

SHOUEIR, Kamel R.; EL-DESOUKY, Nagwa; RASHAD, Moataz M.; AHMED, M. K.; JANOWSKA, Izabela; EL-KEMARY, Maged. Chitosan based-nanoparticles and nanocapsules: Overview, physicochemical features, applications of a nanofibrous scaffold, and bioprinting. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], p. 22, 2020.

SIKKA, Monica Puri; MIDHA, Vinay Kumar. The role of biopolymers and biodegradable polymeric dressings in managing chronic wounds. *In: Advanced Textiles for Wound Care*. [s.l: s.n.]. p. 463–488.

SILVA, Yolanda Karla Cupertino Da et al. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 18, n. 14, p. 5007–5015, 2010.

SIMÕES, Déborah; MIGUEL, Sónia P.; RIBEIRO, Maximiano P.; COUTINHO, Paula; MENDONÇA, António G.; CORREIA, Ilídio J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 127, n. February, p. 130–141, 2018.

SINGH, Sandeep; SINGH, Gurpreet; BALA, Niraj. Analysis of in vitro corrosion behavior and hemocompatibility of electrophoretically deposited bioglass-chitosan-iron oxide coating for biomedical applications. **Journal of Materials Research**, [S. l.], v. 35, n. 13, p. 1749–1761, 2020.

SOUZA, Renata Francielle Bombaldi; SOUZA, Fernanda Carla Bombaldi; BIERHALZ, Andrea Cristiane Krause; PIRES, Ana Luiza Resende; MORAES, Ângela Maria. Biopolymer-based films and membranes as wound dressings. *In: Biopolymer Membranes and Films*. [s.l: s.n.].

STRYJSKA, Karolina; KORONA-GLOWNIAK, Izabela; CHEĆIŃSKA, Lilianna; KUSZ, Joachim; OCHOCKI, Justyn. Synthesis, spectroscopy, single-crystal structure analysis and antibacterial activity of two novel complexes of silver(I) with miconazole drug. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 1–18, 2021.

THE CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. . 2017.

THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Topic Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. . 1998.

THOTA, Sreekanth; RODRIGUES, Daniel A.; PINHEIRO, Pedro De Sena Murteira; LIMA, Lídia M.; FRAGA, Carlos A. M.; BARREIRO, Eliezer J. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters N -Acyhydrazones as drugs. **Biorganic & Medical Chemistry Letters**, [S. l.], v. 28, n. May, p. 2797–2806, 2018.

TOMMALIEH, M. J.; IBRAHIUM, Hala A.; AWWAD, Nasser S.; MENAZEA, A. A. Gold nanoparticles doped Polyvinyl Alcohol/Chitosan blend via laser ablation for electrical conductivity enhancement. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1221, 2020.

ULLAH, Saleem; CHEN, Xin. Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. **Applied Materials Today**, [S. l.], v. 20, 2020.

ULLAH, Sana; HASHMI, Motahira; KHAN, Muhammad Qamar; KHARAGHANI, Davood;

SAITO, Yuseke; YAMAMOTO, Takayuki; KIM, Ick Soo. Silver sulfadiazine loaded zein nanofiber mats as a novel wound dressing. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 268–277, 2019.

VENUS, Matt; WATERMAN, Jacqueline; MCNAB, Ian. Basic physiology of the skin. **Surgery**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 471–474, 2011.

VERLEE, Arno; MINCKE, Stein; STEVENS, Christian V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 164, p. 268–283, 2017.

VOWDEN, Kathryn; VOWDEN, Peter. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (United Kingdom)**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 489–494, 2017.

VRANA, Nihal Engin. Introduction to biomaterials for tissue/organ regeneration. **Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration**, [S. l.], p. 3–17, 2020.

WANDERLEY, Davidson M. S. et al. Physical–chemical characterization of N-acylhydrazone derivative chitosan films using spectroscopic and thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 138, n. 5, p. 3789–3796, 2019.

WANDERLEY, Davidson M. S. **Filmes poliméricos de quitosana com um derivado N-acilidrazônico para tratar lesões cutâneas**. 2019. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

WANDERLEY, Davidson M. S. et al. Biocompatibility and mechanical properties evaluation of chitosan films containing an N-acylhydrazonic derivative. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 155, n. September, p. 105547, 2020.

WANG, Guilin; FAKHRI, Ali. Preparation of CuS/polyvinyl alcohol-chitosan nanocomposites with photocatalysis activity and antibacterial behavior against G⁺/G⁻ bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 155, n. 3, p. 36–41, 2020.

WEIKERT, Tobias; NIEHUES, Anna; CORD-LANDWEHR, Stefan; HELLMANN, Margareta J.; MOERSCHBACHER, Bruno M. Reassessment of chitosanase substrate specificities and classification. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

WELLS, Timothy N. C.; SCULLY, Paul; PARAVICINI, Gerhard; PROUDFOOT, Amanda E. I.; PAYTON, Mark A. Mechanism of Irreversible Inactivation of Phosphomannose Isomerases by Silver Ions and Flamazine. **Biochemistry**, [S. l.], v. 34, n. 24, p. 7896–7903, 1995.

WHITE, R.; COOPER, Rose. Silver sulphadiazine: a review of the evidence. **Wounds uk**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 51, 2005.

WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. **Open Biology**, [S. l.], v. 10, n. 9, 2020.

XING, Lian et al. Alginate membrane dressing toughened by chitosan floccule to load antibacterial drugs for wound healing. **Polymer Testing**, [S. l.], v. 79, n. August, 2019.

XU, Jinjie; LUO, Kathy Qian. Enhancing the solubility and bioavailability of isoflavone by particle size reduction using a supercritical carbon dioxide-based precipitation process. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 2542–2549, 2014.

XUE, Meilang; JACKSON, Christopher J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances in Wound Care**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 119–136, 2013.

YONEDA, Julliane Diniz et al. Docking of anti-HIV-1 oxoquinoline-acylhydrazone derivatives as potential HSV-1 DNA polymerase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1074, p. 263–270, 2014.

YU, Zhen; LI, Baoqiang; CHU, Jiayu; ZHANG, Peifeng. Silica in situ enhanced PVA/chitosan biodegradable films for food packages. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 184, n. October 2017, p. 214–220, 2018.

YUAN, Wenjie; FENG, Yakai; WANG, Heyun; YANG, Dazhi; AN, Bo; ZHANG, Wencheng; KHAN, Musammir; GUO, Jintang. Hemocompatible surface of electrospun nanofibrous scaffolds by ATRP modification. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 3644–3651, 2013.

YUN, Yeon Hum; LEE, Chang Moon; KIM, Youn Sop; YOON, Soon Do. Preparation of chitosan/polyvinyl alcohol blended films containing sulfosuccinic acid as the crosslinking agent using UV curing process. **Food Research International**, [S. l.], v. 100, n. July, p. 377–386, 2017.

ZEPON, Karine Modolon; VIEIRA, Luiz Fernando; SOLDI, Valdir; SALMORIA, Gean Vitor; KANIS, Luiz Alberto. Influence of process parameters on microstructure and mechanical properties of starch-cellulose acetate/silver sulfadiazine matrices prepared by melt extrusion. **Polymer Testing**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1123–1127, 2013.

ZHANG, Jianhong; WEI, Chunle; LI, Shaoyuan; HU, Deyu; SONG, Baoan. Discovery of novel bis-sulfoxide derivatives bearing acylhydrazone and benzothiazole moieties as potential antibacterial agents. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 167, n. May, 2020.

ZHANG, Jing; CHEN, Xi Guang; HUANG, Lu; HAN, Jing Tian; ZHANG, Xiao Fan. Self-assembled polymeric nanoparticles based on oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide: Biocompatibility, protein adsorption and cellular uptake. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 1775–1783, 2012.

ZHANG, Sizhao; FENG, Junzong; FENG, Jian; JIANG, Yonggang; LI, Liangjun. Ultra-low shrinkage chitosan aerogels trussed with polyvinyl alcohol. **Materials and Design**, [S. l.], v. 156, p. 398–406, 2018.

ZHAO, Ruilong; LIANG, Helena; CLARKE, Elizabeth; JACKSON, Christopher; XUE, Meilang. Inflammation in chronic wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 1–14, 2016.

ZOU, Pengfei; LEE, Wen Hui; GAO, Zhiqin; QIN, Di; WANG, Yuxia; LIU, Jiao; SUN, Tongyi; GAO, Yuanyuan. Wound dressing from polyvinyl alcohol/chitosan electrospun fiber membrane loaded with OH-CATH30 nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [*S. l.*], v. 232, n. March 2019, 2020.