

Aline Buttchevitz

**MEMBRANAS E ESPONJAS POLIMÉRICAS PARA
INCORPORAÇÃO DE FÁRMACO CICATRIZANTE:
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

Dissertação submetido(a) ao Programa
de Pós Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio
Segatto Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Caon.

Florianópolis
2018

Buttchevitz, Aline
MEMBRANAS E ESPONJAS POLIMÉRICAS PARA
INCORPORAÇÃO DE FÁRMACO CICATRIZANTE: OBTENÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA / Aline Buttchevitz ;
orientador, Marcos Antônio Segatto Silva,
coorientador, Thiago Caon, 2018.
175 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Quitosana. 3. Alantoína. 4.
Membranas e esponjas poliméricas. 5. Curativos
cicatrizantes. I. Silva, Marcos Antônio Segatto. II.
Caon, Thiago. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

**“Membranas e esponjas poliméricas para incorporação
de fármaco cicatrizante: obtenção e caracterização
físico-química”**

POR

Aline Buttchevitz

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

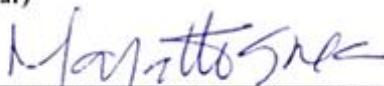
Banca Examinadora:



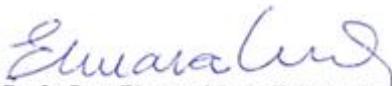
Prof(a). Dr(a). Angela Machado Campos (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Pedro Luiz Manique Barreto (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Marcos Antonio Segatto Silva (UFSC – Orientador(a))



Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 28 de junho de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus
amados pais que nunca me deixaram
faltar amor, carinho e educação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Krishna, Jah, Jeová, Alah, Brâman... ou qualquer outro nome que Lhe é dado. Minha evolução e existência acontecem a cada dia por um motivo maior! Sou grata ao Universo e as pessoas de luz e cheias de amor que passaram e passam todos os dias pelo meu caminho.

Aos meus pais, Denice e Valdir por me trazerem a esse plano e com todo amor, simplicidade e carinho me ajudam a crescer e descobrir a cada dia a minha essência. O exemplo que tenho de vocês é o que me dá força para lutar sempre pelo bem e pelo amor. Ao meu irmão Alex, que sempre foi meu exemplo de sabedoria e persistência, minha admiração por você sempre me fez buscar cada dia mais conhecimento. À minha irmã de coração, Rafa, por entrar em nossa família e sempre transbordar luz e amor!

Ao Man, que me acompanhou em todas as minhas jornadas, sempre ao meu lado me apoiando e me erguendo quando eu achava que não conseguiria mais seguir adiante. Obrigada por ser o melhor amigo, parceiro e namorado. Sua luz, bondade e amor tornaram nossa conexão algo que não se explica, só se sente. Você, Mona e Brisa Maria deixam meus dias mais leves e felizes.

Ao meu querido amigo Marcos Segatto, mas que muitos chamam de orientador. Eu não tenho palavras para descrever a gratidão por todos esses anos de amizade, parceria e conhecimento adquirido. Obrigada pelas palavras de conforto, acolhimento e carinho durante esses anos de muitos altos e baixos! Sem dúvidas você confiou mais em mim, do que eu mesma.

Ao meu outro querido amigo, Thiago, que além de coorientador deste trabalho, sempre foi uma inspiração de criatividade, inteligência e amor pelo que faz. Obrigada Nene, pelos abraços quando eu mais precisei, pelos conselhos e toda ajuda e dedicação.

Ao professor Alexandre Luis Parize e à professora Ângela Machado de Campos, pela ajuda e direcionamento do projeto na Qualificação do mestrado. Ao aluno Rafael Ganzenmüller Andrzejewski por compartilhar comigo seu trabalho e conhecimento, possibilitando a aplicação de suas membranas em outra área. O conhecimento de vocês, leveza e amor pela ciência me ensinaram muito.

Às professoras do Laboratório de Controle de Qualidade, Simone Cardoso e Hellen Stulzer, pela amizade, exemplo de excelentes profissionais e momentos agradáveis de convívio. Si, sua luz e sorriso acalmaram muitas vezes meu coração, obrigada!

Aos meus amigos Cassi e Rafa Nicolay, que foram irmãos científicos e amigos de coração desde o começo. Obrigada por toda ajuda, aprendizado, conversas, abraços e cafés. Cassi, obrigada por assumir mais essa responsabilidade e ajudar no fechamento deste ciclo!

À minha amiga e braço direito, Yasmin. Por toda doçura, luz e confiança nesses anos. Seu apoio e dedicação foram cruciais para a conclusão deste projeto. Obrigada por assumir algumas responsabilidades, vi em nossa parceria o meu e seu crescimento. Beijos de luz!

Aos meus queridos colegas e amigos do Lab CQ: André, Ana, Brenda, Fabi, Juli, Ju, Manu, Maria, Maristela, Paola e Rô, pelos papos científicos e de autoconhecimento, cafés, momentos de descontração, ajuda e carinho. Aos meus amigos de faculdade e vida, Rafa (Salette) e Marihá, pela parceria e bons momentos.

Às mulheres de luz que cruzaram meu caminho nessa jornada de autoconhecimento, Ana Paula Linhares, Grace Kelly Betim e Solange Ezure. Vocês foram cruciais para que eu conseguisse chegar até aqui inteira e consciente. O amor de cada uma pelo que faz me despertou muitos sentimentos esquecidos dentro de mim. Sou eternamente grata por esse encontro. Namastê.

Às Farmas Active Ca, Juli e Mari por todo apoio, conversar e compreensão nesses últimos meses. Em especial a minha amiga de anos, Juli! Sem dúvidas nossos caminhos não se cruzaram por acaso, que nossas antigas dúvidas logo se transformem em grandes certezas.

Aos colegas, professores e servidores de outros laboratórios da UFSC, que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

À UFSC, ao PGFAR e à FAPESC, por possibilitarem a realização deste trabalho, através do apoio financeiro e/ou infraestrutura.

A todos, minha gratidão!

“Don't worry about a thing
'Cause every little thing
Gonna be all right”
(Robert Nesta Marley, 1977)

RESUMO

Considera-se um curativo ideal aquele que auxilia na regeneração rápida e efetiva do tecido, possibilita a absorção de exsudato, mantém alta umidade entre ferida e curativo; permite trocas gasosas e representa uma barreira física contra microrganismos. O uso da quitosana para aplicação em lesões e feridas é amplamente difundida, uma vez que o biopolímero apresenta propriedades cicatrizantes, antimicrobianas, além de ser biodegradável e biorenovável. A associação de fármacos nos sistemas poliméricos auxilia no processo de regeneração tecidual, como é o caso da alantoína, ativo hidrofílico com atividade cicatrizante. Neste contexto, esta dissertação se propõe a desenvolver e caracterizar membranas e esponjas neutras de quitosana com e sem genipina para incorporação de alantoína. As membranas obtidas apresentaram diferentes propriedades nos estudos de caracterização, indicando que o processo de reticulação altera a morfologia e aspectos físico-químicos dos sistemas. Foi observado um aumento na bioadesão, redução no grau de intumescimento e permeação cutânea da alantoína para as membranas reticuladas. Para as esponjas, não foram notadas variações significativas na caracterização dos sistemas com e sem genipina. A liberação *in vitro* da alantoína incorporada nas membranas exibiu um perfil de liberação imediato, característico do efeito de liberação “burst”. Nos sistemas porosos, a liberação do fármaco foi relacionada com o intumescimento da matriz polimérica, seguido da difusão do ativo para o meio. A quitosana promoveu o aumento da permeação da alantoína, comparando-se com a solução do fármaco. Já a reticulação com genipina retardou tanto a liberação quanto a permeação do fármaco. As esponjas, por sua vez, propiciaram maior grau de intumescimento, bioadesão e permeação da alantoína na pele. Dentre os sistemas testados a esponja reticulada foi considerado o mais promissor para aplicação em feridas, baseando-se nas vantagens do sistema de interação com a pele, aumento da permeação cutânea e liberação modificada da alantoína, além da alta capacidade de retenção de líquidos.

Palavras-chave: Quitosana. Alantoína. Genipina. Membranas poliméricas. Esponjas poliméricas. Cicatrização.

ABSTRACT

A wound dressing considered as ideal is one that assists in the fast and effective tissue regeneration, promotes the absorption of exudate, maintains high degree of humidity between the wound and the dressing; allows gas exchange and represents a physical barrier against microorganisms. The use of chitosan for application in lesions and wounds is widely diffused, once the biopolymer has wound healing and antimicrobial properties, in addition to being biodegradable. The association of drugs within the polymeric systems helps in the process of tissue regeneration, as in the case of allantoin, a hydrophilic molecule with wound healing activity. In this context, this dissertation proposes the development and characterization of membranes and neutral sponges of chitosan with and without genipin for the incorporation of allantoin. The obtained membranes presented different properties in the characterization studies, indicating that the crosslinking process alters the morphology and physico-chemical aspects of the systems. An increase in bioadhesion and a reduction in the degree of swelling and skin permeation of allantoin was observed for the crosslinked membranes. As for the sponges, no significant variations were observed in the characterization of the systems with and without genipin. The *in vitro* release of allantoin incorporated into the membranes exhibited an immediate release profile, characteristic of the “burst” release effect. For the porous systems, the drug release was associated to the polymer matrix swelling, followed by allantoin diffusion into the medium. In the *ex vivo* skin permeation tests, chitosan promoted an increase on the permeation of allantoin in comparison to the drug solution. Already crosslinking with genipin slowed both release and permeation of the drug. The sponges provided a higher degree of swelling, bioadhesion and permeation of allantoin in the skin. Among the systems tested, the crosslinked sponge was considered the most promising for wound application, based on the advantages of the skin interaction, increased skin permeation and allantoin modified release, as well as high fluid retention capacity.

Keywords: Chitosan. Allantoin. Genipin. Polymeric membrane. Polymeric sponge. Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das camadas da pele e seus apêndices.....	35
Figura 2 - Esquema das vias de penetração de moléculas através da pele	38
Figura 3 - Esquema da profundidade e graus das úlceras cutâneas.....	42
Figura 4 - Conversão da quitina em quitosana através o processo de desacetilação.	44
Figura 5 - Representação do mecanismo de solubilização da quitosana.	45
Figura 6 - Estrutura química da genipina	47
Figura 7 - Primeira etapa de reticulação entre quitosana e genipina: Mecanismo do ataque nucleofílico.....	48
Figura 8 - Segunda etapa da reticulação entre quitosana e genipina: Mecanismo de substituição nucleofílica.....	48
Figura 9 - Mecanismo de reticulação da quitosana e genipina em meio alcalino.	48
Figura 10 - Estrutura química da alantoína	54
Figura 11 - Espectro de FTIR da ALN, QS MMW, SBT, GNP e Na ₂ CO ₃	63
Figura 12 - Espectro de FTIR da ALN e misturas físicas com QS MMW, SBT, GNP e Na ₂ CO ₃ na proporção 1:1 (m/m).....	63
Figura 13 - Curvas de DSC e TGA da matéria prima ALN.	66
Figura 14 - Curvas de DSC obtidas para matérias primas ALN, QS MMW, SBT, GNP, Na ₂ CO ₃ e respectivas misturas físicas na proporção 1:1 (m/m).....	66

Figura 15 - Curva de DSC e TGA da mistura física ALN + SBT (1:1 m/m).....	67
Figura 16 -Curva de TGA da matéria-prima de SBT.....	67
Figura 17 - Ensaio de microscopia com estágio de aquecimento, em que A, B e C representam a ALN, SBT e a MF ALN+SBT, respectivamente.	69
Figura 18 - Resultado das análises por DRX obtidas para a matéria prima ALN e a MF ALN+SBT (1:1 m/m).	69
Figura 19 -Teste de bioadesão realizado em texturômetro utilizando pele de orelha de porco como modelo de membrana.....	80
Figura 20- Esquema da protonação de repulsão das cadeias de QS em meio ácido.....	86
Figura 21 - Membranas Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca e Q-S 5% ALN.....	88
Figura 22 - Membranas Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca e Q-G-S 5% ALN.....	88
Figura 23 - Espectro de FTIR para as membranas Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca e Q-S 5% ALN.	90
Figura 24 -Espectro de FTIR para as membranas Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca e Q-G-S 5% ALN.	91
Figura 25 - Resultado das análises por DSC da primeira curva de aquecimento obtidas para as membranas: Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN; Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.....	94
Figura 26 - Resultado das análises por DSC e TGA da membrana Q Branca	95

Figura 27 - Resultado das análises por DSC da segunda curva de aquecimento obtidas para as membranas A) Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN; B) Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.....	96
Figura 28 - Resultado das análises por DRX obtidas para as membranas: Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN; Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.	97
Figura 29 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as membranas: A) Q Branca; B) Q-S 5% Branca; C) Q-S 5% ALN.	98
Figura 30 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as membranas: D) Q-G Branca; E) Q-G-S 5% Branca; F) Q-G-S 5% ALN.....	99
Figura 31 - Imagens da gota de água na superfície das membranas A) Q-S 2,5% Branca, B) Q-S 2,5% ALN, C) Q-S 5% Branca, D) Q-S 5% ALN, E) Q-G-S 2,5% Branca, F) Q-G-S 2,5% ALN, G) Q-G-S 5% Branca, H) Q-G-S 5% ALN.....	101
Figura 32 - Resultados da força bioadesiva (N) das membranas testadas em pele de orelha de porco.....	103
Figura 33 - Percentual de ALN liberada em função do tempo (min). A) Comparação entre membranas e mistura física (MF) dos sistemas Q ALN, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% ALN e suas respectivas MF. B) Comparação entre membranas e mistura física (MF) dos sistemas Q-G ALN, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% ALN e suas respectivas MF; C) Comparação entre as membranas Q ALN, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% ALN; D) Comparação entre as membranas Q-G ALN, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% ALN.	105
Figura 34 - Perfis de intumescimento das membranas Q-S 5% Branca; Q-S 5% ALN; Q-G-S 5% Branca; Q-G-S 5% ALN em tampão PBS (pH 7,4) a $32 \pm 0,5$ °C.....	107
Figura 35 - Gráfico do ganho de massa (g) das membranas em função do tempo (h) para o ensaio de permeabilidade do vapor de água.....	110

Figura 36 - Diagrama de tensão-deformação convencional e real para um material dúctil.	111
Figura 37 - Teste mecânico de tração das membranas. Curvas ilustrativas de deformação plástica e/ou elástica das membranas, nas quais não representam a média das análises.....	112
Figura 38 - Perfis de permeação do fármaco puro (ALN) das membranas Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN através da pele de orelha de porco (n=6).	115
Figura 39 - Foto das esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.	130
Figura 40 - Espectro de FTIR para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.....	131
Figura 41 - Primeira curva de aquecimento de DSC para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.....	133
Figura 42 - Segunda curva de aquecimento de DSC para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.....	133
Figura 43 - Análises de DRX para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.....	134
Figura 44 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a superfície das esponjas: A1) Q Branca; B1) Q ALN; C1) Q-G Branca; D1) Q-G ALN.....	135
Figura 45 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a fratura das esponjas: A2) Q Branca; B2) Q ALN; C2) Q-G Branca; D2) Q-G ALN.....	136
Figura 46 – Resultados da força bioadesiva (N) das esponjas testadas em pele de orelha de porco.	137
Figura 47 - Liberação da ALN (%) em função do tempo (min). Comparação entre esponjas Q ALN e Q-G ALN e suas respectivas MF.	139

Figura 48 - Liberação da ALN (%) em função do tempo (min). Comparação entre membranas e esponjas de A) Esponja Q ALN versus Membrana Q-S 5% ALN; B) Esponja Q-G ALN versus Membrana Q-G-S 5 % ALN..... 140

Figura 49 - Teste mecânico de tração. Curvas ilustrativas de deformação plástica e/ou elástica das esponjas (n=1)..... 144

Figura 50 -Perfis de permeação do fármaco puro (ALN) e das esponjas Q ALN e Q-G ALN através da pele de orelha de porco (n=6)..... 147

Figura 51 - Perfis de permeação do fármaco puro (ALN), das membranas (M) Q-S 5% ANL, Q-G-S 5% ALN e das esponjas (E) Q ALN e Q-G ALN através da pele de orelha de porco (n=6)..... 147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Excipientes utilizados nos estudos de compatibilidade, com respectivos lotes e fabricantes.	60
Quadro 2 - Temperatura de fusão da ALN nas misturas físicas com QS MMW, SBT, Na ₂ CO ₃ e GNP.	65
Quadro 3 - Proporções das matérias primas para obtenção das membranas Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN, Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.	76
Quadro 4 - Parâmetros utilizados no teste de bioadesão.	79
Quadro 5 - Proporções das matérias primas para obtenção das esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.	123
Quadro 6 - Parâmetros utilizados no teste de bioadesão.	125
Quadro 7 - Intensidades de absorvância normalizadas do espectro de FTIR das esponjas Q Branca, Q-G Branca, Q ALN e Q-G ALN nas faixas 1548-1558 cm ⁻¹ e 1406-1409 cm ⁻¹	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores dos parâmetros cinéticos de coeficientes de correlação (R^2), coeficiente difusional (n), eficiência de liberação (EL) para as membranas de QS no modelo cinético de Korsmeyer-Peppas.....	106
Tabela 2 - Grau de intumescimento (GI- %) e perda de massa (%) das membranas após 24 h em tampão PBS pH 7,4 (n=3).....	108
Tabela 3 - Permeabilidade ao vapor de água (K^w) e taxa de vapor (TVA) para as membranas de QS, (n=3).	110
Tabela 4 - Teste mecânico de estiramento obtidos para as membranas de QS.....	112
Tabela 5 -Parâmetro de fluxo de permeação (J_s) e coeficiente de correlação (R^2) considerando uma cinética de ordem zero	115
Tabela 6 - Valores dos parâmetros cinéticos de coeficientes de correlação (R^2) e eficiência de liberação (EL) para as esponjas de QS nos modelos cinéticos de Peppas-Sahlin (Q ALN) e Korsmeyer-Peppas (Q-G ALN).	139
Tabela 7 - Parâmetros de grau de intumescimento (GI) e perda de massa (%) das membranas após 24 h em tampão PBS pH 7,4 a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$..	142
Tabela 8 - Parâmetros do teste mecânico de tração obtidos para as esponjas de QS.	143
Tabela 9 - Parâmetros do teste mecânico de compressão obtidos para as esponjas de QS.	145
Tabela 10 - Parâmetro de fluxo (J_s) e coeficiente de correlação (R^2) considerando uma cinética de ordem zero.	146
Tabela 11 - Parâmetro de fluxo (J_s) e coeficiente de correlação (R^2) para a cinética de ordem zero do fármaco puro (ALN) e ALN permeada por meio das membranas (M) Q-S 5% ALN, Q-G-S 5% ALN e esponjas (E) Q ALN e Q-G ALN.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e UNIDADES

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ALN	Alantoína
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
°C	Grau Celsius
Da	Daltons
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GI	Grau de intumescimento
GNP	Genipina
g/mol	Grama/mol
h	Hora
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
J _s	Estado de fluxo constante
LD	Limite de detecção
Log P	Coefficiente de partição
LQ	Limite de quantificação
M	Molaridade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
N	Newton
pH	Potencial hidrogeniônico
QS	Quitosana
SBT	Sorbitol
TGA	Termogravimentia
Tg	Transição vítrea
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	OBJETIVOS	30
1.1.1	Objetivo geral	30
1.1.2	Objetivos específicos	30
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1	PELE	35
2.1.1	Vias de absorção de moléculas através da pele.....	37
2.1.2	Administração de fármacos através da pele	38
2.2	FERIDAS CUTÂNEAS.....	40
2.3	CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	42
2.4	QUITOSANA	43
2.4.1	Modificações químicas da quitosana	46
2.4.1.1	Quitosana e genipina	46
2.4.2	Sistemas cicatrizantes de quitosana.....	49
2.4.2.1	Membranas de QS cicatrizantes	50
2.4.2.2	Esponjas poliméricas.....	52
2.5	AGENTES CICATRIZANTES	53
2.5.1	Alantoína.....	54
2.5.1.1	Propriedades físico-químicas	54
2.5.1.2	Aplicações.....	54
3	CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE	
COMPATIBILIDADE DAS MATÉRIAS-PRIMAS		59
3.1	INTRODUÇÃO	59
3.2	METODOLOGIA	60
3.2.1	Materiais	60
3.2.2	Métodos.....	60
3.2.2.1	Caracterização das matérias-primas e estudo de compatibilidade entre fármaco e excipientes	60

3.2.2.1.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	61
3.2.2.1.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	61
3.2.2.1.3	<i>Termogravimetria (TGA)</i>	61
3.2.2.1.4	<i>Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento</i>	61
3.2.2.1.5	<i>Difração de raios-X (DRX)</i>	62
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.3.1	Caracterização das matérias-primas e estudo de compatibilidade entre fármaco e excipientes	62
3.3.1.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	62
3.3.1.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) & Termogravimetria (TGA).....	64
3.3.1.3	Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento	68
3.3.1.4	Difração de raios-X (DRX).....	68
3.4	CONCLUSÕES	70
4	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E ALANTOÍNA	73
4.1	INTRODUÇÃO	73
4.2	METODOLOGIA	74
4.2.1	Materiais	74
4.2.2	Métodos	74
4.2.2.1	Preparação das membranas de quitosana e alantoína.....	74
4.2.2.2	Caracterização físico-química e morfológica	77
4.2.2.2.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	77
4.2.2.2.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	77
4.2.2.2.3	<i>Difração de raios-X (DRX)</i>	77
4.2.2.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	78
4.2.2.3	Avaliação do ângulo de contato e molhabilidade	78
4.2.2.4	Ensaio de bioadesão.....	78

4.2.2.5	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da alantoína.....	80
4.2.2.6	Determinação do grau de intumescimento (GI)	81
4.2.2.7	Ensaio de erosão das membranas de QS	81
4.2.2.8	Permeabilidade ao vapor de água.....	82
4.2.2.9	Determinação das propriedades mecânicas das membranas de QS e ALN.....	83
4.2.2.10	Ensaio de permeação cutânea <i>ex vivo</i>	83
4.2.2.11	Análises estatísticas.....	85
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.3.1	Preparação das membranas de quitosana e alantoína.....	85
4.3.2	Caracterização físico-química e morfológica.....	89
4.3.2.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	89
4.3.2.2	Difração de raios-X (DRX).....	95
4.3.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	98
4.3.3	Avaliação do ângulo de contato e molhabilidade	100
4.3.4	Ensaio de bioadesão	102
4.3.5	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da alantoína....	103
4.3.6	Determinação do grau de intumescimento (GI)	107
4.3.7	Ensaio de erosão das membranas de QS.....	108
4.3.8	Permeabilidade ao vapor de água.....	109
4.3.9	Determinação das propriedades mecânicas das membranas	110
4.3.10	Ensaio de permeação cutânea <i>ex vivo</i>	113
4.4	CONCLUSÕES	117
5	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ESPONJAS DE QUITOSANA E ALANTOÍNA.....	121
5.1	INTRODUÇÃO	121
5.2	METODOLOGIA	121
5.2.1	Materiais	121

5.2.2	Métodos.....	122
5.2.2.1	Preparação das esponjas de quitosana e alantoína	122
5.2.2.2	Caracterização físico-química e morfológica	123
5.2.2.2.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>123</i>
5.2.2.2.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....</i>	<i>123</i>
5.2.2.2.3	<i>Difração de raios-X (DRX).....</i>	<i>124</i>
5.2.2.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	<i>124</i>
5.2.2.3	Ensaio de bioadesão.....	124
5.2.2.4	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da alantoína	125
5.2.2.5	Determinação do grau de intumescimento (GI).....	125
5.2.2.6	Ensaio de erosão das esponjas de QS	126
5.2.2.7	Determinação das propriedades mecânicas.....	126
5.2.2.7.1	<i>Teste mecânico de tração</i>	<i>127</i>
5.2.2.7.2	<i>Teste mecânico de compressão.....</i>	<i>127</i>
5.2.2.8	Ensaio de permeação cutânea <i>ex vivo</i>	127
5.2.2.9	Análises estatísticas	129
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
5.3.1	Preparação das esponjas de quitosana e alantoína	129
5.3.2	Caracterização físico-química e morfológica	130
5.3.2.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	130
5.3.2.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	132
5.3.2.3	Difração de raios-X (DRX).....	134
5.3.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	135
5.3.3	Ensaio de bioadesão	137
5.3.4	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da alantoína ...	138
5.3.5	Determinação do grau de intumescimento (GI)	141
5.3.6	Ensaio de erosão das esponjas de QS	142

5.3.7	Determinação das propriedades mecânicas.....	143
5.3.7.1	Teste mecânico de tração	143
5.3.7.2	Teste mecânico de compressão	145
5.3.8	Ensaio de permeação cutânea <i>ex vivo</i>	146
5.4	Conclusões	149
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
	REFERÊNCIAS.....	153

1 INTRODUÇÃO

A diversidade de feridas cutâneas considerando-se o tipo, causa, gravidade e local do corpo, resulta em uma ampla gama de curativos destinados à cicatrização. O curativo ideal para alcançar uma regeneração rápida e efetiva do tecido deve possibilitar a absorção do exsudato; manter alta umidade entre ferida e curativo; permitir trocas gasosas; ser uma barreira física contra microrganismos; não agredir a lesão e permitir a remoção sem causar traumas locais (BOATENG et al., 2008; BRASIL, 2002).

A quitosana (QS), um copolímero natural catiônico, caracteriza-se por ser biocompatível, biodegradável, cicatrizante, coagulante e apresenta atividade antimicrobiana. Essas propriedades do polímero torna-o de grande interesse para a aplicação na área médica, tal como em curativos destinados à cicatrização cutânea (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; CROISIER; JÉRÔME, 2013; DASH et al., 2011; LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009; MUZZARELLI, 2009a; MUZZARELLI et al., 2016). Modificações químicas, tais como a reticulação com genipina (GNP) são realizadas na QS como estratégia para aumentar a resistência e estabilidade dos materiais desenvolvidos, além de permitir um maior controle da liberação de fármacos (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; MUZZARELLI, 2009b).

Campos, Mei, Santos (2015), por exemplo, desenvolveram membranas neutralizadas de QS considerando aplicação como substituto de pele. Na comparação com membranas acidificadas em ensaios de citotoxicidade, observou-se que a etapa de neutralização é de extrema importância para evitar a morte celular causada pelos resíduos de ácido acético das membranas. Esponjas de QS vem ganhando destaque para aplicação como curativos, uma vez que são sólidos tridimensionais que fornecem suporte necessário para a fixação, proliferação e diferenciação celular, além de retenção de exsudato e troca de gases (JAYAKUMAR et al., 2011; MITSUISHI et al., 2013). Nesse contexto, membranas e esponjas de QS são exemplos de formulações que, devido suas características físico-químicas, representam alternativas promissoras para o desenvolvimento de curativos para cicatrização cutânea (CAMPOS; MEI; SANTOS, 2015; MA et al., 2017; MAHMOUD; SALAMA, 2016; QIAN et al., 2009).

Fármacos cicatrizantes podem ser incorporados a esses tipos de formulações para potencializar a atividade na regeneração tecidual. A alantoína (ALN) é uma molécula utilizada em formulações tópicas devido

às suas propriedades cicatrizante, hidratante, queratolítica, além de auxiliar na regulação da resposta inflamatória, proliferação fibroblástica e síntese de matriz extracelular (ARAÚJO et al., 2010; BECKER et al., 2010; SAITO, M.L.; OLIVEIRA, 1986; SAVIC et al., 2015; VERALDI; MENTER; INNOCENTI, 2008). Por apresentar baixo valor de log P (-3,14), a sua penetração na pele via difusão passiva pode ser prejudicada, reduzindo os efeitos farmacológicos esperados (HOFMANN et al., 2010; MERCK INDEX, 1996). A incorporação da ALN em membranas e esponjas de QS pode modificar a permeação do ativo na pele, visto que o polímero aumenta a hidratação, maciez, relaxação e fluidez da pele (CERCHIARA et al., 2002; HE et al., 2009)

Considerando o exposto, esta dissertação se propôs a desenvolver membranas e esponjas neutralizadas de QS na forma livre e reticulada com GNP para a incorporação da ALN. Testes de caracterização físico-química, morfológicos, mecânicos, estudo de liberação *in vitro*, bioadesão e permeação cutânea *ex vivo* foram considerados. A presente dissertação foi organizada em quatro capítulos, a considerar: Capítulo I – Revisão bibliográfica; Capítulo II - Caracterização e estudo de compatibilidade das matérias-primas; Capítulo III - Preparo e caracterização físico-química das membranas de quitosana e alantoína; Capítulo IV - Preparo e caracterização físico-química das esponjas de quitosana e alantoína.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar membranas e esponjas neutras de quitosana nas formas livre e reticulada para incorporação da alantoína visando aplicação em lesões cutâneas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o fármaco por técnicas de caracterização do estado sólido como espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA) e difração de raio-X (DRX);
- Avaliar a compatibilidade da alantoína (ALN) com os excipientes quitosana (QS), sorbitol (SBT), genipina (GNP) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) por meio das técnicas de FTIR,

DSC, TGA, DRX e microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento;

- Desenvolver membranas e esponjas neutras de QS nas formas livre e reticulada utilizando os métodos de evaporação do solvente e liofilização, respectivamente;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas das membranas e esponjas desenvolvidas através de técnicas como FTIR, DSC, TGA, DRX, microscopia eletrônica de varredura (MEV); molhabilidade, bioadesão, grau de intumescimento (GI), permeabilidade ao vapor de água e testes de tração e compressão;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* da ALN incorporadas nas membranas e esponjas;
- Avaliar a permeação cutânea *ex vivo* da ALN a partir da solução (controle) e diferentes membranas/esponjas utilizando o modelo de difusão da câmara de Franz;
- Investigar o impacto da reticulação química com genipina nos sistemas poliméricos desenvolvidos;
- Comparar os sistemas do tipo membrana e esponja em relação ao potencial de aplicação em lesões cutâneas.

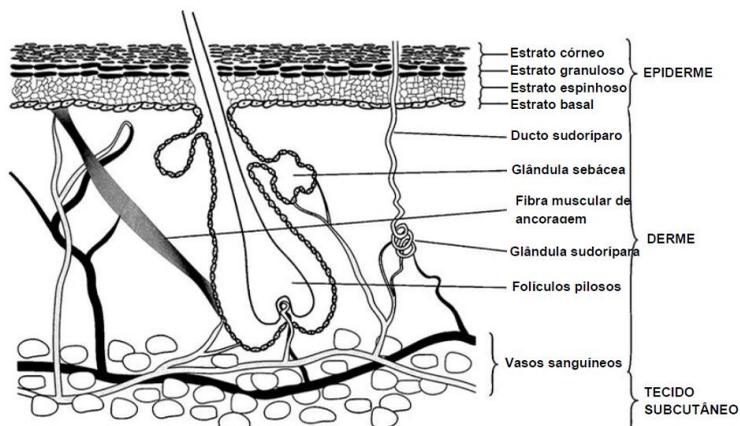
CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele encontra-se na interface entre o organismo e o meio externo, representando aproximadamente 16% do peso total do corpo, o que a torna a maior barreira do corpo humano. Composta por três camadas, é responsável por diversas funções como mecanismos de defesa física, química, imunológica, metabólica, síntese de vitamina D3, regulação da temperatura corporal e da perda de água transepidermica (LIU et al., 2014; PROW et al., 2011). Anatomicamente, é dividida em epiderme, derme e hipoderme (Figura 1), contendo ainda como anexos os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas (PATHAK; THASSU, 2009).

Figura 1 - Representação esquemática das camadas da pele e seus apêndices.



Fonte: Adaptado de Maghraby; Barry; Williams (2008).

A epiderme é composta por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado e aproximadamente 95% das células na epiderme são queratinócitos, conferindo alta hidrofobicidade à essa camada. As demais células são melanócitos, produtores de melanina, células de Langerhans, responsável pela imunovigilância cutânea e as de Merkel, que apresentam funções sensoriais. A epiderme é dividida em estrato córneo (10-15 μm) e epiderme viável (50-100 μm). A epiderme viável é subdividida em estrato germinativo (camada basal), espinhoso (camada espinhosa) e granuloso (camada granular). Por ser avascular, a

viabilidade da epiderme é garantida pela difusão de nutrientes a partir da derme (HOFMANN et al., 2010; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; MENON, 2002).

O estrato basal (germinativo) é a camada mais profunda da epiderme e é constituído por células colunares basais que ficam conectadas com a lâmina basal pelos hemidesmossomos. É também composto por células tronco epidermais que auxiliam na renovação contínua da epiderme (MENON, 2002). A formação do estrato córneo se dá pela divisão, diferenciação e migração dos queratinócitos para a camada mais externa da pele (RANG et al., 2016).

O estrato espinhoso recebe esse nome pela grande presença de desmossomos que apresentam a função de coesão entre as células, dando um aspecto espinhoso à essa camada. Os filamentos de queratina (tonofilamentos) também auxiliam na manutenção da resistência ao atrito e conexão entre as células. Esta região é crucial para a manutenção da integridade e estabilidade da epiderme (HOFMANN et al., 2010; MENON, 2002).

No estrato granuloso, camada que antecede o estrato córneo, as células já se encontram achatadas, em vias de degeneração e com grânulos de querato-hialina. Outra característica do estrato granuloso é presença de componentes lipídicos entre as células, conferindo uma proteção física contra a penetração de substâncias estranhas e perda de água (MENON, 2002; PASTAR et al., 2014).

O estrato córneo é a parte mais externa da epiderme, tendo contato com o meio externo. Esta camada superficial possui espessura entre 10 e 15 μm . É composto por células achatadas e mortas, chamadas de corneócitos, que são separadas por domínios lipídicos intercelulares (ácidos graxos, colesterol e ceramidas). A estrutura do estrato córneo é geralmente associada a uma “parede de tijolos”, onde os corneócitos são os tijolos e o cimento são os lipídeos intercelulares. A presença de domínios hidrofóbicos (lipídeos) e hidrofílicos (proteínas intercelulares), confere ao estrato córneo importante papel de barreira à permeação e desidratação (BOLZINGER et al., 2012; PASTAR et al., 2014).

Logo após a epiderme, encontra-se a derme, uma camada mais espessa formada por densa matriz hidrofílica e que confere suporte mecânico para a pele. É caracterizada pela presença de mucopolissacarídeo, fibras de colágeno, elastina, fibroblastos, células dendríticas, macrófagos, vasos sanguíneos e nervos sensoriais. Aproximadamente 70% da massa seca da derme é constituída por colágeno, majoritariamente o colágeno tipo I e III. As células predominantes desta região da pele são os fibroblastos, os quais são

responsáveis pela secreção de fibras de elastina e colágeno, assim como glicosaminoglicanos, que dão estrutura e suporte para a derme (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009; MONTANARI, 2016). Os anexos tais como os folículos pilosos têm origem na derme e são caracterizados por apresentar células tronco residentes com papel importante na cicatrização e reepitelização (COTSARELIS, 2006). Substâncias que atingem a derme podem ser absorvidas pela circulação sistêmica devido à sua irrigação (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; PATHAK; THASSU, 2009).

A hipoderme, camada mais inferior, é basicamente constituída por células adiposas, conferindo proteção contra traumas físicos, além de servir como reserva energética e como barreira térmica (MONTEIRO-RIVIERE, 2006).

2.1.1 Vias de absorção de moléculas através da pele

A grande área de contato, redução de efeitos adversos da administração oral e baixa degradação enzimática, tornam a pele uma via promissora para a administração de fármacos. Além de fármacos, outras moléculas podem ser absorvidas na pele e este processo ocorre por diferentes vias (BOLZINGER et al., 2012; PRAUSNITZ; LANGER, 2009).

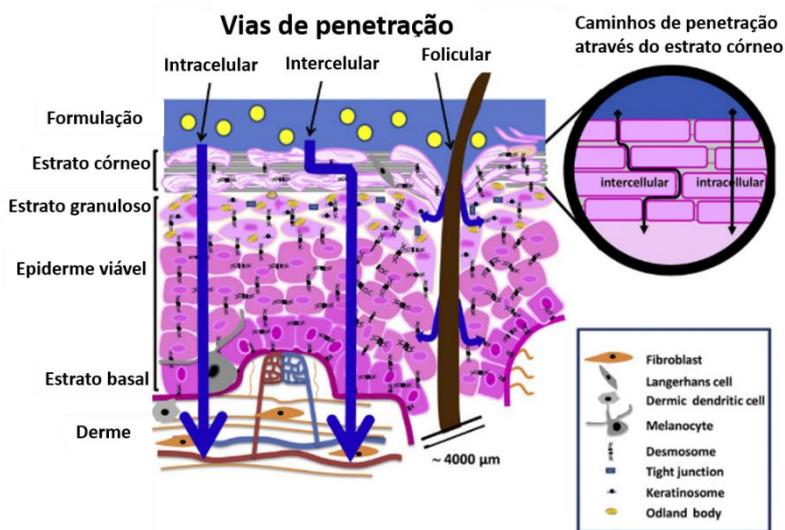
O termo absorção cutânea ou percutânea descreve a passagem de compostos através da pele, sendo este processo dividido em três etapas. A penetração é caracterizada pela entrada da substância no estrato córneo, na permeação, a molécula penetra de uma camada para outra (epiderme para derme, por exemplo) e, na reabsorção, a molécula alcança o sistema vascular; garantindo uma distribuição sistêmica (SCCS, 2010).

A difusão passiva é a via mais comum de transporte de substâncias ativas através da pele, enquanto o transporte ativo, mediado por carreadores é menos comum (NIELSEN; BENFELDT; HOLMGAARD, 2016). As principais vias de absorção através da pele são: intracelular, intercelular e transapendicular (através dos apêndices) (Figura 2).

Na via intercelular ocorre a difusão das moléculas através das camadas lipídicas que circundam as células do estrato córneo. Essa via é descrita como a rota predominante de moléculas lipofílicas. Já a via intracelular (transcelular) ocorre a passagem do fármaco diretamente pela camada de queratina dos corneócitos e pela matriz lipídica circundante. Por fim, na via transapendicular a absorção ocorre através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (BARBERO; FRASCH, 2017; BOLZINGER et al., 2012)

Os apêndices constituem uma porção muito pequena da extensão da pele (cerca de 0,1%), entretanto, representam uma rota paralela para íons e fármacos polares de baixo peso molecular. Além disso, após a penetração via transapendicular, as moléculas podem ficar armazenados nos folículos pilosos (BARBERO; FRASCH, 2017; BOLZINGER et al., 2012; PROW et al., 2011)

Figura 2 - Esquema das vias de penetração de moléculas através da pele



Fonte: Adaptado de Bolzinger e colaboradores (2012)

2.1.2 Administração de fármacos através da pele

A aplicação de medicamentos na pele pode ser utilizada para tratamento local, quando o fármaco fica depositado nas camadas superficiais da pele, ou então, sistêmico quando o objetivo é atingir a corrente sanguínea (HOFMANN et al., 2010).

Na pele, a via tópica é utilizada para o tratamento de doenças dermatológicas, infecções e anestesia local, regeneração tecidual, fotoproteção, além de fins estéticos. A vantagem da administração tópica é a ação direta no sítio alvo, o que requer menor quantidade de fármaco e mais rapidez nos resultados. Além disso, permitem a autoadministração, melhora da adesão do paciente ao tratamento e evita o efeito de primeira passagem. Entretanto, limitações também são observadas como as

reações alérgicas na pele, irritação e restrições de moléculas por conta de suas propriedades físico-químicas (KULKARNI, 2010; MOODY, 2010; SINGLA et al., 2012).

Outra via de administração é a transdérmica, a qual permite a permeação do fármaco via percutânea a nível sistêmico. Formulações transdérmicas ganharam maior notoriedade a partir de 1979 com o desenvolvimento do Transderm-Scop[®], primeiro adesivo transdérmico (*patch*) a base de escopolamina (PAUDEL et al., 2010). As vantagens dessa via de administração estão relacionadas com a diminuição da frequência de aplicação, liberação prolongada, evitar a metabolização hepática de primeira passagem, além de não representarem um sistema invasivo. Dentre as desvantagens, pode-se citar o tempo de latência (tempo necessário para atingir a concentração terapêutica após aplicação), irritação local e variações de absorção por conta da barreira cutânea (BOLZINGER et al., 2012; MARTINS; VEIGA, 2002).

A liberação do fármaco na pele pode ser influenciada por diversos fatores, desde a formulação, características da molécula até a própria barreira cutânea. Inicialmente, para que ocorra a permeação da molécula, o fármaco precisa difundir-se da formulação para a superfície da pele. Na sequência, ocorre a passagem da molécula para o interior do estrato córneo, e por fim, o fármaco difunde-se através da camada mais externa da epiderme (VOLPATO; FREITAS; STORPIRTIS, 2010).

Para que todo esse processo ocorra de forma efetiva, as propriedades físico-químicas do fármaco precisam ser propícias para a penetração na pele. Dentre essas propriedades, podem-se citar a massa e forma molecular, grau de ionização, coeficiente de partição ($\log P$), solubilidade, número de hidrogênios doadores e receptores e ponto de fusão (BOLZINGER et al., 2012; VOLPATO; FREITAS; STORPIRTIS, 2010). São consideradas moléculas ideais para permeação cutânea as que apresentam massa molecular menor que 500 g/mol, $\log P$ entre 1 e 3 e baixo ponto de fusão (HOFMANN et al., 2010).

As condições fisiológicas tais como a hidratação do estrato córneo, integridade do tecido, idade, região anatômica e temperatura, também apresentam influência direta na penetração e permeação de moléculas na pele (DASH et al., 2010; PAUDEL et al., 2010). Outro fator crucial é o tipo de forma farmacêutica utilizada para veicular o fármaco. No mercado, usualmente encontram-se formulações do tipo cremes, géis, óleos, loções, pomadas, *patches* (adesivos). Sistemas de natureza mais oleosa contribuem para um aumento do grau de hidratação da pele, favorecendo a permeação de moléculas. Novos sistemas de base polimérica tais como filmes, membranas, esponjas, *scaffolds* também

vêm sendo propostos para ambas as aplicações, tópica e transdérmica, com o propósito de oferecerem maior controle da liberação do fármaco (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; BI et al., 2011; BOATENG et al., 2008; IKEDA et al., 2014; MA et al., 2017; MAHMOUD; SALAMA, 2016; TAVARES, 2015).

2.2 FERIDAS CUTÂNEAS

Feridas cutâneas que, por definição, envolvem a ruptura da estrutura e funções da pele, incluem queimaduras, traumatismos e úlceras (PRZYBOROWSKI; BERTHIAUME, 2013).

As queimaduras são causadas pela ação direta ou indireta da energia na forma de calor de agentes físicos, químicos, elétricos ou radioativos. Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), no Brasil, acontecem um milhão de casos de queimaduras a cada ano, ocasionando muitas mortes em detrimento da lesão (GIORDANI et al., 2016).

A classificação das queimaduras é acordo com sua profundidade e tamanho. A lesão de primeiro grau se restringe a epiderme, a qual também é chamada de queimadura superficial, apresentando melhoras entre 3 a 6 dias. A de segundo grau, por sua vez, é dividida em duas classificações, segundo grau superficial e profundo. No primeiro caso, a lesão acomete a epiderme e porções mais superficiais da derme, podendo aparecer bolhas e a cura leva em torno de 3 semanas, sem deixar cicatrizes. Por outro lado, a lesão profunda acomete toda a derme, podendo destruir as terminações nervosas da pele. O processo de regeneração leva mais de 3 semanas e deixa cicatrizes. A queimadura de terceiro grau lesiona toda derme e tecido subcutâneo, destruindo terminações nervosas e apêndices da pele, podendo atingir músculos e ossos. Para a regeneração do tecido, é necessário procedimento cirúrgico e enxertos (GIORDANI et al., 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS, 2018).

A falta de integridade do tecido acometido por queimaduras torna-o vulnerável a infecções causadas por fungos e bactérias (TIWARI, 2012). Comumente são encontrados em pacientes queimados bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*. Já os fungos mais encontrados são *Candida sp.*, *Aspergillus* e *Mucor*. Tais infecções podem ser letais para o paciente ou tornar a recuperação mais lenta (BOATENG et al., 2008; GONELLA et al., 2014, 2016).

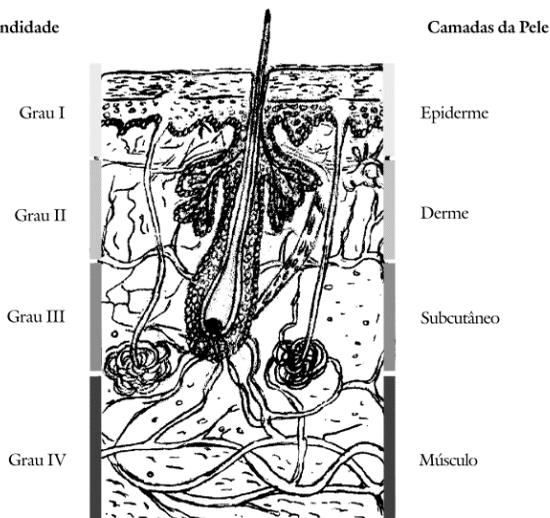
Alguns dos tratamentos de queimaduras consistem na aplicação de sulfadiazina de prata 1% na área lesionada, materiais substitutivos de

pele, oxigenoterapia hiperbárica, administração oral de antimicrobianos e analgésicos, além de curativos biológicos e semi-biológicos e matrizes de regeneração dérmica. Devido à ausência de integridade do tecido, é necessária cautela na escolha do medicamento utilizado na lesão, uma vez que podem ser diretamente absorvidos na circulação sistêmica (BRASIL, 2012; MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013; TAVARES, 2015; TIWARI, 2012). Novas tecnologias como curativos que mantêm a hidratação da ferida, não aderente e com agente antimicrobiano incorporado já estão disponíveis no mercado. O Mepilex® Ag, por exemplo, é um curativo antimicrobiano formado por uma espuma absorvente de poliuretano com sulfato de prata. Resultados promissores são observados durante o uso deste curativo, principalmente em crianças. A espuma não agride o tecido em regeneração e permite a absorção de exsudato e secreções, reduzindo o odor na região da queimadura. Além disso, a redução de trocas frequentes do curativo auxilia na manutenção dos queratinócitos que migraram da camada basal para as camadas superficiais (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

Já as úlceras, outro tipo de ferida cutânea, são alterações na estrutura anatômica e/ou funções fisiológicas do tecido devido a algum comprometimento na região. Podem ser classificadas de acordo com a causa, tempo de reparação ou de acordo com a profundidade. Nesse último caso, são classificadas de grau I até o IV, seguindo a mesma lógica dos graus de queimadura (Figura 3). No caso do grau IV, além do comprometimento da epiderme, derme, hipoderme, a úlcera também acomete tecidos mais profundos (BRASIL, 2002).

Segundo o Manual de Condutas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas, elaborado pelo Ministério da Saúde (2002), as características de um curativo ideal para úlceras cutâneas englobam os seguintes requisitos: remoção do exsudato; manter alta umidade entre ferida e curativo; permitir trocas gasosas; ser impermeável às bactérias; fornecer isolamento térmico; ser isento de substâncias tóxicas; permitir a remoção sem causar traumas locais.

Figura 3 - Esquema da profundidade e graus das úlceras cutâneas.



Fonte: Brasil, 2002

2.3 CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

O processo de cicatrização consiste em sucessivos eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Há uma simultânea degradação do tecido morto e reconstrução de estruturas da matriz extracelular e revestimento do epitélio.

A cicatrização é dividida em três fases: inflamatória, de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou maturação (SINGER, ADAM J; CLARK, 1999).

A fase inflamatória ocorre após a lesão tecidual, na qual há liberação de substâncias vasoconstritoras, iniciando-se a cascata de coagulação. Com a liberação de grânulos pelas plaquetas, vários fatores de crescimento direcionam-se para o local da inflamação, atraindo os neutrófilos. Há um aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação para que ocorra a quimiotaxia. Em seguida, os neutrófilos são substituídos pelos macrófagos, responsáveis pela secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Esta fase é responsável por evitar infecções durante o processo de cicatrização, além

de degradar o tecido necrosado (REINKE; SORG, 2012; ROWAN et al., 2015).

A fase proliferativa se inicia aproximadamente após quatro dias da lesão, sendo caracterizada por etapas que incluem a epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. A epitelização ocorre para reestabelecer o tecido, além da barreira protetora (STEENFOS, 1994). Na angiogênese, há migração de células endoteliais e formação de capilares. A parte final desta fase é a formação de tecido de granulação, na qual fibroblastos e células epiteliais são as principais células do processo (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007)

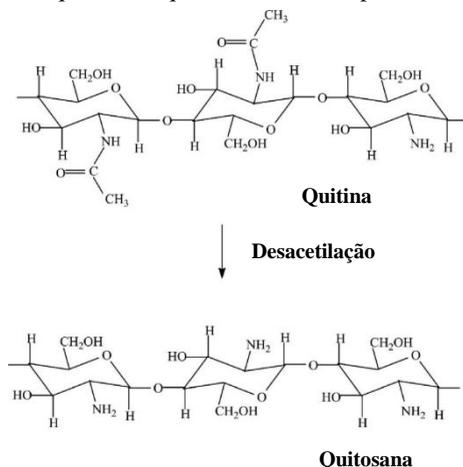
A última fase é a de maturação, sendo caracterizada pela deposição de colágeno na derme. Como o colágeno produzido é mais fino, ocorre um processo de lise desta matriz e produção do colágeno mais espesso. A organização e equilíbrio entre a síntese e degradação de colágeno são fatores fundamentais para uma apropriada cicatrização e reconstituição da matriz extracelular, o que explica o fato de muitos curativos incluírem colágeno na constituição (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; SINGER, ADAM J; CLARK, 1999).

Cada tipo de lesão apresenta características próprias, como por exemplo o pH. Lesões do tipo feridas agudas, feridas com pus ou tecido necrótico apresentam pH mais ácido. Por outro lado, feridas crônicas ou contaminadas com bactérias são caracterizadas por valores de pH próximo da neutralidade (7,3). O pH é um fator importante na cicatrização, visto que cada processo das fases de reconstituição tecidual apresenta valores de pH ótimo (SCHNEIDER et al., 2007).

2.4 QUITOSANA

A quitosana (QS), um copolímero natural catiônico, biocompatível, biodegradável e biorenovável, pode ser obtida através desacetilação da quitina, polímero extraído da casca de crustáceos (Figura 4). As unidades monoméricas que fazem parte da estrutura da QS são a *N*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (glucosamina) e amino-2-desoxi-D-glicose (*N*-acetil-glucosamina) (DASH et al., 2011; MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007).

Figura 4 - Conversão da quitina em quitosana através o processo de desacetilação.

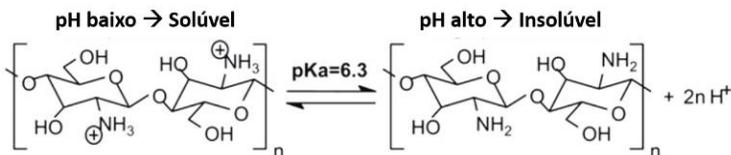


Fonte: Gomathysankar e colaboradores (2014).

Dependendo da fonte de quitina e das condições de processamento, o grau de desacetilação (GD) da QS varia entre 50 e 100%, enquanto o seu peso molecular de 10 a 1000 kDa (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; CROISIER; JÉRÔME, 2013; DASH et al., 2011; MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007). A solubilidade da QS é limitada em soluções aquosas devido às fortes ligações de hidrogênio e interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas. Fatores como grau de cristalinidade e polimerização, neutralização dos grupos amina e força iônica do solvente, influenciam na solubilidade do biopolímero em meio aquoso (KASAAI, 2008; KIM, 2010). A solubilização da QS ocorre na faixa de pH de 6,0 a 6,5 devido à protonação dos grupos amina e repulsão das cargas, levando à diminuição das interações intermoleculares (Figura 5). O pKa da QS é em torno de 6,3, podendo variar de acordo com o GD (DASH et al., 2011).

Na literatura, são relatadas as propriedades de bioadesão, biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliicidade, atividade antimicrobiana, cicatrizante, coagulante da QS; o que é relevante para aplicações na área farmacêutica/biomédica (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; CROISIER; JÉRÔME, 2013; DASH et al., 2011; LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009; MUZZARELLI, 2009a; MUZZARELLI et al., 2016).

Figura 5 - Representação do mecanismo de solubilização da quitosana.



Fonte: Adaptado de Luo e colaboradores (2009).

As propriedades cicatrizantes da QS estão relacionadas com seus mecanismos de ação nas lesões. Os oligômeros de QS são responsáveis pela ativação de macrófagos, estes, por sua vez, liberam interleucina-1 e estimulam a proliferação de fibroblastos. Como já relatado, os fibroblastos são responsáveis pela secreção de fibras de elastina e colágeno, assim como glicosaminoglicanos, que dão estrutura e suporte para a derme (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; JAYAKUMAR et al., 2011; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009; MONTANARI, 2016). Além disso, a biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular ocorre na presença de glucosamina e *N*-acetil-glucosamina. Esses monômeros são gerados após a hidrólise da QS pela *N*-acetilglucosaminidase, a qual também é liberada pelos macrófagos (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; MUZZARELLI, 1997, 2009a; RAVI KUMAR, 2000).

Lisozima é naturalmente encontrada nos sítios das lesões, sendo que essa proteína também é responsável por hidrolisar a QS. Desta forma, ao entrar em contato com lesões, o polímero é convertido em suas unidades monoméricas, processo conhecido como biodegradação. A hidrólise da QS acaba auxiliando na cicatrização, uma vez que a *N*-acetilglucosamina está majoritariamente presente no epitélio e é essencial para a regeneração tecidual (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; DASH et al., 2010; MUZZARELLI, 1997, 2009a; RAVI KUMAR, 2000).

Outra propriedade importante da QS que auxilia no processo de cicatrização é sua atividade antimicrobiana. Diferentes estudos demonstram a eficácia da QS contra bactérias e fungos, e diferentes mecanismos são atribuídos a essa propriedade. Por ser um polímero catiônico, interações entre as cargas positivas (NH_3^+) da QS e negativas da superfície das células bacterianas podem ocorrer. Essa interação forma ligações fortes além de uma camada impermeável ao redor da bactéria, impedindo o transporte de substâncias vitais para o interior do microrganismo (BANO et al., 2017; TAN et al., 2013). O outro

mecanismo proposto envolve a invasão da QS no núcleo da célula bacteriana, inibindo o RNA e a consequente síntese proteica. Esse processo é relatado principalmente para QS de baixo peso molecular e seus oligômeros (BANO et al., 2017; CHUNG; CHEN, 2008). Bactérias como a *Pseudomonas aeruginosas*, encontradas em lesões cutâneas, produzem componentes extracelulares como a 4-hidroxi-2-alquilquinolina (HAQs), que funciona como fator de virulência e comunicação entre as células bacterianas. Em estudo recente, o uso de QS nos testes microbiológicos levou a supressão da HAQs da *P. aeruginosas*, indicando uma nova abordagem do mecanismo de ação do polímero sobre as bactérias (BANO et al., 2017).

Em virtude das diversas aplicações, a QS é utilizada em diferentes formulações que visam a cicatrização e regeneração tecidual como nanopartículas, hidrogéis, filmes, membranas, bandagens, *scaffolds*, nanofibras, esponjas, entre outras (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010; ANISHA et al., 2013; BURKATOVSKAYA et al., 2010; CAETANO et al., 2015; CAI et al., 2010; CAMPOS et al., 2005; CAMPOS; MEI; SANTOS, 2015; CHARERNSRIWILAIWAT et al., 2012; LIH et al., 2012).

2.4.1 Modificações químicas da quitosana

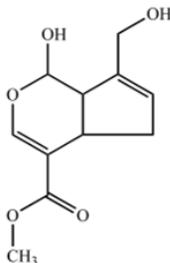
Estudos com reações para melhorias das propriedades mecânicas, físico-químicas ou modificação da liberação de moléculas são frequentemente encontrados na literatura. A QS apresenta duas hidroxilas e um grupamento amina livres para interação com outras moléculas. Dessa forma, é possível modificar quimicamente as cadeias poliméricas, adicionando pequenas moléculas ou outros polímeros ao esqueleto da QS (DASH et al., 2011; KOSSMEH, 2011). A reação de reticulação (*crosslinking*) com a genipina (GNP) é um exemplo de modificação da QS, sendo uma estratégia amplamente utilizada a fim de aumentar a resistência e estabilidade dos materiais desenvolvidos com QS, bem como para controlar a liberação de fármacos (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; MUZZARELLI, 2009b)

2.4.1.1 Quitosana e genipina

A GNP é um pó cristalino branco, com massa molar de 226,226 g/mol, ligeiramente solúvel em água e solúvel em etanol e metanol e temperatura de fusão em torno de 120 °C (Figura 6). Essa molécula pode ser obtida do extrato de frutos da *Gardenia jasminoides Ellis* e da *Genipa*

americana, popularmente conhecidas como gardênia e jenipapo, respectivamente (MANICKAM; SREEDHARAN; ELUMALAI, 2014).

Figura 6 - Estrutura química da genipina

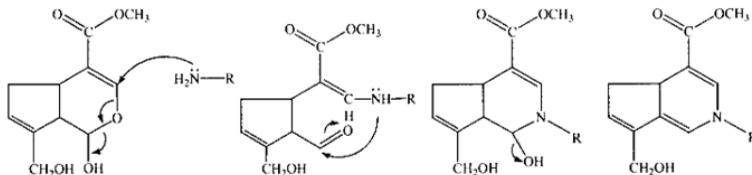


Fonte: Manickam e colaboradores (2014).

Além de ser de origem natural, a GNP é biodegradável e pode apresentar citotoxicidade 10000 vezes menor que outros agentes reticulantes, como por exemplo, o glutaraldeído (MUZZARELLI, 2009b). Por esses motivos a molécula vem sendo estudada como agente reticulante da QS para aplicações biológicas (POZZO et al., 2018; ZHANG et al., 2011). Estudos de caracterização e atividades *in vitro* são relatados para esses sistemas, apresentando resultados promissores na regeneração tecidual, modificação das propriedades dos materiais e liberação controlada de fármacos (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015; HARRIS; LECUMBERRI; HERAS, 2010; MUZZARELLI, 2009b; MUZZARELLI et al., 2016).

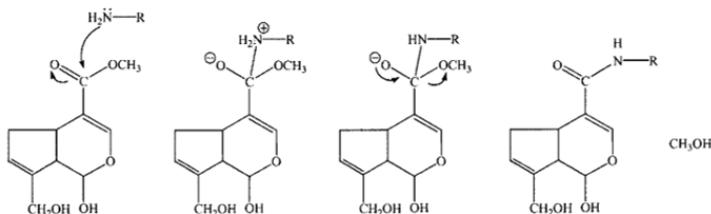
A reação de reticulação entre QS e GNP envolve interações do tipo covalente, uma vez que ocorre a formação de ligações estáveis e irreversíveis. Em pH ácido, sugere-se um ataque nucleofílico inicial de um grupo amino da QS ao carbono da posição 3 da GNP, com conseqüente abertura do anel di-hidropirânico, gerando a função aldeído na molécula. A aldoxila, por sua vez, reage com a amina secundária recém-formada para gerar o novo heterociclo (Figura 7). A última etapa da reação é mais lenta (Figura 8), na qual ocorre uma substituição nucleofílica do grupamento éster da GNP, liberando metanol e formando uma ligação de amida secundária com as cadeias da QS (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; GONSALVES, 2011; MUZZARELLI, 2009b)(MUZZARELLI, 2009; GONSALVES et al., 2011).

Figura 7 - Primeira etapa de reticulação entre quitosana e genipina: Mecanismo de ataque nucleofílico



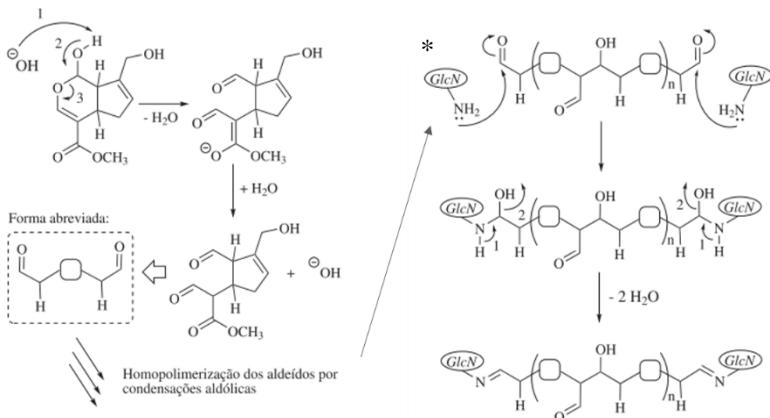
Fonte: Butler e colaboradores (2003).

Figura 8 - Segunda etapa da reticulação entre quitosana e genipina: Mecanismo de substituição nucleofílica



Fonte: Butler e colaboradores (2003).

Figura 9 - Mecanismo de reticulação da quitosana e genipina em meio alcalino.



* *GlcN*: unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose

Fonte: Gonsalves e colaboradores (2011).

Já em pH alcalino, a reticulação ocorre por uma reação de homopolimerização da GNP (Figura 9). O processo inicia-se com a abertura do anel diidropirano por meio de ataque nucleofílico promovido por íons hidroxila do meio reacional. Isso resulta na formação de grupos aldoxila na molécula que, em seguida, sofrem condensação aldólica. Na etapa final, os grupos aldoxila terminais da GNP polimerizada participam de uma reação de Schiff com as aminas das cadeias da QS para promover a reticulação (GONSALVES, 2011; MUZZARELLI, 2009b).

Sistemas reticulados de QS e GNP apresentam coloração azul esverdeada. O mecanismo de formação do pigmento ainda não está totalmente elucidado, porém considera-se a hipótese formação do pigmento azul a partir da polimerização da GNP induzida por radicais de oxigênio (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; PARK et al., 2002; TOUYAMA et al., 1994)

2.4.2 Sistemas cicatrizantes de quitosana

A variedade de feridas cutâneas considerando-se o tipo, causa, gravidade e local do corpo, resulta em uma ampla gama de curativos destinados à cicatrização. Os curativos são classificados de acordo com a função (antibacteriano, absorvente, oclusivo, aderente); tipo da composição (alginato, quitosana, colágeno) e a sua forma física (gel, pomada, creme, membrana, espuma). Além disso, as coberturas podem ser categorizadas em primária, que são aquelas que permanecem em contato direto com a lesão e, em secundária, que são aquelas que ficam sobre a cobertura primária (BOATENG et al., 2008; FALABELLA, 2006; VAN RIJSWIJK, 2006).

Testes padrão listados em compêndios oficiais e normas técnicas devem ser considerados para formulações que estão em fase de desenvolvimento ou como teste de rotina para o controle de qualidade. Dentre os ensaios, pode-se citar a permeabilidade ao vapor de água, grau de intumescimento, testes mecânicos de tração, compressão e força bioadesão (BOATENG et al., 2008; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; PEH; KHAN; CH'NG, 2000).

Devido às várias propriedades terapêuticas relatadas para a QS, encontram-se na literatura e no mercado diversos tipos de curativos biocompatíveis com esse polímero. As formas físicas variam de hidrogéis, xerogéis, pós, *scaffolds* (arcabouços), membranas, esponjas e nanomateriais (AZAD et al., 2004; BANO et al., 2017; JAYAKUMAR et al., 2011; MUZZARELLI, 2009a; SONG et al., 2018). Dentre os curativos cicatrizantes a base de QS e disponíveis comercialmente pode-

se mencionar o Tegaserb[®], Tegaderm[®], Trauma DEX[®] e HemCon Bandage[™], Syvek-Patch[®], Chitopack C[®], Beschitin[®] (JAYAKUMAR et al., 2011).

2.4.2.1 Membranas de QS cicatrizantes

De acordo com a terminologia da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), membranas são materiais com dimensões laterais maiores que sua espessura (KOROS, WILLIAM J; MA, Y, H; SHIMIDZU, 1996). Para a obtenção de membranas, duas técnicas de secagem são utilizadas, o processo de nebulização (*spraying*) e o processo conhecido como evaporação do solvente (*solvent casting*). No processo de nebulização, a membrana é obtida por deposição de gotículas atomizadas, formando camadas homogêneas de membrana. Já no método de evaporação do solvente, ocorre a dispersão do polímero em um solvente ou mistura de solventes adequados. Em seguida, a dispersão é vertida sobre uma superfície não adesiva (suporte) e é levada para uma estufa ou mantida em temperatura ambiente para a evaporação do solvente (KOSSMEH, 2011; KRAJEWSKA, 2004).

Na literatura, diversos estudos com membranas e filmes de QS para aplicação em lesões cutâneas podem ser encontrados, nos quais foram realizados testes de caracterização físico-química, citotoxicidade, liberação *in vitro*, bioadesão e atividade cicatrizante. Azad e colaboradores (2003), por exemplo, desenvolveram membranas de QS neutralizadas com hidróxido de sódio (NaOH) para testes clínicos, incluindo avaliações histológicas. Os sistemas propostos contribuíram para uma maior reepitelização e regeneração do tecido granular, confirmando o potencial das membranas como substitutos da pele em lesões.

Campos e colaboradores (2005), em seus estudos, ressaltaram a importância da neutralização de membranas de QS a fim de remover os resíduos de ácido acético. Com isto, a hidrólise ácida do polímero poderia ser retardada e o sistema destinado a aplicação como curativo. A neutralização ocorreu com a imersão das membranas em solução de NaOH (2% m/m) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) (0,05% m/m). A solubilidade e absorção de água dos sistemas foram reduzidas devido à remoção dos grupos hidrofílicos de ácido acético. Além disso, observou-se uma melhora das propriedades mecânicas.

Em 2015, este mesmo grupo de pesquisa desenvolveu membranas de QS neutralizadas (CN) e membranas de QS plastificadas com sorbitol (CP) como substituto de pele (CAMPOS; MEI; SANTOS, 2015). O

objetivo foi avaliar as propriedades físico-químicas bem como a citotoxicidade *in vitro* dos sistemas propostos. Para fins de comparação, uma membrana de QS sem neutralização e agente plastificante foi preparada (CA). Além da menor deformação no teste de tração à ruptura, maior índice de cristalinidade foi encontrado para CN em relação a CP, o que foi associado ao processo de neutralização. Nenhuma membrana demonstrou citotoxicidade indireta (efeito das substâncias liberadas pela QS no meio de cultura), entretanto, quando em contato direto com as células Vero, evidências de citotoxicidade foram observadas para a membrana CA. Esta citotoxicidade direta foi atribuída ao ácido acético residual, já que o solvente é tóxico para as células. Com resultados promissores de citotoxicidade, o sorbitol foi considerado um agente plastificante seguro e o processo de neutralização uma etapa importante na produção de membranas para fins de aplicação na pele.

Na área de membranas de QS com fármaco incorporado, Ma e colaboradores (2017) desenvolveram sistemas flexíveis e transparentes contendo fármacos antibacterianos (cloridrato de tetraciclina e sulfadiazina de prata) e plastificante (glicerina). Para os testes de caracterização, os resultados mostraram que a adição de glicerol melhorou a resistência à tração, taxa intumescimento, permeabilidade ao vapor de água e a molhabilidade. A degradação enzimática *in vitro* revelou estabilidade a longo prazo e, nos ensaios de liberação *in vitro*, observou-se uma liberação sustentada dos fármacos. Nos testes microbiológicos, as membranas de QS exibiram considerável atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, o que poderia resultar em uma alta eficiência terapêutica, auxiliando na cicatrização de feridas.

Membranas de QS e GNP também são relatadas na literatura quando a aplicação é direcionada para regeneração tecidual. Mi, Tan e Liang (2012), por exemplo, realizaram um estudo comparativo com membranas de QS na ausência e presença de diferentes agentes reticulantes (GNP e glutaraldeído). Os autores observaram que a reticulação com GNP aumentou a força de tensão, porém, reduziu significativamente os valores de deformação na ruptura e grau de intumescimento. Nos ensaios microbiológicos com *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, resultados promissores em relação ao controle foram observados. Além disso, o processo de reticulação manteve a propriedade antibacteriana do polímero. A reticulação com GNP resultou em menor citotoxicidade e taxa de degradação que àquela com glutaraldeído, sugerindo que as primeiras são promissoras para aplicação na liberação de fármacos.

2.4.2.2 Esponjas poliméricas

Esponjas poliméricas são sólidos tridimensionais (3D), flexíveis, podendo mimetizar o comportamento de uma matriz extracelular. São tradicionalmente preparadas por liofilização, uma técnica que se baseia no congelamento da solução de polímero para a formação de cristais de gelo, seguido de sublimação que leva à formação de poros (ASTI; GIOGLIO, 2014; CROISIER; JÉRÔME, 2013). As esponjas fornecem o suporte necessário para a fixação, proliferação, diferenciação e orientação das células a fim de permitir o crescimento de outro tecido (BERNER et al., 2014; MITSUISHI et al., 2013). Quando destinadas à aplicação biológica, materiais biocompatíveis, biodegradáveis e bioabsorvíveis devem ser considerados. As estruturas porosas e interligadas são desejáveis para auxiliar no transporte de nutrientes às células que crescem no interior do arcabouço polimérico. Devido a esse tipo de estrutura, a capacidade de absorção de líquidos e interação com as células é alta. Dependendo do polímero utilizado, as esponjas podem apresentar uma degradação mais rápida e, em casos como a QS, pode apresentar uma vantagem adicional devido à sua atividade cicatrizante (DAI et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2011).

Na literatura, diversos sistemas porosos produzidos com QS para aplicação no segmento de regeneração tecidual e liberação de fármacos são encontrados (BI et al., 2011; HAN et al., 2014; IKEDA et al., 2014; MAHMOUD; SALAMA, 2016; QIAN et al., 2009; SHANMUGASUNDARAM et al., 2001; YAN et al., 2010)

Qian e colaboradores (2009), em seus estudos, obtiveram esponjas de QS e alginato de sódio reticuladas pelo método de liofilização para aplicação em feridas cutâneas. Os dois polímeros são conhecidos por auxiliar no processo de cicatrização. Visando aumentar a capacidade regenerativa, curcumina foi incorporada aos sistemas. Alta capacidade de absorção de água foi observada, a qual variou de 1000 a 4300% para diferentes proporções de QS e alginato de sódio. Tal variação foi associada ao tamanho de poro de cada sistema, o qual foi monitorado por microscopia eletrônica de varredura. Os testes de degradação com lisozima revelaram que as esponjas apresentam propriedades características de um sistema biodegradável. Além disso, a curcumina incorporada nas esponjas apresentou uma liberação controlada por até 20 dias. Em testes *in vivo* utilizando rato como modelo experimental, o sistema poroso mostrou maior performance que o controle (gaze) e a adição de curcumina na esponja potencializou o efeito terapêutico.

O fármaco antimicrobiano norfloxacino também já foi incorporado em esponjas de QS e colágeno (MAHMOUD; SALAMA, 2016). Durante a caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos, observou-se que as propriedades mecânicas eram dependentes do tipo de QS utilizada (cloridrato - HCl ou de baixo peso molecular). A estrutura porosa das esponjas conferiu alta capacidade de absorção de líquidos. Os autores relataram que a força bioadesiva foi maior para os sistemas com QS HCl, comparando-se com QS de baixo peso molecular, devido a maior solubilidade em água. A liberação do norfloxacino foi de quase 100 % em 24 h, apresentando distintos perfis para cada formulação. Nos testes *in vivo*, observou-se uma regeneração tecidual mais rápida para os ratos tratados com as esponjas de QS, colágeno e fármaco, em relação aos animais sem tratamento.

Estudos que associem QS, GNP e aplicação cutânea são dificilmente encontrados, representando uma oportunidade de explorar esse tipo de sistema. Em estudo recente, Ding e colaboradores (2017) desenvolveram esponjas de QS, polissacarídeo de *Bletilla striata* e GNP visando aplicação como curativos. Os sistemas apresentaram altos valores de retenção de água e resultados promissores nos estudos de cicatrização, indicando que a adição de GNP não prejudica a atividade da QS como cicatrizante.

2.5 AGENTES CICATRIZANTES

Na medicina tradicional, muitas plantas são conhecidas por apresentarem atividades que auxiliam na cicatrização. Bancos de dados da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) apresentam 29 espécies de plantas consideradas eficazes pelo uso tradicional para problemas de pele e pequenas feridas e 19 espécies para dores e inflamações (EMA, 2017).

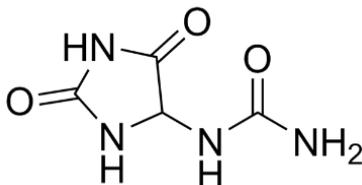
No Brasil, a grande diversidade da flora contribui para o uso de plantas para fins medicinais. Muitas espécies são utilizadas para cicatrização, dentre elas, pode-se citar a *Calendula officinalis*, *Symphytum officinale* L., *Mentha x piperita* L., *Malva parviflora* L., *Aloe arborescens* Mill, *Aloe vera* L. (BATTISTI et al., 2013). Algumas delas são estudadas para verificar a real existência de ação farmacológica e identificar os compostos que auxiliam na atividade. Este é o caso do *Symphytum officinale* L e do *Aloe vera* L. Ambas apresentam estudos que demonstram atividade cicatrizante, podendo ser correlacionados com seus compostos majoritários, a alantoina e aloína, respectivamente (ARAÚJO et al., 2010, 2012; LI et al., 2017).

2.5.1 Alantoína

2.5.1.1 Propriedades físico-químicas

A alantoína (2,5-dioxo-4-imidazolidinil ureia), também conhecida como 5-ureído-hidantoína, é um pó branco, hidrofílico, de baixo peso molecular (PM: 158,121 g/mol) e ponto de fusão em cerca de 225 °C (Figura 10). A solubilidade aquosa é em torno de 5 mg/mL a 25 °C. Trata-se de molécula anfotérica, com pKa de 8,48, log P de -3,4, apresentando quatro e três grupamentos doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente (SCHALI, CHRISTIAN; ROCH-RAMEL, 1980; XU; SUNG; HAN, 2011)(HOFMANN et al., 2010; KIM et al., 2005; MERCK INDEX, 1996; SCHALI, CHRISTIAN; ROCH-RAMEL, 1980; XU; SUNG; HAN, 2011).

Figura 10 - Estrutura química da alantoína



Fonte: Autor

2.5.1.2 Aplicações

A alantoína (ALN) é utilizada em produtos de uso tópico em concentrações variando de 0,5 a 2% (FDA, 2015). Esta molécula pode ser sintetizada ou extraída de plantas tais como *Symphytum officinale*, *Platanus orientalis*, *Aesculus hippocastanum*, *Nelumbo nucifera* (AHN et al., 2014; BECKER et al., 2010; SAVIC et al., 2015). Na literatura, diversas propriedades farmacológicas são atribuídas à ALN, dentre elas, ação cicatrizante, hidratante, queratolítica, regulação da resposta inflamatória, estímulo para a proliferação fibroblástica e síntese de matriz extracelular (ARAÚJO et al., 2010; JORGE et al., 2008; STICKEL; SEITZ, 2000; SWEETMAN, 2013; VERALDI; MENTER; INNOCENTI, 2008). Há relatos do uso da ALN em formulações de aplicação tópica desde o início do século XX devido às suas propriedades cicatrizante, anti-irritante e hidratante (SAITO, M.L.; OLIVEIRA, 1986).

Recentemente, Fedosov e colaboradores (2017) avaliaram a atividade cicatrizante *in vivo* do gel de QS, ALN e taurina (1; 0,5 e 4%, respectivamente). Em um período de monitoramento de 8 dias (n=21), observou-se a completa cicatrização das feridas quatro dias antes que o controle positivo. Quando avaliada durante 35 dias (n=21) e avaliada a atividade em queimaduras, observou-se a cura completa 5 dias antes que o controle, além da diminuição significativa da área de queimadura em 29% no 10º dia. Todos estes resultados positivos foram atribuídos ao efeito sinérgico da QS, ALN e taurina.

O uso da ALN em cosméticos e medicamentos de uso tópico é difundido, porém, poucos estudos da literatura avaliam o mecanismo de ação da molécula frente ao processo de regeneração tecidual. Araújo e colaboradores (2010), por exemplo, avaliaram o perfil cicatricial de emulsões óleo/água contendo 5% de ALN em ratos Wistar (n=60). Emulsões com e sem ALN foram aplicadas durante 14 dias na área da ferida, a qual foi avaliada por planimetria e por análise histológica qualitativa e quantitativa em modelo de ferida aberta. Na análise planimétrica não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Na análise histológica, sugeriu-se que o mecanismo de cicatrização induzido pela ALN ocorre via controle da resposta inflamatória, estímulos à proliferação fibroblástica e síntese de matriz extracelular. A cicatrização nos grupos avaliados com ALN ocorreu de maneira mais intensa e rápida em relação aos grupos controles.

Apesar das suas indicações farmacológicas, a ALN apresenta propriedades físico-químicas como solubilidade em água e baixo valor de log P (-3,14) que podem prejudicar a sua penetração na pele via difusão passiva, reduzindo os efeitos terapêuticos esperados (HOFMANN et al., 2010; MERCK INDEX, 1996).

CAPÍTULO II
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DAS
MATÉRIAS-PRIMAS

3 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DAS MATÉRIAS-PRIMAS

3.1 INTRODUÇÃO

O estudo de compatibilidade entre fármaco e excipientes é de significativa importância durante o desenvolvimento de novas formulações. Por meio deste estudo de pré-formulação, torna-se possível prever algumas interações que podem ocorrer entre as moléculas, as quais são classificadas como físicas ou químicas (CHADHA; BHANDARI, 2014; MCDAID et al., 2003). As interações físicas são responsáveis por causar alterações organolépticas ou na forma polimórfica do insumo farmacêutico ativo (IFA), podendo contribuir com variações no perfil de dissolução, solubilidade e biodisponibilidade. As interações químicas, por sua vez, são caracterizadas por reações químicas entre as moléculas, podendo gerar produtos de degradação tóxicos, além da diminuição da atividade do fármaco (CHADHA; BHANDARI, 2014; WU et al., 2011).

Por outro lado, algumas interações são benéficas e propositivas, como é o caso dos complexos de inclusão entre ciclodextrina e fármacos de baixa solubilidade aquosa. A interação fármaco-polímero pode auxiliar no aumento da solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e atividade *in vivo* do IFA (LONDHE et al., 2018; MENDES et al., 2016; SOLIMAN et al., 2016).

Técnicas termoanalíticas e espectroscópicas são geralmente utilizadas com o propósito de investigar possíveis interações e incompatibilidades. A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é bastante difundida e utilizada há 50 anos na área de pré-formulação (ROUMELI et al., 2013). Nos estudos de compatibilidade, são verificadas alterações nas propriedades térmicas do fármaco, tais como ponto de fusão, energia de entalpia, aparecimento de novos eventos endotérmicos ou exotérmicos, dentre outros aspectos. Outra técnica também muito utilizada na triagem de excipientes é a espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Pela análise dos espectros, é possível prever interações químicas entre as moléculas pela ausência, deslocamento ou ampliação das bandas características dos insumos e excipientes (BHARATE; BHARATE; BAJAJ, 2010; CHADHA; BHANDARI, 2014; PANI et al., 2012).

Em vista da importância desta etapa na fase inicial de desenvolvimento de novas formulações, o presente capítulo teve como objetivo a caracterização das matérias-primas utilizadas nos sistemas

propostos, incluindo a avaliação da compatibilidade entre fármaco e excipientes.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Materiais

A ALN foi adquirida comercialmente da indústria Dinâmica (São Paulo, Brasil - lote 46951). Os excipientes utilizados e seus respectivos lotes e fabricantes estão representados no quadro 1.

Quadro 1 - Excipientes utilizados nos estudos de compatibilidade, com respectivos lotes e fabricantes.

Excipiente	Lote	Fabricante
Quitosana MMW	STBG5137V	Sigma Aldrich
Genipina	-	Challange Bioproducts
Carbonato de sódio	041333	Vetec
Sorbitol 70%	512591SO	Exodo

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Caracterização das matérias-primas e estudo de compatibilidade entre fármaco e excipientes

As membranas e esponjas de QS obtidas nos Capítulos III e IV, são formadas por QS, carbonato de sódio (Na_2CO_3), ALN e, nos sistemas reticuladas, adicionou-se também a GNP. Para aumentar a flexibilidade e maleabilidade das membranas, foi selecionado um agente plastificante, uma solução aquosa de sorbitol a 70% (m/V) (SBT). A caracterização das matérias-primas e os estudos de compatibilidade entre ALN e os excipientes foram realizados pelas técnicas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As amostras foram preparadas na proporção 1:1 (m/m) de ALN e excipiente, misturadas com auxílio de uma espátula. Para a ALN e mistura física (MF) de ALN+SBT, foram realizadas técnicas complementares como termogravimetria (TGA), microscopia óptica acoplada com placa com aquecimento (*Hot stage*) e difração de raios-X (DRX).

3.2.2.1.1 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil), em uma faixa espectral de 600 a 4000 cm^{-1} , com uma média de 32 scans, considerando-se uma resolução espectral de 4 cm^{-1} .

3.2.2.1.2 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

As curvas de DSC foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão), utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados (modelo 201-52943) com aproximadamente 2 mg de amostra. A faixa de temperatura analisada foi de 25 a 270 $^{\circ}\text{C}$, a uma razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2) de 100 mL/min. Os dados obtidos foram processados em software TA-60. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de referência índio (ponto de fusão: 156,6 $^{\circ}\text{C}$, entalpia de fusão = 28,54 J/g) e zinco (ponto de fusão 419,6 $^{\circ}\text{C}$).

3.2.2.1.3 *Termogravimetria (TGA)*

Análises termogravimétricas foram realizadas em termobalança TGA-50 (Shimadzu, Kioto, Japão) na faixa de temperatura de 25 a 800 $^{\circ}\text{C}$ para ALN pura e 25 a 400 $^{\circ}\text{C}$ para o SBT e a MF de ALN+SBT (1:1 m/m). Utilizou-se cadinho de platina com aproximadamente 8 mg de amostra, atmosfera dinâmica de N_2 (fluxo de 100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.2.2.1.4 *Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento*

Ensaio de microscopia com aquecimento para as matérias-primas ALN, SBT e mistura física (ALN+SBT) foram realizados em microscópio Olympus CX41RF (Tóquio, Japão), acoplado com um sistema de controle de temperatura digital MQDCT-31 (Microquímica, Campinas, Brasil). As amostras foram aquecidas em razão de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até sua fusão total.

3.2.2.1.5 Difração de raios-X (DRX)

Os difratogramas da MF ALN+SBT (1:1 m/m) foram obtidos em equipamento θ - θ D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre Ka ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando em corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV, equipado com detector de cintilação unidimensional LINXEYE. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, através de varredura angular a 2θ na faixa de 5 a 40° e com incremento de $0,091^\circ/s$.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização das matérias-primas e estudo de compatibilidade entre fármaco e excipientes

3.3.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR da ALN (Figura 11) é caracterizado pela presença de bandas em 3435 cm^{-1} , atribuída às vibrações de estiramento do grupo $-\text{NH}_2$, bem como bandas em 3338 e 1777 cm^{-1} referentes ao estiramento dos grupos $-\text{NH}$ e $-\text{C}=\text{O}$ do anel de hidantoína, respectivamente. A banda em 1525 cm^{-1} , por sua vez, está associada à deformação angular do grupo $-\text{NH}$ da imida. Já o estiramento do anel de hidantoína é representado pela banda em 1059 cm^{-1} (KUŞ; BAYARI; FAUSTO, 2009; SOCIETY OF JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2001).

Para a QS de médio peso molecular (QS MMW) bandas na região de 3292 cm^{-1} são associadas ao estiramento dos grupamentos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$ (Figura 11). Já as vibrações na região de 2850 a 2950 cm^{-1} devem-se a deformação axial do grupamento $-\text{CH}_2$. As bandas em 1647 , 1375 e 1026 cm^{-1} são atribuídas às vibrações da amida primária, estiramento simétrico do grupo $-\text{CH}_3$ e $-\text{COC}$, respectivamente (HOSSEINI et al., 2015; KIM, 2010; LAWRIE et al., 2007). As unidades monoméricas da QS são representadas pelo anel piranosídeo, as quais apresentam bandas características entre as regiões de 1151 e 844 cm^{-1} (ALHOSSEINI et al., 2012).

Figura 11 - Espectro de FTIR da ALN, QS MMW, SBT, GNP e Na_2CO_3 .

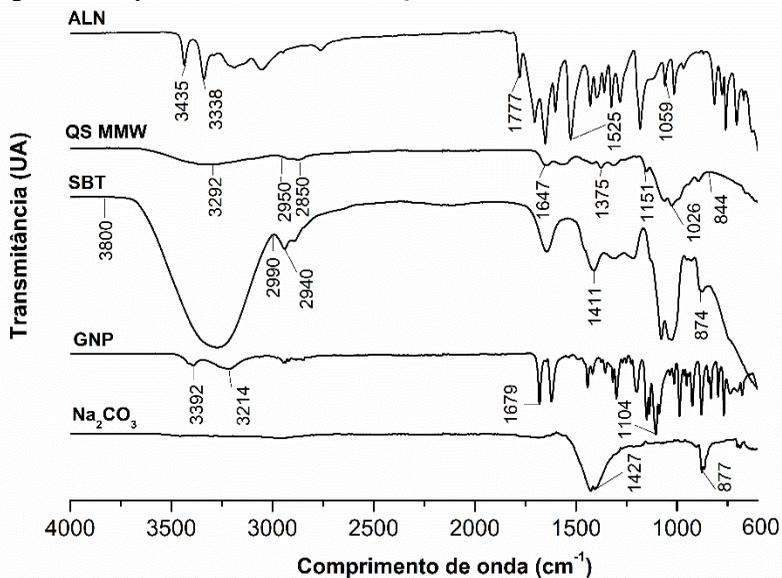
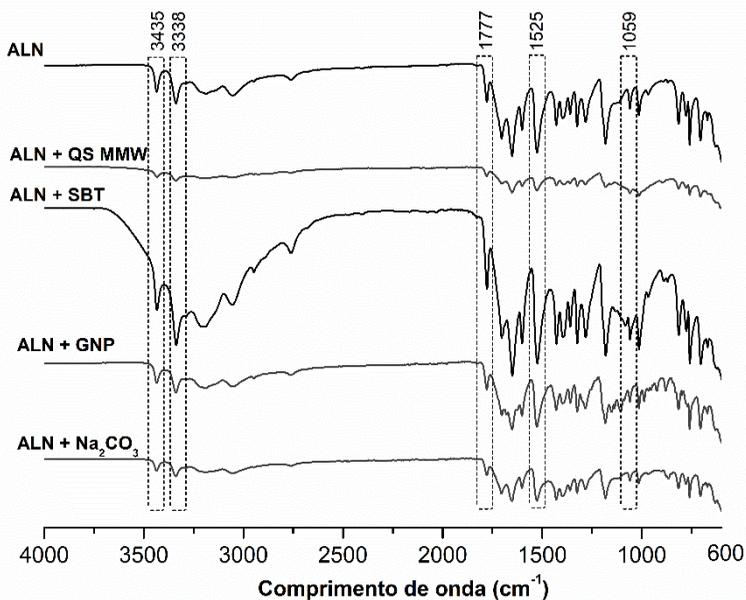


Figura 12 - Espectro de FTIR da ALN e misturas físicas com QS MMW, SBT, GNP e Na_2CO_3 na proporção 1:1 (m/m)



O agente plastificante SBT (Figura 11) apresenta uma banda alargada na região entre 3800 e 2990 cm^{-1} , a qual é referente ao estiramento do grupo -OH . A largura da banda está relacionada com a movimentação do grupamento, além da sobreposição com o estiramento dos grupos -CH . (SIBIK; KORTER; ZEITLER, 2015). A banda em 2940 cm^{-1} também é referente à deformação axial dos grupos -CH . Na região de 1411 e 874 cm^{-1} , as bandas são atribuídas as vibrações dos grupamentos -OH do SBT (DE CASTRO; CASSELLA, 2016; KAVIYA; SANTHANALAKSHMI; VISWANATHAN, 2011; S. QUINQUENET, 1988).

Para a GNP, bandas características na região de 3392 e 3214 cm^{-1} são referentes ao estiramento do ligante -OH livre e -OH em ligação de hidrogênio intermolecular, respectivamente (Figura 11). As bandas em 1679 cm^{-1} e 1104 cm^{-1} são atribuídas aos grupamentos -C=O e C=C (ciclo alqueno) (FONSÊCA, 2015; MI; SHYU; PENG, 2005; MI; SUNG; SHYU, 2000).

O sal Na_2CO_3 (Figura 11) é caracterizado pelas bandas em 1427 cm^{-1} e 877 cm^{-1} (JOSHI; KALYANASUNDARAM; BALASUBRAMANIAN, 2013; MILLER; WILKINS, 1952).

Analisando os espectros de FTIR das misturas físicas 1:1 (m/m) entre ALN e cada excipiente da formulação, deslocamentos, ausência, ou ampliação nas bandas características do ativo não foram observados (

Figura 12). Desta forma, pela análise dos resultados de FTIR, pode-se concluir que não foram constatadas interações químicas ou incompatibilidades entre fármaco e excipiente.

3.3.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) & Termogravimetria (TGA)

A ALN é caracterizada pela presença de um evento endotérmico de fusão em $233\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H=292,27\text{ J/g}$), seguida de degradação térmica em três diferentes estágios – nas temperaturas de $271\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 27,70\%$), $329\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 14,93\%$) e $453\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 26,52\%$) (Figura 13).

A QS MMW (Figura 14) apresenta um evento endotérmico antes de $100\text{ }^\circ\text{C}$ associado à evaporação da água adsorvida (CORAZZARI et al., 2015). As cadeias poliméricas da QS podem passar de um estado vítreo para um estado de maior mobilidade molecular devido à relaxação ao longo de toda cadeia polimérica, chamado de estado elástico. Esta alteração de estado é caracterizada pela temperatura de transição vítrea (T_g) (CASSU; FELISBERTI, 2005; MENCZEL, 2009). Na literatura são encontradas diferentes temperaturas de T_g para a QS, variando de acordo

com a técnica, material, condições experimentais, entre outros fatores (DONG et al., 2004; SAKURAI; MAEGAWA; TAKAHASHI, 2000; ZHANG et al., 2003). Na curva de DSC da QS MMW não foi possível verificar o evento de T_g do polímero (Figura 14). Devido à alta higroscopicidade do polímero, torna-se difícil a determinação da T_g desses materiais por DSC, uma vez que a interação com a água dificulta a organização das moléculas de QS (ANDRZEJEWSKI, 2017; CORAZZARI et al., 2015; IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, 2014; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). O sal de Na₂CO₃ não apresentou alterações térmicas na faixa de temperatura estudada, pois sua fusão ocorre em 858 °C (LIDE, 2005).

O plastificante SBT é uma solução aquosa a 70% (m/V) e sua curva de DSC (Figura 14) é caracterizada por um evento endotérmico alargado em 122 °C ($\Delta H = 254,00$ J/g) o qual está associado a perda da água do material (MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010). Já o agente reticulante GNP apresentou evento de fusão em 120 °C ($\Delta H = 141,47$ J/g).

As curvas de DSC para as misturas físicas evidenciaram que os excipientes QS MMW, Na₂CO₃ e GNP não causaram alterações na temperatura de fusão da ALN (Quadro 2 e Figura 14). Essa ausência de deslocamento no evento de fusão é indicativa de que não há interação entre fármaco-excipiente no estado sólido frente à taxa de aquecimento.

Embora o evento endotérmico característico do SBT tenha sido mantido durante a mistura física com a ALN, foi observado uma diminuição na temperatura de fusão do fármaco para 207 °C ($\Delta H = 42,85$ J/g) (Figura 14). A análise por TGA foi realizada para complementar a análise térmica da mistura (Figura 15). A curva TGA evidencia que há três perdas de massa até a temperatura de 400 °C. A primeira em 132 °C ($\Delta m = 2,25$ %), relacionada com a perda de água do SBT, a segunda em 242 °C ($\Delta m = 27,24$ %) e terceira perda em 277 °C ($\Delta m = 23,19$ %). Estas duas últimas perdas estão relacionadas com a evaporação do SBT e degradação da ALN (Figura 16 e Figura 13), respectivamente.

Quadro 2 - Temperatura de fusão da ALN nas misturas físicas com QS MMW, SBT, Na₂CO₃ e GNP.

Mistura física	T _{peak} (°C) ^a	ΔH (J/g)
ALN:QS MMW	234,23	210,50
ALN:SBT	207,66	42,85
ALN:Na ₂ CO ₃	233,90	137,41
ALN:GNP	234,09	131,79

^a T_{peak} é a temperatura do evento de fusão

Figura 13 - Curvas de DSC e TGA da matéria prima ALN.

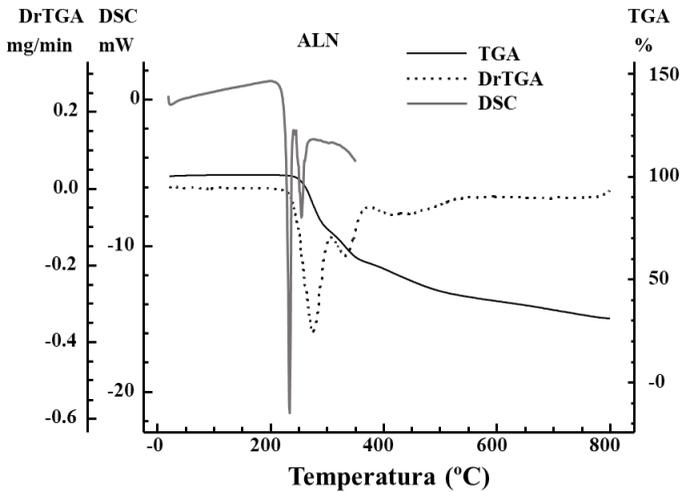


Figura 14 - Curvas de DSC obtidas para matérias primas ALN, QS MMW, SBT, GNP, Na_2CO_3 e respectivas misturas físicas na proporção 1:1 (m/m).

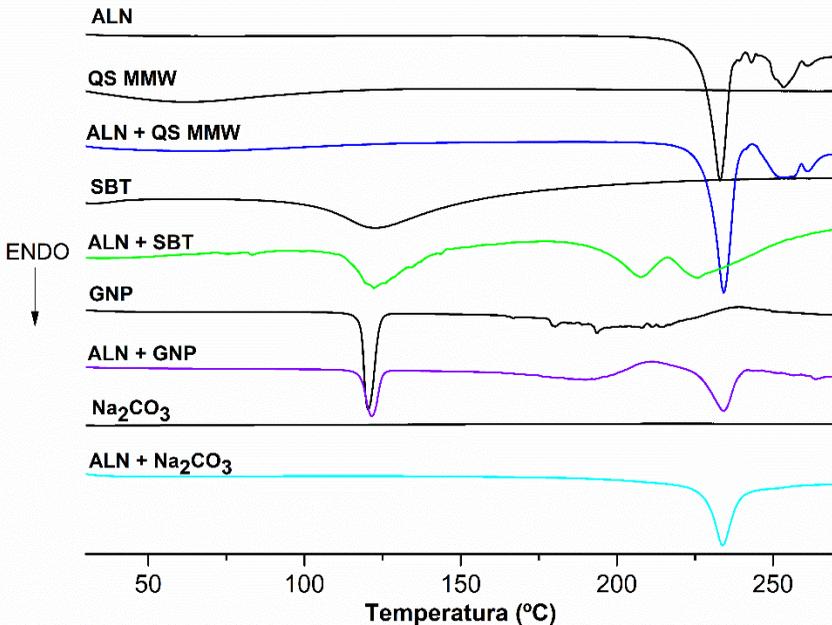


Figura 15 - Curva de DSC e TGA da mistura física ALN + SBT (1:1 m/m).

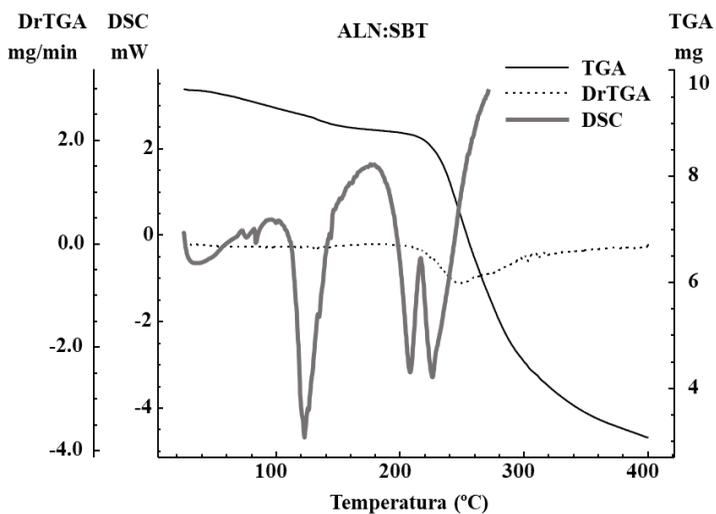
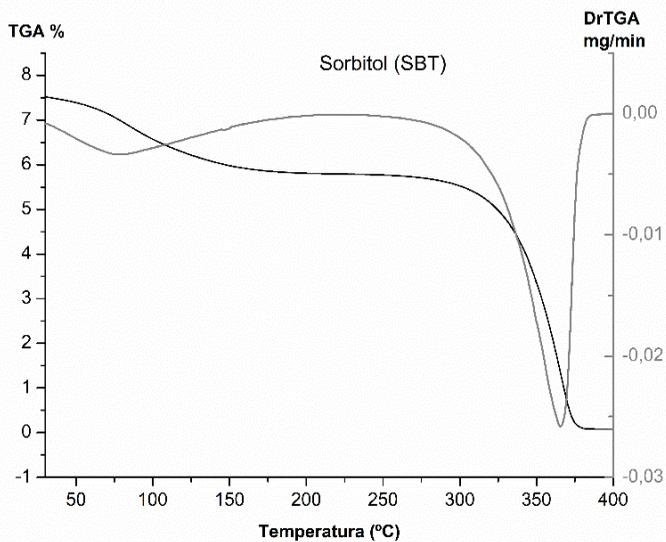


Figura 16 - Curva de TGA da matéria-prima de SBT.



3.3.1.3 Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento

A análise de microscopia com estágio de aquecimento para as matérias-primas exibiu a evaporação da água do SBT em 120 °C (Figura 17 B3) e a fusão da ALN em aproximadamente 224 °C (Figura 17 A2), seguido de degradação em 241 °C (Figura 17 A3). Embora a mistura física tenha apresentado uma temperatura de evaporação da água do SBT também em 120 °C, a fusão e degradação da ALN ocorreram em 217 e 222 °C, respectivamente (Figura 17 C3; C5; C6). Por meio desta técnica, pode-se observar variações na temperatura de fusão e degradação da ALN na mistura física, reforçando a interação entre SBT e ALN. Visto que a ALN é solúvel em SBT (1% m/m) e em água (0,5% m/m), a interação física evidenciada pelas três técnicas térmicas pode estar relacionada com a solubilização parcial do fármaco no excipiente, que é pronunciada com o aumento da temperatura (AKEMA, 2006). A diminuição da energia de entalpia de fusão da ALN ($\Delta H = 42,85$ J/g), em relação ao fármaco puro ($\Delta H = 292,27$ J/g), e as demais misturas físicas (Quadro 2), indica que foi absorvida uma quantidade menor de energia para fundir o fármaco na presença de SBT.

3.3.1.4 Difração de raios-X (DRX)

Para finalizar os estudos de pré-formulação e investigar se a mistura física de ALN e SBT altera a cristalinidade (perfil de difração) do fármaco, utilizou-se a técnica de DRX. Por meio das análises, pode-se observar que os picos de difração presentes na matéria-prima de ALN também estão presentes na mistura física com SBT, ambas analisadas em temperatura ambiente (Figura 18). Além disso, algumas reflexões estão em menor intensidade na MF. A redução na intensidade das reflexões pode estar relacionada com a diminuição da cristalinidade do ativo frente à solubilização no SBT (CHANGDEO; VINOD; SHANKAR, 2011; LIAN et al., 2016).

A ALN é amplamente utilizada em formulações em associação com SBT, uma vez que a solubilização do ativo é facilitada na presença do poliálcool (AKEMA, 2006; ARAÚJO et al., 2010; HWANG et al., 2011). Não há relatos na literatura de incompatibilidades entre os dois insumos.

Figura 17 - Ensaio de microscopia com estágio de aquecimento, em que A, B e C representam a ALN, SBT e a MF ALN+SBT, respectivamente.

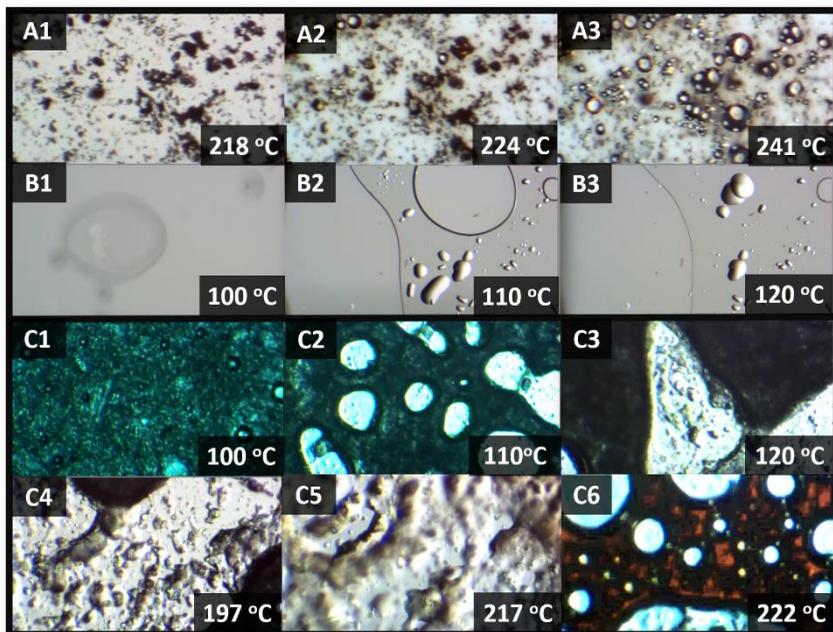
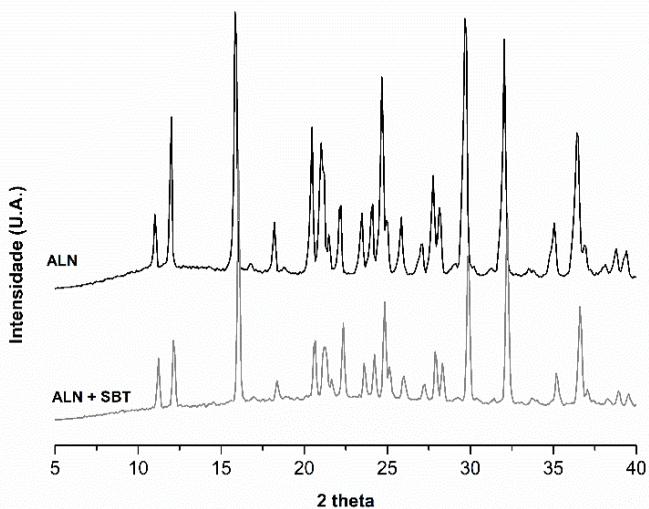


Figura 18 - Resultado das análises por DRX obtidas para a matéria prima ALN e a MF ALN+SBT (1:1 m/m).



3.4 CONCLUSÕES

Não foram observados deslocamentos, ausência ou ampliação nas bandas características do ativo pela técnica de FTIR, sugerindo a ausência de interações químicas entre fármaco e excipiente. Pela técnica de DSC, não foram observados deslocamentos para o evento de fusão da ALN, exceto para a mistura com SBT (1:1 m/m). O ativo puro apresenta fusão em 233 °C, já na mistura física essa temperatura reduz para 207 °C. Técnicas complementares como TGA, microscopia óptica com aquecimento e DRX foram utilizadas para elucidar o tipo de interação entre ALN e SBT. Com o auxílio destas técnicas pode-se concluir que ocorre uma diminuição na temperatura de fusão e degradação da ALN devido à solubilização parcial do ativo no excipiente, pronunciada com o aumento de temperatura. Esta interação física não influencia negativamente na formulação e, por este motivo, todos os excipientes aqui testados foram utilizados no preparo de membranas e esponjas poliméricas.

CAPÍTULO III
PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS
MEMBRANAS DE QUITOSANA E ALANTOÍNA

4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E ALANTOÍNA

4.1 INTRODUÇÃO

A QS, por ser um biopolímero com baixa ou nenhuma toxicidade, biocompatível e biodegradável, é amplamente estudada na área médica. Na literatura, são relatadas atividades antimicrobiana, coagulante, analgésica e cicatrizante para esse polímero, o que o torna um candidato ideal para inclusão em formulações que visam à cicatrização tecidual (AZAD et al., 2004; JAYAKUMAR et al., 2011; LECETA et al., 2015; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Comercialmente, já são encontrados vários curativos cicatrizantes contendo QS, dentre eles, podem-se citar o Tegasorb[®], Tegaderm[®], Trauma DEX[®] e HemCon Bandage[™] (JAYAKUMAR et al., 2011)

Sistemas do tipo membranas e filmes poliméricos representam uma alternativa de curativo, uma vez que permitem trocas gasosas, são barreira de proteção contra microorganismos e auxiliam na absorção do excesso de exsudatos. Azad e colaboradores (2004) desenvolveram membranas de QS para aplicação sobre tecidos lesionados, na qual mostrou um efeito positivo sobre a reepitelização e a regeneração da camada granular da pele.

Campos e colaboradores (2015) realizaram estudo com membranas neutralizadas de QS, como uma alternativa para substituição cutânea. Além de apresentarem flexibilidade aumentada e ausência de citotoxicidade, observou-se um efeito sobre a proliferação celular. No ensaio de viabilidade celular, as membranas ácidas apresentaram quantidades menores de células viáveis aderidas ao substrato, comparando-se com as membranas neutras. Os autores relacionam esses resultados aos resíduos ácidos da membrana, concluindo que a neutralização é uma etapa muito importante na produção dos sistemas propostos.

Recentemente, Fedosov e colaboradores (2017) avaliaram a atividade cicatrizante do gel de QS, ALN e taurina. Observou-se a completa cicatrização das feridas quatro dias antes que o controle positivo utilizado, considerando-se oito dias de experimento. Além disso, quando avaliada atividade em queimaduras, obteve-se melhora em 28% em relação à eficiência do controle. Tais resultados foram atribuídos ao efeito sinérgico da QS, ALN e taurina.

Os agentes reticulantes são pequenas moléculas com grupamentos reativos capazes de interagir com os polímeros. Pode-se citar o

tripolifostato de sódio, genipina e glutaraldeído como exemplos de reticulantes utilizados com a QS. A adição dessas moléculas em membranas de QS pode modular a liberação do fármaco, conferir maior estabilidade e alterar as propriedades mecânicas do sistema (GONSALVES, 2011; JIN; SONG; HOURSTON, 2004; LI et al., 2015; SONG et al., 2018).

Em virtude do cenário exposto, o presente capítulo tem por objetivo demonstrar a preparação e caracterizar membranas neutralizadas de QS e ALN, bem como verificar a influência da adição da ALN, SBT e GNP nos sistemas propostos.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Materiais

Para o desenvolvimento das membranas poliméricas foram utilizados ALN e os excipientes previamente obtidos e caracterizados conforme descrito no Capítulo II. A solução tampão PBS (pH 7,4) foi preparada de acordo com protocolos padronizados (COLD SPRING HARB PROTOC; 2012). Os reagentes utilizados (carbonato de sódio, hidróxido de sódio, ácido acético, ácido fosfórico) são de pureza analítica. A água ultrapura foi obtida a partir de sistema Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, USA).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparação das membranas de quitosana e alantoína

As membranas poliméricas foram obtidas a partir de uma solução (gel) a 2 % (m/V) de QS MMW preparada com uma solução de ácido acético a 0,1 M. A quantidade de sal carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi estabelecida por titulação, utilizando um pHmetro portátil modelo PG1400 (Gehaka, Brasil). Um volume conhecido de solução de QS 2% (m/V) foi mantido sob agitação magnética e alíquotas de 1 mL de Na_2CO_3 (1M) foram adicionadas lentamente até a solução atingir pH 7,0. Com base nos resultados, foi estabelecida a quantidade de 0,71 % (m/m) de Na_2CO_3 para a quantidade de QS acima especificada (2 % m/V) (ANDRZEJEWSKI, 2017)

Nas membranas reticuladas, adicionou-se 1 mM de genipina (GNP) ao gel de QS. As quantidades de Na_2CO_3 e GNP foram previamente estabelecidas em outro trabalho realizado no Laboratório

Polimat do Departamento de Química da UFSC, pelo aluno Rafael Andrzejewski, orientado pelo Prof. Dr. Alexandre Luis Parize.

Para aumentar a flexibilidade e maleabilidade das membranas, considerou-se uma concentração de SBT (solução a 70%, cálculos baseados na massa total da solução) de 2,5 e 5 % em relação à massa total da formulação. Para a ALN, adicionou-se uma concentração que, ao final do processo de secagem, permanecesse em 5 % (m/m). Essa concentração final de ALN foi baseada em estudo *in vivo* da literatura (ARAÚJO et al., 2010). As quantidades em porcentagem de cada excipiente e ALN estão descritas no Quadro 3. Para padronizar a espessura das membranas, foi utilizada uma razão de 0,3 g de gel para cada cm² de área da placa de Teflon™ (12 cm de diâmetro).

O processo de preparação das membranas seguiu uma ordem de adição dos componentes. Inicialmente, pesou-se a QS 2 %, SBT, ALN e GNP, formando um gel. Estes três últimos, quando aplicados, foram agitados durante 1 h com agitação magnética para garantir a homogeneização completa dos componentes. O sal (Na₂CO₃) foi pesado separadamente e solubilizado em 10 mL de água destilada. Na sequência, o gel foi adicionado à solução de Na₂CO₃ diretamente na placa e homogeneizado por agitação magnética. Após este processo, a placa foi mantida por 3 min em banho de ultrassom para retirada das bolhas do gel. Na etapa final de secagem, as placas foram acondicionadas em estufa a 40 °C por 24 h ou até a perda de 95% de massa. Após a retirada da estufa, as membranas foram armazenadas em dessecador e protegidas com papel alumínio.

Quadro 3 - Proporções das matérias primas para obtenção das membranas Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN, Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.

MEMBRANA	QS 2% (%)	ALN (%)	SBT (%)	GNP (%)	Na₂CO₃ (%)
Q Branca ¹	99,30				0,70
Q ALN	99,05	0,25			0,70
Q-S 2,5% Branca	96,83		2,50		0,68
Q-S 2,5% ALN	96,59	0,25	2,50		0,68
Q-S 5% Branca	94,37		5,00		0,67
Q-S 5% ALN	94,06	0,33	5,00		0,66
Q-G Branca	99,28			0,02	0,70
Q-G ALN	99,02	0,25		0,02	0,70
Q-G-S 2,5% Branca	96,81		2,50	0,02	0,68
Q-G-S 2,5% ALN	96,57	0,25	2,50	0,02	0,68
Q-G-S 5% Branca	94,35		5,00	0,02	0,67
Q-G-S 5% ALN	94,04	0,33	5,00	0,02	0,66

¹ A nomenclatura de cada membrana foi baseada na sua composição. A letra Q significa a presença de quitosana, a letra G de genipina, a letra S de sorbitol, as concentrações de 2,5 e 5 % estão relacionadas a concentração inicial de SBT. A presença do ativo nas membranas foi representada pela sigla ALN, já as membranas placebo, ou seja, sem ALN, foram nominadas “brancas”.

4.2.2.2 Caracterização físico-química e morfológica

As membranas desenvolvidas foram caracterizadas quanto às suas propriedades físicas, químicas e morfológicas por técnicas difundidas na área de membranas poliméricas.

4.2.2.2.1 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de absorção na região do infravermelho das membranas foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil) em uma faixa espectral de 600 a 4000 cm^{-1} , com uma média de 32 scans, na resolução do espectro de 4 cm^{-1} .

4.2.2.2.2 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

As curvas DSC foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) utilizando cadinhos de alumínio (modelo 201-52943) hermeticamente fechados com aproximadamente 5 mg de membrana. Foram realizadas duas curvas de aquecimento para cada amostra, a primeira na faixa de 30 a 150 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica nitrogênio (N_2) de 100 mL/min. Após o resfriamento do sistema, as amostras foram submetidas a segunda curva de aquecimento de 30 °C a 270 °C, na razão de aquecimento de 5 °C/min e fluxo de N_2 de 100 mL/min. A primeira etapa teve como objetivo retirar a água ainda presente no sistema, apagando o histórico térmico das membranas (DONG et al., 2004; IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, 2014; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Este procedimento é realizado para facilitar a visualização dos eventos de transição vítrea (T_g) na segunda curva. Os dados obtidos foram processados em software TA-60.

4.2.2.2.3 *Difração de raios-X (DRX)*

Os difratogramas foram obtidos em equipamento θ - θ D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando em corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV, equipado com detector de cintilação unidimensional LINXEYE. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, através de varredura angular a 2θ na faixa de 5 a 40° e com incremento de 0,091°/s.

4.2.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME). As fotomicrografias das membranas foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390 LV (Jeol, Japão), sob voltagem de aceleração de 10 kV, em diferentes aumentos. A preparação prévia das amostras envolveu a fixação das membranas com fita adesiva dupla face em *stubs* e recobrimento com ouro em metalizador EM SCD 500 (Leica, Áustria). Foram analisadas a superfície das membranas e porções fraturadas obtidas a partir da submersão das membranas em N₂ líquido, seguido da quebra do material.

4.2.2.3 Avaliação do ângulo de contato e molhabilidade

As medidas de ângulo de contato foram realizadas com adaptações da metodologia de Pozzo e colaboradores (2018), na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC (EQA/UFSC), em um goniômetro do tipo Ramé-Hart 250 (Ramé-Hart Instrument Co., Estados Unidos), utilizando o método da gota sêssil. Os ensaios foram conduzidos em temperatura ambiente e com volume de gota de 10 µL.

Nesse método da gota sêssil, uma gota com volume fixo do líquido de escolha é depositada por uma seringa na superfície a ser estudada. O líquido se espalha pelo material e em certo momento atinge equilíbrio. A tangente do ângulo de contato entre o sólido e o líquido determina a molhabilidade e/ou hidrofobicidade relativa da superfície do material (AL-NAAMANI; DOBRETSOV; DUTTA, 2016; ZHANG et al., 2017). Para valores de ângulo de contato acima de 90°, a superfície pode ser considerada hidrofóbica. Caso contrário, a superfície é considerada hidrofílica (MA et al., 2017; SIDDIQA et al., 2017).

O ângulo de contato entre as membranas e a água foi obtido por meio de uma câmera acoplada ao *software* de análise de imagem do equipamento, o qual determina o valor do ângulo a partir do tratamento das imagens obtidas. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.4 Ensaio de bioadesão

Para a análise de bioadesão utilizou-se como modelo experimental pele de orelha de porco, adaptando metodologias já descritas na literatura (BREDENBERG; NYSTRÖM, 2003;

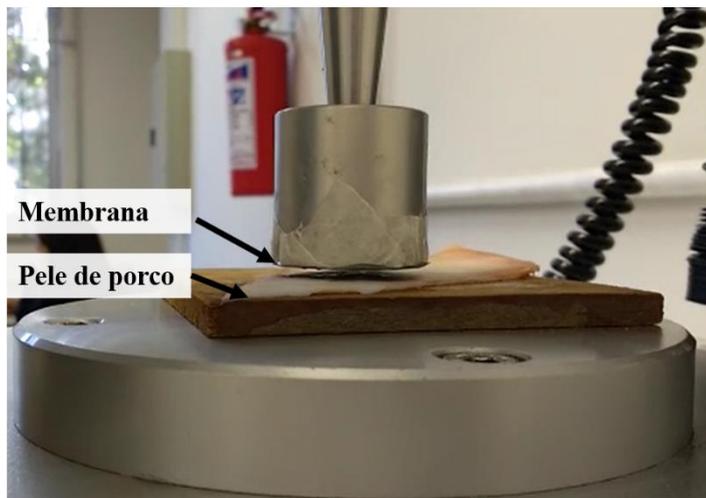
DONNELLY et al., 2006; GONÇALEZ, 2012). Os testes foram realizados na Central de Análises do EQA/UFSC, em texturômetro TA.HD plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), por meio do teste de compressão. Os parâmetros utilizados estão descritos no quadro 4. A força máxima de separação (força bioadesiva) foi obtida através do gráfico de força (N) *versus* tempo de desprendimento (s). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, com a mesma membrana e adição de volume fixo de 25 µL de tampão PBS antes de cada medida.

Quadro 4 - Parâmetros utilizados no teste de bioadesão.

Parâmetro	Valores
Velocidade de descida	1 mm/s
Tempo de contato	30 s
Força de gatilho	5 mN
Velocidade de subida	0,5 mm/s
Temperatura	25 °C

As orelhas suínas foram obtidas em um frigorífero local, situado na cidade de Antônio Carlos (SC) e armazenadas em tampão Krebs a 4°C até o processamento. As camadas mais externas, ou seja, derme e epiderme ($1,00 \pm 0,005$ mm) foram manualmente separadas da hipoderme com auxílio de bisturi. As amostras foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -20 °C até o momento da utilização. O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25 °C), com adição da solução tampão PBS refrigerada (4 °C). As membranas foram cortadas nas mesmas dimensões da superfície circular da sonda (35 mm de diâmetro) e coladas com auxílio de fita dupla face. Já a pele de orelha de porco foi colada em placa de madeira com cola de cianoacrilato (Figura 19).

Figura 19 -Teste de bioadesão realizado em texturômetro utilizando pele de orelha de porco como modelo de membrana.



4.2.2.5 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da alantoína

Os ensaios de liberação *in vitro* das membranas de QS foram realizados em incubadora do tipo *shaker* modelo NT 715 (Novatecnica, Brasil) em erlenmeyer contendo 20 mL de tampão PBS (pH 7,4) sob agitação de 50 rpm e temperatura de $32 \pm 0,5$ °C. O método utilizado foi adaptado da United State Pharmacopeia (USP) 40 <724> (USP, 2017). Quantidades de membrana equivalentes a 2,5 mg de ALN foram pesadas (aproximadamente 50 mg). O ensaio foi realizado para as misturas físicas de cada membrana, pesando-se com precisão a mesma quantidade de ALN. Alíquotas de 500 μ L foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 min. As amostras foram diluídas, filtradas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método de quantificação foi adaptado de Assonuma (2009) e validado de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 166, de 24 de Julho de 2017 (ANVISA, 2017) seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão, seletividade e robustez.

As análises de quantificação foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10A, degasei DGU-14A, detector de luz UV SPD-10A e unidade controladora

de sistema SCL-10AVP. A aquisição dos dados foi realizada por meio do software CLASS-VP® V 6.14. A separação do analito de interesse foi realizada em coluna de fase reversa Phenomenex Gemini® C18 (250 x 4,6 mm; 5µm) em comprimento de onda de 210 nm, temperatura do forno de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 20 µL e fase móvel água pH 3 (ajustado com ácido fosfórico). A curva de calibração analítica foi realizada na faixa de 3,125 – 50 µg/mL.

Com auxílio do *software Add-in DD-Solver®*, foi possível determinar o modelo de cinética de liberação de ALN nas membranas de QS. Foram testadas todas opções de cinética do *software*, como os modelos de *Weibull*, *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas*, ordem zero, entre outros. A cinética que apresentou maior valor de R^2 foi selecionada para representar a liberação do ativo. Parâmetros como eficiência de liberação (EL) e coeficiente difusional (n), também foram calculados para as membranas.

4.2.2.6 Determinação do grau de intumescimento (GI)

A determinação do grau de intumescimento das membranas foi realizada em soluções tampão PBS pH 7,4, adaptando-se metodologia de Bispo e colaboradores (2010). As membranas foram cortadas todas na mesma dimensão e formato (1 cm x 1 cm), secas em estufa a 80°C por 1 h e pesadas antes de iniciar o experimento. As amostras foram mantidas sem agitação no tampão PBS a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em incubadora do tipo *shaker* modelo NT 715 (Novatecnica, Brasil). Em intervalos de tempos pré-estabelecidos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 min, as membranas foram retiradas do meio, secas em papel absorvente para retirar o excesso de solução e pesadas novamente. O estudo foi realizado em triplicata. O GI de cada amostra no tempo t foi calculado pela equação 1.

$$GI(\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde, M_t é a massa da amostra no tempo t e M_0 a massa inicial da amostra.

4.2.2.7 Ensaio de erosão das membranas de QS

A determinação da erosão das membranas em meio aquoso foi realizada após 24 h do experimento de determinação do grau de intumescimento. Ao final desse intervalo de tempo, as soluções tampão foram filtradas e o sólido retido foi colocada em estufa a 60°C por 24 h, até completa secagem. A erosão (E) foi calculada de acordo com a equação 2.

$$E(\%) = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde, M_t se refere ao peso da amostra após 24 h e M_0 se refere a massa inicial da membrana.

4.2.2.8 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente pelo método oficial ASTM E96-00 (ASTM, 2000). O teste foi realizado com auxílio de um dispositivo para medida de permeabilidade ao vapor de água. As membranas foram cortadas em forma circular (área= 20 cm²) e a espessura medida em quintuplicata com micrômetro modelo 102-301 com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm (Mitutoyo, Japão). Na sequência, as amostras foram colocadas em cápsula contendo sílica, vedada com uma mistura de parafina e cera microcristalina. Nessas condições, o ambiente interno da cápsula atinge umidade relativa (UR) de 2%. As cápsulas foram armazenadas em cubas contendo solução saturada de NaCl, (UR 75%), a 25 °C. As mesmas foram pesadas em intervalos de 30 min até 6 h. O valor de permeabilidade ao vapor de água (K^w) foi determinado pela equação 3.

$$K^w = \frac{W \cdot \delta}{S \cdot p_s \cdot (a_{w1} - a_{w2})} \quad (3)$$

Onde, $W = g/t$, sendo g o ganho de massa da célula de difusão e t o tempo. Este dado foi calculado por regressão linear e é representado pelo coeficiente angular da reta; δ = espessura média dos filmes analisados (m); S = área de permeação (0,0020 m²); p_s = pressão de saturação do vapor de água à temperatura do ensaio, 25 °C, (3167 Pa);

a_{w1} = umidade relativa dentro da cuba e a_{w2} = umidade relativa dentro da célula de difusão.

Para a obtenção de valor de taxa de transmissão de vapor de água (TVA), foram considerados os valores de ganho de massa de 24 h. A equação 4 descreve o cálculo de TVA.

$$TVA = \frac{m}{A} \quad (4)$$

Onde, m = ganho de massa da célula de difusão em 24h (g); A= área de permeação (0,0020 m²).

4.2.2.9 Determinação das propriedades mecânicas das membranas de QS e ALN

As propriedades mecânicas das membranas como deformação na ruptura, resistência à tração e módulo de elasticidade (módulo de Young) foram obtidos em texturômetro TA.HD plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), controlado pelo software Exponent Stable Micro System[®], com célula de carga de 50 kgf. Para o teste de tração, considerou-se o método oficial D882-12 (ASTM, 2012), que compreende a determinação das propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes, com espessura menor do que 1,0 mm. A velocidade de tração utilizada foi de 1 mm/s e a distância inicial da probe de 50 mm.

Para se obter os valores de tensão e deformação, foi necessário alimentar o software com as dimensões dos corpos de prova. Para isso, a espessura das membranas foi medida utilizando micrômetro modelo 102-301 (Mitutoyo, Japão) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm.

O cálculo do módulo de elasticidade (E) das amostras foi realizado de acordo com a equação 5.

$$\tau = E \cdot \varepsilon \quad (5)$$

Onde, τ é a tensão (MPa), ε a deformação (%) e E é o módulo de elasticidade (MPa).

4.2.2.10 Ensaios de permeação cutânea *ex vivo*

A permeação cutânea da ALN pura (controle) e das duas membranas de QS (Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN) foi avaliada utilizando-se metodologias já descritas na literatura (BAVARSD et al., 2016; CAON et al., 2015). O modelo de membrana selecionado foi a pele de orelha de porco devido à similaridade anatômicas, bioquímica e fisiológica em relação à pele humana (CAON et al., 2015; JUNG; MAIBACH, 2015; SIMON; MAIBACH, 1982). As orelhas de porco foram obtidas e processadas conforme metodologia previamente descrita (item 4.2.2.4).

As câmaras de Franz foram alocadas em banho termostatzado a 37 °C e o sistema de agitação magnética foi ajustado para 800 rpm. O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de tampão PBS. Não foi necessária a adição de agente solubilizante já que o fármaco apresenta alta solubilidade aquosa. O tecido foi disposto na interface dos compartimentos da câmara de Franz, com a epiderme voltada para o compartimento doador. Considerou-se uma área de difusão de 1,77 cm². Previamente ao início dos ensaios de permeação, ambos os compartimentos foram preenchidos com tampão PBS de modo a manter uma hidratação mais uniforme dos tecidos. Estipulou-se um período de equilíbrio de 30 min.

As membranas foram cortadas em formato circular com área de 1,77 cm², pesadas antes do experimento e depositadas sobre o compartimento doador. Um volume fixo de 100 µL de tampão PBS foi adicionado sobre as membranas para facilitar a bioadesão e simular o ambiente úmido das feridas. Para comparar os perfis de liberação das membranas e do fármaco puro, considerou-se a adição de 1 mL de uma solução aquosa a 1 mg/mL de ALN. Tal concentração foi calculada com base nas quantidades de ALN por área de membrana utilizada no experimento.

Em intervalos pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h), alíquotas de 400 µL da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem (com reposição da solução) e quantificadas por CLAE utilizando o método previamente descrito (item 4.2.2.5).

Com os resultados da quantificação de ALN na câmara receptora foram plotados os gráficos da quantidade de ALN permeada (µg/cm²) em função do tempo (h). O estado de fluxo constante (Js) foi calculado pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade de ALN permeada (µg/cm²) em função do tempo (h) (GANNU et al., 2010; MASHRU et al., 2005). Eventualmente, a quantidade de ALN presente na área de 1,77 cm² de membrana estava um pouco abaixo de 1000 µg, desta forma, os valores finais foram normalizados para que todas as amostras apresentassem a

mesma quantidade inicial de ALN. Como os perfis cinéticos tiveram um comportamento linear, sugerindo uma cinética de ordem zero, calculou-se o coeficiente de correlação (R^2) de modo a julgar se as membranas seriam candidatas apropriadas quando se considera uma liberação controlada do ativo.

A retenção da ALN na epiderme e derme foi avaliada ao final do experimento. As amostras de pele expostas aos tratamentos foram lavadas com PBS para remover o excesso de fármaco nas camadas superficiais e a epiderme foi separada da derme com o auxílio de bisturi. Para aumentar a eficiência de extração do fármaco a partir do tecido, fragmentos menores foram gerados cortando-se o tecido com uma tesoura. A extração da ALN foi realizada com 3 mL de acetonitrila que, após 24 h de armazenamento em geladeira (4°C), incluiu uma etapa de sonicação (15 min) e centrifugação (5 min). As amostras foram diluídas e analisadas por CLAE.

Para avaliar a perda de massa das membranas, ao final do experimento, as amostras foram mantidas em estufa a 60 °C por 24 h e pesadas. A perda de massa (PM) foi expressa em porcentagem, de acordo com a equação abaixo.

$$PM (\%) = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (6)$$

Onde, M_t se refere ao peso da amostra após secagem na estufa por 24h e M_0 se refere a massa inicial da membrana.

4.2.2.11 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos testes de molhabilidade e bioadesão, foi utilizado o teste t-Student. Para os demais experimentos, empregou-se a análise de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey utilizando o *software* GraphPad InStat®. Para as duas análises estatísticas foi aplicado um intervalo de confiança de 95%. Diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

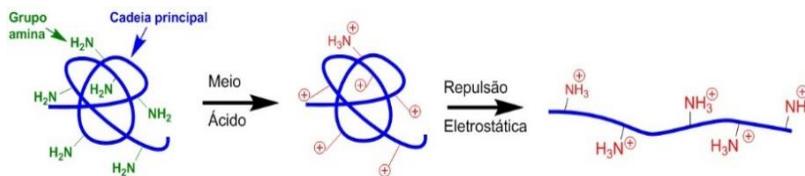
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Preparação das membranas de quitosana e alantoína

A otimização do preparo das membranas foi realizada com o objetivo de desenvolver formulações maleáveis para facilitar o manuseio e aplicação tópica.

A solubilidade aquosa da QS é limitada devido às interação intermolecular e fortes ligações de hidrogênio que ocorrem no polímero. Em meio ácido, os grupamentos amina da QS são ionizados (NH_3^+) e a repulsão das cargas positivas auxiliam na sua solubilização (Figura 20) (KASAAI, 2008; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; SANNAN; KURITA; IWAKURA, 1976). Com a adição do sal Na_2CO_3 , o ácido acético protona o sal, formando acetato de sódio, água e gás carbônico (CO_2), alcalinizando o meio. A QS, antes protonada (NH_3^+), é neutralizada, levando à redução da sua solubilidade e gelificação do sistema. É crucial o conhecimento da quantidade ideal de sal Na_2CO_3 para a neutralização ($\text{pH}_{\text{final}} = 7$), visto que baixas concentrações dificultarão a formação do gel e, em altas concentrações, será observado um sistema heterogêneo e com rede tridimensional instável, o que favorece a separação da água a partir do gel. Tal processo é chamado de sinérese e ocorre quando há forte interação entre as partículas da fase dispersa que é capaz de expulsar o solvente, ocorrendo assim a separação de fases e instabilidade de géis aquosos e não aquosos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007). Como já relatado anteriormente, no tópico de Materiais e Métodos (4.2.2.1), as quantidades de Na_2CO_3 foram estabelecidas por titulação potenciométrica em projeto de pesquisa do Departamento de Química da UFSC (ANDRZEJEWSKI, 2017).

Figura 20- Esquema da protonação de repulsão das cadeias de QS em meio ácido.



Fonte: Grande (2015)

A quantidade de água (10 mL) adicionada para o preparo das membranas foi motivada pela formação exacerbada de CO_2 no gel após a adição do sal Na_2CO_3 . O gel formado apresenta alta viscosidade a qual impede a dispersão do gás, ocasionando o aprisionamento de bolhas de diversos tamanhos na membrana. A adição de maior volume de água auxiliou na redução da viscosidade do gel formado e, por consequência,

na dispersão do CO₂, tornando as membranas mais homogêneas. Além disso, a água ajudou na homogeneização do sistema, evitando a formação de precipitados brancos de QS que são formados quando há neutralização do gel. Outras técnicas para reduzir o número de bolhas nas membranas foram testadas, como filtração a vácuo e secagem a vácuo, mas ambas técnicas não foram tão efetivas quanto a adição de água seguida de sonicação em banho de ultrassom.

A seleção do agente plastificante foi baseada em busca na literatura e experimentos prévios. O SBT é um álcool de cadeia pequena muito utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como umectante, agente estabilizante, diluente e plastificante (ROWE, RAYMOND C.; SHESKEY, PAUL J.; QUINN, 2009). Membranas de QS ácidas e neutralizadas com SBT apresentam características vantajosas para sua aplicação tópica, visto que a adição do agente plastificante reduz a cristalinidade polimérica, promovendo maior flexibilidade e resistência ao sistema. Estudos demonstram que membranas de QS com SBT não são citotóxicas e que o processo de neutralização pode auxiliar na proliferação celular, representando uma vantagem para a aplicação tópica veiculando moléculas cicatrizantes (CAMPOS; MEI; SANTOS, 2015; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Membranas com as concentrações de 0; 1; 2,5; 5; 7,5; e 10 % (m/m) de SBT foram preparadas e, ao final, duas concentrações (2,5 e 5 %) foram selecionadas para dar sequência aos estudos. Essa seleção baseou-se nos critérios de aspectos visuais, maleabilidade, flexibilidade, suavidade ao toque e uniformidade na distribuição de ALN.

A GNP é um composto orgânico extraído de plantas das espécies *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides Ellis* e por apresentar toxicidade menor que outros agentes reticulantes, como o glutaraldeído, vem sendo estudado na obtenção de membranas e filmes de QS (POZZO et al., 2018; ZHANG et al., 2011). Estudos de caracterização e atividades *in vitro* são relatados para esses sistemas, apresentando resultados promissores na área médica (MUZZARELLI et al., 2016). O desenvolvimento de membranas com e sem GNP teve como objetivo a comparação das características físicas, químicas e morfológicas, bem como perfil de liberação e permeação.

Figura 21 - Membranas Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca e Q-S 5% ALN.

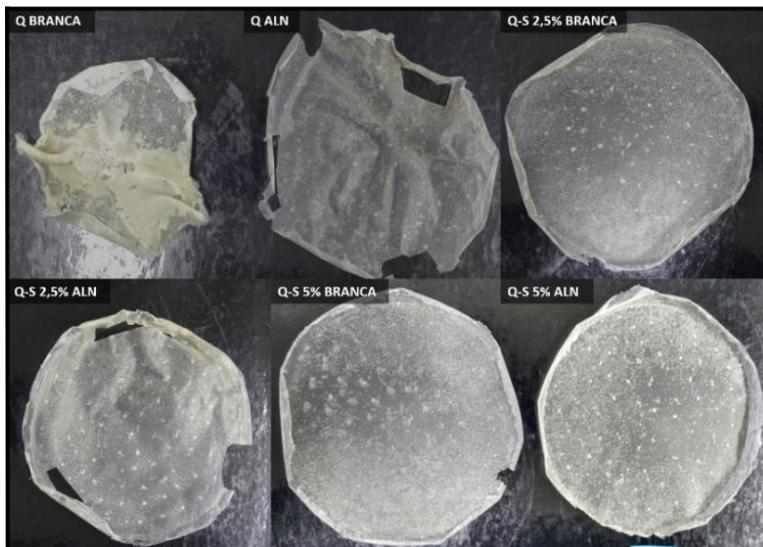
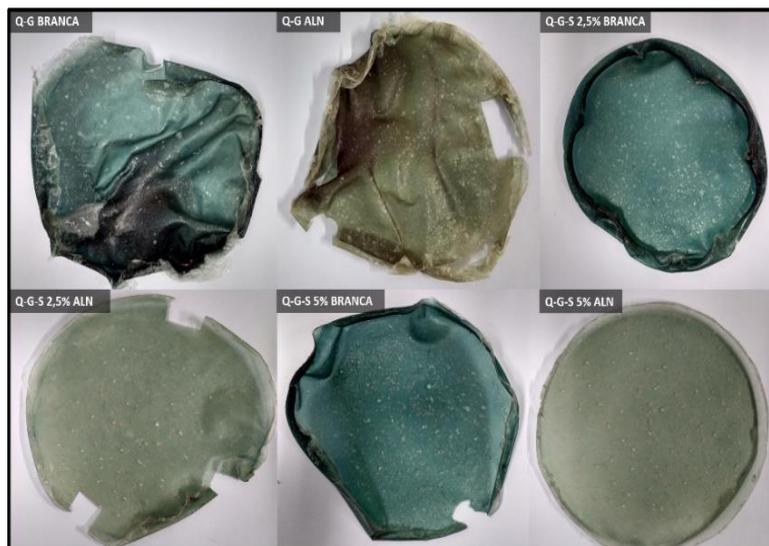


Figura 22 - Membranas Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca e Q-G-S 5% ALN.



Membranas sem o plastificante SBT apresentaram-se quebradiças, rugosas e com deposição de material esbranquiçado na superfície (Figura 21 – Q Branca). Já os sistemas com SBT são lisos, maleáveis e com textura leve. As membranas com agente reticulante são esverdeadas possivelmente devido à reação de polimerização da GNP induzida pela presença de radicais de oxigênio, tal reação ocorre em paralelo à reticulação química entre QS e GN (BERGER et al., 2004). As membranas placebo com GNP apresentam coloração mais esverdeada que as membranas com ALN, sendo indicativo de diferentes interações entre QS e GNP na presença do fármaco (Figura 22). Outra característica notória entre os sistemas reticulados com e sem ALN é a flexibilidade ao manuseio das membranas, a qual foi aumentada com a adição do ativo. Em todas as membranas (Figura 21 e 22) é possível visualizar pontos claros dispersos de forma aleatória ao longo das membranas, os mesmos são referentes aos resquícios de bolhas de CO₂ formadas na reação de neutralização.

4.3.2 Caracterização físico-química e morfológica

4.3.2.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

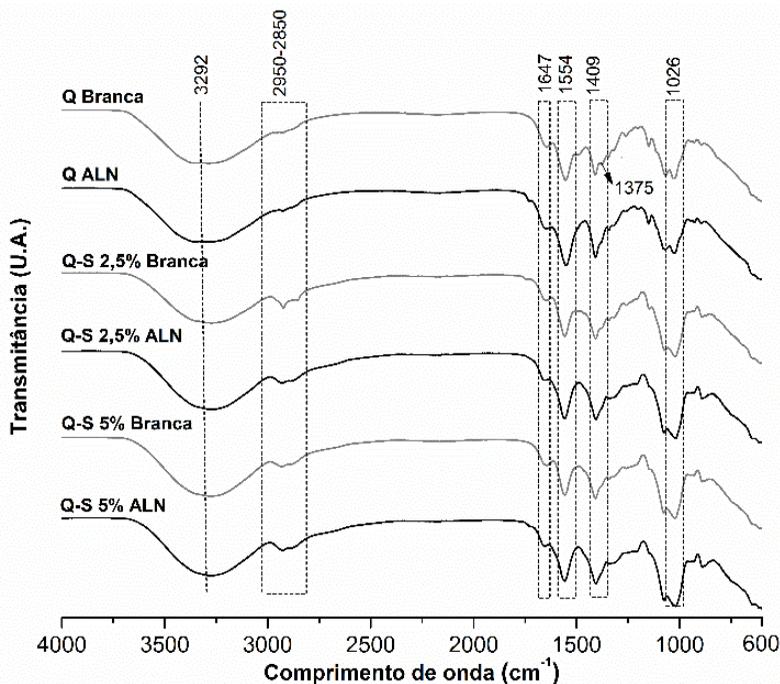
Nas figuras 23 e 24 estão os espectros de FTIR das membranas de QS. Nota-se que não há diferenças significativas entre os espectros dos sistemas plastificados com SBT e puros, assim como para os sistemas com e sem GNP. As bandas características da QS em 3292 cm⁻¹ (grupamento -OH e -NH); entre 2850 e 2950 cm⁻¹ (deformação axial do grupamento -CH₂); 1647 cm⁻¹ (amida I); 1375 cm⁻¹ (estiramento simétrico de -CH₃); 1026 cm⁻¹ (estiramento simétrico de -COC), estão presentes nas membranas (HOSSEINI et al., 2015; KIM, 2010; LAWRIE et al., 2007). As bandas alargadas na região de 3700 cm⁻¹ a 3200 cm⁻¹ são atribuídas aos grupamentos -NH, -OH e ligações de hidrogênio formadas entre QS e a água, e no caso das membranas com SBT, a ligação com o plastificante (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Analisando essa região no espectro das membranas, observou-se um aumento na absorbância para os sistemas plastificados, indicando uma maior quantidade de ligações de hidrogênio.

As bandas das membranas em 1554 cm⁻¹, atribuída a amida I e vibração do N-H (amina II), e em 1409 cm⁻¹, atribuída à vibração C-H, apresentaram deslocamento e maior transmitância em relação à matéria prima. Essas mudanças podem estar relacionadas com as diferentes

interações entre a QS e o sistema, como rearranjos intermoleculares e variações nas configurações das cadeias, além do processo de solubilização e neutralização (LECETA et al., 2015; LIU et al., 2013).

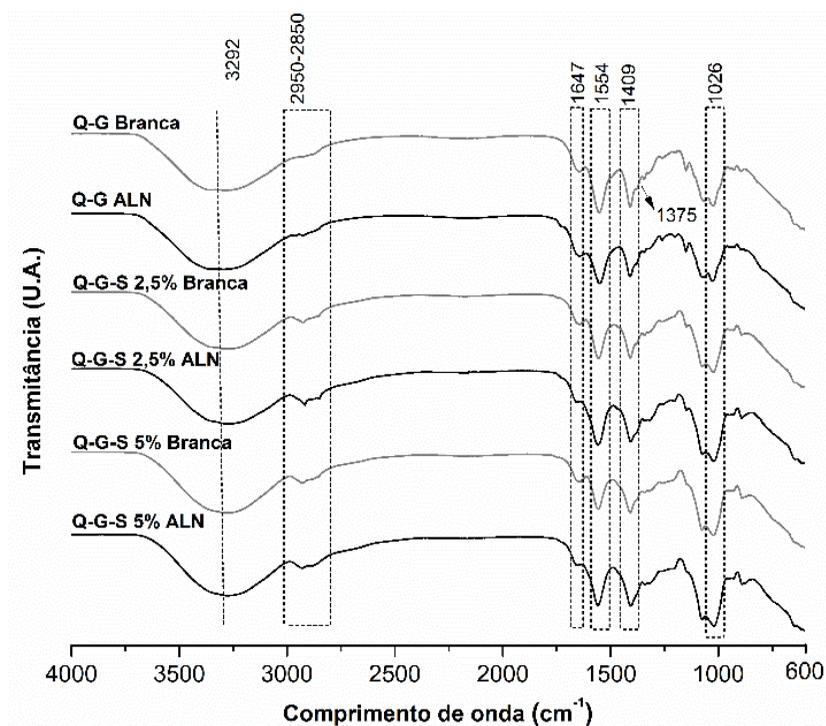
Para as membranas com ALN as bandas na região de 1550-1560 cm^{-1} apresentaram um aumento na transmitância comparando-se com as membranas brancas. Esse aumento pode estar associado ao deslocamento da banda em 1525 cm^{-1} (-NH da imida) do fármaco. Visualmente, nota-se que as membranas reticuladas contendo ALN apresentam uma coloração mais clara que as brancas (Figura 22), indicativo de interações entre o sistema e o ativo. Butler, Ng e Pudney (2003) em estudo da reação entre GNP e aminas primárias, relacionam a diminuição da banda em 1550 cm^{-1} com o processo de reticulação. Considerando todas as informações, as análises de FTIR confirmam que a adição de ALN nas membranas altera a organização e interações que ocorrem no sistema.

Figura 23 - Espectro de FTIR para as membranas Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca e Q-S 5% ALN.



Com base nas técnicas de DSC e MEV, que serão discutidas a seguir, foi possível concluir que na superfície das membranas há grande deposição de partículas com ponto de fusão e espectro de FTIR compatíveis com o sal trihidratado de acetato de sódio. O sal é formado na reação entre Na_2CO_3 e ácido acético, no processo de neutralização das membranas. As bandas mais proeminentes em 1554 cm^{-1} e 1409 cm^{-1} , podem estar relacionadas com a presença do sal, uma vez que na literatura valores próximos a esses são encontrados, os quais caracterizam o estiramento da carbonila do acetato de sódio (AGASTI; KAUSHIK, 2014; MAX; CHAPADOS, 2004).

Figura 24 -Espectro de FTIR para as membranas Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca e Q-G-S 5% ALN.



A reação de reticulação química entre QS e GNP ocorre por meio de ligações covalentes, gerando uma amida secundária e amina terciária. Na literatura são relatadas bandas na região de 1650 a 1515 cm^{-1} e 1250

a 1020 cm^{-1} , referentes a esses novos grupamentos. (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; POZZO et al., 2018; FONSÊCA, 2015). Comparando as amostras com e sem GNP, não foi possível observar uma relação direta entre os diferentes sistemas. A presença de SBT, ALN, GNP e o processo de neutralização, tornam as membranas sistemas complexos para a interpretação no FTIR. Além disso, a rápida alteração de cargas no processo de neutralização gera uma agregação aleatória das moléculas, a qual acarreta em microrregiões de desordem, dificultando a interpretação dos espectros.

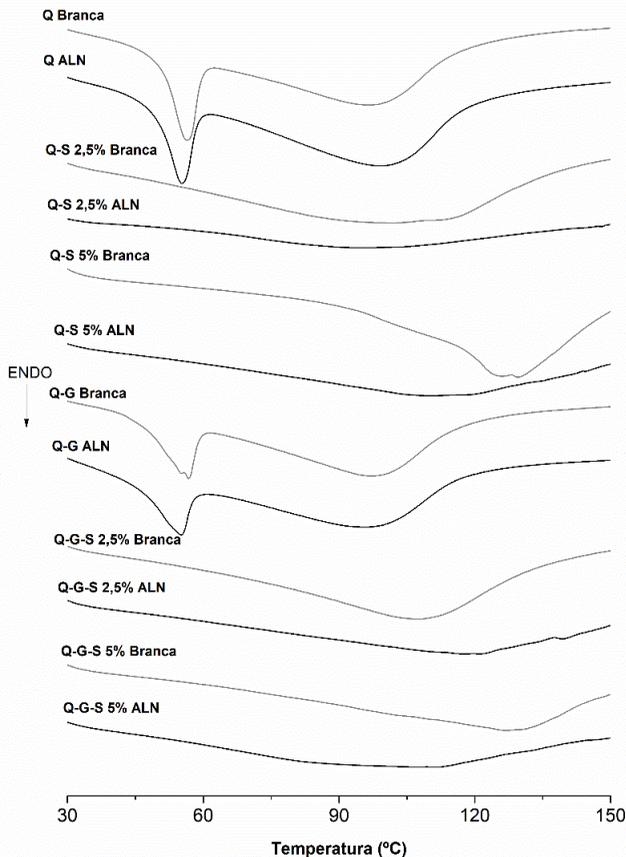
3.3.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na figura 25 estão expostas as curvas de DSC da primeira etapa de aquecimento das amostras. As membranas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca e Q-G ALN, apresentaram um evento endotérmico entre 46 e 60 °C e T_{peak} de aproximadamente 56 °C, sem perda de massa (Figura 25 e 26). Com auxílio das técnicas de MEV, FTIR e TGA conclui-se que o evento é a fusão do sal trihidratado de acetato de sódio formado na reação de neutralização das membranas. Na literatura seu ponto de fusão é relatado em 58 °C, indo ao encontro do resultado aqui encontrado (CABEZA et al., 2003; MACHIDA; SUGAHARA; HIRASAWA, 2017; WADA; YAMAMOTO, 1982). Todas as amostras apresentam eventos endotérmicos alargados antes de 150 °C, relacionado a perda de água ligada à membrana e compostos voláteis, na qual foi confirmada pela técnica de TGA. Na figura 26 estão os resultados das curvas de DSC e TGA para a membrana Q Branca. Nas análises de TGA até 400 °C ocorrem duas perdas de massa, a primeira em 84 °C, relacionada com a perda de água e compostos voláteis e, a segunda, em 274 °C, relacionada à degradação da QS. Na curva de DSC, dois eventos endotérmicos são observados, sendo o primeiro em 54°C, correspondente ao acetato de sódio e, o segundo, em 95 °C (evaporação da água e compostos voláteis).

A T_g representa a temperatura de transição de um estado mais rígido do material para o estado a qual as moléculas apresentam maior mobilidade associada à relaxação da cadeia polimérica. Este estado de relaxação é chamado de estado elástico (MENCZEL, 2009; SENATOV et al., 2016). A adição de pequenas moléculas, como o caso do SBT, acaba atuando como plastificante do sistema, diminuindo a temperatura de T_g do material. Essa propriedade dos plastificantes auxilia nas características mecânicas de membranas e filmes poliméricos, uma vez que os materiais se tornam mais flexíveis (SUYATMA et al., 2005). Não foi possível visualizar o evento característico da T_g das membranas

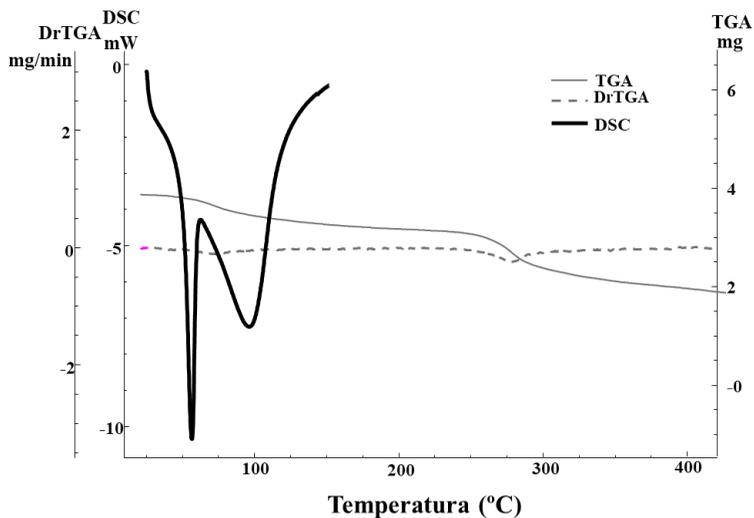
durante a análise da segunda etapa de aquecimento das amostras (Figura 27). Outras formas de preparo das amostras (com N₂) e condições de análise (taxa de aquecimento e temperaturas negativas) foram testadas, porém, sem resultados promissores. Na literatura, diferentes temperaturas de T_g são relatadas para a QS. Filmes neutralizados apresentaram T_g entre -76,90 e -73,16 °C, já filmes contendo SBT a T_g é em torno de 170 °C (CAMPOS et al., 2005; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Devido à alta higroscopicidade do polímero, torna-se difícil a determinação da T_g desses materiais por DSC, uma vez que a interação com a água dificulta a organização das moléculas de QS (ANDRZEJEWSKI, 2017; CORAZZARI et al., 2015; IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, 2014; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010).

Figura 25 - Resultado das análises por DSC da primeira curva de aquecimento obtidas para as membranas: Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN; Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.



O evento de fusão da ALN (233 °C) não está presente em nenhuma das curvas de DSC (Figura 27). A concentração final do fármaco nas membranas é muito baixa, 5 % (m/m), e a possibilidade de amorfização da ALN nas membranas, justificariam o não aparecimento da sua fusão.

Figura 26 - Resultado das análises por DSC e TGA da membrana Q Branca



4.3.2.2 Difração de raios-X (DRX)

As análises por DRX foram realizadas com o objetivo de verificar diferenças na cristalinidade dos sistemas desenvolvidos. As amostras Q Branca e Q ALN não estavam em condições ideais para análise devido à alta rugosidade e desníveis na superfície das membranas, portanto, não foi possível a obtenção difratogramas passíveis de interpretação. Nas demais amostras é possível verificar halos de baixa intensidade em aproximadamente 10 e 20° (Figura 28). Esses halos são típicos da QS e indicam que os sistemas desenvolvidos estão em um estado semicristalino, ou seja, com baixo grau de cristalinidade (CORAZZARI et al., 2015; NUNTHANID et al., 2001).

Figura 27 - Resultado das análises por DSC da segunda curva de aquecimento obtidas para as membranas A) Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN; B) Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN

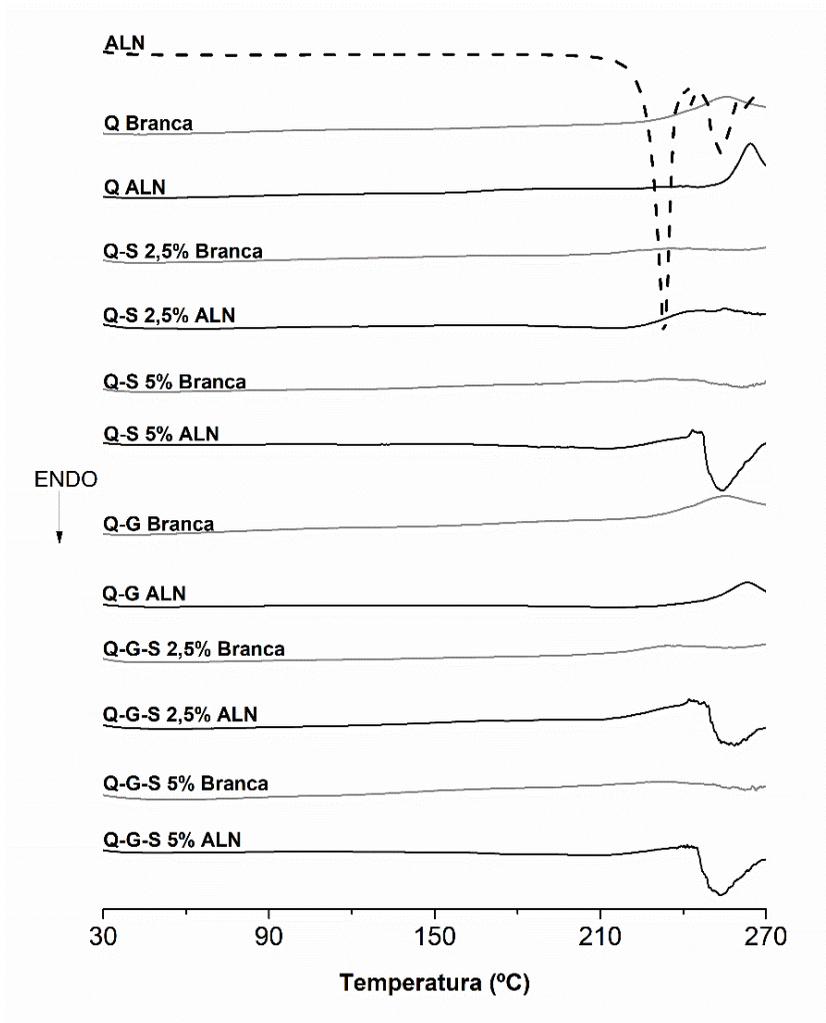
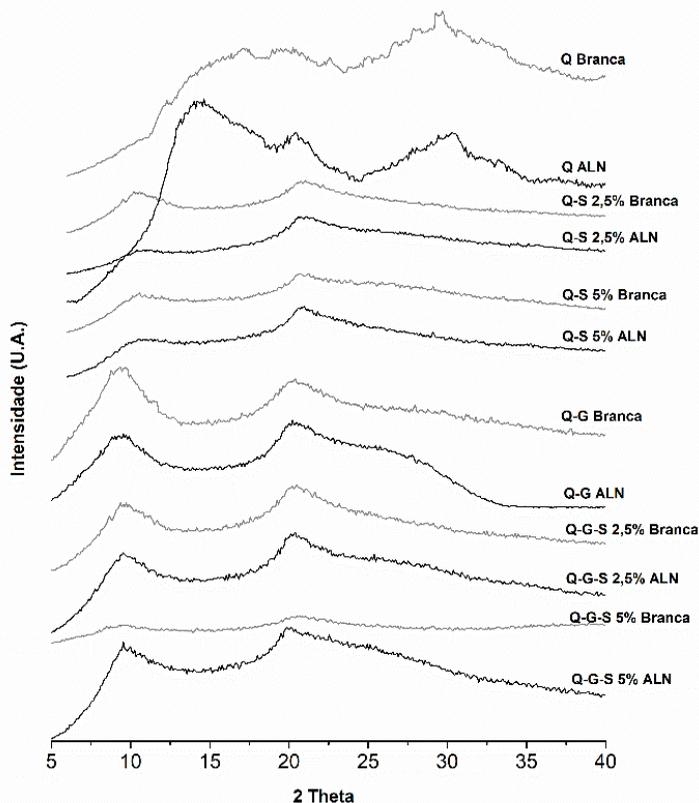


Figura 28 - Resultado das análises por DRX obtidas para as membranas: Q Branca, Q ALN, Q-S 2,5% Branca, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% Branca, Q-S 5% ALN; Q-G Branca, Q-G ALN, Q-G-S 2,5% Branca, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% Branca, Q-G-S 5% ALN.



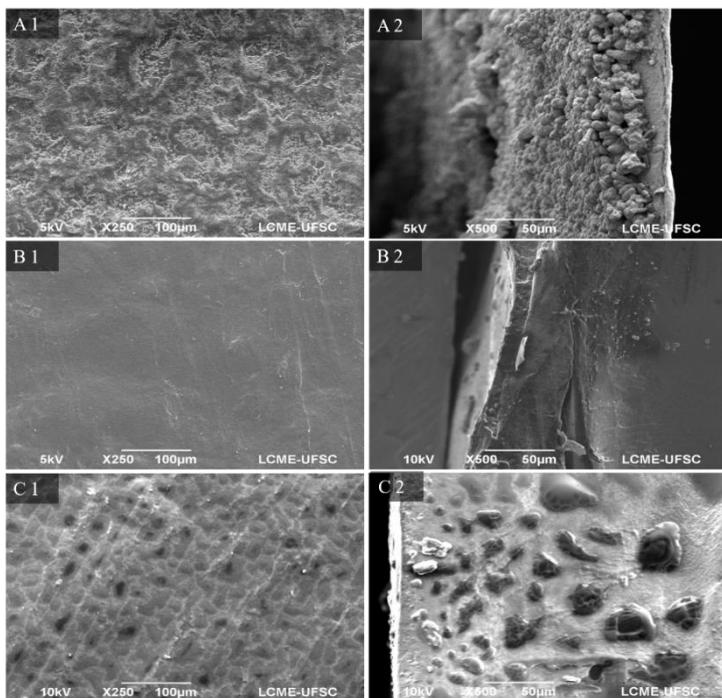
Polímeros semicristalinos apresentam uma morfologia complexa, a qual é formada por pelo menos duas fases, uma região cristalina e uma região amorfa (TALHAVINI et al., 1996). Nas membranas com GNP, a intensidade dos dois halos é maior, comparado com as demais, exceto na membrana Q-G-S 5% Branca. Em estudos de citotoxicidade e proliferação celular de membranas de QS, Campos e colaboradores (2015) relacionam a diminuição da cristalinidade das membranas de QS e SBT com o aumento da proliferação celular. Com isso, a diminuição da cristalinidade verificada para as membranas são indícios favoráveis de ação na reconstituição e cicatrização de tecidos.

4.3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises por MEV permitem observar os aspectos morfológicos e realizar estudo da microestrutura das membranas. Foram realizadas fotomicrografias das membranas sem adição de agente plastificante, Q Branca e Q-G Branca, a fim de comparar com as membranas que apresentaram melhor maleabilidade.

As membranas sem SBT apresentaram deposição de aglomerados de partículas de tamanho em torno de $10\ \mu\text{m}$ sobre a superfície e na parte interna (Figura 29-A e 30-D). Com base nos resultados de DSC e FTIR, esta camada de partículas foi associada a presença do sal de acetato de sódio trihidratado, formado na reação de neutralização das membranas. As demais membranas analisadas por MEV apresentaram menores quantidades de partículas de sal na superfície.

Figura 29 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as membranas: A) Q Branca; B) Q-S 5% Branca; C) Q-S 5% ALN.

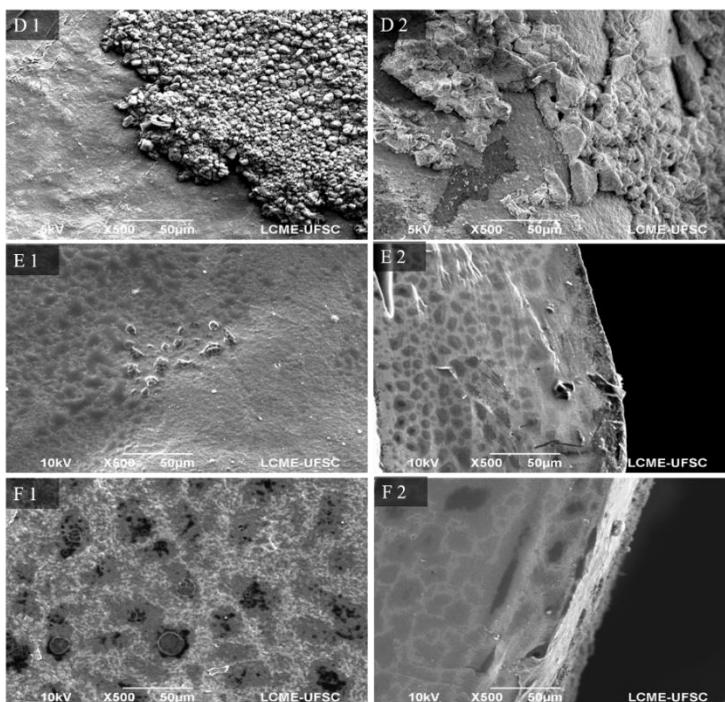


A numeração 1 são para as imagens das superfícies e 2 das fraturas das membranas.

A membrana Q-S 5% branca (Figura 29-B) apresentou superfície lisa, homogênea e, na imagem da fratura (Figura 29-B2), observa-se um sistema compacto, confirmando que as partículas se agregaram perfeitamente durante a secagem.

Na superfície da membrana Q-S 5% ALN (Figura 29-C1), é possível observar a presença de porções escurecidas e aspecto rugoso e, nas imagens da fratura (Figura 29-C2), são vistas regiões escuras em alto relevo. Ambas podem estar associadas ao gás CO₂ retido nas membranas, o qual é formado após a etapa de neutralização.

Figura 30 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as membranas: D) Q-G Branca; E) Q-G-S 5% Branca; F) Q-G-S 5% ALN.



A numeração 1 são para as imagens das superfícies e 2 das fraturas das membranas.

Assim como para a amostra Q-S 5% ALN, as membranas Q-G-S 5% Branca e Q-G-S 5% ALN (Figura 30-E e 30-F) são densas e compactas, apresentando regiões escurecidas, sendo que a maioria não apresenta aspecto rugoso. Essas regiões podem estar relacionadas com a

dispersão do agente plastificante ao longo da membrana, visto que tal característica está presente apenas nas amostras que contém SBT.

Liu e colaboradores (2013), em estudo com filmes de QS e SBT, relataram a formação de sistemas homogêneos, contínuos e compactos, sem poros na estrutura analisada por MEV. Portanto, a adição de SBT proporcionou adequada compatibilidade e miscibilidade no sistema. Resultados semelhantes foram obtidos por Campos e colaboradores (2015) no desenvolvimento de membranas com estes mesmos componentes. As fotomicrografias indicavam a formação de sistemas densos, mas com rugosidades na superfície das membranas neutralizadas.

4.3.3 Avaliação do ângulo de contato e molhabilidade

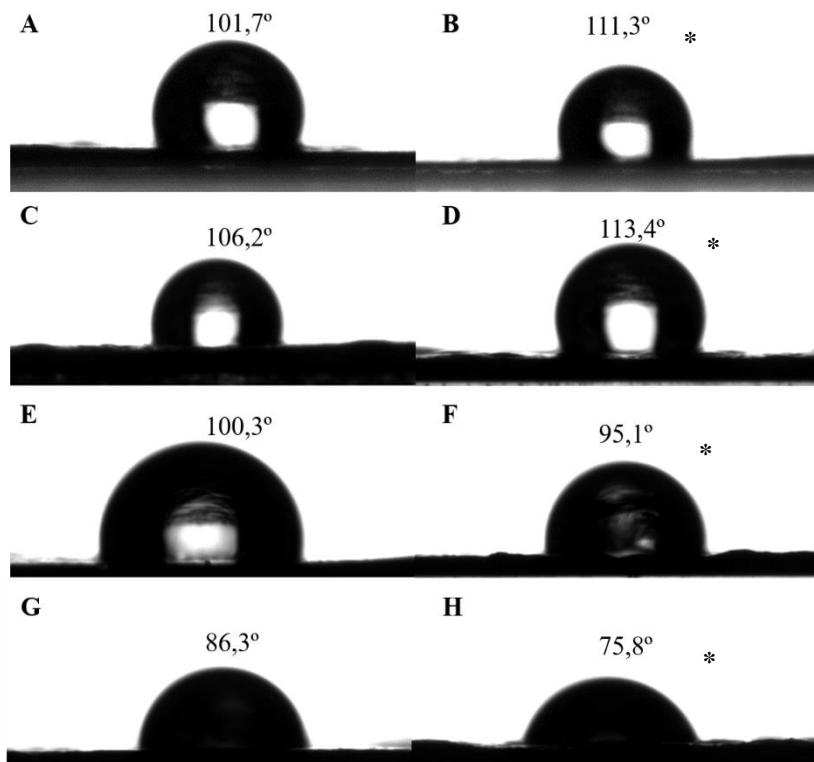
As análises de ângulo de contato foram realizadas apenas para as membranas contendo SBT, uma vez que o requisito para as análises são superfícies lisas e sem rugosidades. Os resultados foram analisados conforme os seguintes critérios: Para valores de ângulo de contato acima de 90° , a superfície pode ser considerada hidrofóbica. Caso contrário, a superfície é considerada hidrofílica (MA et al., 2017; SIDDIQA et al., 2017).

Para filmes puros de QS, o ângulo de contato descrito na literatura é em torno de 100 e 105° (DE BRITTO; ASSIS, 2007; HSIEH et al., 2005; ZHANG et al., 2017). A adição de componentes em filmes pode alterar a molhabilidade da superfície pela formação de ligações entre o aditivo e os grupos funcionais da QS, diminuindo a disponibilidade dos grupamentos hidroxila e amino, limitando a interação entre o polissacarídeo e a água por ligações de hidrogênio, resultando em um aumento do ângulo de contato líquido-material (OJAGH et al., 2010).

As membranas Q-S 2,5 % ALN e Q-S 5% ALN apresentam valores de ângulo theta (Θ) maiores que suas respectivas membranas placebo, indicando que a adição de ALN alterou as propriedades dos sistemas, tornando-os mais hidrofóbicos (Figura 31). Essa alteração pode ser indicativa de interação da QS com ALN, a qual reduz a disponibilidade dos ligantes da QS e/ou ALN para interagir com a água (OJAGH et al., 2010). Todas as membranas sem agente reticulante podem ser classificadas como superfícies hidrofóbicas, de acordo com a classificação do ângulo maior que 90° . Tal característica pode representar uma vantagem para formulações de uso tópico ou transdérmico, uma vez que o extrato córneo (pele íntegra) possui espessura entre 5 e 20 μm , sendo altamente hidrofóbico e constitui uma das principais barreiras para

a penetração de fármacos (HOFMANN et al., 2010; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008)

Figura 31 - Imagens da gota de água na superfície das membranas A) Q-S 2,5% Branca, B) Q-S 2,5% ALN, C) Q-S 5% Branca, D) Q-S 5% ALN, E) Q-G-S 2,5% Branca, F) Q-G-S 2,5% ALN, G) Q-G-S 5% Branca, H) Q-G-S 5% ALN.



* Indica diferença estatística significativa, $p < 0,05$ (teste t-Student) comparando com a respectiva amostra placebo (branca).

As membranas com GNP apresentaram valores menores de ângulo de contato, indicando que o agente reticulante aumentou a hidrofiliabilidade do sistema. Gao e colaboradores (2014) relatam que o aumento na concentração de GNP em hidrogéis de QS diminuiu o ângulo de contato das formulações, relacionando principalmente esse evento com as interconexões mais densas do polímero e o aumento de conjugados reticulados. Pozzo e colaboradores (2018) avaliaram o ângulo de contato

de filmes de QS e observaram uma redução de 25% para os filmes reticulados com GNP, comparando-se com os não reticulados. Tal resultado foi associado à natureza hidrofílica da GNP.

A adição de ALN também aumentou a hidrofiliabilidade das membranas. Uma vez que QS, SBT e GNP são hidrofílicos, a adição de ALN nas membranas pode ter deixado algum destes excipientes mais disponível para interação com a água. A concentração de 5% de SBT aumentou a molhabilidade do sistema. Isso pode ser justificado pela higroscopia (capacidade de ligação a água) do plastificante (SUYATMA et al., 2005).

4.3.4 Ensaio de bioadesão

As análises de bioadesão são realizadas para formulações de uso tópico ou transdérmico, visando prever a interação entre membrana e pele. No caso de feridas cutâneas, a derme apresenta-se exposta, aumentando a necessidade de interações para manter a formulação na região. As medidas do teste são baseadas na força necessária para separação das duas superfícies, sendo expressa em Newton (N). Quanto maior a força de separação, também chamada de força bioadesiva, maiores são as interações entre a formulação e a pele (BREDENBERG; NYSTRÖM, 2003; DONNELLY et al., 2006; GONÇALEZ, 2012; PEH; KHAN; CH'NG, 2000; SILVA et al., 2008)

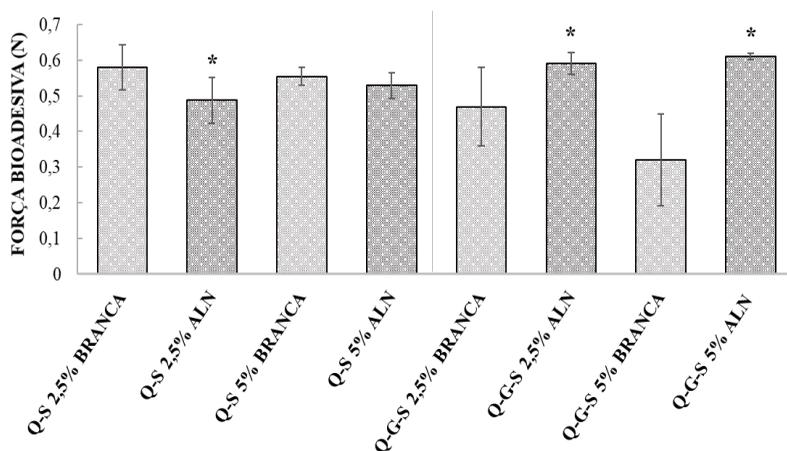
Dentre as teorias que tentam explicar o processo de bioadesão, há a teoria da adsorção que sugere que a interação entre pele e materiais ocorre por meio de ligações do tipo Van der Waals e/ou ligações de hidrogênio. Sob outra perspectiva, a teoria de molhabilidade relaciona as tensões interfaciais entre as superfícies, na qual a água presente no sistema é de total importância para o processo (BREDENBERG; NYSTRÖM, 2003; DUCHÈNE; TOUCHARD; PEPPAS, 1988).

Comparando os resultados de força bioadesiva e ângulo de contato, pode-se verificar uma tendência na relação entre hidrofiliabilidade da superfície das membranas e aderência na pele. Quanto menor o ângulo de contato, maior a bioadesão do sistema (Figura 31 e Figura 32).

Assim como para os resultados de ângulo de contato, verificou-se diferença entre as membranas com e sem GNP. As membranas reticuladas contendo ALN apresentaram maior força bioadesiva em relação às sem GNP. Tais resultados são indicativos de melhor adesão na pele de sistemas que apresentam a superfície mais hidrofílica, uma vez que as análises foram feitas com a adição de 25 μ L de tampão PBS para simular as condições da pele com exsudatos. A matriz extracelular, que apresenta

papel importante na cicatrização de tecidos, possui uma capacidade alta de ligação com a água, auxiliando na adesão e na proliferação celular. Desta forma, membranas com essas propriedades são vantajosas para o uso em lesões cutâneas (DONNELLY et al., 2006; XUE; JACKSON, 2015)

Figura 32 - Resultados da força bioadesiva (N) das membranas testadas em pele de orelha de porco.



Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=6). * Indica diferença estatística significativa, $p < 0,05$ (teste t-Student) comparando com a respectiva amostra placebo (branca).

4.3.5 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da alantoína

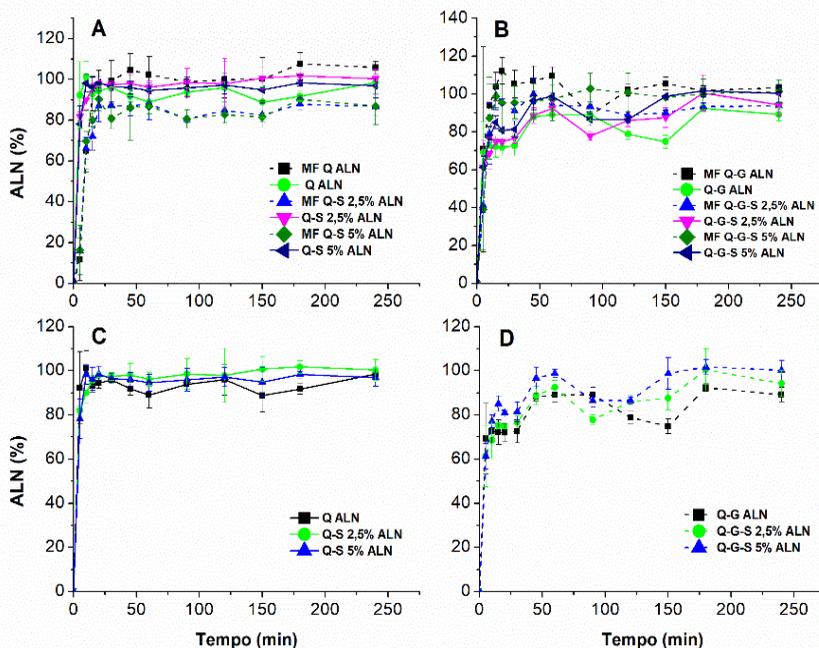
Para o ensaio de liberação *in vitro* foi necessário adaptar metodologia de Assonuma (2009) para a quantificação da ALN, validando-a. O método adaptado demonstrou-se linear, sensível, seletivo, preciso, exato e robusto, conforme exigido pelos órgãos regulatórios (ANVISA, 2017; ICH, 2005). Valores de precisão intradia e interdia (n = 6 para cada analito) demonstraram variabilidade aceitável com desvio padrão relativo inferior a 5% para a quantificação da ALN. Em termos de exatidão, os valores obtidos variaram entre 98,89 e 102,49 %. A curva de calibração mostrou-se linear ($r=0,9999$) na faixa de 3,125 – 50 $\mu\text{g/mL}$, e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 0,1845 e 0,6151 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os ensaios de liberação foram realizados para verificar a influência da presença/ausência de SBT, assim como suas diferentes concentrações, além do impacto da reticulação das membranas com e sem GNP na liberação da ALN.

Para as membranas Q ALN, Q-S 2,5% ALN e Q-S 5% ALN, a liberação do ativo foi maior que 75% (m/m) no primeiro ponto de coleta (5 min), diferente de suas misturas físicas, nas quais a concentração de ALN atingida foi maior que 75% após 20 min (Figura 33). Com base nesses dados, fica evidente que a liberação rápida de ALN das membranas está associada com o efeito “*burst*” de liberação. Moléculas pequenas e hidrofílicas, como é o caso da ALN, passam facilmente pelos poros da membrana e são liberadas de forma rápida do sistema, acarretando um efeito *burst*. Tanto as propriedades físico-químicas do ativo (solubilidade, coeficiente de partição), quanto as do polímero, explicam este mecanismo de liberação do fármaco (BERGER et al., 2004; HUANG; BRAZEL, 2001). Além disso, o processo de secagem pode influenciar e acarretar na deposição de fármaco na superfície das membranas (BAZZO et al., 2008). A presença de SBT nas membranas, contribui para a solubilização da ALN, desta forma, a rápida liberação também pode estar relacionada com esse processo. No caso de sistemas de uso tópico visando à cicatrização de feridas e lesões, uma liberação rápida de ALN não representaria um problema, uma vez que a concentração do ativo nas membranas é em torno de 5% (m/m). Estudos de toxicidade dérmica aguda da ALN demonstram que sua dose letal (LD_{50}) é maior ou igual a 5000 mg/kg (AKEMA, 2006). Becker e colaboradores (2010) testaram a aplicação de loção contendo ALN a 2% (m/m), 1 a 4 vezes por dia durante 6 meses, e não observaram qualquer efeito adverso nos pacientes.

Já para os sistemas reticulados com GNP, nota-se que a mistura física teve a liberação de ALN mais rápida que as membranas. Após 10 min, nas três misturas físicas, já ocorreu a solubilização de mais de 75% do ativo, em contrapartida, para as membranas, esse tempo foi estendido para 30 min. A reticulação química é responsável por diminuir os espaços livres entre as cadeias poliméricas, tornando as membranas mais compactas e com menor tamanho de poro. Essa alteração morfológica é responsável pela liberação mais “lenta” da ALN para o meio aquoso. Por consequência, o efeito *burst* também é reduzido (BERGER et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Figura 33 - Percentual de ALN liberada em função do tempo (min). A) Comparação entre membranas e mistura física (MF) dos sistemas Q ALN, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% ALN e suas respectivas MF. B) Comparação entre membranas e mistura física (MF) dos sistemas Q-G ALN, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% ALN e suas respectivas MF; C) Comparação entre as membranas Q ALN, Q-S 2,5% ALN, Q-S 5% ALN; D) Comparação entre as membranas Q-G ALN, Q-G-S 2,5% ALN, Q-G-S 5% ALN.



Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Comparando-se a eficiência de liberação (EL) dos sistemas com e sem o agente plastificante SBT, não foram verificadas alterações significativas na liberação da ALN, sendo um indicativo de que o mecanismo de liberação não sofre influência do SBT (Tabela 1). Por outro lado, a reticulação das membranas com GNP levou à redução da liberação de ALN, resultado já esperado por conta das características morfológicas do sistema (Figura 33; Tabela 1). Uma diferença significativa na EL entre as membranas com e sem GNP, com a mesma composição de plastificante, foi observada ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Valores dos parâmetros cinéticos de coeficientes de correlação (R^2), coeficiente difusional (n), eficiência de liberação (EL) para as membranas de QS no modelo cinético de Korsmeyer-Peppas.

Membrana	PARÂMETROS CINÉTICOS		
	R^2	n	EL _{240min} (%)
Q ALN	0,98	0,004	92,29 ± 0.73 (a,*)
Q-S 2,5% ALN	0,99	0,046	97,57 ± 1.68 (b,*)
Q-S 5% ALN	0,97	0,026	95,13 ± 2.15 (a,b,*)
Q-G ALN	0,94	0,065	79.22 ± 0.81 (*,c)
Q-G-S 2,5% ALN	0,95	0,097	83.07 ± 1.45 (*,c,d)
Q-G-S 5% ALN	0,94	0,103	82.62 ± 2.14 (*,c,d)

Os dados de EL estão apresentados como média ± desvio padrão. Utilizou-se o teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($n=3$). Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias ($p > 0,05$). Os resultados das membranas de mesma composição, variando-se apenas a presença ou ausência de GNP, foram avaliadas por teste *t*-Student. *indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$).

Com auxílio do *software Add-in DD-Solver*[®], foi possível calcular os parâmetros cinéticos da liberação de ALN das membranas. O modelo que apresentou maior valor de R^2 foi o de Korsmeyer-Peppas. Tal modelo descreve a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do soluto (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não- Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER; PEPPAS, 1987). O modelo é representado pela equação abaixo:

$$\frac{M_T}{M_\infty} = Kt^n \quad (7)$$

Onde, M_t/M_∞ representa a fração do soluto liberada no tempo t ; “ k ” é uma constante que incorpora características da matriz polimérica e do soluto e “ n ” é o coeficiente difusional, o qual fornece informações sobre o mecanismo de liberação a partir de matriz polimérica (RITGER; PEPPAS, 1987).

Para todas as membranas o valor de “ n ” foi menor que 0,5 (Tabela 1) indicando que o mecanismo de liberação da ALN é por difusão Fickiana, também chamada de Caso I, na qual o transporte do soluto para o solvente é descrito pelo coeficiente de difusão (RITGER; PEPPAS, 1987). Tal mecanismo também está diretamente associado ao efeito *burst*,

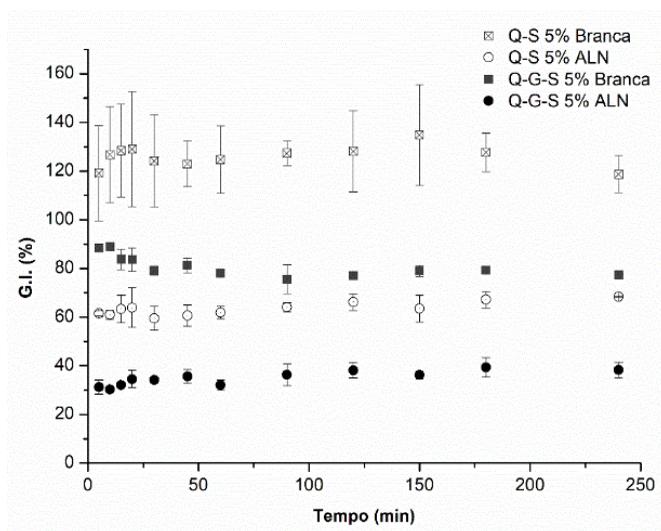
uma vez que a liberação é tão rápida que a relaxação das cadeias poliméricas não apresenta influência no processo.

Analisando os resultados dos testes realizados até o presente tópico, concluiu-se que não há diferenças estatísticas entre as membranas com 2,5% e 5% de SBT, principalmente no teste de liberação *in vitro*. Desta forma, optou-se por dar sequência aos estudos de caracterização dos sistemas com 5% de SBT, em virtude de apresentarem melhor maleabilidade e uniformidade de conteúdo de ALN (valores não apresentados).

4.3.6 Determinação do grau de intumescimento (GI)

O grau de intumescimento (GI) de um material está relacionado com a sua capacidade de expansão após o contato com líquidos. Esse estudo de absorção de fluídos é relevante visto que as propriedades físicas e químicas das membranas podem ser alteradas, as quais influenciam na proliferação celular e regeneração tecidual (ALHOSSEINI et al., 2012; BISPO et al., 2010). A captação de água pelas membranas favorece a adesão e crescimento celular, além da remoção de exsudatos (AZAD et al., 2004; NATH et al., 2015).

Figura 34 - Perfis de intumescimento das membranas Q-S 5% Branca; Q-S 5% ALN; Q-G-S 5% Branca; Q-G-S 5% ALN em tampão PBS (pH 7,4) a $32 \pm 0,5$ °C.



O perfil de intumescimento das membranas de QS (Figura 34) é semelhante aos descritos na literatura, apresentando um aumento de massa nos minutos iniciais do estudo, seguido do equilíbrio entre a fase líquida e a membrana (ANDRZEJEWSKI, 2017; BAVARSAD et al., 2016). O intumescimento das membranas com ALN, comparado com o seu respectivo sistema placebo, foi menor (Tabela 2). Essa redução pode ser atribuída às ligações intra e intermoleculares entre polímero e fármaco, diminuindo os espaços disponíveis para a ligação com a água (ALHOSSEINI et al., 2012).

Nota-se que a membrana reticulada Q-G-S 5% ALN absorveu menos tampão em relação à membrana Q-S 5% ALN. A reticulação química também é um processo que aumenta a compactação do sistema e diminui a mobilidade das cadeias poliméricas, devido às ligações covalentes, podendo reduzir pela metade o GI (BISPO et al., 2010).

Tabela 2 - Grau de intumescimento (GI- %) e perda de massa (%) das membranas após 24 h em tampão PBS pH 7,4 (n=3).

Membrana	GI 24h (%)	Perda de massa (%)
Q-S 5% Branca	121,41 ± 15,31 ^(**)	12,64 ± 2,17 ^(**)
Q-S 5% ALN	69,18 ± 3,24 ^(**,a)	69,55 ± 0,56 ^(**,a)
Q-G-S 5% Branca	77,98 ± 0,54 ^(**,a)	69,49 ± 0,76 ^(a,b)
Q-G-S 5% ALN	48,45 ± 1,25 ^(**)	68,21 ± 0,91 ^(a,b)

*Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Utilizou-se o teste ANOVA com pós-teste Tukey para comparação do GI e perda de massa das membranas. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias; ** indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$) comparando com o placebo/branco.*

4.3.7 Ensaio de erosão das membranas de QS

A avaliação da erosão das membranas em condições semelhantes de temperatura e pH de lesões na pele auxiliam no entendimento da degradação de polímeros biodegradáveis (LIU et al., 2013; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; SCHNEIDER et al., 2007).

Em virtude da alta concentração final de SBT nas membranas e sua rápida difusão para o meio aquoso, os valores de GI encontrados são menores do que os valores reais. Esta diferença também pode ser notada na perda de massa das membranas (Tabela 2). Ao final de 24 h, a erosão da membrana no tampão foi maior que 60 % (m/m), exceto para Q-S 5% Branca. Após a operação de secagem, visualmente não foi observada uma grande perda de massa das membranas, apenas o encolhimento das

mesmas, possivelmente pela difusão do SBT e ALN para o meio aquoso. Andrzejewski (2017) relata valores de perda de massa para membranas neutralizadas de QS e QS:GNP de 33,66 % e 13,02 %, respectivamente, representando grande diferença comparado com os encontrados neste estudo. Sistemas reticulados, além de apresentar menor taxa de intumescimento, são mais estáveis e solubilizam menos em meio aquoso (ANDRZEJEWSKI, 2017; CARDOSO et al., 2014; JIN; SONG; HOURSTON, 2004). Comparando os resultados de permeabilidade ao vapor de água, que serão discutidos a seguir, nota-se distinção entre as membranas com e sem GNP, sendo outra evidência que a difusão do SBT para o meio aquoso influenciou nos resultados de GI e perda de massa.

4.3.8 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi medida para determinar a capacidade de permeação da água nas membranas de QS por unidade de área.

Polímeros hidrofílicos são capazes de reter água com maior facilidade que polímeros hidrofóbicos (SILVA et al., 2008). A QS apresenta pelo menos três sítios de ligação com a água, as hidroxilas, aminas e a porção final da cadeia polimérica (CERVERA et al., 2004; GOCHO et al., 2000). No caso das membranas com GNP, a quantidade de aminas disponíveis é reduzida, devido à reação que ocorre entre QS e GNP, podendo ser uma das explicações para a menor permeabilidade de vapor de água, comparando com as membranas sem GNP (Figura 35; Tabela 3). Aldana e colaboradores (2012), relacionam a diminuição da permeabilidade de filmes de QS e GNP com a presença de regiões densamente interligadas, o que resulta na redução de volume livre dos filmes.

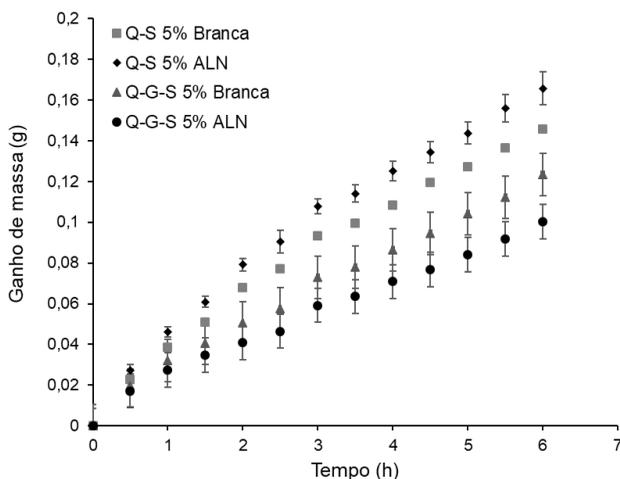
A membrana Q-S 5% ALN foi a que apresentou maior valor de permeabilidade ao vapor de água, $K^w = 6,08 \pm 0,04 \text{ (g/m.h.Pa)} \times 10^{-7}$, ou $326,68 \pm 14,92 \text{ g/m}^2\text{.dia}$. Ma e colaboradores (2017) mencionam que a taxa de vapor para a pele normal é de $204 \text{ g/m}^2\text{.dia}$, enquanto que, para a pele lesionada, pode variar de $279 \text{ g/m}^2\text{.dia}$, para uma queimadura de primeiro grau, a $5138 \text{ g/m}^2\text{.dia}$ para uma ferida granulosa. A presença de ALN favoreceu a captação de moléculas de água, comportamento similar aos agentes plastificantes (MA et al., 2017; RODRÍGUEZ et al., 2006). A presença do plastificante, além de aumentar a área hidrofílica das membranas, diminui as forças intermoleculares das cadeias poliméricas, permitindo a passagem por difusão das moléculas de água nos espaços livres (CAMPOS; MEI; SANTOS, 2015).

Tabela 3 - Permeabilidade ao vapor de água (K^w) e taxa de vapor (TVA) para as membranas de QS, (n=3).

Membrana	K^w (g/m.h.Pa). 10^{-7}	TVA (g/m ² .dia)
Q-S 5% Branca	$5,17 \pm 1,20$ ^(a)	$290,32 \pm 17,04$ ^(a)
Q-S 5% ALN	$6,08 \pm 0,04$ ^(a,b)	$326,68 \pm 14,92$ ^(a,**)
Q-G-S 5% Branca	$3,58 \pm 0,23$ ^(a,b,c)	$239,03 \pm 33,58$ ^(a,b)
Q-G-S 5% ALN	$3,17 \pm 0,03$ ^(a,c)	$193,30 \pm 0,97$ ^(b,**)

Dados foram representados como média \pm desvio padrão e tratados por ANOVA com pós teste Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias; ** indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$).

Figura 35 - Gráfico do ganho de massa (g) das membranas em função do tempo (h) para o ensaio de permeabilidade do vapor de água.



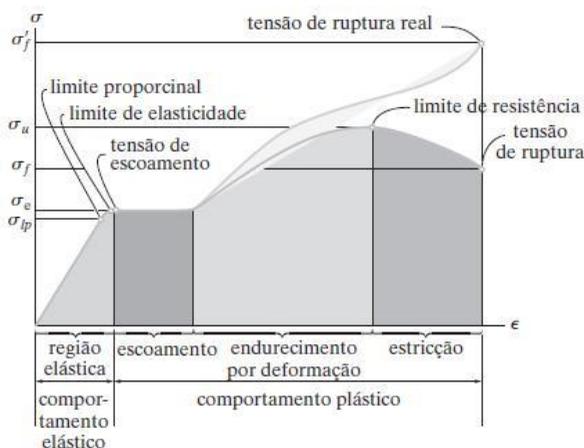
4.3.9 Determinação das propriedades mecânicas das membranas

A determinação das propriedades mecânicas dos materiais pode ser realizada por meio de testes como o ensaio de tração. Neste ensaio, o material é submetido a uma carga ou força de tração, gradativamente crescente, que promove uma deformação progressiva de aumento de comprimento até a ruptura do mesmo. Quando um material é submetido a tração, dentro de certos limites, a deformação é proporcional à tensão, seguindo a lei de Hooke (Equação 5) (HIBBELER, 2004)

Os materiais podem apresentar uma deformação elástica, a qual é reversível e desaparece quando a tensão é retirada (Figura 36). A deformação plástica, por sua vez, é provocada por tensões que ultrapassam o limite de elasticidade, caracterizando-se por ser irreversível (BARBOSA et al., 2017; HIBBELER, 2004; MANUEL; DIAS, 2017).

A tensão de ruptura é a medida da resistência máxima que um material suporta contra uma tensão de tração aplicada. Já a deformação na ruptura é o alongamento relativo que o material sofreu em relação a seu comprimento original (HIBBELER, 2004)

Figura 36 - Diagrama de tensão-deformação convencional e real para um material dúctil.



Fonte: Hibbeler (2004)

O módulo de elasticidade (E) é o parâmetro que caracteriza a rigidez de um material. Por sua vez, está relacionado com a energia necessária para deformar os ângulos e a distância de ligações entre átomos da cadeia polimérica. Quanto mais rígido o material, maior será o módulo de Young, resultando em uma menor flexibilidade do sistema (CANEVAROLO JR., 2004; MANUEL; DIAS, 2017; ROTTA; MINATTI; BARRETO, 2011).

Analisando os parâmetros avaliados, nota-se que as membranas sem agente plastificante (SBT) apresentam valores maiores de tensão de ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade (Tabela 4). Analisando os gráficos, essas membranas exibem um comportamento diferente em relação às demais (Figura 37). Enquanto as membranas com SBT apresentam apenas uma região elástica antes da ruptura, nos gráficos

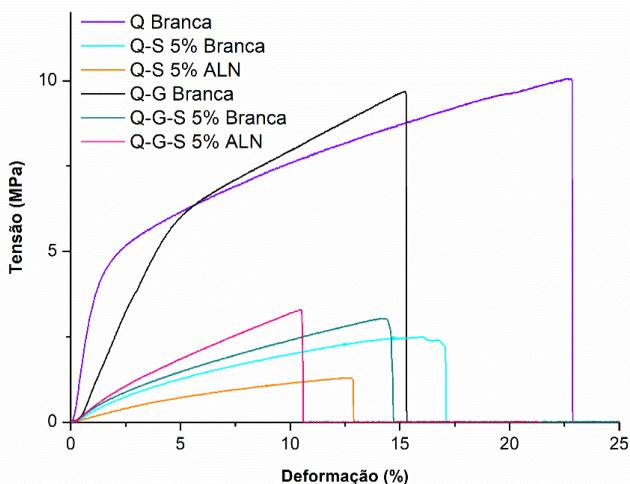
das membranas sem SBT encontram-se duas regiões, a região elástica e a região plástica. A presença de agentes plastificantes reduz as forças intermoleculares ao longo da rede tridimensional polimérica. Dessa forma, a ausência de moléculas menores entre as cadeias do polímero gera sistemas com menor flexibilidade (CAMPOS; MEI; SANTOS, 2015; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010)

Tabela 4 - Teste mecânico de estiramento obtidos para as membranas de QS.

Membrana	Tensão de ruptura (MPa)	Deformação na ruptura (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
Q Branca	9,43 ± 0,77 (a)	26,97 ± 3,60 (a)	3,72 ± 0,59 (a)
Q-S 5% Branca	2,58 ± 0,50 (b)	16,75 ± 2,78 (a,b)	0,19 ± 0,04 (b)
Q-S 5% ALN	1,33 ± 0,13 (b,c)	11,66 ± 1,99 (b,c)	0,12 ± 0,019 (b,c)
Q-G Branca	8,59 ± 2,35 (a)	13,84 ± 1,86 (b,c,d)	1,48 ± 0,40 (d)
Q-G-S 5% Branca	2,08 ± 1,18 (b,c,d)	8,18 ± 6,41 (b,c,d,e)	0,22 ± 0,03 (b,c,e)
Q-G-S 5% ALN	2,08 ± 1,00 (b,c,d)	8,62 ± 4,67 (b,c,d,e)	0,38 ± 0,06 (b,c,e)

Dados foram representados como média ± desvio padrão e tratados por ANOVA com pós teste Tukey (n=5). Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias (p > 0,05). Os parâmetros do teste mecânico de estiramento foram avaliados separadamente.

Figura 37 - Teste mecânico de tração das membranas. Curvas ilustrativas de deformação plástica e/ou elástica das membranas, nas quais não representam a média das análises.



Para as membranas com SBT, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os três parâmetros analisados (Tabela 4). Apesar disso, nota-se que as membranas sem GNP apresentaram valores menores de módulo de elasticidade e maiores para a deformação na ruptura, indicativos de sistemas mais flexíveis.

A ruptura das membranas plastificadas precedida pela região plástica do gráfico é característica de ruptura frágil, também chamada de “ruptura catastrófica”. Esse comportamento pode estar relacionado com a maior presença de água e desestruturação da rede tridimensional (CANEVAROLO JR., 2004; LLANOS RODRIGUEZ, 2014). Todas as membranas com SBT, indiferente da concentração, apresentaram maior maleabilidade e fácil manuseio, características as quais as membranas sem o plastificante não puderam ser notadas.

4.3.10 Ensaios de permeação cutânea *ex vivo*

A ALN é uma molécula utilizada em formulações tópicas devido às suas propriedades cicatrizante, hidratante, queratolítica, auxiliar na regulação da resposta inflamatória, estímulo para a proliferação fibroblástica e síntese de matriz extracelular (ARAÚJO et al., 2010; BECKER et al., 2010; SAITO, M.L.; OLIVEIRA, 1986; SAVIC et al., 2015; VERALDI; MENTER; INNOCENTI, 2008). Por apresentar baixo valor de log P (-3,14), a sua penetração na pele via difusão passiva pode ser prejudicada, reduzindo os efeitos farmacológicos esperados (HOFMANN et al., 2010; MERCK INDEX, 1996).

Quando o tecido cutâneo está íntegro, ou seja, sem lesões, a taxa de difusão passiva de moléculas hidrofílicas nas camadas superficiais da pele é reduzida comparativamente às moléculas hidrofóbicas. Desta forma, formulações que auxiliem na passagem do ativo do meio externo para a epiderme e derme podem contribuir para um efeito terapêutico mais efetivo. Já nos casos de lesões na pele, a integridade do tecido está comprometida, facilitando a penetração de moléculas, uma vez que a barreira de proteção não está mais presente (HOFMANN et al., 2010; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). Neste caso, tratamentos que associem atividade farmacológica, proteção contra infecções, choques externos, perda de líquidos e que permitam a troca gasosa entre a pele e o ambiente, podem acelerar o processo de regeneração tecidual e cura da lesão.

Analizando os resultados da quantidade de ALN permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) (Figura 38), observou-se um aumento na permeação do ativo quando veiculado nas membranas em relação ao

controle (solução de ALN a 1 mg/mL). Comparando-se os valores de fluxo (J_s) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$), obteve-se uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre Q-S 5% ALN e ALN (Tabela 5). Esses resultados indicam que as membranas de QS neutralizada auxiliam na passagem da ALN do meio externo para as camadas da pele. Em relação às membranas, notou-se que a permeação da ALN no sistema reticulado (Q-G-S 5% ALN) foi menor que na membrana não reticulada (Q-S 5% ALN). Tal resultado já era esperado, uma vez que a reticulação altera as propriedades morfológicas dos sistemas, tornando-os mais compactados. Além disso, nos ensaios de grau de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água, foram observados comportamentos similares. Para o teste de liberação *in vitro*, pôde-se observar uma liberação mais lenta para as membranas com GNP, corroborando com os resultados de permeação. Membranas não reticuladas também proporcionaram maior retenção de ALN na derme e epiderme. Os valores não foram apresentados, uma vez que a metodologia de extração não foi validada e um alto coeficiente de variação foi observado. Para a perda de massa, foram encontrados valores quase idênticos aos do ensaio de grau solubilidade das membranas de 69,03 e 67,29 %, para Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN, respectivamente. Esses valores foram associados com a difusão do SBT para o meio aquoso, levando a alta perda de massa do sistema.

Com relação a análise do coeficiente de correlação da cinética de liberação, valores mais próximos de 1 foram encontrados para membranas não reticuladas. Observou-se que a permeação da ALN incorporada nas membranas sofre variações principalmente nos pontos finais do experimento, descaracterizando este tipo de cinética nos tempos finais. Este resultado pode estar associado ao fato de as membranas terem sido umedecidas com 100 μL de tampão PBS no início do experimento. Com o decorrer do experimento, o líquido da câmara doadora teve seu volume reduzido devido à evaporação, limitando a capacidade de solubilização da ALN que era liberada e, conseqüentemente, a taxa de permeação da ALN. Isto explicaria o declínio da permeação naqueles estágios finais e perda do comportamento linear. Outro comportamento poderia ter sido observado caso maior quantidade de tampão tivesse sido utilizada no compartimento doador. Para a ALN pura, 1 mL de solução foi aplicado no compartimento doador. Neste caso, não foram observadas essas variações e tendência de formação de platô no perfil de permeação já que todo fármaco se encontrava solúvel na fase doadora. Outra hipótese está relacionada com a presença de SBT nas membranas. Esse excipiente é utilizado como umectante e, dependendo da sua concentração e condições de umidade, pode ocorrer a desidratação da pele pela absorção de água

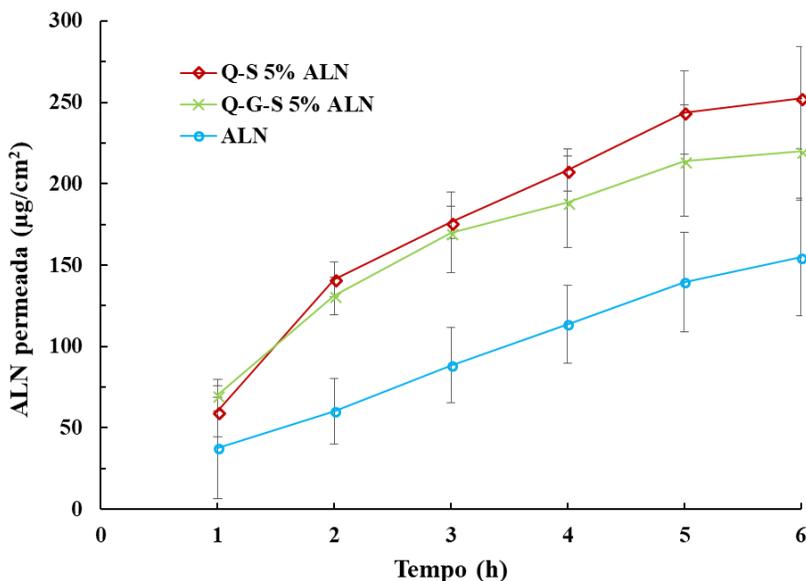
pele SBT, levando à redução da absorção da ALN no tecido (ROWE, RAYMOND C.; SHESKEY, PAUL J.; QUINN, 2009; YU et al., 2011).

Tabela 5 -Parâmetro de fluxo de permeação (J_s) e coeficiente de correlação (R^2) considerando uma cinética de ordem zero

	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	R^2 – Ordem zero
ALN	$26,45 \pm 5,23^{(a,**)}$	0,997
Q-S 5% ALN	$47,21 \pm 10,88^{(b,**)}$	0,965
Q-G-S 5% ALN	$36,81 \pm 5,82^{(a,b)}$	0,956

Os dados de fluxo (J_s) estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$). Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias utilizando-se o teste ANOVA/Tukey ($p > 0,05$), ** indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$).

Figura 38 - Perfis de permeação do fármaco puro (ALN) das membranas Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN através da pele de orelha de porco ($n=6$).



Apesar de ser extensivamente utilizada em formulações tópicas, poucos estudos de permeação cutânea com a ALN são encontrados na literatura. Manca e colaboradores (2016) analisaram a permeação,

hidratação e elasticidade da pele (estudos reológicos) com modelo de pele de porco. Foram avaliadas formulações lipossomais, um gel comercial (Sameplast®) e uma dispersão do fármaco. O perfil de permeação foi maior para os lipossomas, assim como a retenção de ALN nas camadas da derme e epiderme. Tais resultados foram associados com os estudos reológicos que demonstraram uma maior hidratação, relaxação e maciez da pele de porco após contato com essas formulações.

Em relação a dose efetiva de ALN para auxiliar na regeneração tecidual, em estudos *in vitro* de proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, as concentrações utilizadas variaram de 0,25 a 250 µg/mL (AB RAHMAN; ABDUL RAZAK; MOHD BAKRI, 2014; JORGE et al., 2008). As formulações disponíveis no mercado, que trazem a ALN na composição como ativo, apresentam uma concentração de 0,5 a 2 % do fármaco (FDA, 2015). Além disso, em estudos sobre a toxicidade aguda oral e dérmica da ALN em ratos, foi observado valor maior que 5000 mg/Kg (AKEMA, 2006; BECKER et al., 2010). Uma vez que há aproximadamente 500 µg de ALN por área de membrana, seria necessária uma grande quantidade de membrana para apresentar efeitos tóxicos (1 m² de membrana para um animal de 1 kg). Esses dados demonstram que o aumento da permeação da ALN pode não causar efeitos tóxicos ao paciente. Os fibroblastos, células que auxiliam na regeneração celular e cicatrização, estão localizados na derme, desta forma, torna-se necessária a permeação até esta camada para que a atividade farmacológica da ALN seja desempenhada (DRISKELL; WATT, 2015; KIM et al., 2007). A maior permeação da ALN, associada com a presença da QS podem desempenhar um ótimo papel na cicatrização de feridas e queimaduras. Essa avaliação poderia ser observada em testes *in vivo* de cicatrização.

Há poucos estudos sobre os mecanismos da QS no aumento da permeação cutânea de fármacos. Os autores relacionam as interações das cargas positivas da QS e negativas das junções intercelulares do estrato córneo como uma explicação para esse aumento (HE; GUO; ZHANG, 2008; TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009). No estudo aqui realizado, as membranas Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN passaram por um processo de neutralização antes da secagem, tornando o polímero neutro ou com poucas cargas positivas para interagir com a pele. Em busca de outras explicações para os resultados de permeação, encontraram-se avaliações da permeação cutânea de hidrogéis de QS com reticulantes físicos para a liberação de cloridrato de propanol (outra molécula hidrofílica). Cerchiara e colaboradores (2002) observaram uma relação entre o aumento da permeação do fármaco e a sua solubilidade na pele, a qual ocorreu pela interação entre QS e estrato córneo. He e colaboradores

(2009) avaliaram a influência do contato da QS e seus derivados (mono-*N*-carboximetil quitosana e *N*-trimetil quitosana) na estrutura da queratina do estrato córneo da pele de ratos. Foram observadas significativas alterações na estrutura secundária da queratina, por meio da redução da absorção da banda de amida I. Com a alteração da estrutura secundária da queratina do estrato córneo, a proteína torna-se mais flexível e com maior grau de liberdade para movimentação de carbono, o que justificaria um aumento da permeabilidade de moléculas através da pele. Além disso, também foi reportado um aumento na hidratação do estrato córneo e fluidez das membranas celulares na presença dos polímeros. Esse estudo compila e demonstra o mecanismo de interação entre QS e a pele que auxiliam na justificativa para os resultados encontrados para o aumento da permeação da ALN nas membranas Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN.

4.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, membranas neutras de QS, GNP e SBT foram desenvolvidas para a incorporação de ALN, visando uma formulação para aplicação em feridas e queimaduras. Os sistemas propostos com e sem agente reticulante foram comparados frente as suas características físico-químicas, morfológicas, mecânicas e nos testes de liberação e permeação *ex vivo*.

Com base na coloração das membranas contendo GNP, espectro de FTIR e teste de ângulo de contato foi sugerido que ocorrem interações entre ALN e o sistema polimérico. Observou-se uma relação entre a hidrofiliabilidade da superfície dos sistemas e maior força de bioadesão. A liberação *in vitro* da ALN das membranas sem GNP foi rápida, sendo caracterizado como o efeito de liberação “*burst*”, a qual está relacionado com a presença de fármaco na superfície da membrana. Quando se comparou o perfil de liberação de ALN para as duas concentrações de SBT, não foram observadas diferenças significativas. Além disso, as membranas reticuladas com GNP apresentaram valores menores de eficiência de liberação, indicando que a reticulação auxilia no controle da liberação de ALN. Optou-se por dar sequência dos estudos com as membranas Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN, devido à maior maleabilidade e uniformidade de conteúdo de ALN. O sistema não reticulado, Q-S 5% ALN apresentou maior valor de permeabilidade ao vapor de água, sendo comparável com valores da literatura de taxa de vapor para peles lesionadas. O perfil de ruptura das membranas contendo SBT demonstrou que os sistemas são menos rígidos que os demais, sendo uma vantagem para o uso e aplicação na pele pela facilidade de manuseio.

A incorporação da ALN nas membranas foi eficaz para o aumento da permeação do fármaco na pele, comparando-se com a molécula em solução. Tal aumento foi associado à presença da QS e relatos na literatura do polímero ser responsável por aumentar a fluidez das membranas celulares, hidratação do estrato córneo e alterar a estrutura da queratina. Com base na caracterização das membranas e suas propriedades, os sistemas propostos Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN são promissores para aplicação na pele e auxiliar na regeneração tecidual.

CAPÍTULO IV
PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS
ESPONJAS DE QUITOSANA E ALANTOÍNA

5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ESPONJAS DE QUITOSANA E ALANTOÍNA

5.1 INTRODUÇÃO

Matrizes poliméricas porosas, tais como esponjas e *scaffolds* são sólidos tridimensionais que fornecem suporte necessário para a fixação, proliferação e diferenciação celular quando aplicados na engenharia de tecidos. Usualmente apresentam graus de porosidade, podendo ser mecanicamente rígidas ou gelatinosas, dependendo do grau de reticulação (ASTM, 2018; MITSUISHI et al., 2013). Para aplicação na área médica, estes sistemas devem se biocompatíveis, maleáveis e, dependendo da aplicação, biodegradáveis (JAYAKUMAR et al., 2011). Na literatura, são encontrados diversos sistemas porosos produzidos com quitosana (QS) com aplicação no segmento de regeneração tecidual e liberação de fármacos (BI et al., 2011; HAN et al., 2014; IKEDA et al., 2014; MAHMOUD; SALAMA, 2016; QIAN et al., 2009; SHANMUGASUNDARAM et al., 2001; YAN et al., 2010).

Esponjas de QS apresentam propriedades terapêuticas, são flexíveis, porosas, com alta capacidade de absorção de líquidos (como exsudatos, por exemplo) e fornecem uma barreira física contra infecções e agressões. Essas características as tornam um sistema promissor para aplicação em queimaduras e lesões cutâneas (DAI et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2011).

Testes de cicatrização em ratos com esponjas de QS e curcumina, apresentaram resultados promissores de adesão na superfície da lesão e absorção de sangue e exsudato. Além disso, o processo de cicatrização foi mais rápido comparando-se com o controle (gaze). Foi observado maior formação de colágeno no local, sugerindo que as esponjas de QS (com ou sem curcumina) são viáveis para aplicação em feridas (QIAN et al., 2009).

Em virtude do cenário exposto, a proposta deste capítulo foi avaliar a preparação, bem como as características físicas, químicas mecânicas e morfológicas de esponjas neutralizadas de quitosana, alantoina e genipina.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Materiais

Para o desenvolvimento das esponjas poliméricas foram utilizados ALN e os excipientes previamente caracterizados antes do preparo das formulações conforme descrito no Capítulo II. A solução tampão PBS (pH 7,4) foi preparada de acordo com protocolos padronizados (COLD SPRING HARB PROTOC; 2012). Os reagentes utilizados (carbonato de sódio, hidróxido de sódio, ácido acético, ácido fosfórico) são de pureza analítica. A água ultrapura foi obtida a partir de sistema Milli-Q® (Millipore, Estados Unidos da América).

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Preparação das esponjas de quitosana e alantoína

As esponjas poliméricas foram obtidas a partir de uma solução a 2% (m/V) de QS MMW preparada com uma solução de ácido acético a 0,1 M. A quantidade de sal carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi estabelecida por titulação, utilizando um medidor de pH portátil modelo PG1400 (Gehaka, Brasil). Um volume conhecido de solução de QS 2% (m/V) foi mantido sob agitação magnética e alíquotas de 1 mL de Na_2CO_3 (1 M) foram adicionadas lentamente até a solução atingir pH 7,0. Com base nos resultados, foi estabelecida a quantidade de 0,71 % (m/m) de Na_2CO_3 para a quantidade de QS acima especificada (2 % m/V).

Nas esponjas reticuladas, adicionou-se 1 mM de genipina (GNP) ao gel de QS. As quantidades de Na_2CO_3 e GNP foram previamente estabelecidas em outro trabalho realizado no Laboratório Polimat do Departamento de Química da UFSC, orientado pelo Prof. Dr. Alexandre Luis Parize (ANDRZEJEWSKI, 2017).

Para a ALN, adicionou-se uma concentração que, ao final do processo de secagem, fosse de 5 % (m/m). As quantidades em porcentagem de cada excipiente e ALN estão descritas no quadro 5. Para padronizar a espessura das esponjas, foi utilizada uma razão de 0,3 g de gel para cada cm^2 de área da placa de Teflon™ (12 cm de diâmetro).

O processo de preparo das esponjas seguiu uma ordem de adição dos componentes. Inicialmente, pesou-se a QS 2 %, ALN e GNP, formando um gel. Estes dois últimos, quando aplicados, foram agitados durante 1 h com agitação magnética para garantir a homogeneização completa dos componentes. O sal (Na_2CO_3) foi pesado separadamente e solubilizado em 10 mL de água destilada. Na sequência, o gel foi adicionado à solução de Na_2CO_3 diretamente na placa e homogeneizado por agitação magnética. Após esse processo, a placa foi mantida por 3 min em banho de ultrassom para retirada das bolhas do gel. As amostras

foram congeladas em *freezer* a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h e liofilizadas em liofilizador LD 1500 (Terroni, Brasil) por 24 horas. Após a retirada do liofilizador, as esponjas foram armazenadas em dessecador e protegidas com papel alumínio.

Quadro 5 - Proporções das matérias primas para obtenção das esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.

ESPONJA	QS 2% (%)	ALN (%)	GNP (%)	Na ₂ CO ₃ (%)	Água (mL)
Q Branca ¹	99,30			0,70	10
Q ALN	99,15	0,15		0,70	10
Q-G Branca	99,28		0,02	0,70	10
Q-G ALN	99,13	0,15	0,02	0,70	10

¹ A nomenclatura de cada esponja foi baseada na sua composição. A letra Q significa a presença de quitosana, a letra G de genipina. A presença do ativo nas membranas foi representada pela sigla ALN, já as membranas placebo, ou seja, sem ALN, foram nominadas “brancas”.

5.2.2.2 Caracterização físico-química e morfológica

5.2.2.2.1 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de absorção na região do infravermelho das esponjas foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil), em uma faixa espectral de 600 a 4000 cm^{-1} , com uma média de 32 scans, considerando uma resolução espectral de 4 cm^{-1} .

5.2.2.2.2 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

As curvas DSC foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) utilizando cadinhos de alumínio (modelo 201-52943) hermeticamente fechados com aproximadamente 5 mg de esponja. Foram realizadas duas curvas de aquecimento para cada amostra, a primeira na faixa de 30 a 150 $^{\circ}\text{C}$, a uma razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica nitrogênio (N_2) de 100 mL/min . Após o resfriamento do sistema, as amostras foram submetidas a segunda curva de aquecimento de 30 a 270 $^{\circ}\text{C}$, reduzindo-se a razão de aquecimento para 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantendo-se o mesmo fluxo de N_2 da etapa anterior. A primeira etapa teve como objetivo retirar a água ainda presente no sistema,

apagando o histórico térmico das esponjas (DONG et al., 2004; IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, 2014; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Este procedimento é realizado para facilitar a visualização dos eventos de transição vítrea (T_g) na segunda curva. Os dados obtidos foram processados com o auxílio do *software* TA-60®.

5.2.2.2.3 Difração de raios-X (DRX)

Os difratogramas das esponjas foram obtidos em equipamento θ - θ D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre Ka ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando em corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV, equipado com detector de cintilação unidimensional LINXEYE. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, através de varredura angular a 2θ na faixa de 5 a 40° e com incremento de $0,091^\circ/s$.

5.2.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME). As fotomicrografias das esponjas foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390 LV (Jeol, Japão) sob voltagem de aceleração de 10 kV, considerando diferentes magnificações. A preparação prévia das amostras envolveu a fixação das membranas com fita adesiva dupla face em *stubs* e recobrimento com ouro em metalizador do tipo EM SCD 500 (Leica, Áustria). Analisou-se a superfície das membranas e porções fraturadas obtidas a partir da submersão das esponjas em N_2 líquido, seguido da quebra do material.

5.2.2.3 Ensaio de bioadesão

Para a análise de bioadesão, utilizou-se como modelo experimental a pele de orelha de porco, adaptando-se metodologias já descritas na literatura (BREDENBERG; NYSTRÖM, 2003; DONNELLY et al., 2006; GONÇALEZ, 2012). Os testes foram realizados em texturômetro TA.HD plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), por meio do teste de compressão. Os parâmetros utilizados estão descritos no quadro 6. A força máxima de separação (força bioadesiva) foi obtida através do gráfico de força (N) *versus* tempo (s). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, com a mesma esponja e adição de volume fixo de $25 \mu\text{L}$ de tampão PBS antes de cada medida.

Quadro 6 - Parâmetros utilizados no teste de bioadesão

Parâmetro	Valores
Velocidade de descida	1 mm/s
Tempo de contato	30 s
Força de gatilho	5 mN
Velocidade de subida	0,5 mm/s
Temperatura	25 °C

As membranas foram cortadas nas mesmas dimensões da superfície circular da sonda (35 mm de diâmetro) e coladas com auxílio de fita dupla face. Já a pele de orelha de porco foi fixada em placa de madeira com cola de cianoacrilato.

5.2.2.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da alantoina

Os ensaios de liberação *in vitro* das esponjas de QS foram realizados em incubadora do tipo *shaker* modelo NT 715 (Novatecnica, Brasil). O método utilizado foi adaptado da Farmacopeia Americana <724> (USP, 2017). Utilizou-se 20 mL de tampão PBS (pH 7,4), agitação de 50 rpm a $32 \pm 0,5$ °C, considerando-se condição *sink*². Aproximadamente 50 mg de esponja foram pesadas, equivalente a 2,5 mg de ALN. O ensaio também foi realizado para as misturas físicas, pesando-se com precisão a mesma quantidade de ALN. Alíquotas de 500 µL foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 min. As amostras foram diluídas, filtradas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência conforme já descrito no Capítulo III.

Com o auxílio do *software Add-in DD-Solver*[®], foi possível analisar o perfil cinético de liberação da ALN a partir das esponjas de QS. Os modelos selecionados foram os mesmos do capítulo anterior. A cinética que apresentou maior valor de R^2 foi selecionada para representar a liberação do ativo. Parâmetros tais como eficiência de liberação (EL) e coeficiente difusional (n) também foram calculados.

5.2.2.5 Determinação do grau de intumescimento (GI)

² condição *sink*: pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada de fármaco (ABDOU, 1989).

A determinação do grau de intumescimento das esponjas foi realizada em soluções tampão PBS pH 7,4. A metodologia foi adaptada de Mahmoud e Salama (2016). As esponjas foram cortadas de modo que todas apresentassem a mesma dimensão e formato (1cm x 1 cm), secas em estufa a 80 °C por 1 h e pesadas antes de iniciar o experimento. As amostras foram mergulhadas em tampão PBS e incubadas no *shaker* modelo NT 715 (Novatecnica, Brasil) a $32 \pm 0,5$ °C (sem agitação). Nova pesagem foi realizada após 24 h de incubação. Para isto, as esponjas foram retiradas do meio, secas em papel absorvente para remover o excesso de solução na superfície e pesadas novamente. O estudo foi realizado em triplicata. O GI de cada amostra no tempo t foi calculado pela equação 8.

$$GI(\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (8)$$

Onde, M_t é a massa da amostra no tempo t e M_0 a massa inicial da amostra.

5.2.2.6 Ensaio de erosão das esponjas de QS

A determinação da erosão das esponjas em meio aquoso foi realizada após 24 h do experimento de determinação do grau de intumescimento (5.2.2.5). Ao final desse intervalo, as soluções tampão foram filtradas e o sólido retido foi colocado em estufa a 60 °C por 24 h, até completa secagem. A erosão (E) foi calculada de acordo com a equação 9.

$$E (\%) = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (9)$$

Onde, M_t se refere ao peso da amostra após 24 horas e M_0 se refere a massa inicial da esponja.

5.2.2.7 Determinação das propriedades mecânicas

Testes de tração e compressão foram realizados com o auxílio de texturômetro modelo TA.HD plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), o qual é controlado pelo *software* Exponent Stable Micro System®, com uma célula de carga de 50 kgf. A espessura das esponjas foi medida utilizando-se micrômetro modelo 102-301 (Mitutoyo, Japão),

com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

5.2.2.7.1 *Teste mecânico de tração*

As amostras foram preparadas na forma retangular, de acordo com a norma D638-14 (ASTM, 2003). A velocidade de tração e distância inicial da sonda foi de 1 mm/s e 50 mm, respectivamente.

Para obter os valores de tensão e deformação foi necessário alimentar o *software* com as dimensões dos corpos de prova.

O cálculo do módulo de elasticidade (E) das amostras foi realizado de acordo com a equação 10.

$$\tau = E \cdot \varepsilon \quad (10)$$

Onde, τ é a tensão (MPa), ε a deformação (%) e E é o módulo de elasticidade (MPa).

5.2.2.7.2 *Teste mecânico de compressão*

Para os testes de compressão, as amostras foram preparadas na forma cilíndrica de acordo com a norma D 5024-15 (ASTM, 2015). A velocidade de tração utilizada foi de 1 mm/s até atingir 80 % de compressão do material.

O módulo de compressibilidade (MPa) foi calculado na porção linear da curva tensão (MPa) *versus* deformação (%).

5.2.2.8 Ensaio de permeação cutânea *ex vivo*

A permeação cutânea da ALN pura (controle) e das duas esponjas de QS (Q ALN e Q-G ALN) foi avaliada utilizando-se metodologias já descritas na literatura (BAVARSD et al., 2016; CAON et al., 2015). O modelo de membrana selecionado foi a pele de orelha de porco devido à similaridade anatômicas, bioquímica e fisiológica em relação à pele humana (CAON et al., 2015; JUNG; MAIBACH, 2015; SIMON; MAIBACH, 1982). As orelhas de porco foram obtidas e processadas conforme metodologia previamente descrita (Capítulo III, item 4.2.2.4).

As câmaras de Franz foram alocadas em banho termostaticado a 37 °C e o sistema de agitação magnética foi ajustado para 800 rpm. O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de tampão PBS. Não foi necessária a adição de agente solubilizante já que o fármaco apresenta

alta solubilidade aquosa. O tecido foi disposto na interface dos compartimentos da câmara de Franz, com a epiderme voltada para o compartimento doador. Considerou-se uma área de difusão de $1,77 \text{ cm}^2$. Previamente ao início dos ensaios de permeação, ambos os compartimentos foram preenchidos com tampão PBS de modo a manter uma hidratação mais uniforme dos tecidos. Estipulou-se um período de equilíbrio de 30 min.

As esponjas foram cortadas em formato circular com área de $1,77 \text{ cm}^2$, pesadas antes do experimento e depositadas sobre o compartimento doador. Um volume fixo de $100 \mu\text{L}$ de tampão PBS foi adicionado sobre as esponjas para facilitar a bioadesão e simular o ambiente úmido das feridas. Para comparar os perfis de liberação das esponjas e do fármaco puro, considerou-se a adição de 1 mL de uma solução aquosa a 1 mg/mL de ALN. Tal concentração foi calculada com base nas quantidades de ALN por área de esponja utilizada no experimento.

Em intervalos pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h), alíquotas de $400 \mu\text{L}$ da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem (com reposição da solução) e quantificadas por CLAE utilizando o método previamente descrito (item 4.2.2.5).

Com os resultados da quantificação de ALN na câmara receptora foram plotados os gráficos da quantidade de ALN permeada ($\mu\text{g/cm}^2$) em função do tempo (h). O estado de fluxo constante (J_s) foi calculado pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade de ALN permeada ($\mu\text{g/cm}^2$) em função do tempo (h) (GANNU et al., 2010; MASHRU et al., 2005). Eventualmente, a quantidade de ALN presente na área de $1,77 \text{ cm}^2$ de esponja estava um pouco abaixo de $1000 \mu\text{g}$, desta forma, os valores finais foram normalizados para que todas as amostras apresentassem a mesma quantidade inicial de ALN. Como os perfis cinéticos tiveram um comportamento linear, sugerindo uma cinética de ordem zero, calculou-se o coeficiente de correlação (R^2) de modo a julgar se as esponjas seriam candidatas apropriadas quando se considera uma liberação controlada do ativo.

A retenção da ALN na epiderme e derme foi avaliada ao final do experimento. As amostras de pele expostas aos tratamentos foram lavadas com PBS para remover o excesso de fármaco nas camadas superficiais e a epiderme foi separada da derme com o auxílio de bisturi. Para aumentar a eficiência de extração do fármaco a partir do tecido, fragmentos menores foram gerados cortando-se o tecido com uma tesoura. A extração da ALN foi realizada com 3 mL de acetonitrila que, após 24 h de armazenamento em geladeira (4°C), incluiu uma etapa de sonicação (15

min) e centrifugação (5 min). As amostras foram diluídas e analisadas por CLAE.

Para avaliar a perda de massa das esponjas, ao final do experimento, as amostras foram mantidas em estufa a 60 °C por 24 h e pesadas. A perda de massa (PM) foi expressa em porcentagem, de acordo com a equação abaixo.

$$PM (\%) = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (11)$$

Onde, M_t se refere ao peso da amostra após secagem na estufa por 24h e M_0 se refere a massa inicial da esponja.

5.2.2.9 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas do teste de bioadesão e liberação *in vitro* utilizou-se o teste *t*-Student. Para os demais testes, empregou-se a análise de variância (ANOVA) com pós-teste Tukey. O software GraphPad InStat foi utilizado para o tratamento dos dados. Para todas as análises estatísticas, aplicou-se um intervalo de confiança de 95%. Diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

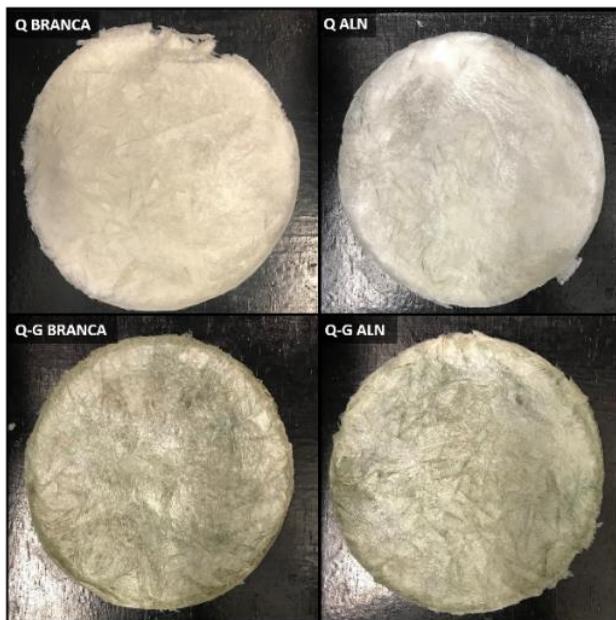
5.3.1 Preparação das esponjas de quitosana e alantoína

Conforme já descrito no Capítulo III, no tópico de preparação das membranas (4.3.1), as esponjas de QS passaram pelo processo de neutralização previamente à secagem. Nos primeiros testes, considerou-se a adição do plastificante SBT, porém, durante o processo de liofilização ocorreu extravasamento do mesmo nas bandejas do equipamento. Além disto, as esponjas sem SBT não apresentaram fragilidade ao manuseio. Desta forma, optou-se por trabalhar com os sistemas sem plastificante.

A operação de secagem por liofilização resultou em uma perda de massa de aproximadamente 97,5% (m/m), o que exigiu novo ajuste da quantidade de ALN adicionada de modo que as membranas e esponjas apresentassem a mesma concentração final (5% m/m).

A reticulação química com GNP forma membranas de coloração diferenciada. Tal processo inicia quando QS e GNP são misturadas, na etapa de preparação, e intensifica-se ao longo do processo de secagem. Contudo, pôde-se observar que, ao congelar as amostras, essa alteração de cor foi interrompida. Ao final da liofilização, as esponjas desenvolvidas apresentaram coloração levemente esverdeada (Figura 39).

Figura 39 - Foto das esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.



5.3.2 Caracterização físico-química e morfológica

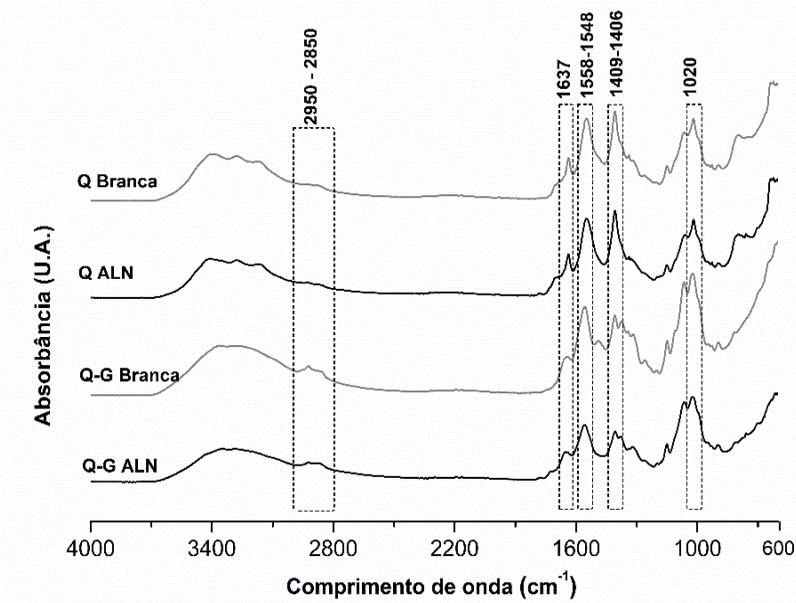
5.3.2.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Analisando os espectros de FTIR das esponjas de QS, atribui-se diversas bandas ao polímero (Figura 40). Dentre elas estão as bandas em 3292 cm^{-1} (grupamento -OH e -NH); entre 2850 e 2950 cm^{-1} (deformação axial do grupamento $-\text{CH}_2$); 1637 cm^{-1} (amida I); 1375 cm^{-1} (estiramento simétrico de $-\text{CH}_3$) e 1026 cm^{-1} (estiramento simétrico de $-\text{COC}$) (HOSSEINI et al., 2015; KIM, 2010; LAWRIE et al., 2007). Na região de 3700 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} , a qual é atribuída aos grupamentos -NH, -OH

e ligações de hidrogênio formadas entre QS e a água, a intensidade da banda é menor para as esponjas em relação às membranas. Essa redução pode estar associada a menor quantidade de água presente nos sistemas liofilizados (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010).

Butler, Ng e Pudney (2003) analisaram o espectro de FTIR da mistura de QS e GNP. Os autores relacionam a diminuição na intensidade das bandas em 1550 e 1414 cm^{-1} com as interações que ocorrem entre polímero e reticulante. Isto foi observado nas esponjas com GNP para as bandas entre 1548 e 1558 cm^{-1} e entre 1406 e 1409 cm^{-1} , confirmando que ocorreu reação de reticulação (Quadro 7). O sal de acetato de sódio trihidratado, formado na reação de neutralização da QS também é caracterizado pela presença de bandas nesta região (AGASTI; KAUSHIK, 2014; MAX; CHAPADOS, 2004).

Figura 40 - Espectro de FTIR para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.



De forma análoga as membranas do capítulo anterior, bandas na região de 1550 - 1560 cm^{-1} apresentaram um aumento comparando-se com os sistemas placebo. Esse aumento pode estar associado ao deslocamento da banda em 1525 cm^{-1} (-NH da imida) da ALN devido às interações com o sistema.

Quadro 7 - Intensidades de absorvância normalizadas do espectro de FTIR das esponjas Q Branca, Q-G Branca, Q ALN e Q-G ALN nas faixas 1548-1558 cm^{-1} e 1406-1409 cm^{-1} .

Esponja	1548- 1558 cm^{-1}	1406 - 1409 cm^{-1}
Q Branca	2,0753	2,255
Q-G Branca	1,7273	1,5587
Q ALN	2,2106	2,4955
Q-G ALN	1,4056	1,1714

5.3.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas termoanalíticas das esponjas apresentaram um perfil semelhante ao encontrado no Capítulo III. No primeiro ciclo de aquecimento (Figura 41), é possível visualizar um evento de fusão próximo a 55 °C, o que é associado ao sal trihidratado de acetato de sódio formado na reação de neutralização das esponjas (CABEZA et al., 2003; MACHIDA; SUGAHARA; HIRASAWA, 2017; WADA; YAMAMOTO, 1982). Entre 70 e 115 °C, outro evento endotérmico mais alargado está presente, o qual é associado a evaporação de água e compostos voláteis. Silva e colaboradores (2016) avaliaram o comportamento térmico de *scaffolds* de QS e curcumina e relacionaram o evento endotérmico em 146 °C à evaporação de compostos voláteis e possível relaxação das cadeias da QS. Para a esponja Q ALN, o evento associado à perda de água ocorreu entre 115 e 150 °C. Tal variação pode estar relacionada com a amostra, visto que a esponja Q ALN estava armazenada a mais tempo que as demais. Outra possível explicação está relacionada com as interações que a ALN faz com o sistema, podendo alterar a temperatura de volatilização da água e outras substâncias.

Figura 41 - Primeira curva de aquecimento de DSC para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.

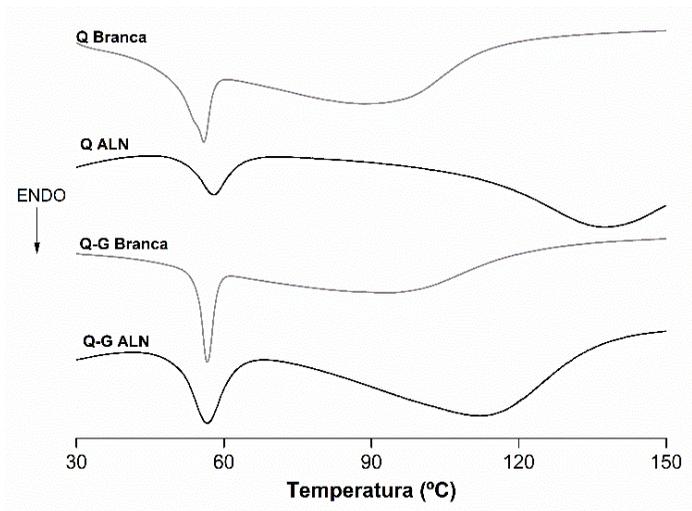
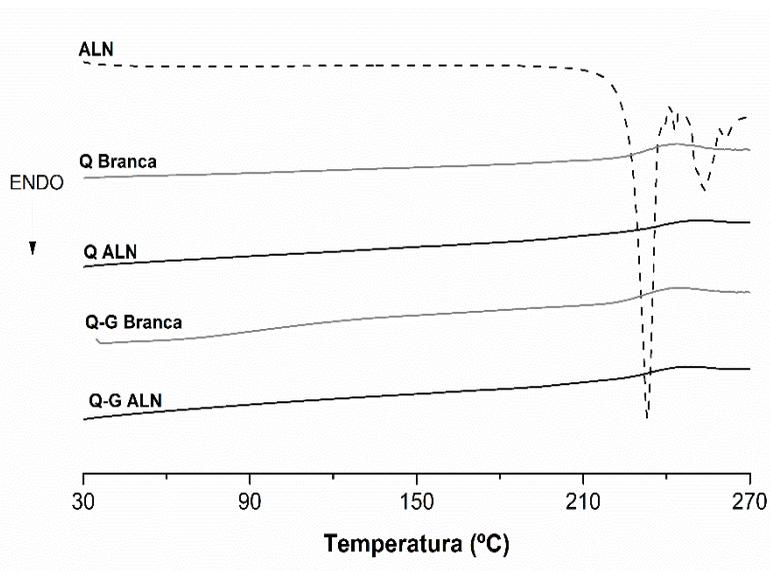


Figura 42 - Segunda curva de aquecimento de DSC para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.

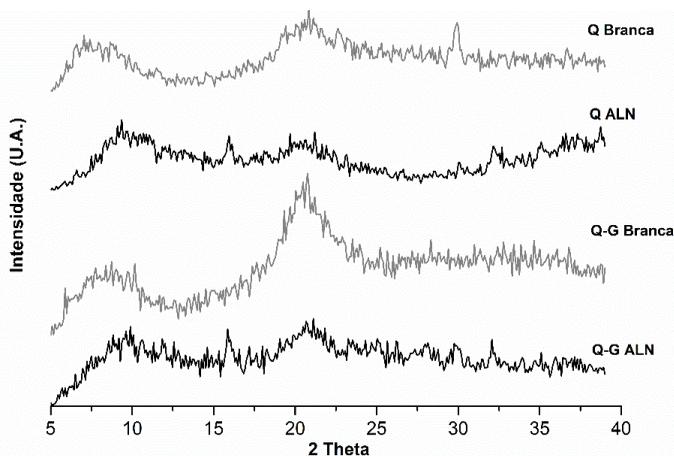


Na segunda etapa de aquecimento (Figura 42), o evento de fusão da ALN não foi observado para nenhuma das esponjas, o qual está associado à baixa quantidade de ativo nas formulações (inferior ao limite de detecção do equipamento) e a possível amorfização. Novamente, não foi possível visualizar o evento característico da Tg dos sistemas de QS. A Tg ocorre nos polímeros amorfos e é caracterizada por uma mobilidade aumentada dos segmentos da cadeia, fazendo com que o material mude de um estado vítreo, imobilizado, para um estado flexível (BERG et al., 2014). Conforme discutido no capítulo anterior, a alta higroscopicidade da QS dificulta a determinação da Tg dos sistemas desenvolvidos (ANDRZEJEWSKI, 2017; CORAZZARI et al., 2015; IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, 2014; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010)

5.3.2.3 Difração de raios-X (DRX)

Para todas as amostras analisadas, halos de baixa intensidade em 2θ em 10° e 20° foram observados, sendo característicos de sistema amorfo (Figura 43). Ambos são característicos da QS e são indicativos que os sistemas desenvolvidos estão no estado semicristalino com baixo grau de cristalinidade (CORAZZARI et al., 2015; NUNTHANID et al., 2001). A esponja Q-G Branca foi a que apresentou maior intensidade para os dois halos, esse mesmo comportamento foi observado para as membranas de QS reticuladas.

Figura 43 - Análises de DRX para as esponjas Q Branca, Q ALN, Q-G Branca, Q-G ALN.



Comparando-se os difratogramas das esponjas com as membranas de QS, notou-se uma diminuição na intensidade das reflexões para os sistemas liofilizados. Pierre e Pajonk (2002) mencionam que sistemas do tipo aerogel, na grande maioria das vezes, apresentam estrutura amorfa quando analisados por DRX.

5.3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens da superfície dos sistemas liofilizados revelaram um caráter poroso e laminar com depósito de sal de acetato de sódio trihidratado, o qual também foi observado na superfície das membranas de QS neutralizadas. As imagens A1, B1 e D1 (Figura 44) revelaram uma superfície lisa e homogênea para a parede dos poros.

Nas microfotografias das fraturas (Figura 45), é observada a mesma característica porosa, evidenciando as formas irregulares e heterogêneas dos poros. As regiões analisadas das esponjas Q Branca e Q-G ALN (Figura 45 A2 e D2) apresentaram tamanhos menores de poros em relação as demais.

Figura 44 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a superfície das esponjas: A1) Q Branca; B1) Q ALN; C1) Q-G Branca; D1) Q-G ALN.

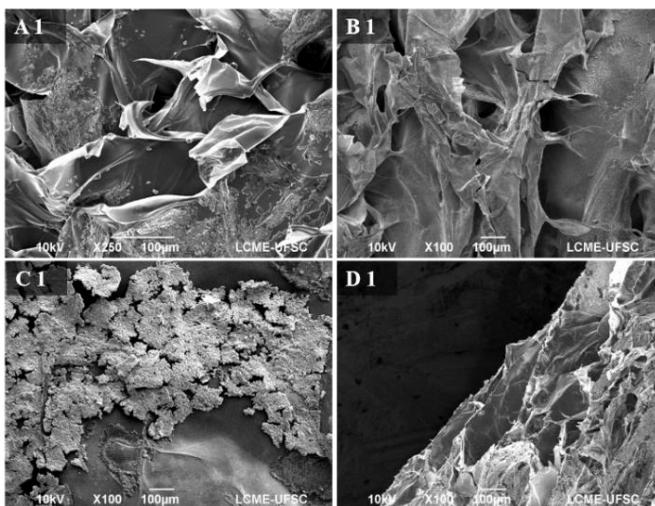
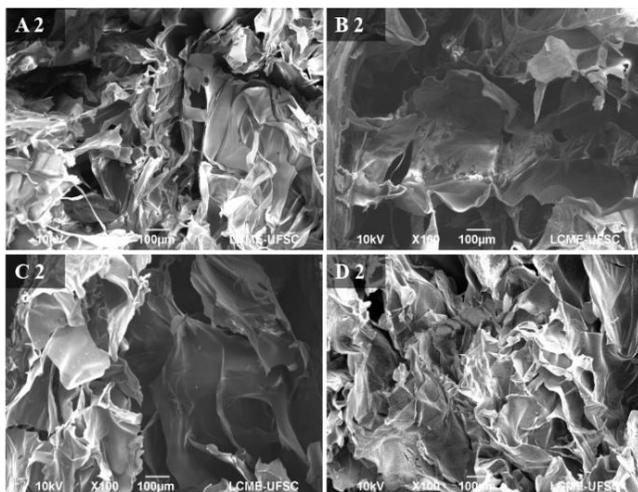


Figura 45 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a fratura das esponjas: A2) Q Branca; B2) Q ALN; C2) Q-G Branca; D2) Q-G ALN.



A formação de estruturas laminares e porosas é descrita por Suh e Matthew (2000). Os autores explicam que o congelamento dos sistemas leva a formação de cristais de água no gel de QS, gerando materiais porosos após a remoção da água por liofilização. O tamanho de poro e distribuição podem ser controlados pela velocidade de congelamento. Em outro estudo com diferentes métodos de congelamento de géis de QS, observou-se que métodos rápidos de congelamento resultavam em cristais de gelo menores e, por consequência, menor tamanho de poro dos *scaffolds* (MADIHALLY; MATTHEW, 1999). Dessa forma, os poros irregulares das esponjas podem estar associados ao congelamento lento do gel de QS (a -5°C por 72 h).

Em formulação para regeneração tecidual, como em úlcera e queimaduras, a presença de poros auxilia na troca de gases, absorção de exsudato e fornece o suporte necessário para a fixação e proliferação celular (JAYAKUMAR et al., 2011; SILVA et al., 2016).

Os testes de ângulo de contato e molhabilidade, descritos no Capítulo III também foram realizados para as esponjas. Por outro lado, devido à alta porosidade do sistema, a gota de água foi rapidamente absorvida, impedindo a visualização do ângulo formado entre as superfícies.

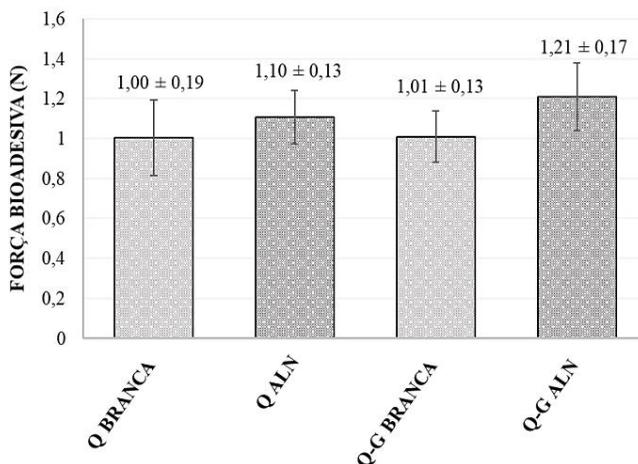
5.3.3 Ensaio de bioadesão

A adesão das esponjas e *scaffolds* à pele é um pré-requisito para a obtenção de produtos adequados para uso tópico em lesões e queimaduras. Quando maior a força bioadesiva, maiores são as interações entre a formulação e o tecido biológico (BREDENBERG; NYSTRÖM, 2003; DONNELLY et al., 2006; GONÇALEZ, 2012; PEH; KHAN; CH'NG, 2000; SILVA et al., 2008).

Não foram observadas variações significativas entre as amostras quando comparadas duas a duas ou todas ao mesmo tempo ($p > 0,05$, *t*-Student e ANOVA/Tukey; Figura 46). Isso indica que a presença do fármaco não alterou a propriedade bioadesiva das esponjas.

Analisando os resultados obtidos para as membranas de QS no Capítulo III (4.3.4), são observadas diferenças nos valores comparando-se com as esponjas. Os sistemas liofilizados apresentam o dobro de força de bioadesão. As esponjas, por serem sistemas porosos e de alta retenção de líquidos, interagem com a pele mais facilmente.

Figura 46 – Resultados da força bioadesiva (N) das esponjas testadas em pele de orelha de porco.



Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n=6).

Mahmoud e Salama (2016), em estudo com *scaffolds* de QS e colágeno, realizaram o teste de bioadesão em condições experimentais semelhantes. A formulação com maior força bioadesiva apresentou valor

de $0,35 \pm 0,01$ N ($36,0 \pm 0,8$ g). Os autores não utilizaram tampão ou água para umidificar a pele, o que explicaria os baixos valores encontrados. Wang, Yan e Zhang (2006), por sua vez, realizaram este teste com esponjas de QS submergindo-as previamente em PBS pH 7,4. Os resultados encontrados foram elevados, em torno de 23 N. Tais informações vão ao encontro da teoria da molhabilidade que relaciona as tensões interfaciais entre as superfícies, na qual a água presente no sistema é de total importância para o processo de adesão (BREDENBERG; NYSTRÖM, 2003).

5.3.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da alantóina

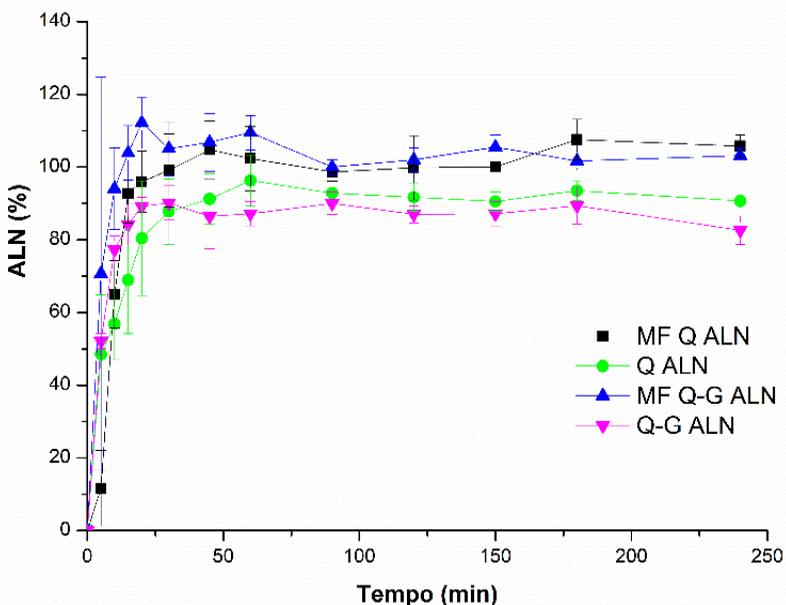
Analisando as curvas de liberação (Figura 47), nota-se que as esponjas não apresentam liberação tão rápida quanto suas respectivas misturas físicas nos primeiros 20 min. Comparando-se as formulações Q ALN e Q-G ALN, não foram observadas diferenças significativas no valor de eficiência de liberação (Tabela 6).

Os perfis de liberação das esponjas e membranas (Q-S 5% ALN e Q-G-S 5% ALN) foram também comparados, a fim de verificar a influência da operação de secagem dos géis de QS na liberação de ALN (Figura 47). Analisando os sistemas sem agente reticulante, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, *t*-Student) entre os valores de EL da esponja e membrana ($88,71 \pm 2,77$ % *versus* $95,13 \pm 2.15$ %, respectivamente). O efeito *burst* de liberação não é tão pronunciado na esponja, sendo notória a diferença nos perfis de liberação. Foram necessários 45 min para a concentração de ALN ser a mesma para ambas as formulações. Já nos sistemas com GNP, o perfil de liberação não apresentou muitas variações, contudo, observou-se diferença estatisticamente significativa para o valor de EL ($p < 0,05$).

De forma geral, as esponjas apresentaram uma liberação mais lenta em relação às membranas (Figura 48). Tal comportamento não era esperado, uma vez que a estrutura das esponjas é constituída por poros maiores, como observado pelas análises de MEV. O efeito de liberação *burst*, observado claramente para as membranas, pode estar associado à grande quantidade de ALN na superfície, ocasionada pela operação de secagem e/ou a presença de SBT, que auxilia na solubilização do ativo (HUANG; BRAZEL, 2001). Mahmoud e Salama (2016), em estudo de liberação do norfloxacino a partir de *scaffolds* de QS e alginato, relacionou a rápida liberação do fármaco com a alta porosidade e superfície de contato dos sistemas. No caso das esponjas estudadas, o

mecanismo de liberação pode estar associado com o intumescimento das esponjas e a difusão do fármaco para o meio aquoso.

Figura 47 - Liberação da ALN (%) em função do tempo (min). Comparação entre esponjas Q ALN e Q-G ALN e suas respectivas MF.



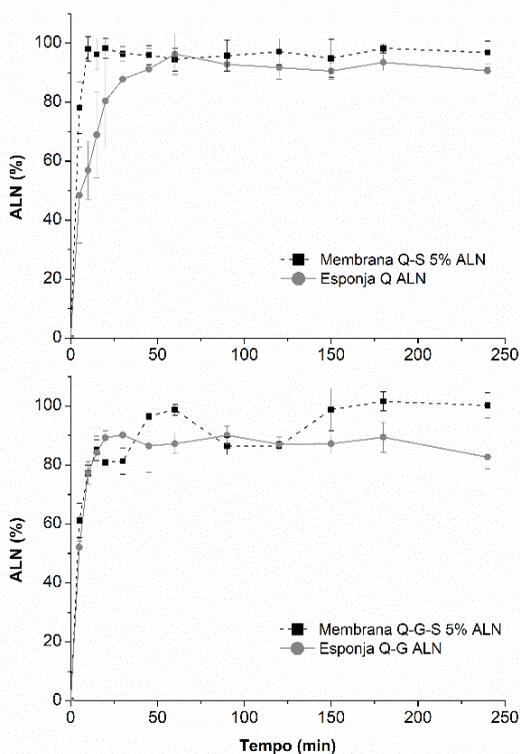
Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Tabela 6 - Valores dos parâmetros cinéticos de coeficientes de correlação (R^2) e eficiência de liberação (EL) para as esponjas de QS nos modelos cinéticos de Peppas-Sahlin (Q ALN) e Korsmeyer-Peppas (Q-G ALN).

Esponja	PARÂMETROS CINÉTICOS	
	R^2	EL _{240min} (%)
Q ALN	0,97	88,71 \pm 2,77 ^a
Q-G ALN	0,95	85,64 \pm 2,88 ^a

Os dados de EL estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias ($p > 0,05$, *t-Student*).

Figura 48 - Liberação da ALN (%) em função do tempo (min). Comparação entre membranas e esponjas de A) Esponja Q ALN versus Membrana Q-S 5% ALN; B) Esponja Q-G ALN versus Membrana Q-G-S 5% ALN.



Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Com auxílio do *software Add-in DD-Solver*[®], foi possível calcular os parâmetros cinéticos da liberação de ALN das esponjas. Os modelos que apresentaram maiores valores de R^2 para Q ALN e Q-G ALN foram o de Peppas-Sahlin e Korsmeyer-Peppas, respectivamente (Tabela 6).

O modelo de Peppas-Sahlin une dois fenômenos para explicar o processo de liberação, a difusão do fármaco e o relaxamento da matriz polimérica. A equação que representa o modelo de liberação da esponja Q ALN está descrita abaixo:

$$\frac{M_T}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 \cdot t^{2m} \quad (12)$$

Onde, “ M_t/M_∞ ” representa a fração do soluto liberado no tempo “ t ”, “ K_1 ” e “ K_2 ” representam constantes associadas às contribuições relativas do mecanismo de difusão Fickiana e do mecanismo de erosão/relaxamento (transporte Caso II) o coeficiente “ m ” é o expoente de difusão Fickiana (PEPPAS; SAHLIN, 1989).

Já o modelo de Korsmeyer-Peppas descreve a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece é uma combinação do intumescimento e relaxamento das cadeias poliméricas e da difusão do fármaco para o meio. Este modelo é representado pela equação abaixo:

$$\frac{M_T}{M_\infty} = Kt^n \quad (13)$$

Onde, “ M_t/M_∞ ” representa a fração do soluto liberada no tempo t ; “ k ” é uma constante que incorpora características da matriz polimérica e do soluto e “ n ” é o coeficiente difusional, fornece informações sobre o mecanismo de liberação a partir de matriz polimérica (RITGER; PEPPAS, 1987).

Para a esponja Q-G ALN o valor de “ n ” foi menor que 0,5 ($n=0,07$) indicando que o mecanismo de liberação da ALN é por difusão Fickiana, na qual o transporte do fármaco para o solvente ocorre pela difusão do soluto através de camadas da matriz (RITGER; PEPPAS, 1987).

5.3.5 Determinação do grau de intumescimento (GI)

A captação de líquidos pelas matrizes porosas tem relação direta com a capacidade de adesão, diferenciação e proliferação celular, assim como na absorção de exsudatos em lesões cutâneas (HAN et al., 2014; LIN et al., 2009; SHANMUGASUNDARAM et al., 2001).

Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras ($p>0,05$, ANOVA/Tukey; Tabela 7) e os valores de GI foram expressivamente maiores do que os encontrados para as membranas do capítulo anterior. As esponjas proporcionaram alta capacidade de absorção de água na temperatura da pele, tornando-as promissoras na área de bandagens e liberação de fármacos.

A hidroflicidade e higroscopicidade da QS, assim como a presença de poros na estrutura, são responsáveis pela capacidade de absorção de água das matrizes (MAHMOUD; SALAMA, 2016). Analisando individualmente os resultados, observaram-se valores maiores para os sistemas sem agente reticulante. Bi e colaboradores

(2011), em estudo com *scaffolds* de QS/colágeno/GNP, observaram o mesmo comportamento de redução de GI com o aumento da concentração de GNP e tempo de reação. A reticulação química entre a QS e GNP leva à formação de estruturas menores e redução dos grupamentos hidrofílicos (BISPO et al., 2010; YAN et al., 2010). Yan e colaboradores (2010), por sua vez, encontraram resultados contrários para *scaffolds* de QS/colágeno/GNP, em que sistemas com reticulante apresentaram maior GI comparativamente àqueles sem reticulante. Para os autores, o aumento da estabilidade estrutural dos sistemas com GNP explicaria estes resultados. Os *scaffolds* sem o agente reticulante, em contato com a água, colapsam e permitem menor captação do líquido.

Tabela 7 - Parâmetros de grau de intumescimento (GI) e perda de massa (%) das membranas após 24 h em tampão PBS pH 7,4 a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Esonja	GI 24h (%)	Perda de massa (%)
Q Branca	1257,82 \pm 116,33	23,37 \pm 1,83
Q ALN	1373,47 \pm 149,31	30,35 \pm 3,79*
Q-G Branca	1222,87 \pm 188,69	21,20 \pm 3,89*
Q-G ALN	1142,66 \pm 197,52	26,09 \pm 3,84

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) indica diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).*

5.3.6 Ensaio de erosão das esponjas de QS

Ao final do experimento de GI, a erosão das esponjas foram verificadas nas condições de temperatura da pele e pH das lesões (SCHNEIDER et al., 2007). Essa propriedade das matrizes porosas pode revelar a estabilidade dos sistemas frente a condições que simulam feridas cutâneas. Apenas para as esponjas Q ALN e Q-G Branca foram observadas diferenças significativas entre as médias quando este parâmetro foi analisado ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey; Tabela 7). As esponjas contendo ALN apresentaram maior perda de massa em relação ao placebo. Analisando a erosão entre os sistemas com ALN, a esponja Q-G ALN teve menor perda, indicando maior estabilidade frente às condições experimentais utilizadas.

Estudos na literatura relatam que a reticulação de matrizes porosas aumenta a bioestabilidade dos materiais; reduzindo a solubilidade em meio aquoso (BI et al., 2011; QIAN et al., 2009; YAN et al., 2010). Dependendo da aplicação, a bioestabilidade pode ou não ser desejada. Em casos de *scaffolds* utilizados como implantes na engenharia de tecidos,

esta é uma característica importante (GRIFFON et al., 2006; SEOL et al., 2004). Já para materiais de uso tópico, por exemplo, esse aspecto não é uma exigência. A solubilização/erosão da QS pode representar uma vantagem quando se objetiva a cicatrização de tecidos considerando que os seus monômeros *N*-acetil-glucosamina e glucosamina auxiliam na biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006).

5.3.7 Determinação das propriedades mecânicas

5.3.7.1 Teste mecânico de tração

Por meio do teste mecânico de tração, pôde-se obter as curvas de tensão *versus* deformação para as esponjas. A tensão de ruptura (MPa), deformação na ruptura (%) e módulo de elasticidade (MPa) não apresentou variações significativa entre as amostras testadas ($p > 0.05$, ANOVA/Tukey; Tabela 8). Para todos os parâmetros analisados, principalmente tensão de ruptura e deformação na ruptura, os valores encontrados foram expressivamente menores aos das membranas de QS (Capítulo III, Tabela 4). Devido à menor maleabilidade das matrizes porosas, esses resultados já eram esperados.

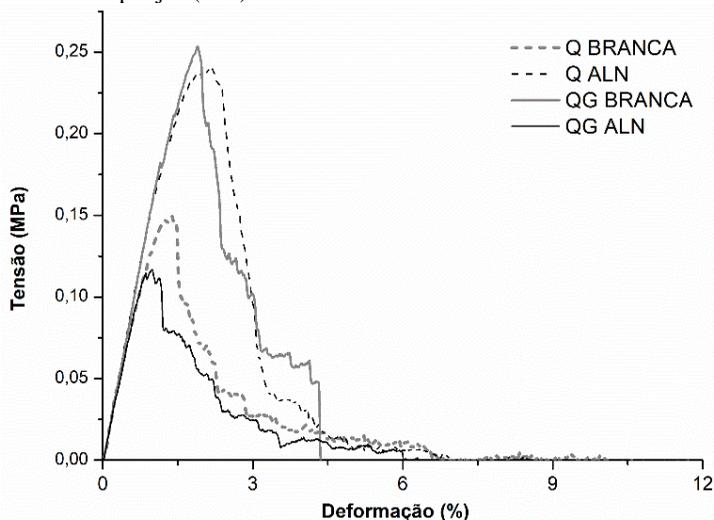
Tabela 8 - Parâmetros do teste mecânico de tração obtidos para as esponjas de QS.

Espunja	Tensão de ruptura (MPa)	Deformação na ruptura (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
Q Branca	0,18 ± 0,07	1,60 ± 0,47	0,14 ± 0,03
Q ALN	0,20 ± 0,06	1,63 ± 0,54	0,15 ± 0,01
Q-G Branca	0,26 ± 0,10	2,28 ± 0,51	0,15 ± 0,06
Q-G ALN	0,14 ± 0,04	1,87 ± 0,64	0,11 ± 0,04

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias utilizando-se o teste ANOVA/Tukey ($p > 0,05$).

O comportamento das esponjas, quando submetidas à tração, pode ser observado na figura 49. Assim como para as membranas com agente plastificante, as matrizes porosas apresentam apenas a região elástica antes da ruptura. Essa deformação é reversível quando retirada a tensão sobre o material (BARBOSA et al., 2017; CANEVAROLO JR., 2004; HIBBELER, 2004; MANUEL; DIAS, 2017).

Figura 49 - Teste mecânico de tração. Curvas ilustrativas de deformação plástica e/ou elástica das esponjas (n=1)



Suh e Matthew (2000) relatam a redução no módulo de elasticidade de *scaffolds* de QS comparando-se com membranas não porosas do mesmo polímero. Os valores de tensão de ruptura para os sistemas porosos foram entre 30-60 KPa (0,03-0,06 MPa). Estudos demonstram que a porosidade de *scaffolds* influencia na tensão de ruptura e módulo de elasticidade. O aumento da porosidade estaria relacionado com a diminuição desses parâmetros. O tamanho, assim como espessura das paredes dos poros, podem ser controladas no momento de preparo, variando-se a temperatura de congelamento (IKEDA et al., 2014; LIN et al., 2003) ou alterando-se a força iônica do meio (adição de açúcares, sais).

Nas análises por MEV, as esponjas Q Branca e Q-G ALN apresentam menor tamanho de poro. Entretanto, divergindo dos estudos citados acima, os parâmetros mecânicos encontrados não apresentaram correlação com a porosidade. A heterogeneidade da morfologia das esponjas pode ser o motivo para a similaridade dos resultados nos testes de tração.

5.3.7.2 Teste mecânico de compressão

No teste mecânico de compressão, regiões lineares em baixas tensões são características de materiais porosos, indicando comportamento elástico (PIERRE; PAJONK, 2002; ZMORA; GLICKLIS; COHEN, 2002). Em estudos com *scaffolds* de fibroína de seda, Kim e colaboradores (2005) verificaram a influência do tamanho de poro nos parâmetros de compressão. Quanto menores os poros do material, maior a rigidez e resistência mecânica.

Tabela 9 - Parâmetros do teste mecânico de compressão obtidos para as esponjas de QS.

Esponja	Tensão máxima (MPa)	Módulo de compressibilidade (MPa)
Q Branca	0,0795 ± 0,0099	0,0013 ± 0,0002
Q ALN	0,0431 ± 0,0076	0,0014 ± 0,0004
Q-G Branca	0,050 ± 0,021	0,0013 ± 0,0003
Q-G ALN	0,0548 ± 0,0247	0,0012 ± 0,0004

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias, utilizando-se o teste ANOVA ($p < 0,05$).

Para as esponjas de QS testadas, também se observou um comportamento elástico à compressão. Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras para os dados de tensão máxima (MPa) e módulo de compressibilidade (MPa) ($p > 0,05$, ANOVA/Tukey; Tabela 9). Os valores encontrados para estes parâmetros foram relativamente baixos quando comparado a sistemas semelhantes da literatura (LIMA, 2006; ZHANG; ZHANG, 2002). Estes resultados indicam a menor resistência mecânica e rigidez dos materiais, contudo, certa resistência ao manuseio. Considerando-se que as esponjas são para uso tópico em lesões, tais características podem representar uma vantagem para os sistemas poliméricos.

Não foram observadas relações entre tamanho de poro, adição de fármaco ou de agente reticulante para esse teste mecânico.

5.3.8 Ensaios de permeação cutânea *ex vivo*

De forma análoga às membranas, ensaios de permeação foram realizados com esponjas de QS. Novamente, observou-se um aumento na permeação do fármaco ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ao longo do tempo (Figura 50) para todos os sistemas testados. Analisando o parâmetro fluxo (J_s) na tabela 10, nota-se que houve diferença entre as esponjas e o controle (solução de ALN a $1\text{mg}/\text{mL}$) ($p < 0,001$). Entre as esponjas, há uma diminuição aparente da permeação para o sistema reticulado Q-G ALN, porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$). A redução dos grupamentos hidrofílicos disponíveis após a reticulação, diminui a interação com a água, podendo influenciar na difusão da ALN, bioadesão e permeação. Da mesma forma que o observado para as membranas, a ALN apresentou maior retenção na derme e epiderme quando veiculada em esponjas não reticuladas. A discussão dos dados de retenção cutânea foi apenas qualitativa pelas razões já expostas (limitações da metodologia de extração e altos valores de coeficiente de variação). Uma perda de massa próxima a 30% foi encontrada para ambas as esponjas, corroborando com valores do teste de solubilidade. As membranas apresentaram perda de massa de aproximadamente 70% na permeação, porém tal resultado está associado a difusão do SBT para a pele, impossibilitando a correlação entre os sistemas para a biodegradação da QS. Os testes de liberação *in vitro* das esponjas revelaram um perfil semelhante aos sistemas com e sem GNP. Observou-se uma tendência de maior permeação para o sistema Q ALN em relação ao reticulado, porém sem diferenças estatísticas.

Com relação à análise do comportamento cinético de ordem zero (Tabela 10), esponjas sem reticulante apresentaram maior coeficiente de correlação comparativamente às esponjas reticuladas. A esponja sem reticulante apresentou um perfil cinético similar ao do fármaco puro.

Tabela 10 - Parâmetro de fluxo (J_s) e coeficiente de correlação (R^2) considerando uma cinética de ordem zero.

	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	R^2 – Ordem zero
ALN	$26,45 \pm 5,23^{(**)}$	0,997
Q ALN	$64,99 \pm 5,01^{(a,**)}$	0,978
Q-G ALN	$61,19 \pm 2,45^{(a,**)}$	0,964

*Os dados de fluxo (J_s) estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$). Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias utilizando-se o teste ANOVA/Tukey ($p > 0,05$).** indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$).*

Figura 50 - Perfis de permeação do fármaco puro (ALN) e das esponjas Q ALN e Q-G ALN através da pele de orelha de porco (n=6).

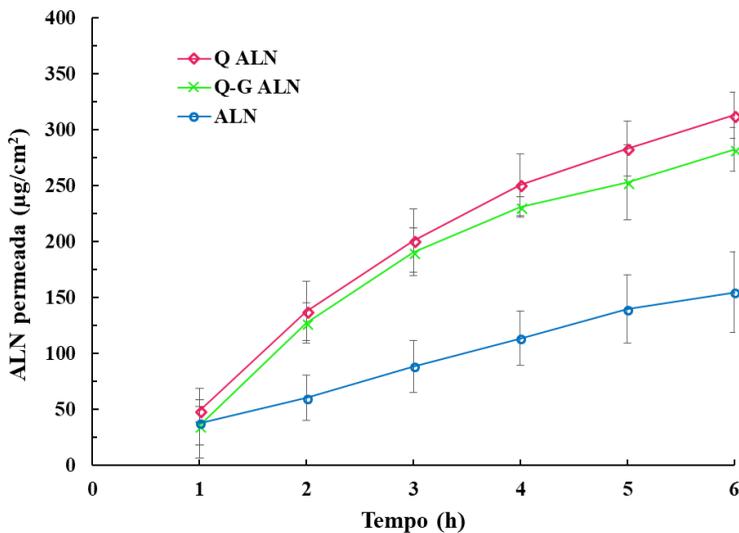
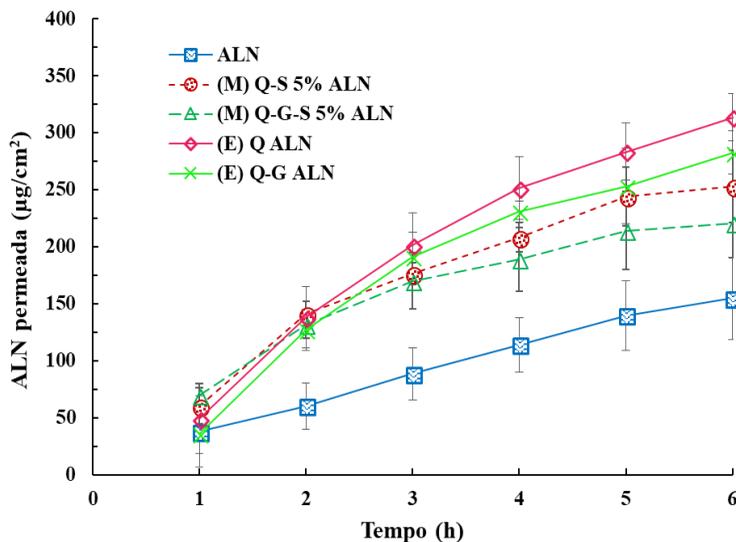


Figura 51 - Perfis de permeação do fármaco puro (ALN), das membranas (M) Q-S 5% ANL, Q-G-S 5% ALN e das esponjas (E) Q ALN e Q-G ALN através da pele de orelha de porco (n=6).



Esse aumento na permeação da ALN, quando incorporada nas esponjas, foi novamente associado à interação que ocorre entre QS e a pele. Conforme descrito no capítulo anterior, estudos associam o aumento da hidratação, maciez, relaxação e fluidez da pele à maior permeação de fármacos. Tais propriedades são observadas quando a pele entra em contato com a QS. Além disso, a modificação conformacional da queratina do estrato córneo também estaria diretamente relacionada com esse aumento na permeação (CERCHIARA et al., 2002; HE et al., 2009).

Tabela 11 - Parâmetro de fluxo (J_s) e coeficiente de correlação (R^2) para a cinética de ordem zero do fármaco puro (ALN) e ALN permeada por meio das membranas (M) Q-S 5% ALN, Q-G-S 5% ALN e esponjas (E) Q ALN e Q-G ALN.

	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	R^2 – Ordem zero
ALN	26,45 \pm 5,23 ^(a,*)	0,997
(M) Q-S 5% ALN	47,21 \pm 10,88 ^(b,*)	0,965
(M) Q-G-S 5% ALN	36,81 \pm 5,82 ^(a,b,**)	0,956
(E) Q ALN	64,99 \pm 5,01 ^(c,*,**)	0,978
(E) Q-G ALN	61,19 \pm 2,45 ^(c,*,**)	0,964

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$). Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias utilizando-se o teste ANOVA/Tukey ($p > 0,05$). * e ** indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$).

Comparando-se os perfis de permeação, bem como valores de J_s e R^2 entre todos os sistemas testados, incluindo o fármaco em solução, notam-se algumas diferenças (Figura 51 e Tabela 11). O perfil de permeação e J_s das esponjas apresentaram valores maiores em relação às membranas e fármaco puro. Esses resultados indicam que as esponjas apresentam maior interação com a pele e, desta forma, facilitariam a permeação da ALN. Nas análises por MEV, estruturas porosas e de alta área de contato foram observadas nas esponjas, diferentemente das estruturas compactadas e superfícies lisas das membranas. Nos testes de bioadesão e GI, um aumento significativo da interação dos sistemas porosos com a água e a pele foi relatado, bem como uma maior área de contato, o que justificaria a maior permeação da ALN encontrada. Analisando os resultados da permeação e dos testes de liberação *in vitro*, notou-se uma inversão nos comportamentos dos sistemas. Na liberação, as membranas apresentaram um efeito de liberação “burst”, na qual a quantidade de ALN liberada foi maior que 75% nos primeiros 5 min. Já as esponjas apresentaram uma liberação mais lenta em relação às

membranas. Para o estudo de permeação foi observado o inverso. Visto que a liberação ocorre com a submersão da membrana/esponja no meio PBS, a liberação do fármaco que está na superfície da membrana foi facilitada. Na permeação, além da solubilização da ALN o fator interação com a pele tem grande peso na permeação da molécula. Desta forma, verifica-se que os resultados de bioadesão podem ser indicativos do comportamento na permeação cutânea de sistemas contendo QS.

As esponjas de Q-ALN e Q-G ALN facilitaram a permeação de ALN a níveis não tóxicos na pele, podendo conferir um aumento da atividade farmacológica do ativo (AKEMA, 2006; BECKER et al., 2010). Uma vez que os fibroblastos encontram-se na derme, torna-se importante a permeação do fármaco até essa camada para que possa auxiliar na cicatrização tecidual (DRISKELL; WATT, 2015; KIM et al., 2007). A estrutura das esponjas, além de facilitar a absorção de líquidos (exsudato, por exemplo), funcionam como suporte para a fixação, proliferação e diferenciação celular quando aplicados na engenharia de tecidos. Suas estruturas 3D e alta porosidade representam ambientes apropriados para a regeneração tecidual. Além disso, pode-se considerar também a atividade cicatrizante das unidades monoméricas da QS como uma terceira vantagem do sistema (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006). Com a perda de massa de aproximadamente 30 % na permeação de 6 h, estima-se que uma quantidade considerável de QS foi liberada no local. Ensaio de cicatrização *in vivo* poderiam confirmar as vantagens dos sistemas propostos em relação aos géis de ALN e outros curativos encontrados no mercado.

5.4 CONCLUSÕES

A operação de liofilização foi eficaz para a obtenção das esponjas de QS, GNP e ALN e estudos de caracterização, liberação e permeação cutânea *ex vivo* foram realizados neste capítulo. Pela análise de FTIR foi confirmada a reação de reticulação entre o polímero e GNP, além de possíveis interações entre ALN e o sistema. As matrizes apresentaram poros heterogêneos, associados ao processo de congelamento, além de deposição de sal na parede dos mesmos. Devido à morfologia das esponjas, verificou-se o dobro dos valores encontrados para as membranas no teste de bioadesão, indicando que os sistemas porosos interagem mais com a pele. Outro resultado associado à porosidade foi o GI, no qual os valores foram expressivamente maiores para os sistemas liofilizados (GI > 1100 %), em relação às membranas.

Com base na cinética de liberação, é sugestivo que o mecanismo de liberação da ALN incorporada nas esponjas está relacionado com o intumescimento da matriz polimérica, seguida da difusão do fármaco para o meio aquoso. Comparando-se com as membranas, apesar da liberação mais lenta da ALN, foi observado valores maiores de permeação cutânea para as esponjas. Estes sistemas são porosos e de alta retenção de líquidos, interagem com a pele mais facilmente, auxiliando para aumentar a permeação de ALN. Com base nas caracterizações dos sistemas desenvolvidos, não foram observadas diferenças entre as esponjas com e sem o agente reticulante.

A alta porosidade, bioadesão, capacidade de absorção de líquidos, aumento da permeação de moléculas na pele e as propriedades cicatrizantes e antimicrobianas da QS, tornam as esponjas Q ALN e Q-G ALN fortes candidatos para formulações que objetivam a regeneração tecidual cutânea.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de pré-formulação foram realizados a fim de investigar possíveis interações entre o fármaco e excipientes das formulações. Com auxílio de técnicas de caracterização do estado sólido, foi verificada a interação física que ocorre entre ALN e o plastificante SBT. Considerando que não foram observadas alterações no espectro de FTIR dessa mistura física, tão pouco deslocamentos nas reflexões do difratograma do fármaco, a interação foi relacionada com a solubilização parcial que ocorre entre ALN e SBT, intensificada com o aumento de temperatura. Dessa forma, todos excipientes foram utilizados para o desenvolvimento das membranas e esponjas de QS.

Comparando-se os sistemas com e sem GNP, foram notadas diferenças entre as membranas, principalmente na bioadesão, grau de intumescimento e ângulo de contato. Já para as esponjas, foi confirmada a reação de reticulação pela técnica de FTIR, porém, diferenças sutis foram notadas entre os sistemas frente à caracterização físico-química. A variação da cor esverdeada das membranas e esponjas reticuladas com e sem o fármaco, são indicativos que a adição de ALN interage com o sistema de alguma forma. Outro fato observado foi que as baixas temperaturas de congelamento podem ter reduzido a formação dos compostos que dão cor à esponja, interferindo no processo de reticulação. Notou-se que a permeação da ALN na pele foi mais lenta para os sistemas reticulados, auxiliando na modulação da liberação e permeação do fármaco. Considerando o estudo de desenvolvimento das membranas, o uso de SBT facilitou a dispersão de ALN, bem como aumentou a maleabilidade dos sistemas.

As membranas e esponjas de QS neutras e reticuladas com GNP apresentaram notórias diferenças nos estudos de caracterização. A capacidade de absorção e retenção de líquidos e a força de bioadesão das esponjas foi maior que das membranas, uma vez que as esponjas apresentam estruturas porosas, permitindo a maior interação com a água e a pele. Já a estrutura compactada e lisa das membranas reduz essa captação de líquidos e interação com a pele. Nos ensaios de liberação *in vitro*, as membranas exibiram um perfil de liberação imediata, característico do efeito de liberação “burst”, já nos sistemas porosos a liberação da ALN foi relacionada com o intumescimento da matriz polimérica, seguido da difusão do fármaco para o meio.

Nos ensaios mecânicos de tração, observou-se uma melhor resistência à ruptura das membranas, indicando que esses sistemas são mais maleáveis e resistentes. O aumento da permeação cutânea da ALN

nos testes *ex vivo* em câmara de difusão de Franz foi associado ao uso da QS como veículo, uma vez que o polímero interage com as camadas da pele, possibilitando a passagem do fármaco para a epiderme e derme. Tal efeito, promove uma ação mais rápida e efetiva do fármaco no local de cicatrização. A ALN apresentou maior permeação quando incorporada nas esponjas, fato associado à interação que ocorre entre o sistema poroso, pele e tampão PBS.

As propriedades de biodegradação, bioadesão, baixa toxicidade e efeitos farmacológicos da QS, bem como o fácil manuseio, baixo índice de cristalinidade, capacidade de captação de líquidos e troca de gases e aumento da permeação cutânea de ALN, tornam os sistemas do tipo membrana e esponjas neutras de QS promissores para aplicação em feridas e queimaduras.

Considerando as quatro formulações desenvolvidas, a esponja Q-G ALN representa um sistema promissor e inovador na área de curativos funcionais. Tal conclusão se baseia nas vantagens do sistema de interação com a pele, aumento da permeação cutânea e liberação modificada da ALN, além da alta capacidade de retenção de líquidos e troca de gases do sistema.

REFERÊNCIAS

AB RAHMAN, M. R.; ABDUL RAZAK, F.; MOHD BAKRI, M. Evaluation of wound closure activity of nigella sativa, melastoma malabathricum, pluchea indica, and piper sarmentosum extracts on scratched monolayer of human gingival fibroblasts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

AGASTI, N.; KAUSHIK, N. K. One Pot Synthesis of Crystalline Silver Nanoparticles. **American Journal of Nanomaterials**, v. 2, n. 1, p. 4–7, 2014.

AHN, Y. J. et al. Effects of allantoin on cognitive function and hippocampal neurogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 210–216, 2014.

AKEMA. Allantoin: a safe and effective skin protectant. **Akema Fine Chemicals**, p. 1–13, 2006.

AL-NAAMANI, L.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 231–237, 2016.

ALDANA, A. A. et al. Chitosan films modified selectively on one side with dendritic molecules. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 42, p. 22670, 2012.

ALHOSSEINI, S. N. et al. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 25–34, 2012.

ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2227–2236, 2010.

ANDRZEJEWSKI, R. G. . P. A. L. **Membranas neutras de quitosana reticuladas com genipin: preparação e caracterização.** [s.l.: s.n.].

ANISHA, B. S. et al. Chitosan-hyaluronic acid/nano silver composite sponges for drug resistant bacteria infected diabetic wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 310–320, 2013.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 9, p. 407, 2007.

ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Ministerio da Saúde**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

ARAÚJO, L. U. et al. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 5, p. 460–461, 2010.

ARAÚJO, L. U. et al. In vivo wound healing effects of Symphytum officinale L. leaves extract in different topical formulations. **Pharmazie**, v. 67, n. 4, p. 355–360, 2012.

ASSONUMA, M. M. **DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA E Cordia ecalyculata VELL**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

ASTI, A.; GIOGLIO, L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. **The International journal of artificial organs**, v. 37, n. 3, p. 187–205, 2014.

ASTM. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. v. 01, n. November, p. 1–8, 2000.

ASTM. Standard test method for tensile properties of plastics. **ASTM International**, v. 08, p. 46–58, 2003.

ASTM. **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheet** 1. [s.l: s.n.].

ASTM. Standard Test Method for Plastics: Dynamic Mechanical Properties: In Compression 1. v. 08, p. 2–5, 2015.

ASTM. Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products 1. **Test**, p. 1–10, 2018.

AZAD, A. K. et al. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 69B, n. 2, p. 216–222, 2004.

BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration. **Journal of Controlled Release**, v. 260, n. June, p. 234–246, 2017.

BARBOSA, L. A. et al. Polietileno de baixa densidade - PEBD : mercado, produção, principais propriedades e aplicações. **Revista Espacios**, v. 38, n. 2005, p. 10–23, 2017.

BATTISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões , RS , Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 338–348, 2013.

BAVARSAD, N. et al. Preparation and physicochemical characterization of topical chitosan-based film containing griseofulvin-loaded liposomes. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 7, n. 3, p. 91, 2016.

BECKER, L. C. et al. Final report of the safety assessment of allantoin and its related complexes. **International Journal of Toxicology**, v. 29, n. 3_suppl, p. 84S–97S, 2010.

BERG, G. J. et al. New directions in the chemistry of shape memory polymers. **Polymer (United Kingdom)**, v. 55, n. 23, p. 5849–5872, 2014.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BERNER, A. et al. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 506–513, 2014.

BHARATE, S. S.; BHARATE, S. B.; BAJAJ, A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. **Journal of excipients and food chemistry**, v. 1, n. 3, p. 3–26, 2010.

BI, L. et al. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 51–62, 2011.

BISPO, V. M. et al. Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly(vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 166–175, 2010.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BRASIL, M. DA S. S. DE P. DE S. D. DE A. B. **Manual de Condutas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas**. [s.l: s.n.].

BRASIL, M. DA S. S. DE P. DE S. D. DE A. B. Cartilha para tratamento de emergência das queimaduras. **Secretaria de Atenção à Saúde**, v. 1, p. 20, 2012.

BREDENBERG, S.; NYSTRÖM, C. In-vitro evaluation of bioadhesion in particulate systems and possible improvement using interactive mixtures. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 169–77, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA. British Pharmacopoeia 2009. v. 39, p. 418–420, 2009.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 12–34, 2006.

BURKATOVSKAYA, M. et al. NIH Public Access. v. 16, n. 3, p. 425–431, 2010.

BUTLER, M. F.; NG, Y. F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 3941–3953, 2003.

CABEZA, L. F. et al. Thermal performance of sodium acetate trihydrate thickened with different materials as phase change energy storage material. **Applied Thermal Engineering**, v. 23, n. 13, p. 1697–1704, 2003.

CAETANO, G. F. et al. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013–1022, 2015.

CAI, Z. X. et al. Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for Wound-dressing Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3529–3539, 2010.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CAMPOS, M. G. N. et al. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposia**, v. 229, p. 253–257, 2005.

CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I.; SANTOS, A. R. Sorbitol-Plasticized and Neutralized Chitosan Membranes as Skin Substitutes. **Materials research**, v. 18, n. 4, p. 781–790, 2015.

CANEVAROLO JR., S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. [s.l: s.n.].

CAON, T. et al. Novel perspectives in the tuberculosis treatment: Administration of isoniazid through the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 463–470, 2015.

CARDOSO, D. A. et al. Effects of physical and chemical treatments on the molecular weight and degradation of alginate-hydroxyapatite composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 6, p. 872–880, 2014.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255–263, 2005.

CERCHIARA, T. et al. Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 54, n. 11, p. 1453–9, 2002.

CERVERA, M. F. et al. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 69–76, 2004.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-exciipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHANGDEO, J. S.; VINOD, M.; SHANKAR, K. B. Physicochemical characterization and solubility enhancement studies of allopurinol solid dispersions. v. 47, n. 124, 2011.

CHARERNSRIWILAIWAT, N. et al. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 379–384, 2012.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 261–268, 2001.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2806–2814, 2008.

CORAZZARI, I. et al. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. **Polymer Degradation and Stability**, v. 112, p. 1–9, 2015.

COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

COTSARELIS, G. Epithelial stem cells: A folliculocentric view. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 7, p. 1459–1468, 2006.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.

DAI, T. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, n. 7, p. 857–879, 2011.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–23, 2010.

DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 2, p. 305–310, 2007.

DE CASTRO, E. D. S. G.; CASSELLA, R. J. Direct determination of sorbitol and sodium glutamate by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) in the thermostabilizer employed in the production of yellow-fever vaccine. **Talanta**, v. 152, p. 33–38, 2016.

DELMAR, K.; BIANCO-PELED, H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 28–37, 2015.

DING, L. et al. Spongy bilayer dressing composed of chitosan–Ag nanoparticles and chitosan–Bletilla striata polysaccharide for wound healing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1538–1547, 2017.

DONG, Y. et al. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 4, p. 1553–1558, 2004.

DONNELLY, R. F. et al. Design and physicochemical characterisation of a bioadhesive patch for dose-controlled topical delivery

of imiquimod. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 318–325, 2006.

DRISKELL, R. R.; WATT, F. M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 2, p. 92–99, 2015.

DUCHÊNE, D.; TOUCHARD, F.; PEPPAS, N. A. Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 2–3, p. 283–318, 1988.

FALABELLA, A. F. Debridement and wound bed preparation. **Dermatologic Therapy**, v. 19, n. 6, p. 317–325, 2006.

FDA. Code of Federal Regulations Title 21. n. c, p. 1–85, 2015.

FONSÊCA, G. D. **MICROPARTÍCULAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA USANDO SULFATO DE SÓDIO E GENIPINA PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DA TRIANCINOLONA: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO EM CÉLULAS TUMORAIS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, 2015.

FRANCIS SUH, J. K.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589–2598, 2000.

GANNU, R. et al. Enhanced bioavailability of lacidipine via microemulsion based transdermal gels: Formulation optimization, ex vivo and in vivo characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 231–241, 2010.

GAO, L. et al. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 398–405, 2014.

GIORDANI, A. T. et al. Complicações em pacientes queimados: revisão integrativa. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v. 7, n. 2, p. Pág. 535-548, 2016.

GOCHO, H. et al. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 1, p. 87–90, 2000.

GOMATHYSANKAR, S.; HALIM, A. S.; YAACOB, N. S. Proliferation of keratinocytes induced by adipose-derived stem cells on a chitosan scaffold and its role in wound healing, a review. **Archives of Plastic Surgery**, v. 41, n. 5, p. 452–457, 2014.

GONÇALEZ, M. L. **Avaliação da permeação cutânea in vitro de sistemas nanoestruturados contendo ácido fólico**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2012.

GONELLA, H. A. et al. Colonização bacteriana nas primeiras 24 horas das queimaduras Bacterial colonization in burns patients before 24 hours. **Rev Bras Queimaduras**, v. 13, n. 2, p. 99–102, 2014.

GONELLA, H. A. et al. Análise da microbiota bacteriana colonizadora de lesões provocadas por queimaduras nas primeiras 24 horas Bacterial microbiota colonization analysis of burn wounds in the initial 24 hours. **Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba**, v. 18, n. 1, p. 19–23, 2016.

GONSALVES, A. A. et al. Different strategies for crosslinking of chitosan. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GRIFFON, D. J. et al. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 2, n. 3, p. 313–320, 2006.

HAN, F. et al. Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1, p. 124–133, 2014.

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; HERAS, A. Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: Clarithromycin, tramadol and heparin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1750–1762, 2010.

HE, W. et al. Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1–2, p. 234–243, 2009.

HE, W.; GUO, X.; ZHANG, M. Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1–2, p. 82–87, 2008.

HIBBELER, R. C. **Resistência de Materiais - 5ª Ed.**, 2004.

HOFMANN, F. B. et al. **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 197

HOSSEINI, S. F. et al. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 172–182, 2015.

HSIEH, C. Y. et al. Preparation of γ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. **Biomaterials**, v. 26, n. 28, p. 5617–5623, 2005.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, 2001.

HWANG, W. et al. Cosmeceutical Formulations With Long Term Stability Application for Light and Heat. v. 3, 2011.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

IKEDA, T. et al. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. **BioMed Research International**, v. 2014, n. Dd, 2014.

IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, D. **GIOLITO - Fundamentos da Termogravimetria e Análises Térmicas Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial**. 2ª edição ed. São Paulo: [s.n.].

JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 322–337, 2011.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D. J. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 1, p. 162–168, 2004.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 361–366, 2008.

JOSHI, S.; KALYANASUNDARAM, S.; BALASUBRAMANIAN, V. Quantitative analysis of sodium carbonate and sodium bicarbonate in solid mixtures using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). **Applied Spectroscopy**, v. 67, n. 8, p. 841–845, 2013.

JUNG, E. C.; MAIBACH, H. I. Animal models for percutaneous absorption. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2015.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 497–508, 2008.

KAVIYA, S.; SANTHANALAKSHMI, J.; VISWANATHAN, B. Green synthesis of silver nanoparticles using *Polyalthia longifolia* leaf extract along with D-sorbitol: Study of antibacterial activity. **Journal of Nanotechnology**, v. 2011, 2011.

KIM, S.-K. (ED. . **Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications**. [s.l.: s.n.].

KIM, U. J. et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2775–2785, 2005.

KIM, W. S. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 1, p. 15–24, 2007.

KOROS, WILLIAM J; MA, Y, H; SHIMIDZU, T. Terminology for Membranes and. **Pure & Appl. Chemicals**, v. 68, n. 7, p. 1479–1489, 1996.

KOSSMEH, G. S. AND G. **Advances in Polymer Science**. [s.l.: s.n.].

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

KULKARNI, V. S. **Handbook of non-invasive drug delivery systems**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.

KUŞ, N.; BAYARI, S. H.; FAUSTO, R. Thermal decomposition of allantoin as probed by matrix isolation FTIR spectroscopy. **Tetrahedron**, v. 65, n. 47, p. 9719–9727, 2009.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223–226, 2009.

LARANJEIRA, M. C. M.; DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomedico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

LECETA, I. et al. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **European Polymer Journal**, v. 66, p. 170–179, 2015.

LI, L. J. et al. Evaluation of efficacy of aloin in treating acute trauma in vitro and in vivo. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1211–1219, 2017.

LI, Y. H. et al. Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 237–244, 2015.

LIAN, C. et al. Solubilization and formulation of chrysofenol C in solid dispersion with hydrophilic carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 314–321, 2016.

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 86. ed. Boca Raton: [s.n.].

LIH, E. et al. Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 9, p. 3261–3269, 2012.

LIMA, A. M. F. **ESTUDO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ALGINATO DE SÓDIO, PECTINA E BLENDA EM SOLUÇÃO E NO ESTADO SÓLIDO COM APLICAÇÃO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

LIN, A. S. P. et al. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 481–489,

2003.

LIN, Y. C. et al. Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2591–2600, 2009.

LIU, M. et al. Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 186–191, 2013.

LIU, X. et al. Using skin for drug delivery and diagnosis in the critically ill. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 77, p. 40–49, 2014.

LLANOS RODRIGUEZ, J. H. **Propriedades físicas de filmes de quitosana dopados como condutores iônicos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

LONDHE, V. Y. et al. Lurasidone- β -cyclodextrin complexes: Physicochemical characterization and comparison of their antidepressant, antipsychotic activities against that of self microemulsifying formulation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1157, p. 395–400, 2018.

MA, Y. et al. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, n. August, p. 522–531, 2017.

MACHIDA, H.; SUGAHARA, T.; HIRASAWA, I. Relationship between supercooling stability and solution structure in sodium acetate aqueous solution. **Journal of Crystal Growth**, v. 475, p. 295–299, 2017.

MADIHALLY, S. V; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. January, p. 1133–1142, 1999.

MAGHRABY, G. M. EL; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin : From drug delivery to model membranes. v. 4, p. 203–222, 2008.

MAHMOUD, A. A.; SALAMA, A. H. Norfloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin reconstruction: Preparation, evaluation and in-vivo wound healing assessment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 155–165, 2016.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin

polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4–5, p. 207–233, 2007.

MANCA, M. L. et al. Combination of argan oil and phospholipids for the development of an effective liposome-like formulation able to improve skin hydration and allantoin dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, n. 1–2, p. 204–211, 2016.

MANICKAM, B.; SREEDHARAN, R.; ELUMALAI, M. “Genipin” - the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: an overview. **Current drug delivery**, v. 11, n. 1, p. 139–45, 2014.

MANUEL, T.; DIAS, O. Poli (Adipato De Butileno-Co-Tereftalato De Butileno) a Diferentes Velocidades De Deformação. 2017.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305–315, 2010.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33–54, 2002.

MASHRU, R. et al. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: In vitro determination of routes of buccal transport. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 54–62, 2005.

MAX, J. J.; CHAPADOS, C. Infrared Spectroscopy of Aqueous Carboxylic Acids: Comparison between Different Acids and Their Salts. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 16, p. 3324–3337, 2004.

MCD AID, F. M. et al. Further investigations into the use of high sensitivity differential scanning calorimetry as a means of predicting drug-excipient interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, n. 1–2, p. 235–240, 2003.

MENCZEL, J. D. ET AL. **Differential scanning calorimetry (DSC). Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications.** New

Jersey: [s.n.].

MENDES, C. et al. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and β -cyclodextrin: Physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 71–78, 2016.

MENON, G. K. New insights into skin structure: Scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., 2002.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1985–2000, 2005.

MI, F. L.; SUNG, H. W.; SHYU, S. S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, n. 15, p. 2804–2814, 2000.

MI, F.; TAN, Y.; LIANG, H. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross- linked with genipin. **Journal of Biomaterials Science**, v. 12, n. June 2013, p. 37–41, 2012.

MILLER, F. A.; WILKINS, C. H. Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 1253–1294, 1952.

MITSUISHI, M. et al. Biomanufacturing. **CIRP Annals - Manufacturing Technology**, v. 62, n. 2, p. 585–606, 2013.

MONTANARI, T. **Histologia**. [s.l: s.n.].

MOODY, M. L. Topical Medications in the Treatment of Pain. **Pain Medicine News Special Edition**, p. 15–21, 2010.

MOSER, H.; PEREIMA, R. R.; PEREIMA, M. J. L. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 2, p. 60–67, 2013.

MOYANO, M. A.; BROUSSALIS, A. M.; SEGALL, A. I. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 2, p. 631–637,

2010.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, n. 2, p. 131–140, 1997.

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

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009b.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1366–1381, 2016.

NATH, S. D. EB et al. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. **Carbohydrate polymers**, v. 115, p. 160–169, 2015.

NIELSEN, J. B.; BENFELDT, E.; HOLMGAARD, R. Penetration through the Skin Barrier. **Current Problems in Dermatology (Switzerland)**, v. 49, p. 103–111, 2016.

NUNTHANID, J. et al. Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 143–157, 2001.

OJAGH, S. M. et al. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 161–166, 2010.

PANI, N. R. et al. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 219–226, 2012.

PARK, J. E. et al. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia*

jasminoides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6511–6514, 2002.

PASTAR, I. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 445–464, 2014.

PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization**. [s.l: s.n.]. v. 191

PAUDEL, K. S. et al. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 1, p. 109–131, 2010.

PEH, K.; KHAN, T.; CH'NG, H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 3, n. 3, p. 303–311, 2000.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

PIERRE, A. C.; PAJONK, G. M. Chemistry of aerogels and their applications. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 11, p. 4243–4265, 2002.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.

POZZO, L. et al. Chitosan coatings crosslinked with genipin for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy sheets. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. August 2017, p. 71–77, 2018.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261–1268, 2009.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

PRZYBOROWSKI, M.; BERTHIAUME, F. Nanoparticles for Skin

Wound Healing. **Nano LIFE**, v. 03, n. 03, p. 1342004, 2013.

QIAN, Z. et al. Chitosan-alginate sponge: Preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

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

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987.

RODRÍGUEZ, M. et al. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 840–846, 2006.

ROTTA, J.; MINATTI, E.; BARRETO, P. L. M. Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 450–455, 2011.

ROUMELI, E. et al. Compatibility study between trandolapril and natural excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2109–2115, 2013.

ROWAN, M. P. et al. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2015.

ROWE, RAYMOND C.; SHESKEY, PAUL J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Sixth edit ed. London: [s.n.].

S. QUINQUENET, M. O. AND C. G.-M. Polymorphism of Hydrated Sorbitol. **Thermochimica Acta**, v. 125, p. 125–140, 1988.

SAITO, M.L.; OLIVEIRA, F. Comfrey: the vistue and problems. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 74–85, 1986.

SAKURAI, K.; MAEGAWA, T.; TAKAHASHI, T. Glass transition

temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. **Polymer**, v. 41, n. 19, p. 7051–7056, 2000.

SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on Chitin, 1 - Effect of Deacetylation on Solubility. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 177, n. 12, p. 3589–3600, 1976.

SAVIC, V. L. et al. Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 8, p. 1117–1122, 2015.

SCCS. **Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients** European Commission. [s.l: s.n.].

SCHALI, CHRISTIAN; ROCH-RAMEL, F. Renal Handling of [¹⁴C] Allantoin in the Rabbit. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1980.

SCHNEIDER, L. A. et al. Influence of pH on wound-healing: A new perspective for wound-therapy? **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 9, p. 413–420, 2007.

SENATOV, F. S. et al. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p. 139–148, 2016.

SEOL, Y.-J. et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 1037–1041, 2004.

SHANMUGASUNDARAM, N. et al. Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 1943–1951, 2001.

SIBIK, J.; KORTER, T. M.; ZEITLER, J. A. Combined infrared and terahertz analysis of amorphous sorbitol. **IRMMW-THz 2015 - 40th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves**, p. 1–2, 2015.

SIDDIQA, A. J. et al. A facile route to develop hydrophilicity on the polyolefin surface for biomedical applications. **Advances in Polymer Technology**, n. December 2015, p. 1–10, 2017.

SILVA, C. L. et al. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. **Journal of Membrane Science**, v. 320, n. 1–2, p. 268–279, 2008.

SILVA, M. C. et al. Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. **Revista Materia**, v. 21, n. 3, p. 560–568, 2016.

SIMON, G. A.; MAIBACH, H. I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. **Skin pharmacology and applied skin physiology**, v. 13, n. 5, p. 229–234, 1982.

SINGER, ADAM J; CLARK, R. A. CUTANEOUS WOUND HEALING. **The New England Journal of Medicine Review**, 1999.

SINGLA, V. et al. Emulgel: A new platform for topical drug delivery. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 1, p. P485–P498, 2012.

SOCIETY OF JAPANESE PHARMACOPOEIA. the Japanese Pharmacopoeia. **Fourteenth Edition**, p. 885, 2001.

SOLIMAN, O. A. E.-A. et al. Potential Use of Cyclodextrin Complexes for Enhanced Stability, Anti-inflammatory Efficacy, and Ocular Bioavailability of Loteprednol Etabonate. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 1228–1241, 2016.

SONG, Y. et al. In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 88, n. July 2017, p. 1–12, 2018.

STEENFOS, H. H. Growth Factors and Wound Healing. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 28, n. 2, p. 95–105, 1994.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public health nutrition**, v. 3, n. 4A, p. 501–508, 2000.

SUYATMA, N. E. et al. Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical , Thermal , and Surface Properties of Chitosan Films Effects of

Hydrophilic Plasticizers on Mechanical , Thermal , and Surface Properties of Chitosan Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 3950–3957, 2005.

SWEETMAN, S. Martindale The complete drug reference. **Pharmaceutical Press**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

TALHAVINI, M. et al. Characterization of static and dynamic properties of a low-density polyethylene. Evidence for translocation of fluorescent probes upon stretching and determination of relaxation processes at the mesoscopic level. **Polymer**, v. 37, n. 19, p. 4365–4374, 1996.

TAN, H. et al. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: Antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1854–1869, 2013.

TAVARES, W. D. S. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras : uma revisão integrativa Dressing used in the treatment of burns : an integrative review Curaciones utilizadas en el tratamiento de quemaduras : una revisión integradora. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 14, n. 4, p. 300–306, 2015.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, n. 1, p. 35–40, 2009.

TIWARI, VK. Burn wound: How it differs from other wounds? **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 364, 2012.

TOUYAMA, R. et al. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 668–673, 1994.

VAN RIJSWIJK, L. Ingredient- based wound dressing classification: A paradigm shift that is passé and in need of replacement. **Wound Care**, v. 15, p. 11–14, 2006.

VERALDI, S.; MENTER, A.; INNOCENTI, M. Treatment of mild to moderate seborrheic dermatitis with MAS064D (Sebclair??), a novel topical medical device: Results of a pilot, randomized, double-blind, controlled trial.

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 22, n. 3, p. 290–296, 2008.

WADA, T.; YAMAMOTO, R. **Studies on Salt Hydrate for Latent-Heat Storage .1. Crystal Nucleation of Sodium-Acetate Trihydrate Catalyzed By Tetrasodium Pyrophosphate Decahydrate**. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, 1982.

WANG, X.; YAN, Y.; ZHANG, R. A comparison of chitosan and collagen sponges as hemostatic dressings. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, n. 1, p. 39–54, 2006.

WU, Y. et al. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1248–1263, 2011.

XU, B.; SUNG, C.; HAN, B. Crystal Structure Characterization of Natural Allantoin from Edible Lichen *Umbilicaria esculenta*. **Crystals**, v. 1, n. 3, p. 128–135, 2011.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 3, p. 119–136, 2015.

YAN, L. P. et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95 A, n. 2, p. 465–475, 2010.

YU, T. et al. Quantitative analysis of dehydration in porcine skin for assessing mechanism of optical clearing. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 9, p. 095002, 2011.

ZHANG, C. et al. Synthesis and characterization of water-soluble O-succinyl-chitosan. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 8, p. 1629–1634, 2003.

ZHANG, X. et al. Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 101–107, 2017.

ZHANG, Y. et al. Enhancing effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the intestinal absorption process of genipin. **Journal of Agricultural and**

Food Chemistry, v. 59, n. 20, p. 10919–10926, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 1, p. 1–8, 2002.

ZMORA, S.; GLICKLIS, R.; COHEN, S. Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. **Biomaterials**, v. 23, n. 20, p. 4087–4094, 2002.