



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ULANA CRISTINA DE ARAÚJO TAVARES

**Novos curativos biodegradáveis com biopolímeros e triterpeno α , β -Amirenona:
Obtenção, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante e anti-inflamatória *in vivo*.**

NATAL/RN

2023

ULANA CRISTINA DE ARAÚJO TAVARES

Novos curativos biodegradáveis com biopolímeros e triterpeno α , β -Amirenona: Obtenção, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante e anti-inflamatória *in vivo*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima

NATAL/RN

2023

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Tavares, Ulana Cristina de Araújo.

Novos curativos biodegradáveis com biopolímeros e triterpeno Alfa Beta-Amirenona: Obtenção, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante e anti-inflamatória in vivo / Ulana Cristina de Araújo Tavares. - 2023.
64f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2023.

Orientador: Ádley Antonini Neves de Lima.

1. Quitosana - Filmes de Quitosana - Dissertação. 2. Alfa Beta-Amirenona - Dissertação. 3. Caracterização físico-química - Dissertação. 4. Cicatrização - Dissertação. 5. Curativos - Dissertação. 6. Estudos in vivo - Dissertação. I. Lima, Ádley Antonini Neves de. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 547.995

Novos curativos biodegradáveis com biopolímeros e triterpeno α , β -Amirenona: Obtenção, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante e anti-inflamatória *in vivo*.

Defesa apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

APROVADA EM: 23 / 01 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Presidente da Banca

Prof^a. Dr Emerson Silva Lima
Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Externo ao Programa

Prof^a. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE
Externo ao programa

NATAL/RN

2023

Dedico este trabalho a minha avó Maria da Apresentação Araújo da Silva (in memoriam) , por todo amor, apoio, dedicação e principalmente por acreditar fielmente de que eu seria uma excelente profissional e poderia ajudar as outras pessoas. A ela meu enorme amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha luz divina, pois sem Ele nada disso teria acontecido e eu não teria chegado onde cheguei, foram muitos momentos em que pensei em desistir e Ele me sustentou. E a Santa Teresinha que de forma sublime me mostrou os sinais de que deveria continuar a luta e perseverar.

A minha avó Maria da Apresentação (*in memoriam*), que se sacrificou muito pra poder me ajudar na realização dos meus sonhos, muitas vezes abrindo mão dos seus próprios sonhos e vontades pra me ver tendo uma oportunidade da qual ela não teve, pois ela sempre me incentivou, me apoiou e acreditou no meu potencial. Te amarei até o fim da minha vida.

A minha tia Edna por acreditar que a educação é a melhor ferramenta para a formação de um indivíduo e sempre, incansavelmente me incentivar a estudar e a não desistir de meus sonhos, inclusive em momentos do qual me chateei por sua insistência para comigo.

A Dyego, pelo seu amor, carinho, aconchego, companheirismo, e apoio nessa jornada, sempre acreditando no meu potencial e sucesso, quando muitas vezes nem eu acreditava em mim, ele acreditou de que daria certo. Por ser aquele que pegou na minha mão em todos os momentos, e que sequer pensou em algum momento em largar, e continua segurando minha mão, a ele minha enorme gratidão. Além de ser meu ponto de paz e equilíbrio e não me permitir desistir de tudo, te amo demais.

Aos meus familiares, Wanessa, Edu, Vivi, Uiara, Josimar, Kauã, Sofia, e Pedro por todas as brincadeiras, risadas e momentos de descontração, sempre tornando minha vida mais leve e por estarem na torcida por mim, além de todo apoio que me deram.

Aos meus amigos, em especial, Andreza, Daisy, Lisandra, Ely, Nilzete, Kaysa, Kelvin, e tantos outros que não foram aqui citados por estarem sempre me colocando em suas orações, por entenderem minhas ausências e distanciamentos, e por estarem sempre disponíveis a me ajudar, além de nunca terem se afastado de mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, apesar do tamanho desafio que é pra mim aprofundar nessa área, por toda orientação, conversas, confiança, conhecimentos compartilhados e aposta neste trabalho e em mim para executá-lo.

Ao grupo de pesquisa INOFARM pela acolhida e por fazer parte desse grupo nesses dois anos, mas em especial aos amigos que construí, Thiago, Verônica, Rita, Lucas, Bárbara e Luana, pela amizade, conversas, orações, lanches, ajuda nos experimentos e todos os momentos que passamos juntos, tudo que compartilhamos e vivemos foi essencial pra que eu não desistisse de tudo, minha enorme gratidão.

E a todos, aqui não citados, que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, minha gratidão.

*“O bom Deus não seria capaz de inspirar-me
desejos irrealizáveis.”*

*“O amor de Jesus faz superar todas as
dificuldades.”*

(Santa Terezinha do Menino Jesus)

RESUMO

A α , β -amirenona (ABAME) é uma mistura de dois isômeros naturais que fazem parte da classe dos triterpenos, onde essas apresentam grande potencial para atividade antiinflamatória, cicatrizante. Os filmes de quitosana são cada vez mais usados para uso tópico porque permitem uma liberação gradual do medicamento e apresentam muitas vantagens como biodegradáveis, flexíveis, duráveis e resistentes. Assim, o objetivo deste estudo é desenvolver, caracterizar e avaliar os filmes de quitosana incorporados com a α , β -amirenona, além de analisar o efeito antiinflamatório e cicatrizante, visando a aplicação tópica no tratamento de lesões cutâneas. Os sistemas de ABAME foram avaliados pelas seguintes técnicas: FTIR, DR-X, DSC, TG e MEV. Na parte *in vivo*, o modelo animal foram os camundongos, sendo submetidos a lesões no dorso e acompanhados por 14 dias para avaliação do processo cicatricial da lesão. Após eutanásia, foi realizado a quantificação das citocinas, a análise macroscópica das lesões e a análise histológica. A análise térmica demonstrou a incorporação da amostra e um aumento na estabilidade térmica do ABAME. Os espectros de FTIR dos filmes demonstraram interações ocorrendo entre ABAME e a matriz de quitosana. Os resultados de DRX mostraram picos em halos, característicos de compostos amorfos, indicando a amorfização do ABAME pela quitosana. Imagens de MEV mostraram o protótipo incorporado na matriz de quitosana de forma homogênea e com perda parcial da característica cristalina do ABAME puro. *In vivo* foi possível observar que a terapia com filmes incorporados com ABAME é bastante eficaz, visto que possui propriedades antiinflamatórias que auxiliaram no processo de cicatrização de lesões cutâneas, possibilitando avaliar esta evolução de forma macroscópica, histológica e com a citocinas dosadas no presente estudo. Neste estudo os fatores analisados sugerem que o curativo de quitosana com ABAME obtiveram um efeito regenerador nos camundongos, minimizando os parâmetros do processo inflamatório e progredindo a cicatrização, validando assim sua eficácia, com isso é possível dar continuidade ao estudo, de preferência seguindo para próximas etapas como seu uso em humanos com o propósito de elucidar a sua aplicabilidade de forma terapêutica.

Palavras chaves: Filmes de quitosana; α , β -Amirenona; Caracterização físico-química, cicatrização; curativos; estudos *in vivo*.

ABSTRACT

α , β -amirenone (ABAME) is a mixture of two natural isomers that are part of the triterpene class, where they have great potential for anti-inflammatory and healing activity. Chitosan films are increasingly used for topical use because they allow a gradual release of the drug and have many advantages such as biodegradable, flexible, durable and resistant. Thus, the objective of this study is to develop, characterize and evaluate chitosan films incorporated with α , β -amirenone, in addition to analyzing the anti-inflammatory and healing effect, aiming at topical application in the treatment of skin lesions. The ABAME systems were evaluated by the following techniques: FTIR, DR-X, DSC, TG and SEM. In the *in vivo* part, the animal model was mice, which were subjected to injuries on the back and followed for 14 days to assess the healing process of the injury. After euthanasia, quantification of cytokines, macroscopic analysis of the lesions and histological analysis were performed. Thermal analysis demonstrated sample incorporation and an increase in the thermal stability of ABAME. The FTIR spectra of the films demonstrated interactions occurring between ABAME and the chitosan matrix. XRD results showed peaks in halos, characteristic of amorphous compounds, indicating the amorphization of ABAME by chitosan. SEM images showed the prototype homogeneously incorporated into the chitosan matrix and with partial loss of the crystalline characteristic of pure ABAME. *In vivo*, it was possible to observe that therapy with films incorporated with ABAME is quite effective, since it has anti-inflammatory properties that help in the healing process of skin lesions, making it possible to evaluate this evolution macroscopically, histologically and with the cytokines measured in the present study. In this study, the factors analyzed suggest that the dressing of chitosan with ABAME obtained a regenerating effect in mice, minimizing the parameters of the inflammatory process and progressing healing, thus validating its effectiveness. stages such as its use in humans with the purpose of elucidating its therapeutic applicability.

Keywords: Chitosan films; α , β -Amirenone; Physicochemical characterization, healings; bandages; *in vivo* studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da: (A) α , β -Amirenona (ABAME) e (B) Quitosana.....	18
Figura 2: Camadas da pele.....	21
Figura 3: Hematoma/ contusão	23
Figura 4: Ferida cirúrgica.....	23
Figura 5: Lesões perfurantes	24
Figura 6: Lesões lacerantes.....	24
Figura 7: Classificação das queimaduras.....	25
Figura 8: Fases da cicatrização dos tecidos.....	27
Figura 9: Desenho experimental.....	37
Figura 10: Filmes depois de preparados, prontos para uso.	41
Figura 11: Apresentação das diferentes concentrações dos filmes na etapa de produção	41
Figura 12: Espectros da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes de α , β -Amirenona (ABAME), filme branco de quitosana (BCF), e filmes de quitosana-ABAME nas concentrações (F1, F2 e F5)	42

Figura 13: Difração de raios-X (DRX) dos filmes de α , β -Amirenona (ABAME), filme branco de quitosana (BCF), e filmes de quitosana-ABAME nas concentrações (F1, F2 e F5).....44

Figura 14: Análise térmica DSC, TG e DTG (A) ABAME e (B) filme de quitosana em branco (BCF); (C) DSC dos filmes e (D) TG dos filmes nas concentrações (F1, F2 e F5)44

Figura 15: Imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de α , β Amirenona (ABAME): (A) ABAME 500X, (B) ABAME 1.500X; dos filmes de quitosana ABAME nas concentrações (F1, F2 e F5): (C) F1 500X, (D) F1 1.500X, (E) F2 500X, (F) F2 1.500X, (G) F5 500X, (H) F5 1.500X e do filme branco de quitosana (BCF): (I) BCF 500X.....47

Figura 16: Estudo de cicatrização de feridas *in vivo* no dorso de camundongos Swiss, realizado no 3º, 7º, 10º e 14º dias, submetidos ao tratamento com filme branco de quitosana (BCF), filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5). (A) Imagens macroscópicas das feridas na pele dos animais testados. (B) Fechamento das lesões expresso pela porcentagem da área da ferida em relação ao tamanho original de 0 ao 14º dia de pós-operatório, de acordo com o tratamento recebido48

Figura 17: Imagem representativa da análise histopatológica de úlceras de camundongo no 7º e 14º dias de experimentos. Não tratados. Camundongos tratados com BCF. Camundongos tratados com ABAME - F1. Camundongos tratados com ABAME - F2. Camundongos tratados com ABAME - F5. C - Crosta, * Infiltrado inflamatório discreto, ** Infiltrado inflamatório moderado, *** Infiltrado inflamatório intenso, Setas – Novos vasos, Círculo branco – Áreas de necrose 49

Figura 18: Histomorfologia do tecido epitelial corado com hematoxilina e eosina dos animais submetidos aos seguintes tratamentos: não tratado, filme branco de quitosana (BCF) e filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5). Foram avaliados as seguintes características: (a) Infiltrado inflamatório; (b) neovascularização; (c) reepitelização; (d) crosta e necrose 50

Figura 19: Níveis de interleucina IL-1 β , citocinas do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina IL-10 quantificadas nos 7º e 14º dias do experimento para os seguintes tratamentos: não tratado, filme branco de quitosana (BCF) e filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5).....53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Classificação dos critérios utilizados nas análises histopatológicas.....39

Tabela 2: Descrição dos eventos térmicos das curvas de DSC filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5).....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABAME	α , β -Amirenona
AH	Ampère-hora
ATR	Reflectância total atenuada
BCF	Filmes brancos de quitosana
CEUA	Comitê de Ética de Uso em Animais
cm	Centímetros
DP	Desvio padrão
DR-X	Difração de Raio- X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FB	Filmes brancos
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Gramas
<u>H₂SO₄</u>	Ácido Sulfúrico
HE	Hematoxilina e eosina
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
kg	Kilograma
kV	Kilovolt
M	Molar

mA	Miliampére
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaOH	Hidróxido de Sódio
°C	Grau Celsius
p/v	Peso/Volume
pg/mL	Picograma/Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
TG	Termogravimetria
TNF-α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

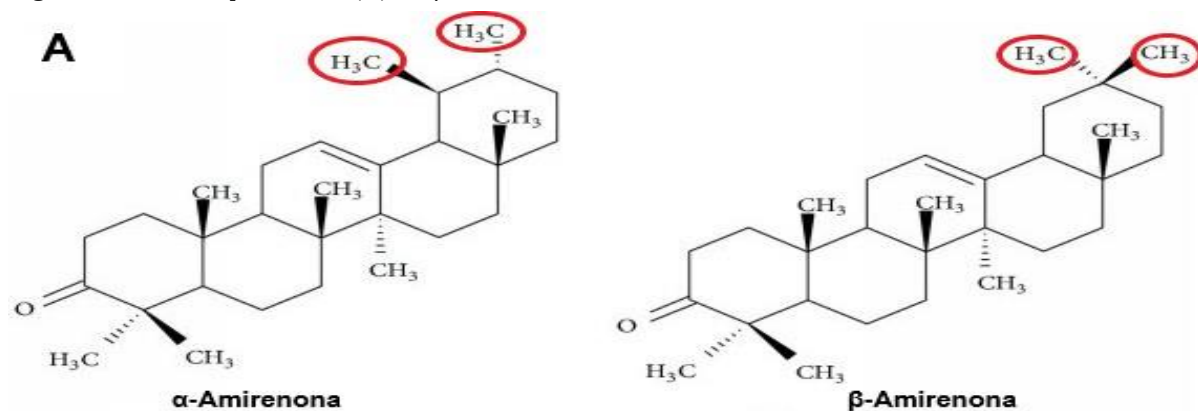
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. PELE	21
2.2. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS	22
2.3. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	26
2.3.1. Fase inflamatória.....	27
2.3.2. Fase proliferativa.....	28
2.3.3. Fase de remodelamento	29
2.3.4. Cicatrização por primeira intenção	30
2.3.5. Cicatrização por segunda intenção.....	30
2.3.6. Cicatrização por terceira intenção	30
2.4. CURATIVOS	30
2.5. ALFA BETA AMIRENONA	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO (ALFA BETA AMIRENONA).....	35
4.2. DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS	35
4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES	35
4.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	35
4.3.2. Difração de raio- x (DR-X)	36
4.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	36
4.3.4. Termogravimetria (TG).....	36
4.3.5. Microscopia eletrônica varredura (MEV)	36
4.4. ANIMAIS	36

4.4.1. Grupos experimentais.....	37
4.4.2. Indução de feridas na pele	37
4.5. EFEITO CICATRIZANTE	38
4.6. ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	39
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS	41
5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES	42
5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier.....	42
5.2.2. Difração de raios- x (DR-X)	43
5.2.3. Termogravimetria (TG) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	44
5.2.4. Microscopia eletrônica varredura (MEV)	46
5.3. ANIMAIS	47
5.3.1. Efeito cicatrizante	47
5.3.2. Análise de quantificação de citocinas	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	56
ANEXOS	62
APÊNDICES	63

1. INTRODUÇÃO

A α,β -Amirenona (ABAME) (Figura 1 A) é um composto binário formado a partir da combinação de dois isômeros triterpenóides, que é descrito como substância isolada da α,β -Amirina sendo esta encontrada em espécies vegetais da família Bureraceae, como por exemplo *Protium heptaphyllum*, *P. opacum* var. *opacum* e *P. giganteum*, *Trattinnickia glaziovii* e *T. peruviana*, conhecida popularmente como Breu Branco. Essas espécies são encontradas facilmente no território brasileiro, principalmente na região amazônica, contendo sete gêneros e cerca de 60 espécies nativas (FERREIRA et al., 2017a; ROSALEM et al., 2017).

Figura 1: Estrutura química da: (A) α e β -Amirenona.



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/a-b-Amyrenone-isolated-from-Aleurites-moluccana-leaves_fig8_268234380, 2023.

Essetriterpenóide ABAME ocorre naturalmente na natureza e é sintetizado por oxidação a partir da α,β -Amirina que é obtida dessas espécies vegetais citadas acima, essa gera um derivado semissintético que é a α,β -Amirenona. Os triterpenos constituem uma classe de compostos naturais, do grupo dos terpenos, com grande relevância farmacológica devido a sua grande distribuição na natureza e diversidade de atividades biológicas, tais como atividade antiinflamatória (BEDNARCZYK-CWYNAR et al., 2016; MENDES HOEPERS et al., 2015), antimicrobiana (EL-SAYED et al., 2016), antineoplásica (SALVADOR et al., 2017; WOŹNIAK; SKĄPSKA; MARSZALEK, 2015; ZHANG et al., 2015), antivirais (HUANG et al., 2018; NOWICKA-SANS et al., 2016), antiparasitária (ISAH et al., 2016; ROCHA E SILVA et al., 2015), cardioprotetor (DINH et al., 2015), hepatoprotetor (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO et al., 2016; HSIANG et al., 2015; XU et al., 2018), nefroprotetor (DING et al., 2015), neuroprotetor (HUANG et al., 2018), além de hipoglicemiante (WU et al., 2015), hipolipemiante e auxiliar na síndrome metabólica (FERREIRA et al., 2017a). Nesse contexto, esses compostos vêm sendo cada vez mais investigados nas áreas de saúde e farmacêutica, em

busca de novos candidatos a fármacos (HODON et al., 2019).

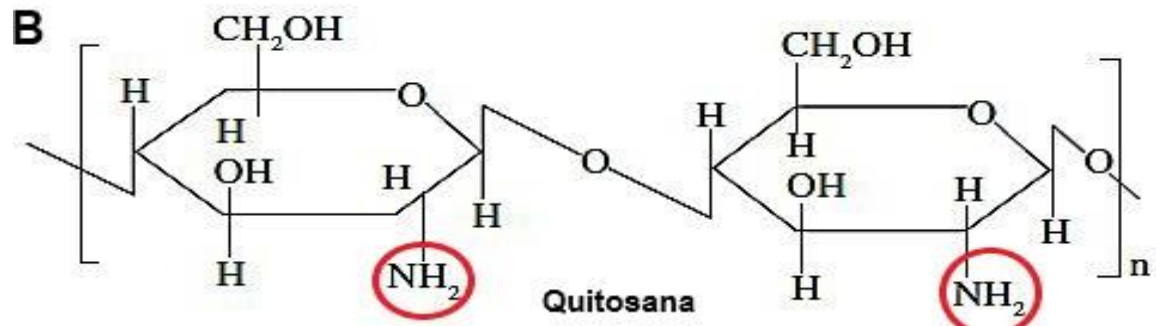
Alguns estudos com mistura de terpenos ABAME já demonstraram potencial significativo de atividade antiinflamatória *in vivo*, porém os estudos são escassos e não mostram um protótipo em forma farmacêutica viável (FERREIRA et al., 2017a).

O desenvolvimento de novos fármacos tem sido um desafio crescente ao longo dos anos, devido à crescente demanda por novas tecnologias que proporcionem maior comodidade, atividade terapêutica e eficácia farmacológica, onde os produtos derivados de plantas são promissores nesta área (SUT et al., 2018). Para obtenção desses novos fármacos e formas farmacêuticas ou para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, destacam-se os biopolímeros, que são matrizes poliméricas classificadas de acordo com sua estrutura em polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas, estes se tornaram conhecidos por apresentarem propriedades como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e alergenidade, ampliando diferentes aplicações na área hospitalar (AZEVEDO; DE SÁ; FUNGARO, 2018; AZUMA et al., 2015).

Além disso, os biopolímeros podem ser utilizados em preparações como agente espessante, excipientes para dar consistência a cremes, matrizes em adesivos, curativos tipo esponja, hidrogéis, membranas e adesivos em sistemas de liberação transdérmica, e também promotores de permeação e outras aplicações, como filmes para feridas cutâneas (NETA et al., 2019; ZOU; LI; LI, 2015).

Dentre os biopolímeros existentes, a quitosana (Figura 1 B) é um polissacarídeo de cadeia linear, obtido a partir de uma N-desacetilação da quitina sendo solúvel em soluções ácidas (ARANAZ et al., 2016). A quitina é um polissacarídeo abundantemente encontrado na natureza, estando presente no exoesqueleto de crustáceos (VAN DEN BROEK et al., 2015). A quitosana, por ser um polímero natural muito estudado em tratamentos de feridas em pele, destaca-se para o desenvolvimento de filmes poliméricos, constituindo um sistema de liberação controlada de fármacos, em particular para uso tópico (AZUMA et al., 2015). Conforme mencionado anteriormente, isso é possível devido a sua biodegradabilidade, fácil aplicação, baixa toxicidade e controle de concentração de fármacos para formulações de uso tópico (BEDIAN et al., 2017; CAMPANI et al., 2018; LIZARDI-MENDOZA; ARGÜELLES MONAL; GOYCOOLEA VALENCIA, 2016; SAYARI et al., 2016).

Figura 1: (B) Quitosana.



https://www.researchgate.net/figure/a-b-Amyrenone-isolated-from-Aleurites-moluccana-leaves_fig8_268234380, 2023.

De acordo com a literatura, os filmes de quitosana apresentam várias características muito bem definidas, tais como: são biodegradáveis, flexíveis, duráveis e resistentes, não se rompem nem rasgam facilmente, possuem permeabilidade à água e ao oxigênio e inibem o crescimento bacteriano (AZUMA et al., 2015; LIZARDI-MENDOZA; ARGÜELLES MONAL; GOYCOOLEA VALENCIA, 2016). Com isso, a quitosana se torna o foco de pesquisas que trabalham com regeneração tecidual, cicatrização de lesões e administração de medicamentos, com ênfase em desenvolvimento de membranas para carrear ativos em uso tópico, pois esta apresenta controle cinético de liberação de fármacos (BEDIAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2020).

Atualmente, nos tratamentos de feridas, os curativos disponíveis que são utilizados, são em grande parte importados e com um custo elevado, sendo interessante o desenvolvimento de outras alternativas terapêuticas que possam fazer uso de matérias-primas renováveis, sendo produzidas com uma tecnologia relativamente simples e de baixo custo (AZUMA et al., 2015).

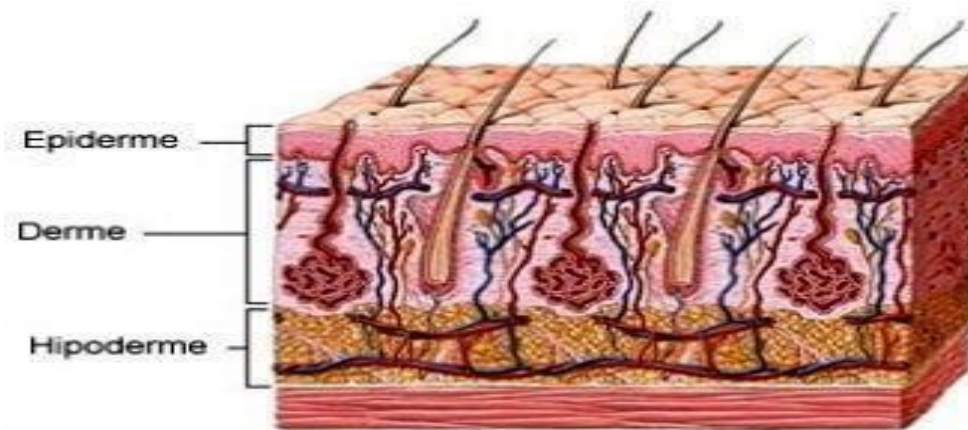
Portanto, o presente estudo visa desenvolver filmes poliméricos, criando um novo sistema de liberação de fármacos, resultante da incorporação de α , β -amirenona (ABAME) em uma matriz de quitosana. Adicionalmente, avaliar o potencial antiinflamatório e cicatrizante dos sistemas, visando possíveis aplicações no tratamento de lesões cutâneas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PELE

A pele se enquadra como o maior tecido do corpo humano, esta apresenta aproximadamente dois metros quadrados de extensão pelo corpo, o que representa em torno de 15% do peso corporal. Esta é constituída por três camadas: Epiderme, derme e hipoderme (Figura 2), esta constituição proporciona a função de barreira primária, servindo de proteção do corpo, sendo responsável por proteger os órgãos e os outros tecidos contra agentes externos infecciosos, que possam gerar uma injúria nesse tecido (BASU et al., 2017; WANG et al., 2018).

Figura 2: Camadas da pele.



Fonte: <https://static.todamateria.com.br/upload/ca/ma/camadasdapele.jpg>, 2022.

A epiderme é a primeira camada desse tecido (mais superficial), esta camada possui um epitélio estratificado pavimentoso, ou seja, é constituído por estratos de células achatadas, onde esse epitélio será responsável dentre suas funções por gerar um bloqueio entre o ambiente externo, e impedir a perda de água, pigmentação da pele e mediar respostas inflamatórias. Os principais tipos celulares presentes nessa camada são: Queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. Esta camada não possui vascularização, portanto sua nutrição vem a partir da camada abaixo (derme) (CAPELLA et al., 2020; CHAMBERS, 2020).

A derme é a segunda camada da pele, essa camada é mais espessa que a epiderme, entretanto, no sentido de número de células, essa camada possui uma quantidade bem menor ao se comparar com a epiderme. A derme possui em sua constituição uma quantidade majoritariamente de matriz extracelular, tendo o principal composto o colágeno produzido pelos fibroblastos, uma proteína da qual é responsável por conferir elasticidade e firmeza ao tecido. Nessa camada encontramos a matriz extracelular, rica em colágeno; o tecido conjuntivo propriamente, onde encontramos os fibroblastos, glândulas sudoríparas e sebáceas, além dos

vasos sanguíneos, linfáticos, e nervos (CHAMBERS, 2020; JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS UCHOA; CARNEIRO, 2017).

A hipoderme é a terceira camada de constituição da pele, e também a mais profunda, chamada também de tecido subcutâneo (adiposo), este é um tecido rico em adipócitos, ou seja células de gordura, responsável por várias funções como isolante térmico, reserva energética, absorvente de possíveis choques mecânicos, dentre outros (CHAMBERS, 2020; JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS UCHOA; CARNEIRO, 2017).

2.2. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS

As lesões cutâneas são qualquer ruptura que venha a interromper a continuidade da pele, podendo vir a acometer uma das camadas ou até estruturas mais profundas como a fáscia muscular em diante são definidas como feridas (MARTINS et al., 2021). Se isto acontece, a mesma perde eficácia como barreira, tornando susceptível a agentes infecciosos, causando perturbações às funções fisiológicas dos tecidos, e desencadeando processos inflamatórios e infecções (DÍEZ-PASCUAL; DÍEZ-VICENTE, 2015).

Em média, 6 milhões de indivíduos possuem lesões por todo o mundo. Nos Estados Unidos, as lesões cutâneas que não conseguem cicatrizar acometem milhares de enfermos e com isso acabam gerando um custo de aproximadamente US\$ 50 bilhões, queimaduras representam US\$ 7,5 bilhões, e incisões cirúrgicas/traumas correspondem aproximadamente US\$ 12 bilhões em custos de tratamento ao ano (RODRIGUES et al., 2019). Porém, esses resultados econômicos dessas lesões são constantemente subestimados, visto que seja difícil mensurar de forma integral. Elas representam um importante problema de saúde pública. No Brasil, também há esse problema, entretanto os documentos médicos sobre essas lesões são escassos (LORDANI et al., 2018; SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

Essas lesões são classificadas de acordo com alguns parâmetros importantes que servem como embasamento para contribuir no diagnóstico e na classificação propriamente da lesão, como por exemplo, o tipo de ferida se é aberta ou fechada, o agente casual, o grau de contaminação dessa lesão, a duração da contaminação e o comprometimento que foi atribuído a esse tecido (CÂMARA; FELIX; CORGOZINHO, 2022).

Quanto aos agentes casuais, as lesões tidas como fechadas, mantém íntegra a camada superficial da pele, deixando a lesão protegida de possíveis contaminações. Porém, os tecidos mais profundos podem ser lesionados. Caso não haja a terapia adequada, essas lesões podem ocasionar uma ferida aberta, em função da desvitalização desse tecido. Alguns exemplos dessas

lesões são os hematomas e contusões (MARTINS et al., 2021). As contusões são feridas causadas por um traumatismo de tecidos subjacentes moles, geralmente é ocasionada por um objeto rombo e posteriormente pode resultar em uma lesão aberta, pois causa hemorragia e edema. O hematoma é a agregação do sangue fora dos vasos sanguíneos (extravasamento), após a pressão de algum objeto, o hematoma fica identificável na pele como uma mancha vermelha, roxa ou preta (Figura 3) (CAPELLA et al., 2020).

Figura 3: Hematoma/ contusão.



Fonte: <https://www.infoescola.com/traumatologia/contusao/>, 2022.

As feridas abertas são uma suspensão da pele ou mucosas, de forma a separar e expor os tecidos. Com base nisso, temos as seguintes classificações:

- **Cirúrgicas ou incisivas:** Essas lesões são limpas, normalmente induzidas por algum procedimento cirúrgico com fim terapêutico, com um instrumento cortante, como bisturi, faca, lâminas, onde após o procedimento esse tecido é fechado por intermédio de suturas, com o intuito da cicatrização (Figura 4) (CÂMARA; FELIX; CORGOZINHO, 2022);

Figura 4: Ferida cirúrgica.



Fonte: <https://suturasonline.com.br/como-cuidar-corretamente-de-feridas-com-suturas/>, 2022.

- **Perfurantes:** Lesões ocasionadas por objetos pontiagudos, que causam pequenas aberturas na pele, gerando uma profundidade no tecido. Provocada por objetos como armas de

fogo, vidros, ponta de faca (Figura 5) (TREMORI et al., 2018);

Figura 5: Lesões perforantes.



Fonte: <https://www.sobral24horas.com/2015/03/sobral-ce-jovem-e-lesionado-bala-no.html>, 2022.

- **Lacerantes:** São lesões que exprimem a apresentação de bordas irregulares, com mais de duas dimensões. Sendo essas induzidas por uma tração do tecido, lembrando um rasgão ou arranquedo tecido, como por exemplo na mordedura de um cachorro ou outro animal (Figura 6) (MARTINS; ONOFRE; MARCONDES, 2021);

Figura 6: Lesões lacerantes.

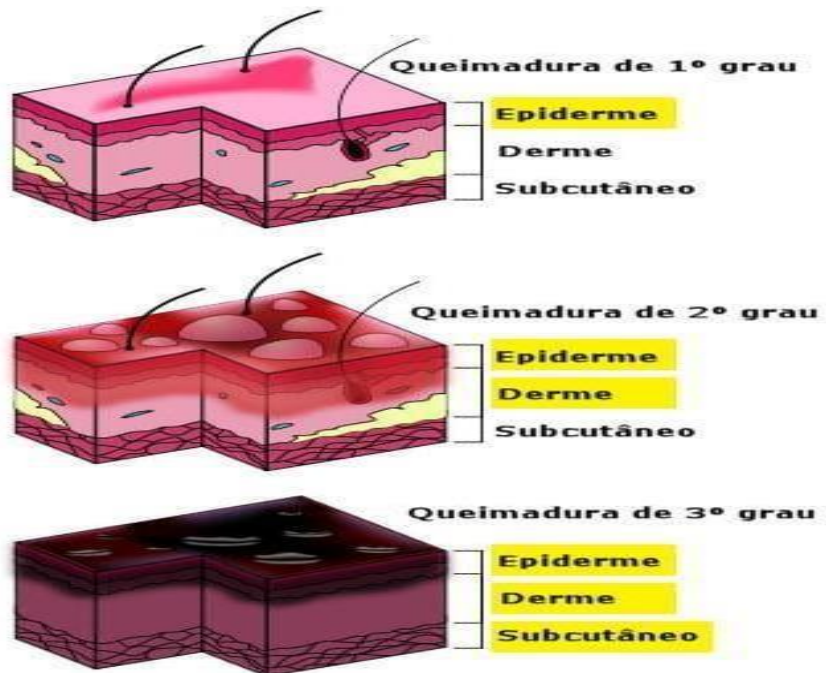


Fonte: <https://www.opovo.com.br/noticias/brasil/2016/06/bebe-e-hospitalizado-com-marcas-de-mordida-e-mae-e-levada-a-delegacia.html>, 2022.

- **Queimaduras:** São lesões traumáticas que causam a destruição da pele ou de outros tecidos mais subjacentes, e que podem ser ocasionadas a partir de calor, eletricidade, radiação, temperaturas extremamente frias, ou por produtos químicos (SENA; BRANDÃO, 2021). Essas lesões possuem uma classificação de acordo com o quanto atingiram de profundidade nos tecidos. As queimaduras de 1º grau acometem apenas a epiderme, onde essa área fica dolorida e com descamação. As queimaduras de 2º grau são lesões que afetam a epiderme e a derme (tecido conjuntivo), nesse grau a área fica com eritema, calor, dor, e podem aparecer complicações sistêmicas (CAPELLA et al., 2020). Nas queimaduras de 3º grau, estas acometem

tecidos mais profundos como o tecido subcutâneo, tendões, músculo e ossos (Figura 7). Esse tipo de queimadura por ocasionar uma destruição maior de camadas, necessita que o indivíduo passe mais tempo hospitalizado, possuindo um maior risco de infecções, além de demandar um tratamento mais complexo nesses tecidos. As queimaduras também podem ser classificadas quanto a extensão da área acometida no corpo do indivíduo, classificando como: pequeno, médio e grande queimado (DA SILVA et al., 2020).

Figura 7: Classificação das queimaduras.



Fonte: <https://www.mdsaude.com/dermatologia/queimaduras>, 2022.

O nível de contaminação existente nas lesões possibilita que se classifique em quatro tipos diferentes: Limpas, limpas-contaminadas, contaminadas e sujas/infetadas. Quanto ao grau de contaminação, as lesões podem ser classificadas em:

- **Limpas:** As lesões limpas não expõem nenhum sinal de infecção, essas lesões são praticadas de forma cirúrgica, de forma mais asséptica possível, sem contaminação, nem inflamação e com as bordas das lesões sendo unidas por suturas. A chance de infecção nesse grupo é bem baixa, em torno de 1 a 5%. Além disso, essas lesões não afetam os trato urinário, genital, digestivo e respiratório (DA SILVA et al., 2020);

- **Limpas-contaminadas:** Essas lesões mostram contaminação de forma moderada, por envolvimento cirúrgico aos trato digestivo, respiratório, genital e urinário. O risco de uma infecção nessas lesões não passa de 10% (DA FERNANDA CAMILA FERREIRA SILVA et al., 2015; DA SILVA et al., 2020);

- **Contaminadas:** Essas lesões são aquelas feridas acidentais traumáticas que estão

abertas há pelo menos seis horas ou mais, ou que entraram em contato com agentes que causam contaminação, como microorganismos, areia, fezes, implicando nas condições de assepsia. O risco de infecção nessas lesões fica em média entre 20 a 30% (DA FERNANDA CAMILA FERREIRA SILVA et al., 2015; DA SILVA et al., 2020);

- **Sujas-infectadas:** Essas lesões são feridas traumáticas que estão abertas, apresentando sinais nítidos de infecção, como edema, supuração e de aspecto purulento, sendo possível visualizar os tecidos lesionados e com a presença de exsudato. Isso tudo ocorre devido a multiplicação e invasão desenfreada de microorganismos bacterianos, que estão em consonância direta ao tempo em que se encontram em contato com a ferida (MARTINS et al., 2021).

As classificações das lesões também podem ser realizadas a partir do comprometimento desse tecido, nesse caso a lesão será classificada em estágios I, II, III e IV. Segue a descrição de cada um abaixo:

- **Estágio I:** Nesse estágio, ocorrerá comprometimento apenas da epiderme, no qual a pele estará com eritema, porém não ocorrerá perda tecidual. O tecido terá pequenas mudanças na sensibilidade, temperatura e consistência (SANTOS, TIAGO LOPES DOS; CERÁVOLO, MARINARA KORT; ANDREAZZI, MARCIA APARECIDA; SANTOS, JOSÉ, 2021; SILVA et al., 2022);

- **Estágio II:** Nesse estágio há uma perda tecidual ocorrendo um comprometimento da epiderme, derme ou dos dois. O tecido pode apresentar uma coloração vermelha ou rosa, será úmido, e pode aparecer uma bolha intacta ou rompida (CALIRI et al., 2016; SILVA et al., 2022);

- **Estágio III:** Nesse estágio ocorre um comprometimento total da pele, e uma necrose no tecido subcutâneo, podendo se visualizar tecido de granulação e lesões com bordas enroladas, mas não se atingiu ainda a fáscia muscular (CALIRI et al., 2016; SILVA et al., 2022);

- **Estágio IV:** Nesse estágio pode-se observar uma grande destruição de tecido, com perda tissular, com lesão muscular, óssea ou necrose tecidual (CALIRI et al., 2016).

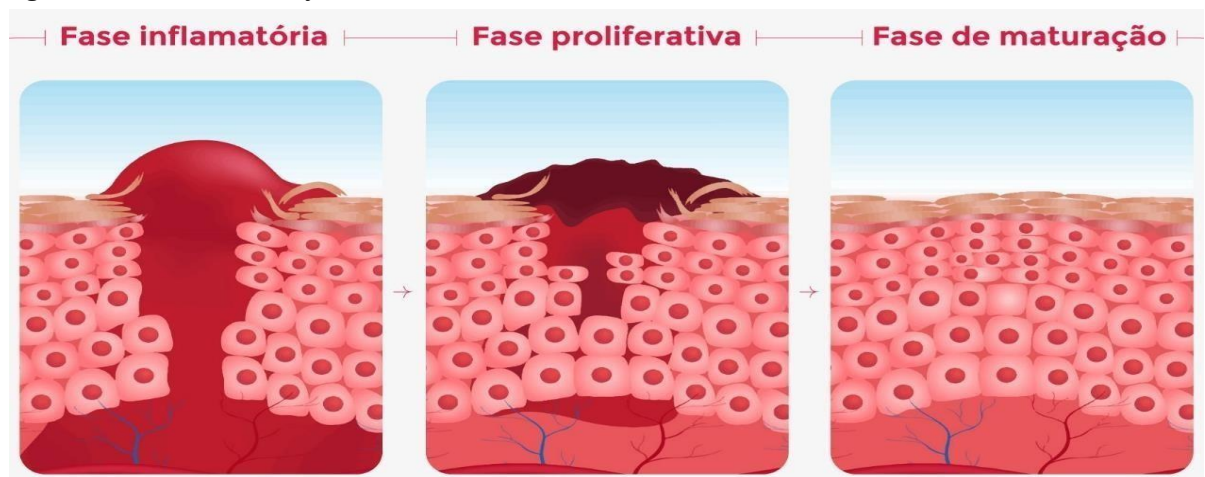
2.3. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A preservação e o processo de reparo da pele se fazem importantes, e com isso são bastante estudados as causas e formas de tratamento de processos inflamatórios que nela ocorram, devido a sua relevância no sistema de saúde, pois apresenta um número considerável de pessoas afetadas (MENDES HOEPERS et al., 2015). Pacientes com condições de saúde como diabetes, idosos e pacientes com doenças genéticas, possuem uma predisposição a uma cicatrização anormal de lesões, com isso gerando sequelas a longo prazo como uma cicatrização retardada, incompleta

ou desordenada. Atualmente existem várias terapias para o processo de cicatrização de feridas, de modo geral essas terapias são moderadamente eficazes. Sendo assim, observa-se uma necessidade de terapias cada vez mais eficazes para cicatrização de feridas, visto que esse processo seja um desafio (BASU et al., 2017; LORDANI et al., 2018).

Quando ocorre uma lesão em um indivíduo, acontece uma série de acontecimentos bioquímicos responsáveis por consertar o dano gerado e com isso possibilitar a cicatrização. Esses acontecimentos são relatados em fases diferentes, representando as principais etapas observadas em cada período. Existem três fases que representam esses eventos e são elas: Fase inflamatória, fase proliferativa ou de reparação e fase de maturação ou remodelação (Figura 8). Cada fase tem suas diferenças, suas funções que se complementam e suas características histológicas (MOREIRA, 2016).

Figura 8: Fases da cicatrização dos tecidos



Fonte: <https://blog.medcel.com.br/post/fases-da-cicatrizacao>, 2022.

2.3.1. Fase inflamatória

Nessa fase como seu próprio nome diz, é possível se observar os sinais cardinais de inflamação nesse tecido como edema, calor, vermelhidão e dor no local da lesão. Essa fase tem início imediato após a lesão, e gira em torno de até 3 dias após o início da lesão. Inicialmente os primeiros eventos tem relação com respostas vasculares caracterizadas por coagulação sanguínea e hemostasia, onde é possível se observar uma ativação da agregação plaquetária, e o começo da formação de um coágulo, esse mecanismo será responsável por fazer uma rede selando provisoriamente essa lesão da entrada de microorganismos oportunistas que venham a se espalhar pelo tecido. A nível celular, ocorrerá uma dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, favorecendo a infiltração de leucócitos nesse local, tendo esses diferentes funções como liberação de fatores de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de

crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico, prostaglandinas e tromboxanas, que atraem neutrófilos a lesão, dando início a resposta proliferativa para reparo da ferida, além de atuar como uma trama para migração de neutrófilos, monócitos, células endoteliais e fibroblastos (MARTELLI et al., 2016; NOUR et al., 2019; SILVA; MOREIRA, 2020).

Os macrófagos e neutrófilos que circulam pelo sangue se comprimem por intermédio dos capilares dilatados, contribuindo na retirada de bactérias e restos de tecidos mortos e/ou células. Os macrófagos possuem um papel muito importante pois eles finalizam o desbridamento que foi começado pelos neutrófilos e sua colaboração é secretando citocinas e fatores de crescimento (PDGF, TGF- β e EGF), além de auxiliarem na síntese de matriz extracelular, produção de colágeno (fibroplasia), formação de novos vasos (angiogênese), etapas que serão essenciais para a próxima fase que é a proliferativa (HAN; CEILLEY, 2017).

2.3.2. Fase proliferativa

Essa fase acontece no intervalo de 4 a 12 dias após a lesão, nessa fase como o próprio nome diz é o momento em que ocorrerá um enorme aumento na produção e desenvolvimento de células nesse tecido. Essa fase é responsável pelo início de formação propriamente do tecido, onde consiste no engajamento das células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, fibroblastos, com o intuito de revestir e preencher a área lesionada, reintegrando o tecido (NOUR et al., 2019; WANG et al., 2018).

Existe quatro estágios básicos que ocorrem no processo de cicatrização: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Tudo começa com a multiplicação de células epiteliais, na borda da lesão, simultaneamente com a angiogênese e a fibroplasia, a partir desses estágios será formado o tecido de granulação, este será encarregado por ocupar a lesão por baixo da crosta, colaborando na formação de uma barreira protetora inibindo infecções e ajudando na epitelização da lesão. O tecido de granulação é formado por macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos, com uma matriz frouxa de colágeno, glicoproteína, fibronectina e ácido hialurônico (HA) (AZEVEDO et al., 2020; PEREIRA et al., 2019).

Na fase proliferativa, o leito da lesão está repleto de células da pele em desenvolvimento, e fatores de crescimento sendo secretados como as citocinas TNF- α e IL-6. Além disso, células-tronco derivadas da medula vão se diferenciar em células da epiderme e da derme, e com isso se multiplicar para reorganizar o tecido e substituir as células que estão faltando. Porém, em lesões crônicas, essa capacidade de cicatrização é desajustada por causa do processo de inflamação contínua (NOUR et al., 2019).

Na fase proliferativa os macrófagos induzem a ativação dos fibroblastos, um macrófago de subconjunto CD206+/CD301b+ ativa a modificação de fibroblasto para miofibroblasto (uma célula com fenótipo híbrido, com características de fibroblasto e célula muscular lisa), tanto no homem quanto nos camundongos, a modificação dessa célula vai desencadear um aumento de colágeno e de actina no músculo da lesão. Além disso os macrófagos possuem também a possibilidade de se modificar em células fibróticas, aplicando colágeno e outros fatores da matriz extracelular, esses macrófagos que possuem essa característica são chamados de fibrócitos ou macrófagos M2a, e sua funcionalidade será importante na formação do processo de cicatrização. Não se sabe ao certo se os macrófagos M2 provascular e os macrófagos fibróticos M2a são de um mesmo subconjunto, visto que tanto a neovascularização quanto a deposição de colágeno na lesão sejam interligadas. Acredita-se que existam vários fenótipos híbridos do macrófago e não apenas um subconjunto (RODRIGUES et al., 2019).

2.3.3. Fase de remodelamento

Essa é a última e mais duradoura etapa da cicatrização das lesões, essa fase dura em média de 14 dias até meses após o início da lesão, nesta fase é necessário um equilíbrio entre a morte celular das células já existentes e a produção de novas células. O tecido granulado torna-se um aglomerado livre de células. Para que isso aconteça, é elaborado uma matriz de colágeno densa com fibras compactas sendo acrescentadas por proteoglicanos e glicoproteínas (NOUR et al., 2019).

Nesta etapa nota-se uma contínua reabsorção e deposição de colágeno, a matriz do início de colágeno se diferencia no conteúdo e organização do tecido normal. A lesão jovem apresenta uma matriz com 20% predominante de colágeno do tipo III, tornando a matriz e consequentemente a lesão frágil. Devido a isso, esse colágeno é degenerado dando espaço ao colágeno do tipo I, sendo este mais resistente e denso. No decorrer do tempo de amadurecimento da lesão, as fibras colágenas se ajustam entrelaçando-se, em média após uma semana transcorrida, a resistência da lesão alcança 3% da mesma que um tecido normal, além disso ocorre uma diminuição da angiogênese, dos elementos celulares e uma reestruturação dos anexos da pele. As collagenases e proteinasas irão declinar as fibras de colágeno, e um novo colágeno será disposto pelos fibroblastos (CAPELLA et al., 2020; MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2017).

Na fase de remodelamento, os macrófagos possuem uma importante função, eles irão assumir um fenótipo fagocítico com um cunho fibrolítico, conseguindo dissipar a matriz excessiva e as células mortas. Esses macrófagos são intitulados M2c, onde conseguem liberar

proteases e fagocitar as células e a matriz que se encontra em excesso e que não se precisa mais para a lesão ser fechada. Se não ocorrer uma sinalização adequada por parte dos miofibroblastos para que os macrófagos atuem nesse processo, isso resultará em um excesso de matriz depositada, resultando em uma fibrose cutânea (CÂMARA; FELIX; CORGOZINHO, 2022; RODRIGUES et al., 2019).

2.3.4. Cicatrização por primeira intenção

Essa cicatrização acontece quando as bordas das lesões são aproximadas, por intermédio de uma suturação, ocorrendo a menor perda de tecido, ausência de infecção, sua cicatrização acontece em torno de 4 a 7 dias depois da incisão. O fechamento dessa lesão só é indicado quando a mesma se encontra sem infecção. Exemplo: Ferimento suturado por cirurgia (DILLER; TABOR, 2022).

2.3.5. Cicatrização por segunda intenção

Essa lesão acontece uma perda considerável de tecido, podendo ter infecção ou não, e com bordas que não conseguem ser aproximadas. Essas lesões ficarão abertas e serão tratadas como um ferimento aberto. Elas terão maior dificuldade com a cicatrização, pois precisarão de um maior tempo para cicatrizar. Será necessária formação de colágeno, angiogênese, contração e epitelização. Esse evento pode durar dias a meses (DILLER; TABOR, 2022).

2.3.6. Cicatrização por terceira intenção

Essa cicatrização se dá a partir da aproximação das bordas da lesão depois de um tratamento inicial. Normalmente isso acontece quando a lesão está infeccionada, sendo esta primeiramente tratada e posteriormente então ser suturada (DILLER; TABOR, 2022).

2.4. CURATIVOS

A área de atuação na terapia de lesões está em contínuo crescimento e a gestão satisfatória depende do entendimento do processo de cicatrização, do tipo de lesão a ser tratada, da condição de saúde do paciente, além das características físico-químicas do material utilizado no curativo. É inexistente um curativo singular que seja adequado para tratar todos os tipos de feridas, quer seja ela agudas ou crônicas (BASU et al., 2017).

As metodologias mais novas para o tratamento de lesões, estão inclusas desbridamento, enxertos de tecido, irrigação, enzimas proteolíticas e antibióticos, e com elas vem acompanhado as suas vantagens, mas também desvantagens, além de algumas vezes efeitos adversos indesejados. Esforços estão sendo feitos em todo o mundo para descobrir agentes que possam promover a cura e, assim, reduzir por exemplo o custo da hospitalização e salvar o paciente de

situações como amputações ou de outras complicações graves (DUQUE et al., 2016).

Com isso, foi desenvolvida ao longo dos anos, uma vasta variedade de curativos, tendo alguns como base polímeros sintéticos, semissintéticos ou naturais. É necessário que os curativos apresentem propriedades físico-químicas e biológicas que são importantes pra sua ação, como boa aderência à ferida, fácil formação do gel, boas propriedades mecânicas, além de ajudar na regeneração celular, inibir o crescimento bacteriano ou fúngico, e ter ausência de antigenicidade (KAYGUSUZ et al., 2017; ROCHA E SILVA et al., 2015).

Na prática clínica, os curativos e produtos de uso tópico são utilizados para criar e manter um ambiente favorável para a cicatrização. Entretanto, muitas vezes estes possuem um alto custo, além de serem ineficazes ou não tão eficazes assim para aquele fim a que se destinam. Apesar de existir à disposição várias formulações farmacêuticas, novas alternativas terapêuticas podem contribuir num menor número de efeitos indesejáveis, menor custo e também otimizando o tempo de recuperação (LORDANI et al., 2018).

Com isso, a pesquisa farmacêutica continua procurando desenvolver novos sistemas de liberação, onde seja possível veicular substâncias com um bom potencial farmacológico. O objetivo de novos sistemas sugere requisitos que se enquadrem como um bom curativo, como por exemplo, uma forma farmacêutica de fácil aplicação, com controle de dose, veiculando uma substância que seja possível de tratar as infecções cutâneas, além de conduzir uma proposta inovadora mostrando uma alternativa às formas farmacêuticas convencionais de uso tópico, como cremes, géis, pomadas (ESKANDARINIA et al., 2019).

Atualmente, existe uma enorme variedade de curativos, partindo desde as coberturas mais simples, como uma compressa de gaze, até as formas farmacêuticas mais bem elaboradas como pomadas, géis, soluções, cremes, suspensões, além dessas ainda tem as formas com mais tecnologia aplicada como as espumas, filmes, hidrocolóides e hidrogéis. Cada forma farmacêutica é aplicada para condições em específico. Ademais, os curativos possuem a propriedade de veicular diversos tipos de princípios ativos como antimicrobianos, cicatrizantes, dentre outros (BOATENG; CATANZANO, 2015; KAMOUN et al., 2015).

Dentro do universo de curativos disponíveis no mercado, eles são classificados como: curativos passivos, esse grupo de curativos possui a função restrita a cobertura e proteção do local; curativos interativos, esse grupo tem a função de modificar a fisiologia do micro ambiente da lesão, mantendo o local da lesão úmido e favorecendo sua cicatrização, e por fim os curativos bioativos, esse grupo possuem as mesmas funções dos grupos anteriores, porém além disso ainda tem a função de receptáculo de fármacos, com o propósito de tratar as lesões

e promovera regeneração dos tecidos a partir da liberação dos fármacos no tecido lesionado (BOATENG; CATANZANO, 2015; MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

Os filmes apresentam uma fina espessura, e são usados como barreira a agentes externos. Eles podem ser adquiridos por vários processos diferentes, dentro dessas técnicas, existe a de casting, que constitui-se da preparação de uma solução de um polímero seguido da evaporação do solvente. Com isso, ocorrerá a formação de uma solução filmogênica devido as interações inter e intramoleculares que ocorrem entre o polímero e o solvente. Os filmes terão particularidades que irão variar de acordo com o tipo de polímero utilizado e a sua concentração (DUTRA et al., 2017).

Os filmes apontam a possibilidade de tornar o tratamento cômodo e funcional quando comparado a outras formas farmacêuticas, pelo fato de serem transparentes, possibilitando a visualização da lesão, são capazes de ser aplicados em lesões com uma extensão maior, além de serem removidos com mais facilidade, sem dor ou perturbação na sua remoção. Além do mais, eles podem atuar como matrizes de liberação controlada ou extendida do fármaco, ocasionando a diminuição no número de trocas do curativo e favorecendo a adesão ao tratamento por parte do paciente (OSHIRO JUNIOR; SHIOTA; CHIAVACCI, 2014).

2.5 ALFA BETA AMIRENONA

Na indústria farmacêutica existe um impasse que acomete o uso das plantas medicinais, que é a quantidade de matéria-prima que se faz necessária para produção dos produtos, entretanto com o avanço de ensaios de síntese ou semissíntese é possível se isolar, purificar e aumentar a quantidade de matéria-prima que será utilizada dessas plantas. A Amazônia alberga um dos biomas com maior biodiversidade de fauna e flora e também mais diversificado do planeta. Devido a essa grande biodiversidade, isso favorece a manufatura de novos produtos farmacêuticos, dentro dessa logística os breus amazônicos possuem aspectos farmacológicos que influem no estudo e isolamento de compostos bioativos (FERREIRA et al., 2017).

O *Protium heptaphyllum* é uma árvore de grande porte, que faz parte da família Burseraceae, onde essa família envolve em torno de 16 gêneros e mais de 800 espécies, essas são vistas na região Amazônica majoritariamente e em outras regiões do Brasil. Essa árvore é conhecida de forma popular como Almecegueira, Breu Branco. Quando o tronco dessa árvore sofre um corte, este libera uma óleo-resina amorfa que pode ser utilizada como vernizes, cosméticos, dentre outros, além de apresentar ação biológica como antiinflamatório, gastroprotetor, dentre outros (MELO et al., 2010).

Estudos realizados nessa óleo-resina apresentam que em sua constituição tem a presença de substâncias de natureza da classe dos triterpenos pentacíclicos, o que se encontrou em maior quantidade é a α,β -amirina. Nos últimos tempos já foi relatado na literatura estudos com essa mistura de isômeros, onde esta apresentam várias atividades biológicas como, anti-inflamatória, gastro e hepatoprotetora, hipoglicemiante e hipolipemiante e muitas outras (FERREIRA et al., 2017).

Os triterpenos são uma classe de compostos naturais que possuem grande magnitude para novas descobertas de uso, devido a sua capacidade farmacológica, apresentando várias propriedades como: antifúngica, antiviral, antibacteriana, neuroprotetor, dentre outros. Triterpenos exibem uma variação estrutural, onde podem ser tetracíclicos ou pentacíclicos, os triterpenos pentacíclicos apresentam em sua estrutura 30 átomos de carbono e 5 anéis, eles podem ser classificados em 3 subclasses: oleanos (β -amirina), ursanos (α -amirina) e lupanos. Os oleanos e ursanos contém 5 anéis hexagonais, e se distinguem no posicionamento dos seus grupamentos metilo onde nos oleanos os dois grupamentos estão em C-20, e nos ursanos um grupamento está em C-20 e outro em C-19. Nos lupanos a sua estrutura difere um pouco mais que as duas subclasses anteriores, visto que o seu quinto anel seja pentagonal (NUNES, 2013).

Além da α,β -amirina também é encontrado em quantidade menor na óleo-resina a presença da α,β -amirenona, este da mesma forma é um derivado triterpênico que faz parte das séries oleano e ursano como a α,β -amirina. A α,β -amirenona além de ser encontrada nas espécies vegetais, também pode ser obtida a partir de uma reação de oxidação da α,β -amirina, tornando o produto dessa reação uma molécula semissintética. Devido a necessidade de se obter a substância em maior quantidade do que pode ser encontrado na natureza, algumas vezes se faz necessário o processo de síntese e semissíntese em laboratório (MELO et al., 2010).

A α,β -amirenona ainda não possui muitos relatos na literatura sobre suas atividades biológicas visto que ainda é uma molécula nova e que necessita de mais estudos sobre suas ações terapêuticas, entretanto, estudos como o de (NIU et al., 2014) que apresenta um efeito antiinflamatório reduzindo edema de orelha em modelo animal, fez o uso do isômero δ -amirenona. O estudo de (FERREIRA et al., 2017b) também conseguiu avaliar as atividades hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade dessa vez da α e β - amirenona em camundongos, obtendo resultados promissores.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um filme polimérico a base de quitosana para incorporação da α,β -Amirenona e avaliação *in vivo* das atividades cicatrizante e anti-inflamatória de uso tópico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver filmes poliméricos a base de quitosana para veiculação da ABAME;
- ✓ Incorporar a ABAME no sistema polimérico;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente os sistemas;
- ✓ Avaliar *in vivo* a ação cicatrizante e anti-inflamatória dos filmes com ABAME, utilizando camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO (ALFA BETA AMIRENONA)

Foi obtido no mercado de Coari, no estado do Amazonas, no Brasil, 2 kg de óleo-resina do *Protium* spp. As amostras foram limpas, moídas, e após identificação ficaram guardadas na geladeira até irem pra etapa de extração. A etapa de extração e isolamento da amirina se deu por cromatografia em coluna de fase normal, em seguida a amirina isolada seguiu pra etapa de oxidação. A mistura de α , β -amirenona foi obtida pela oxidação de α , β -amirina isolada das óleo-resinas do *Protium*. O rendimento da reação baseado em 1,0 g de α , β -amirina foi cerca de 70% de α , β -amirenona com aproximadamente 99,66% de pureza (FERREIRA et al., 2017a). Todas essas etapas foram realizadas na UFAM pelo professor Emerson Lima.

4.2. DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS

Os filmes de quitosana foram preparados a partir do método Casting, onde neste método o polímero foi acrescentado ao ácido acético (solvente), até a obtenção de mistura homogênea e depois de vertermos a mistura no recipiente adequado, secamos em estufa até a evaporação do solvente. A quitosana (polímero) foi dissolvida em ácido acético (solvente) (1% p / v) e submetida a agitação magnética a 500 rpm por 24h. A solução resultante foi filtrada a vácuo e 7 mL da solução de quitosana foram vertidos em placas de Petri com 47 mm de diâmetro para formação de filmes brancos (BCF).

Para a incorporação do ABAME nos filmes, foram previamente preparadas as soluções dissolvidas em etanol a 96% nas concentrações de 1mg / mL, 2mg / mL e 5mg / mL. Sendo assim, 2 mL de cada solução pronta foram acrescentadas a 7 mL da solução de quitosana, formando F1 (1 mg / mL ABAME), F2 (2 mg / mL ABAME) e F5 (5 mg / mL ABAME).

Os filmes foram submetidos à secagem em estufa Quimis® a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Na sequência foi adicionado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M sobre os filmes formados, para neutralização do ácido residual. Em seguida, lavou-se com água destilada até atingir o pH próximo de 7.0 e secos em temperatura ambiente por 24h.

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES

4.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram submetidas à análise da espectroscopia de infravermelho utilizando o equipamento Shimadzu ® (IRPrestige-21). Estas foram colocadas em chapas de aço e

analisados diretamente pela ATR (Attenuated Total Reflectance). As amostras foram analisadas na região de 700-4000 cm^{-1} com 15 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

4.3.2. Difração de raio- x (DR-X)

A difração de raio X foi realizada utilizando um Bruker D2 Phaser, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) a uma voltagem de 30 kV e uma corrente de 10 mA usando um detector Lynxeye. As amostras foram escaneadas à temperatura ambiente durante um período de 2 horas a uma faixa de 5 a 60° a 0.05°/s.

4.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises do DSC foram realizadas utilizando o calorímetro de exploração diferencial Shimadzu DSC-60A, na razão de aquecimento de 10°C/min e no intervalo de temperatura de 25-400°C com a atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL/min, em um cadinho de alumínio com massa de amostra de torno de 3 mg. Antes do ensaio, a temperatura e o fluxo de calor do instrumento DSC foram calibrados com índio (ponto de fusão = 157.5 °C e $\Delta H = 26.7 \text{ J g}^{-1}$).

4.3.4. Termogravimetria (TG)

As amostras foram submetidas ao analisador termogravimétrico DTG 60AH da Shimadzu®, na faixa de temperatura entre 25-500°C, com razão de aquecimento de 10°C/min sob uma atmosfera dinâmica N_2 a 50 ml min^{-1} , em um cadinho de alumina contendo amostras de cerca de 3mg. A verificação do instrumento empregado será feita com padrão de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

4.3.5. Microscopia eletrônica varredura (MEV)

As amostras foram montadas em tocos de ouro usando fita adesiva dupla face. As análises morfológicas vão ser realizadas no FEG ZEISS, modelo Auriga Microscope, com ampliação de 500X, 1500X. Imagens de microscopia eletrônica de varredura serão obtidas a um potencial de aceleração de 5 kV sob pressão reduzida.

4.4. ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, protocolo número 210.080 / 2019 (**ANEXO I**). Nesta pesquisa foram utilizados 50 camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), dividindo esses animais em duas etapas, uma de 7 dias e outra de 14 dias, esses animais tinham idade de 8 a 10 semanas, com peso entre 25 a 35g, alojados no Biotério do Centro de Ciências da Saúde - CCS, no anexo do Hospital Universitário Onofre Lopes – HUOL/UFRN. Os animais durante todo o processo receberam alimentação (ração tipo

pellets) e água *ad libitum*, respeitando o número de 5 animais por gaiola. Mantidos a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas.

Todos os ensaios basearam-se também na quantidade de animais por grupo que fossem mais bem aproveitados de forma ética e responsável para minimizar o sofrimento e produzir resultados científicos confiáveis, de acordo com estudos anteriores citados no documento de projeto submetido ao Comitê de Ética de Uso em Animais (CEUA).

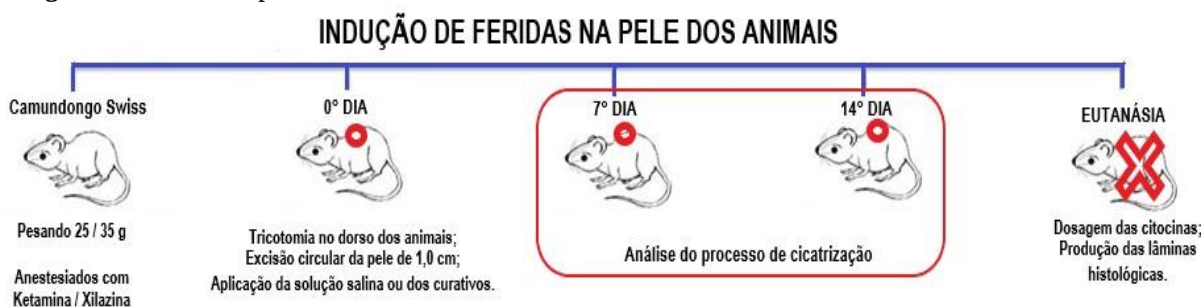
4.4.1. Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos em cinco grupos experimentais de acordo com o tratamento proposto, sendo o n de 10 animais por grupo. O primeiro grupo é os não tratados (recuperação natural, utilizando apenas solução salina), o segundo grupo é os BCF foram tratados aplicando o filme de quitosana em branco e os grupos três, quatro e cinco, respectivamente F1, F2 e F5, correspondem aos grupos tratados com filmes de quitosana-ABAME que foram recortados de forma circular com 1,0 cm de diâmetro e apresentando concentração teórica a ser testada nas concentrações F1 - $0,11 \text{ mg/cm}^2$, F2 - $0,23 \text{ mg/cm}^2$, e F5 - $0,57 \text{ mg/cm}^2$.

4.4.2. Indução de feridas na pele

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 80 mg / kg de cetamina e 10 mg / kg de xilazina. Após a anestesia, foi realizada tricotomia na região dorsal para facilitar uma boa visualização do campo operatório, bem como para facilitar a análise do processo de cicatrização da ferida. Realizou-se assepsia do dorso e, em seguida, excisão circular da pele medindo 1,0 cm de diâmetro com auxílio de punch, expondo *Panniculus carnosus*, conforme protocolo adaptado de (MARTINS et al., 2006). A membrana (curativo) foi aplicada imediatamente sobre a ferida. Os camundongos foram sacrificados com cetamina e xilazina (120 mg / kg e 30 mg / kg, respectivamente, por via intraperitoneal) nos dias 7 e 14 após o procedimento. Desenho experimental representado na figura 9.

Figura 9: Desenho experimental



Fonte: Elaborado pela Autora.

4.5. EFEITO CICATRIZANTE

Após a eutanásia, aos 7º e 14º dias, foi realizada a análise macroscópica das lesões no dorso dos camundongos. A porcentagem de área da ferida nos dias de pós-operatório foi calculada comparando-se as mudanças no tamanho da ferida em relação ao primeiro dia de procedimento. O monitoramento da evolução da cicatriz foi utilizado no software ImageJ para mensuração. Após análise macroscópica, as feridas foram excisadas com margem de 2 mm além da borda da ferida para avaliação histopatológica, e uma amostra representativa foi utilizada para ilustrar a cicatrização da ferida observada no presente estudo.

A área ferida foi fotografada e medida utilizando a escala graduada que foi importada do software Image J® 1.49 (disponível gratuitamente em: <http://imagej.nih.gov/ij/>) e as bordas da ferida contornada para ter sua área determinada em 0, 3, 7, 10 e 14 dias pós-feridos para à avaliação do período inflamatório agudo até o período de cicatrização tecidual. Os resultados foram expressos como porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida usando a Eq. (1):

$$\% \text{ cicatrização da ferida} = \frac{A^0 - A_n}{A^0} \times 100$$

Onde A0 corresponde ao dia 0 da cirurgia e An corresponde ao número de dias (3º, 7º, 10º e 14º dia).

Na análise histológica, amostras das lesões cutâneas dos animais submetidos ao modelo experimental foram coletadas e imediatamente fixadas em formalina tamponada a 10%, após 24 horas as amostras foram retiradas da formalina e desidratadas em álcool, tomando seis banhos de álcool a cada uma hora (partindo da concentração de álcool a 70% até álcool absoluto) onde as amostras ficavam imergidas por uma hora em cada concentração de álcool, a partir do álcool 70% seguindo para 80%, 90%, 95% e absoluto em duplicata, em seguida imergiu em três banhos de xilol e posteriormente submetidos a três banhos de parafina. Após essa etapa, as amostras encontram-se submersas na parafina, formando blocos, quando os blocos estavam solidificados as amostras foram cortadas em micrótomo em seções de 5 µm de espessura. Na etapa seguinte, esses cortes foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente examinadas em microscopia óptica.

As principais medidas das análises histopatológicas das lesões cutâneas nos dias 7 e 14 do modelo experimental, incluíram a quantidade de infiltrados inflamatórios, quantidade e manutenção de tecido de granulação (viável), depósito de colágeno, reepitelização, neovascularização e a presença de tecido necrosado (não viável). Em cima

dessas características, estas foram classificadas e pontuadas de acordo com a tabela da seguinte forma: infiltrado inflamatório, reepitelização, neovascularização e áreas de necrose. Utilizando escores de 0 a 3 (0 - nenhum, 1 - escasso, 2 - moderado, 3 - abundante) sendo atribuídos pontuação a cada parâmetro e fazendo a média dos escores, de acordo com o protocolo adaptado por (ABRAMOV et al., 2007).

Tabela 1. Classificação dos critérios utilizados nas análises histopatológicas

Pontuações	Infiltrado Inflamatório	Neovascularização	Reepitelização	Crosta e Necrose
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	Discreto	Inicial	Parcial	Presente
2	Moderado	Parcial	Completo	-
3	Intenso	Completo	-	-

Fonte: Adaptado de ABRAMOV, 2007.

4.6. ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

A concentração de citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α foi medida usando kits comerciais de imuno ensaio enzimático (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), e a densidade óptica medida digital a 450 nm em espectrofotômetro. As amostras das lesões foram homogeneizadas e processadas conforme descrito por (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). O procedimento aconteceu em placas com 96 poços, onde foram incubadas por 18 horas a 4°C (over night) com o anticorpo de captura de IL-1 β , IL-10 e TNF- α . No dia seguinte, as placas passaram por 9 lavagens divididas em grupos de 3 em 3 lavagens a cada duas horas com PBS. Primeiramente foram lavadas três vezes com solução de lavagem de tampão fosfato salino (PBS) para retirada do anticorpo de captura, e em seguida as amostras foram adicionadas nas placas e incubadas por 2 horas em geladeira a 4° C. Após o período de incubação, realizou-se uma nova etapa de lavagem por mais três vezes com o PBS, e adicionou o anticorpo de detecção. Fez-se o processo de incubação novamente por mais duas horas em geladeira a 4° C, seguido de mais três lavagens com PBS. Em seguida, foi adicionada a solução de estreptavidina, após a adição da estreptavidina incubou novamente a placa, dessa vez em temperatura ambiente por 20 minutos, após essa incubação realizou-se novamente mais três lavagens com o PBS. Adicionou uma solução reveladora de tetrametilbenzedina com peróxido de hidrogênio. Uma solução de parada foi usada com H₂SO₄ (1M). Por fim as placas foram lidas no ELISA, e os resultados foram expressos em pg / mL (ARAÚJO et al., 2013).

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

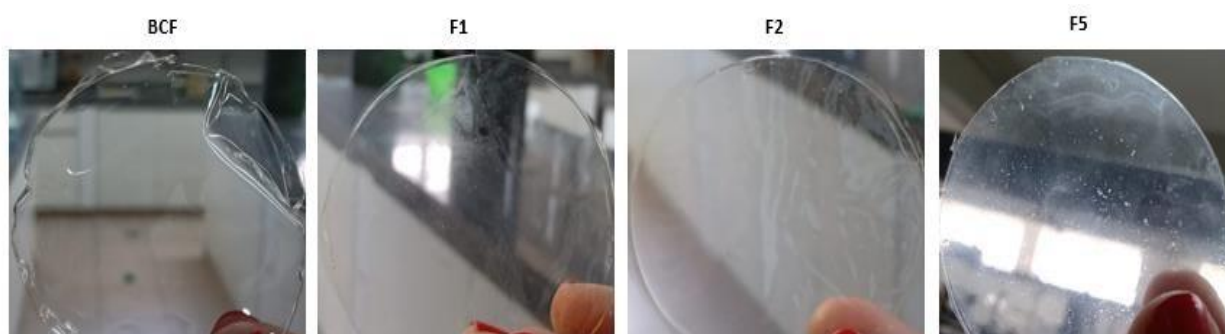
Os dados obtidos foram expressos com médias $\pm$ DP (desvio padrão) e as diferenças entre os grupos foram averiguadas através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS

Os filmes resultantes obtiveram um aspecto macroscópico homogêneo e contínuo (Figura 10), com ausência de macroporos, com boa flexibilidade, porém, sua superfície não é lisa, independentemente de ser apenas o filme com quitosana ou os filmes de quitosana associados ao ABAME.

Figura 10: Filmes depois de preparados, prontos para uso.



Fonte: Elaborado pela Autora.

Com essas características citadas, podemos corroborar o que é apresentado na literatura, onde os filmes a base de quitosana apresentem características definidas como: são biodegradáveis, flexíveis, resistentes, não se rompem ou rasgam facilmente. Tudo isso é possível se obter a partir do peso molecular escolhido e do solvente indicado para utilização (PEREIRA et al., 2020).

Os filmes obtidos com diferentes concentrações de ABAME apresentaram diferentes aspectos macroscópicos. Com o aumento da concentração do princípio ativo, o filme F5 apareceu mais opaco, devido a lipofilicidade do ABAME, muito provavelmente o mesmo não ficou tão disperso no curativo, como nas outras concentrações. Já o filme F1, teve um aspecto mais translúcido, semelhante ao filme branco de quitosana (BCF). E o filme F2 mostrou um aspecto ainda translúcido (Figura 11).

Figura 11: Apresentação das diferentes concentrações dos filmes na etapa de produção destes.



Fonte: Elaborado pela Autora.

No presente trabalho, foi possível obter as membranas produzidas a partir da quitosana

com a incorporação do ABAME. Entretanto, existem vários fatores que podem interferir no método, e modificar por consequência a estrutura física e química dos filmes. Os tipos de solventes envolvidos na produção, a variação do pH nas etapas realizadas e a concentração são capazes de modificar a estabilidade do produto final (DE ARAGÃO TAVARES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2017).

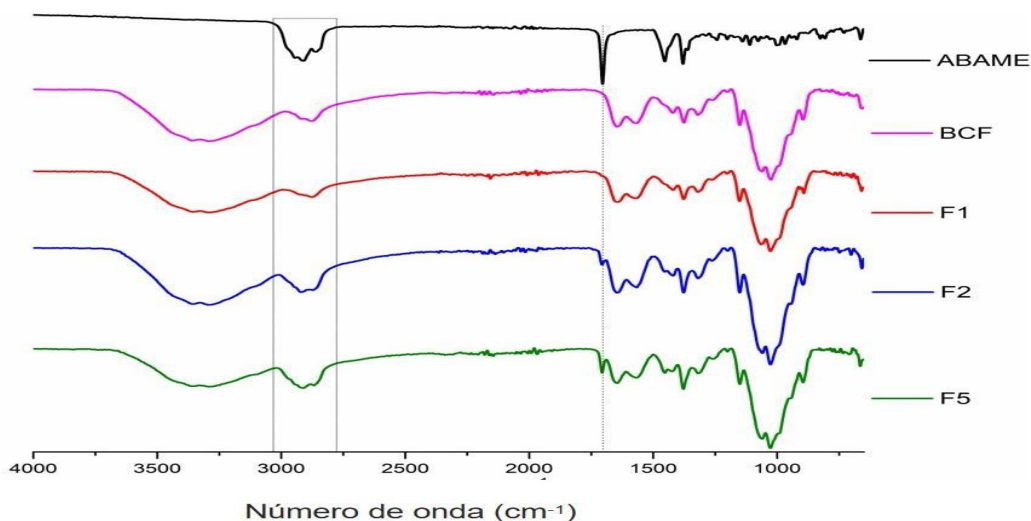
5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES

5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier

Os espectros obtidos no FTIR são mostrados na Figura 12, onde o filme branco (BCF) apresentou em seu espectro uma banda característica entre 3500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação -OH , que se sobrepõe, na mesma região, ao estiramento da ligação -NH . Outra banda característica está na região de 1200 a 1020 cm^{-1} , referente à ligação vibratória -NH_2 , grupo amino primário livre, localizado na posição C2 da cadeia. Em 2980 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} , há a ligação de estiramento -CH (SUN et al., 2017).

A banda aparente em 1647 cm^{-1} corresponde ao grupo amino acetilado da quitina, o que mostra que a desacetilação da amostra não foi completa. Por fim, é possível identificar no espectro do filme de quitosana um pico na região de 1386 cm^{-1} a 1467 cm^{-1} , que representa a ligação CO do grupo álcool primário ($\text{-CH}_2\text{-OH}$) (LOZANO-NAVARRO et al., 2018).

Figura 12: Espectros da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes de α , β -Amirenona (ABAME), filme branco de quitosana (BCF), e filmes de quitosana-ABAME nas concentrações (F1, F2 e F5).



ABAME possui em sua estrutura química um grupo carbonila, que é demonstrado no espectro por uma banda de absorção na região de 1705 cm^{-1} , representando a ligação de estiramento $\text{C}=\text{O}$. Foi observada uma banda de alta absorção entre 3050 cm^{-1} e 2790 cm^{-1} , característica das ligações C-H em anéis aromáticos. Duas outras bandas de absorção,

consecutivas em 1450 cm^{-1} e 1385 cm^{-1} , correspondem à ligação de vibração C-H dos grupos metil e metileno, respectivamente (FERREIRA et al., 2017a).

Filmes de quitosana com α , β -amirenona mostraram espectros semelhantes ao BCF, com alguns picos característicos do ABAME, como bandas em 1450 cm^{-1} e 1385 cm^{-1} , correspondendo às ligações de vibração CH dos grupos metil e metileno, presente nos filmes com as três diferentes concentrações. A banda carbonila ainda é observada no FTIR dos filmes F2 e F5, o que indica uma presença da ABAME nos filmes, no F1 é possível ver uma interação da quitosana com a ABAME nesta região, visto que não se observa mais a banda carbonila.

5.2.2. Difração de raios- x (DR-X)

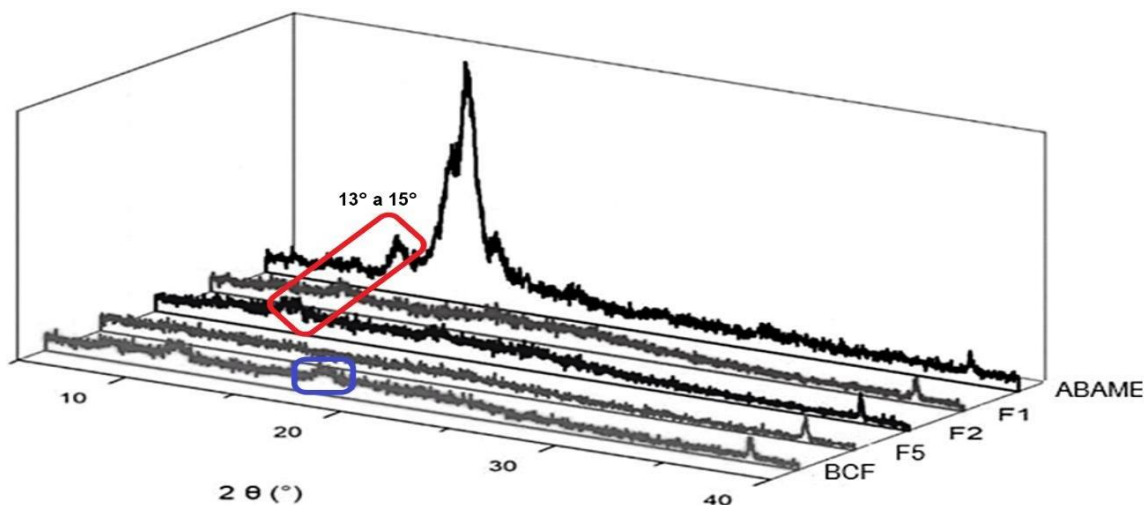
A difração de raios-X compõe uma parte importante no estudo de quase todos os sólidos, tendo incluso os medicamentos e formulações medicinais. Ela pode ser utilizada em: fazer estudo da cristalinidade do material, identificar compostos conhecidos, investigar solvatação, polimorfismo, encontrar possíveis impurezas, além de determinar propriedades físico-químicas. Com isso, é possível analisar cada substância cristalina de forma qualitativamente ou quantitativamente, onde se traça os padrões de difração, visto que cada substância tenha suas linhas específicas de difração e sua intensidade, seguindo um comportamento como o de “impressões digitais” (JENDRZEJEWSKA, 2020). Substâncias cristalinas são definidas como tendo uma estrutura tridimensional capaz de causar difração de raios X e tendo um ponto de fusão definido (PEREIRA et al., 2020).

ABAME apresenta uma difração característica na região de 13° a 15° (Figura 13), confirmando uma estrutura cristalina, conforme figura 5. O mesmo comportamento de ABAME já foi descrito por (FERREIRA et al., 2017a), sugerindo que devido a essa cristalinidade, a tendência é de que haja uma baixa solubilidade em água desse composto.

O filme de quitosana apresenta uma característica amorfa, sem a presença de picos de difração cristalinos, apenas um pico pronunciado fraco é observado na região entre 15° e 20° . De acordo (SUN et al., 2017), essa característica é atribuída ao estado amorfo do filme de quitosana.

Nos filmes é possível observar pequenas difrações na região de 13° , mas predomina o padrão de difração da quitosana. Conforme já observado no FTIR, ocorre interação entre as moléculas. Uma possível ligação é entre os hidrogênios da cadeia da quitosana e o grupo carbonila (ANTONIO et al., 2021), assim parte do caráter cristalino do ABAME é perdido com predomínio do estado amorfo.

Figura 13: Difração de raios-X (DRX) dos filmes de α , β -Amirenona (ABAME), filme branco de quitosana (BCF), e filmes de quitosana-ABAME nas concentrações (F1, F2 e F5).

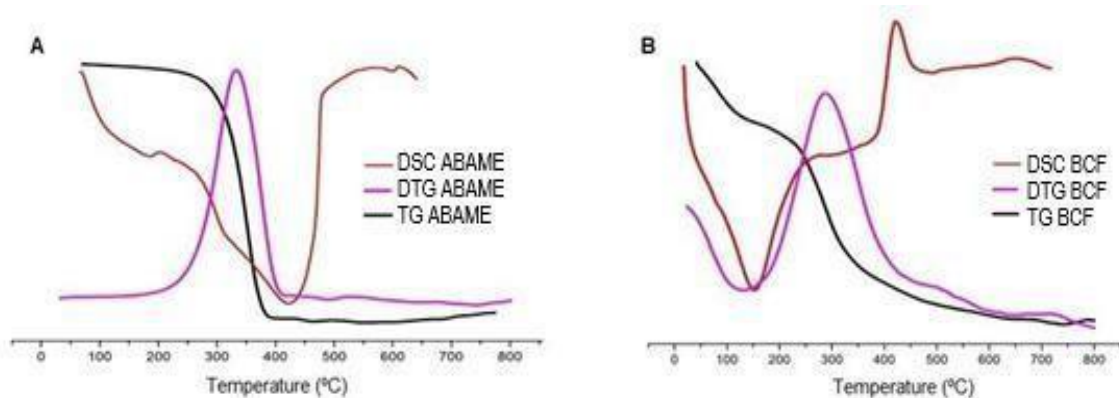


5.2.3. Termogravimetria (TG) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na curva DSC de ABAME pode-se observar um evento endotérmico em 104,97 ° C (Tonset = 90,14 ° C, Tendset = 115 ° C) e valor de entalpia (ΔH) -18,42 J / g. Este evento corresponde à fusão da ABAME, pois não há perda de massa no processo, quando correlacionada com a curva TG, conforme mostrado na Figura 14. Um segundo evento endotérmico foi observado em 280,84 ° C, (Tonset = 195,09 ° C, Tendset = 325,69 ° C e ΔH = -2,52 kJ / g), relacionado à decomposição de ABAME (FERREIRA et al., 2017a). Além disso, um terceiro pico endotérmico foi encontrado com Tpeak a 420,05 ° C (Tonset = 410,85 ° C, Tendset = 426,79 ° C e ΔH = -8,28 J / g). Eventos nesta região são descritos na literatura relacionados à decomposição de materiais carbonáceos (ricos em carbono), como também são encontrados em outros triterpenos (FERREIRA et al., 2017a; PEREIRA et al., 2020).

Para permitir uma observação mais clara do pico de fusão ABAME, foi considerada a Termogravimetria Derivada (DTG), uma vez que a massa da amostra utilizada para esta análise é maior, permitindo assim uma melhor visualização dos eventos térmicos.

Figura 14: Análise térmica DSC, TG e DTG (A) ABAME e (B) filme de quitosana em branco (BCF).



Na análise termogravimétrica, a ABAME apresentou o evento principal, iniciando em 210 ° C e terminando em 363 ° C, com uma perda de massa (Δm) de 98,9% (Figura 14), atribuída à sua decomposição. Outro evento de decomposição secundária pode ser observado mais claramente no DTG, mas a perda de massa (Δm) foi mínima.

O filme branco de quitosana (BCF) apresentou dois eventos em sua curva DSC, o primeiro evento endotérmico em T_{peak} de 108,48 ° C (T_{onset} = 87,79 ° C, T_{endset} = 135,10 ° C, e ΔH = -191,23 J / g), relacionado a perda de água (SHANKAR; WANG; RHIM, 2017). E em um segundo evento exotérmico, relacionado à decomposição da quitosana, em T_{peak} a 271,69 ° C (T_{onset} = 254,68 ° C, T_{endset} = 286,17 ° C e ΔH = 107,64 J / g).

Na curva TG da BCF, o primeiro evento de perda de massa foi encontrado entre 80 ° C- 140 ° C, correspondendo à perda de água nesta região. O segundo processo na faixa de 240 ° C com perda de massa (Δm) de 34,93%, correspondendo à desidratação dos anéis de sacarídeo, decomposição e despolimerização das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana (LOZANO-NAVARRO et al., 2018) corroborando com os resultados de DTG e DSC (evento exotérmico).

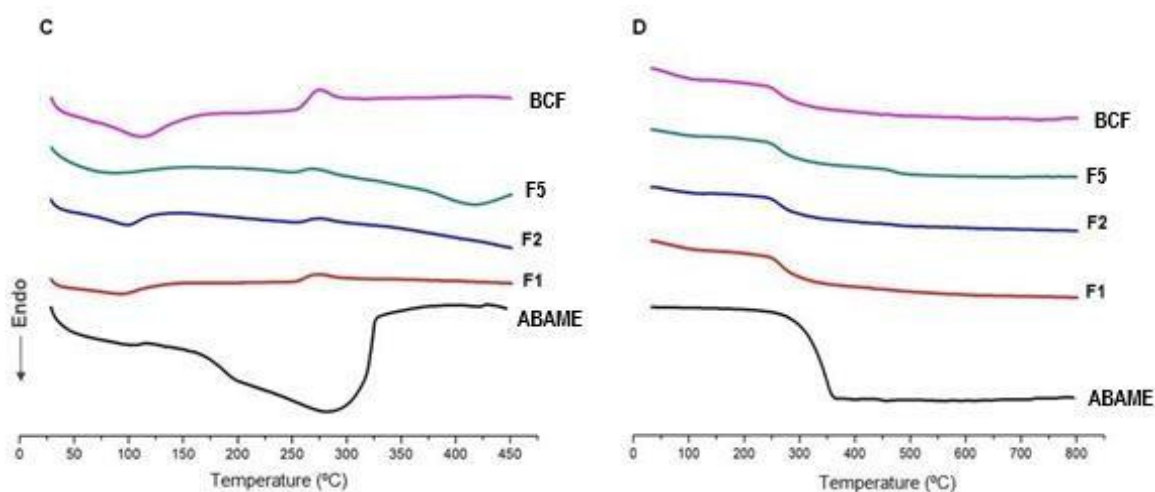
Tabela 2: Descrição dos eventos térmicos das curvas de DSC filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5).

Filme		T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	T_{peak} (°C)	ΔH (J/g)
F1	1º evento	67,26	106,76	89,21	-55,36
	2º evento	254,11	285,51	271,82	45,84
F2	1º evento	72,26	108,65	94,15	-98,21
	2º evento	255,46	286,42	272,28	33,21
F5	1º evento	49,62	107,48	85,99	-100,48
	2º evento	252,84	286,89	267,19	45,49

Os filmes F1, F2, e F5 apresentaram suas curvas DSC com características semelhantes às apresentadas pelo BCF, podendo ser verificado na Figura 14 C. O evento endotérmico nos filmes está relacionado à perda de água, ocorrendo entre 70-140 ° C, o segundo evento ocorre entre 250-290 ° C, pico exotérmico indicando a decomposição da quitosana. Os valores de T_{onset} , T_{endset} , T_{peak} e ΔH de cada evento dos filmes F1, F2 e F5 estão listados na tabela 2.

F5 também apresentou um pico endotérmico em sua curva DSC, em torno de 400 ° C, que está relacionado ao pico do ABAME puro na mesma região, indicativo da decomposição de compostos carbonáceos. Acredita-se que esse evento seja evidente apenas em F5 devido à maior concentração da ABAME neste filme.

Figura 14: (C) DSC dos filmes e (D) TG dos filmes nas concentrações (F1, F2 e F5).



As curvas TG dos filmes F1, F2 e F5 mostraram uma perda de massa inicial em torno de 100° C, indicativo da perda de água dos filmes. Eles apresentaram uma curva característica semelhante à do filme branco de quitosana (BCF). Devido à temperatura de decomposição do ABAME ser muito próxima à da quitosana, não houve alteração significativa neste aspecto. Analisando a porcentagem de perda de massa, o filme F1 teve uma perda de 23,69%, enquanto o F2 exibiu uma variação de massa de 24,04% e o F5 teve um valor de 28,70%. Essa redução na perda de massa, quando comparada ao ABAME, demonstra que o filme confere maior proteção térmica à substância.

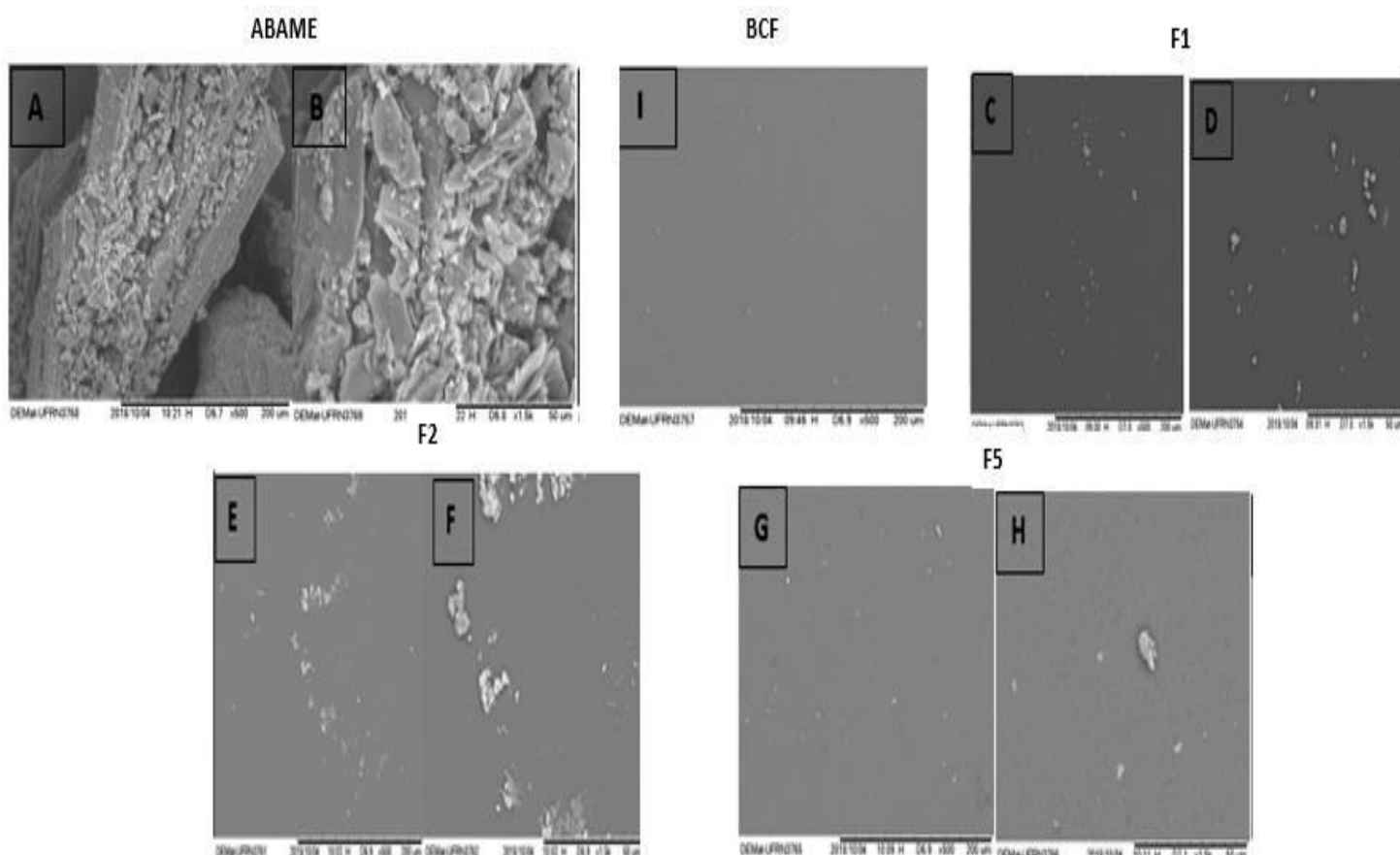
5.2.4. Microscopia eletrônica varredura (MEV)

Imagens de MEV ABAME (Figura 15A e 15B) demonstraram uma aparência cristalina, conforme confirmado por análises de DRX.

O BCF (Figura 15I) apresentou uma superfície lisa, contínua e compacta. Esse aspecto corresponde ao esperado, convergindo com outros estudos da literatura que indicam o comportamento de filmes de quitosana, sem a presença de estruturas cristalinas (HAJJI et al., 2016; LOZANO-NAVARRO et al., 2018).

Os filmes F1, F2 e F5 apresentaram partículas de ABAME incorporadas na matriz de quitosana, porém, sem a característica cristalina do ABAME. Esse resultado foi confirmado pelo DRX, que mostra perda de cristalinidade nos filmes, mas com a presença do fármaco incorporado. Além disso, foi possível observar uma distribuição homogênea ao longo da matriz polimérica, com a presença de alguns agregados de partículas, verificando que o filme que apresentou a distribuição mais homogênea foi o F5 (Figura 15G e H).

Figura 15: Imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de α , β Amirenona (ABAME): (A) ABAME 500X, (B) ABAME 1.500X; dos filmes de quitosana ABAME nas concentrações (F1, F2 e F5): (C) F1 500X, (D) F1 1.500X, (E) F2 500X, (F) F2 1.500X, (G) F5 500X, (H) F5 1.500X e do filme branco de quitosana (BCF): (I) BCF 500X.



5.3. ANIMAIS

5.3.1. Efeito cicatrizante

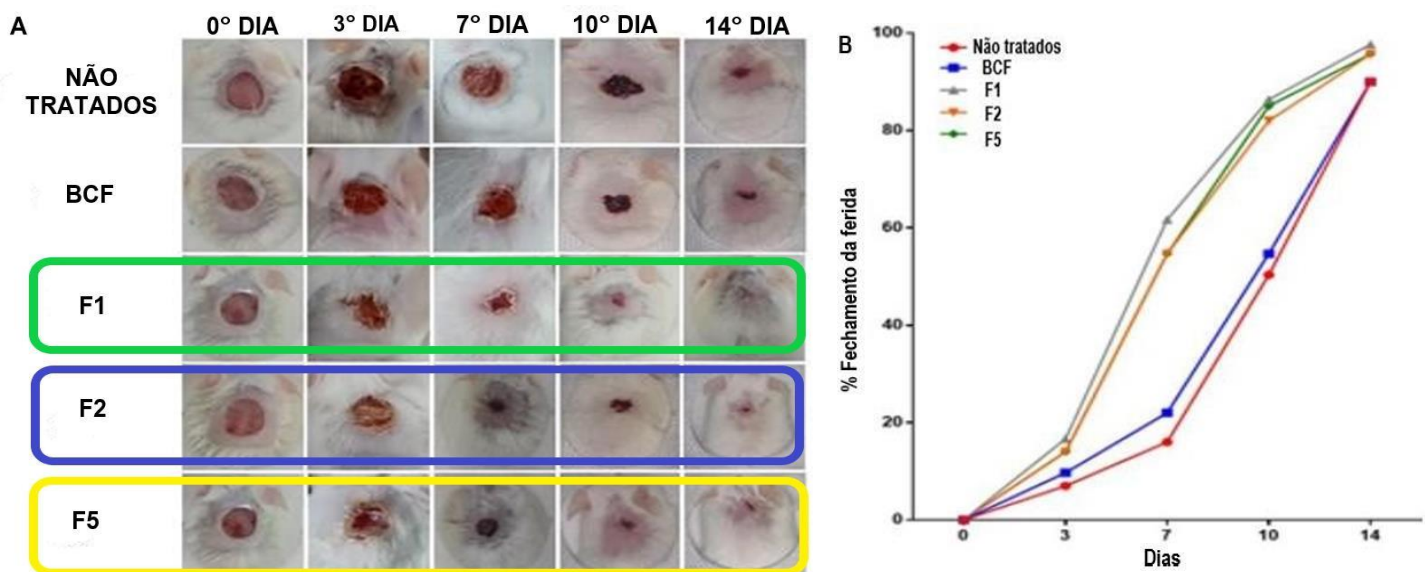
De acordo com (WANG et al., 2017) a cicatrização é entendida como um processo em que o tecido afetado é substituído por outro tecido, sendo este tecido conjuntivo vascularizado, independentemente se a lesão foi traumática ou necrótica. Assim, a cura visa estabelecer a homeostase do tecido. A partir disso, é importante conhecer o processo de fundo, para que seja possível interceder e acelerar a cicatrização, sempre com o objetivo principal de gerar a homeostase do organismo e o bem-estar do paciente (WANG et al., 2017).

O processo fisiológico da lesão contempla três fases sucessivas: hemostasia / inflamatória, proliferativa e fases de remodelação (WANG et al., 2018). A principal atenção dada aos tratamentos de lesões cutâneas, é a regeneração epidérmica e dérmica (BASU et al., 2017; OKUR et al., 2018; XIAO et al., 2018).

Os resultados da evolução da cicatrização das feridas (Figura 16A e B), ficaram evidentes

que o processo de cicatrização foi muito mais eficiente e rápido quando as lesões foram tratadas com filmes de quitosana-ABAME. A avaliação macroscópica das lesões cutâneas, gráfico este gerado pelo ImageJ no 7º e 14º pós-operatório mostrou diferença significativa em relação à área da lesão, que foi de aproximadamente 17 e 90% para o grupo não tratado (cicatrização natural), 19 e 90% para BCF (tratado com membrana de quitosana pura), 62 e 98% no tratamento com F1, 54 e 95% no tratamento com ABAME F2, e 54 e 96% no F5 no 7º e 14º dias, respectivamente. Na comparação entre as médias, os grupos tratados com membrana de quitosana e ABAME nas concentrações 1, 2 e 5 não apresentaram diferença significativa entre eles no 14º dia, mas foram estatisticamente superiores aos demais grupos.

Figura 16: Estudo de cicatrização de feridas *in vivo* no dorso de camundongos Swiss, realizado no 3º, 7º, 10º e 14º dias, submetidos ao tratamento com filme branco de quitosana (BCF), filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5). (A) Imagens macroscópicas das feridas na pele dos animais testados. (B) Fechamento das lesões expresso pela porcentagem da área da ferida em relação ao tamanho original de 0 ao 14º dia de pós-operatório, de acordo com o tratamento recebido.



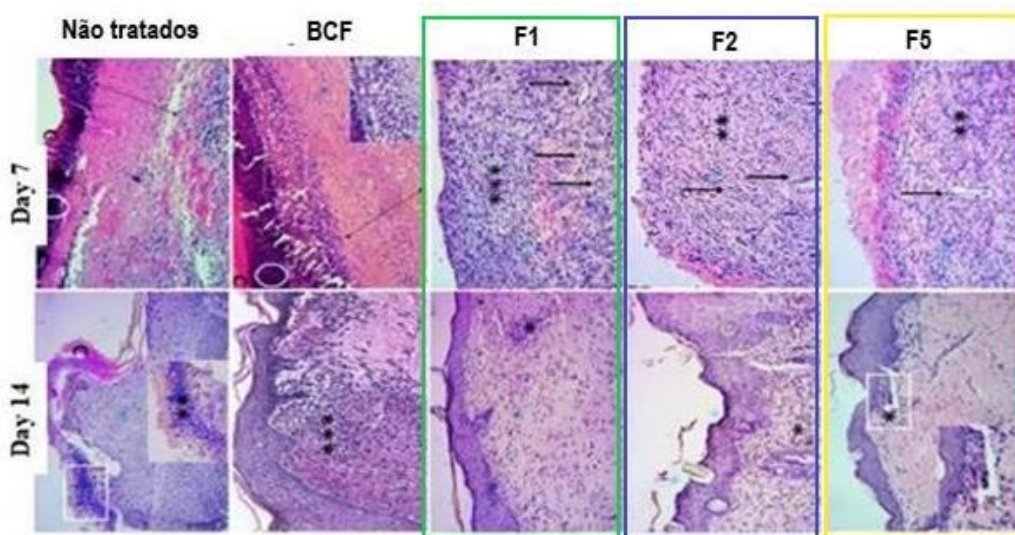
Nos processos inflamatórios, a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) produzida converte o ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, a partir da enzima fosfolipase A2. A ação da enzima (COX-2) pode ser inibida com anti-inflamatórios, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) (BORGATI; DE SOUZA FILHO; DE OLIVEIRA, 2019; SILVA et al., 2019).

Nesse sentido, a classe dos triterpenos possui diversas atividades farmacológicas, incluindo efeito anti-inflamatório, especificamente tópico. Sabe-se que a mistura de α e β amirina (precursor do ABAME) tem o mecanismo de diminuir os níveis de prostaglandina E2, por suprimir a expressão da ciclooxigenase-2, inibindo assim os sinais do processo inflamatório (HUANG et al., 2018).

De acordo com o que foi relatado na literatura sobre as propriedades dos triterpenos e levando em consideração os resultados obtidos, é sugestivo que o ABAME também possui atividade antiinflamatória, confirmando esta como uma de suas atividades relatadas na literatura, o que com isso, reforça também a sua atividade referente as propriedades cicatrizantes.

Na análise histológica (Figura 17), observou-se que havia presença abundante de novos vasos (angiogênese) nos camundongos tratados com filmes de quitosana-ABAME, além disso, o remodelamento da derme e o fechamento da lesão foram completos. Já nos camundongos que utilizaram os filmes de quitosana em branco (BCF), estes apresentaram edema, intenso infiltrado inflamatório e áreas focais de necrose logo abaixo da crosta, apresentando uma reepitelização parcial. As feridas dos camundongos não tratados tiveram reepitelização incompleta. Os animais tratados com filmes de quitosana- ABAME (F1, F2 e F5) apresentaram melhora qualitativa e quantitativa na cicatrização das feridas, quando comparados aos animais tratados apenas com filme de quitosana e aos não tratados.

Figura 17: Imagem representativa da análise histopatológica de úlceras de camundongo no 7º e 14º dias de experimentos. Não tratados. Camundongos tratados com BCF. Camundongos tratados com ABAME - F1. Camundongos tratados com ABAME - F2. Camundongos tratados com ABAME - F5. C - Crosta, * Infiltrado inflamatório discreto, ** Infiltrado inflamatório moderado, *** Infiltrado inflamatório intenso, Setas – Novos vasos, Círculo branco – Áreas de necrose.

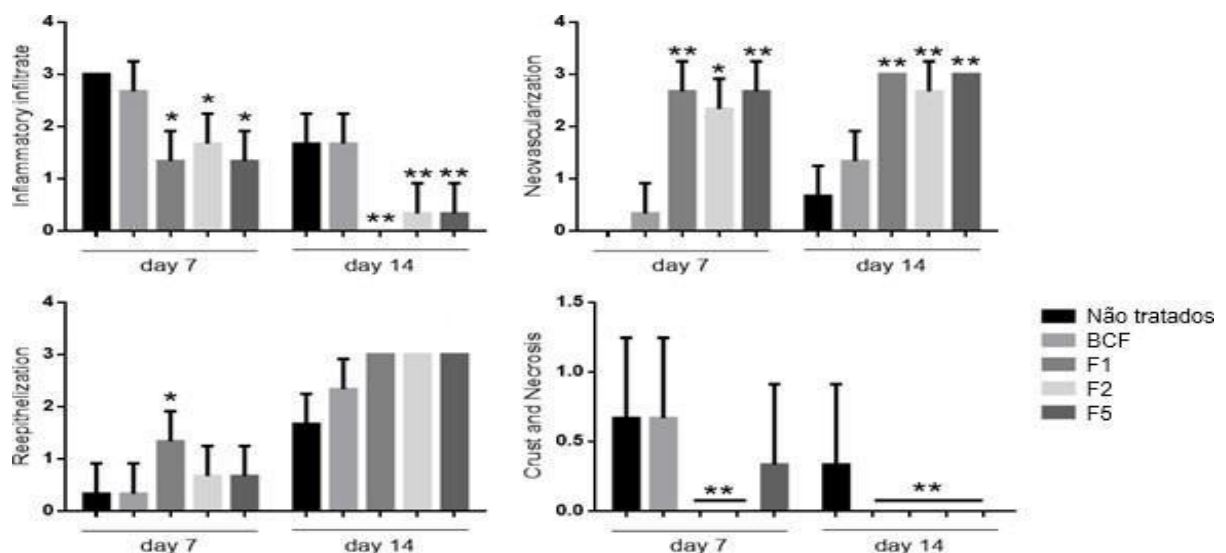


Para ocorrer a cicatrização das lesões cutâneas, esta se dá início imediatamente após a lesão e continua nesse processo por até meses. Um dos indicadores da cicatrização se dá a partir do crescimento regular do tecido de granulação. A reepitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e a deposição de colágeno são etapas que formam essa cicatrização (AYLA et al., 2017; SERRA et al., 2017).

A angiogênese é responsável pelo surgimento de capilares ao redor da ferida (borda) prosseguindo com a difusão no local lesionado, onde este surgimento de novos vasos sinaliza como parte da restauração bem sucedida da lesão. A angiogênese é estimulada após a formação do tampão hemostático, com as plaquetas liberando outros mediadores envolvidos (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

Os resultados histológicos das feridas tratadas com filmes de quitosana-ABAME mostraram um nível mais abundante de reepitelização e neovascularização em comparação com os outros grupos no 7º e 14º dias. Além disso, os níveis de infiltrado inflamatório dos grupos que receberam filmes de quitosana-ABAME foram menores do que os da quitosana em branco e os não tratados. O filme de quitosana em branco também se mostrou eficaz em melhorar a reepitelização, neovascularização e menos infiltrado inflamatório. Conforme descrito na Figura 18.

Figura 18: Histomorfologia do tecido epitelial corado com hematoxilina e eosina dos animais submetidos aos seguintes tratamentos: não tratado, filme branco de quitosana (BCF) e filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5). Foram avaliadas as seguintes características: (a) Infiltrado inflamatório; (b) neovascularização; (c) reepitelização; (d) crosta e necrose. Diferença estatística demonstrada pela análise ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados representam a média dos valores obtidos em cinco animais e as linhas verticais indicam o desvio padrão. ** $p < 0,001$ e * $p < 0,01$ para comparação entre os grupos não tratado, BCF e ABAME.



Nos resultados histológicos apresentados na figura 17, nos grupos do 7º dia o grupo da cura natural e o BCF apresentaram uma área de edema e intenso infiltrado inflamatório e

granulação, além de formar crosta e áreas pontuais de necrose, porém o BCF ainda apresentou um tecido mais organizado quando comparado ao não tratado. Já nos grupos de ABAME, foi visto infiltrado inflamatório discreto e presença abundante de angiogênese (novos vasos). Nos resultados referentes ao 14º dia, o grupo da cura natural e no BCF foi apresentado reepitelização parcial, discreto infiltrado inflamatório, e no BCF em específico além desses resultados, ainda foi possível observar um tecido com fibrose. Quando comparados, os grupos de ABAME desse mesmo período apresentaram reepitelização completa e remodelação da derme. Presença de vasos (neovascularização). E em algumas amostras ainda percebemos um infiltrado inflamatório, porém discreto e pontual.

O propósito na terapia da lesão é reduzir o tempo de cicatrização e/ou decair os resultados não desejados (OKUR et al., 2018). A quitosana, possui um sinergismo nas atividades antimicrobianas, com isso, os filmes também apresentam essa atividade, tudo isso é possível graças aos grupamentos amina primária na sua estrutura química do qual realizam atividade antimicrobiana. O uso de uma substância que apresente propriedades antimicrobianas, é muito relevante para um sistema de cicatrização, pois evita que a lesão venha a infeccionar, o que auxilia numa profilaxia contra agentes como as bactérias. A quitosana além disso, tem a propriedade de modificar as características de permeabilidade na membrana celular da bactéria, levando a escoamento de constituintes celulares que ocasionam a morte bacteriana (ROOHI et al., 2017; ÜSTÜNDAL -OKUR et al., 2015).

Em resumo, conforme foi apresentado na análise macroscópica foi possível observar a olho nu o processo de cicatrização do dorso dos animais, onde os animais que fizeram uso da ABAME incorporada na quitosana tiveram um processo de regeneração tecidual muito mais eficaz e rápida quando comparado aos outros grupos. No grupo de ABAME F1 na foto não é possível nem visualizar mais a crosta de cicatrização (casca da ferida). Na análise microscópica, os filmes de ABAME com a quitosana apresentam uma organização tecidual eficiente, onde todas as camadas encontram-se muito bem organizadas, com um tecido muito bem remodelado, com a presença de vasos, sustentando a sua eficácia no processo de cicatrização, quando comparado aos demais grupos, que é possível visualizar áreas necróticas e de crosta nos tecidos, provando que estes não apresentaram eficiência suficiente no seu processo de regeneração tecidual.

5.3.2. Análise de quantificação de citocinas

As citocinas fazem parte de um grupo de proteínas que são mediadoras as respostas: imunidade inata e adquirida. A partir de estímulos inflamatórios ou antigênicos, as citocinas são

sintetizadas no local da lesão, onde vários tipos celulares estão atuando no sítio lesado, portanto, diferentes tipos celulares secretam a mesma citocina. A partir disso, as citocinas podem ser classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (QING, 2017). As citocinas anti-inflamatórias atuam inibindo a resposta imune, auxiliando no processo de cicatrização de feridas. Já as citocinas pró-inflamatórias aparecem de forma exagerada, em resposta a uma lesão ou infecção (SILVA et al., 2019).

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória da qual é produzida e secretada em processos inflamatórios pelos macrófagos. Em altas concentrações, atua na cascata inflamatória, gerando outros mediadores da inflamação e destruição tecidual (KIM; NAIR, 2019; NOSENKO; AMBARYAN; DRUTSKAYA, 2019).

Por sua vez, a Interleucina um beta (IL-1 β) é responsável por desencadear um processo inflamatório sistêmico que ativa a ciclooxigenase 2 (COX-2), induzindo a formação de prostaglandina E2 (PGE2), além de induzir a produção de óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial. As prostaglandinas são responsáveis por participar de vários processos fisiológicos, com isso ela é importante como mediador nos processos inflamatórios, além de estar envolto em algumas doenças como a artrite reumatóide por exemplo (KANSU-CELIK et al., 2017). Com isso, a resposta inflamatória gerada por ela, gera mais danos as células e aos tecidos que se encontram adjacentes ao local da ferida, isso acaba retardando o processo de cicatrização (HEIDEGGER et al., 2017; WOBST et al., 2017).

Assim, é possível observar que existe um mecanismo de homeostase envolvendo a IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias. Há um equilíbrio, pois o TNF- α está presente na presença de um estímulo inflamatório, porém a IL-10 provoca um bloqueio na produção de TNF- α e é proporcional de acordo com a resolução do processo inflamatório, tornando o nível sérico de citocina dentro da normalidade (KIM; NAIR, 2019).

A quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 avaliadas durante o 7º e 14º dia de tratamento das lesões cutâneas são relatadas na Figura 19. Os camundongos não tratados, onde se usou apenas solução salina (cura natural) apresentaram níveis elevados de TNF- α , tanto no 7º quanto no 14º dia de terapia. Seguindo esse grupo, encontra-se o tratamento BCF, onde este também apresentou níveis altos dessa citocina. No entanto, as maiores reduções nos níveis de TNF- α foram para os tratamentos com filmes de quitosana-ABAME (p < 0,01).

Na Figura 19, os níveis de IL-1 β foram semelhantes aos de TNF- α , porém as maiores variações de IL-1 β ocorreram principalmente no 7º dia de terapia, para os grupos submetidos ao tratamento com os filmes (BCF e CF-ABAME) quando comparados ao grupo de não tratados.

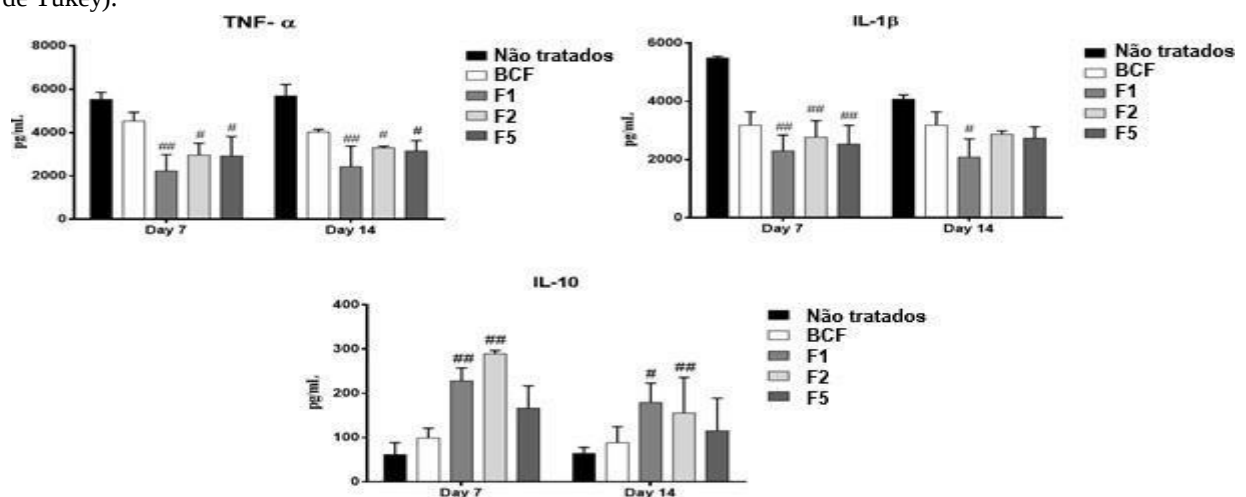
Em relação à IL-10 (Figura 19), foram encontrados níveis baixos dessa citocina no grupo normal, valor bem inferior ao dos demais grupos, tanto para o 7º quanto para o 14º dia. Foi observado aumento desses níveis para o grupo BFC e níveis mais elevados de IL-10 para os grupos submetidos ao tratamento com filmes de quitosana-ABAME, principalmente no 7º dia de terapia.

A IL-10 é uma citocina do tipo anti-inflamatória da qual é secretada pelos macrófagos do tipo M2, esses macrófagos são um tipo celular muito importante na expressão da imunidade inata (natural) e das respostas imunes adaptativas. Essas células desempenham funções como cicatrização de feridas, reparo tecidual e regulação na atividade metabólica. A modulação da IL-1 β contribui na redução da inflamação e na formação da cicatriz (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018).

Os macrófagos possuem a habilidade de adaptar sua função ao tecido em que se encontra, essa adaptação se dá de acordo com os fatores derivados desse tecido. Com isso, eles conseguem fenótipos com diferentes funções. Os macrófagos de fenótipo M2, secretam citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β , IL-1 e IL-10. Esses macrófagos M2 atuam na supressão das respostas imunes, e aprimoramento do remodelamento tecidual (RODRIGUES et al., 2019).

A estabilidade entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é muito relevante. As vantagens na resposta inflamatória aguda acontecem nas etapas celulares iniciais da lesão, como a resposta aos microorganismos na lesão aguda e a remoção de detritos, porém a ativação crônica e a produção exagerada dos fatores pró-inflamatórios, podem induzir a destruição do tecido, dificultando o reparo e a cicatrização da lesão (WANG et al., 2018).

Figura 19: Níveis de interleucina IL-1 β , citocinas do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina IL-10 quantificadas nos 7º e 14º dias do experimento para os seguintes tratamentos: não tratado, filme branco de quitosana (BCF) e filmes de quitosana-ABAME em diferentes concentrações (F1, F2 e F5). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média (n = 5). # p < 0,01 ## p < 0,001 vs. grupo não tratado (ANOVA com pós-teste de Tukey).



De acordo com os resultados, pode-se observar que o $\text{TNF-}\alpha$ foi induzido em decorrência de estímulo inflamatório (lesões cutâneas), e por sua vez, a citocina IL-10 produziu em maior concentração nos grupos submetidos ao tratamento com filmes de quitosana-ABAME, causou uma redução maior na produção de $\text{TNF-}\alpha$. Assim, indicando o estabelecimento do mecanismo de homeostase envolvido entre as citocinas IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias, de acordo com a resolução do processo inflamatório (QING, 2017).

Em síntese, de acordo com o presente exposto na dosagem de citocinas, nota-se que os tratamentos realizados nas lesões com filmes de quitosana com a incorporação de ABAME apresentaram resultados promissores e eficientes na cicatrização das lesões cutâneas, dentre as concentrações de ABAME que mais se destacou entre as 3, foi o ABAME 1, onde esta apresentou um valor significativo de p tanto na diminuição da produção como na secreção das citocinas pró inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β principalmente no 7º dia do processo, como também apresentou aumento da produção e secreção da citocina antiinflamatória IL-10 no mesmo período do experimento (7º dia), validando que há um controle homeostático eficiente entre as citocinas nesse processo de cicatrização.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de filmes de quitosana com α , β -amirenona foi executado com êxito, obtendo-se filmes com boa integração e aspecto físicos. No presente trabalho, foi possível alcançar facilmente as membranas produzidas a partir da quitosana com a inclusão do ABAME.

Com as técnicas analíticas de caracterização físico-química foi possível observar a interação química entre a ABAME e a quitosana, o que indica algumas mudanças nos aspectos de ABAME, a partir das técnicas trabalhadas por FTIR, DR-X, DSC e TG. Também houve uma melhora na estabilidade térmica com ABAME nos filmes. Imagens de MEV mostraram que as partículas de ABAME estão bem distribuídas na matriz de quitosana, mostrando uma mudança na aparência cristalina na microscopia dos curativos. Com os resultados obtidos, pode-se perceber que a ABAME foi bem incorporada nas três diferentes concentrações, mudando apenas o aspecto visual dos filmes.

Os estudos que foram realizados expressaram reepitelização, estímulo a angiogênese (neovascularização), depósito de colágeno e expressão de proteínas (citocinas) que contribuem no processo de cicatrização e desinflamação, em relevância significativa nos grupos que foram tratados com os curativos de ABAME F1, F2 e F5 quando comparados aos grupos dos não tratados ou o uso de curativos apenas de quitosana. Os curativos com ABAME reduziram os níveis de TNF- α , IL-1 β e aumentaram os níveis de IL-10 reforçando o grande potencial para o tratamento de lesões cutâneas.

Neste estudo os fatores analisados sugerem que o curativo de quitosana com ABAME obtiveram um efeito regenerador nos camundongos, minimizando os parâmetros do processo inflamatório e progredindo a cicatrização, validando assim sua eficácia, com isso é possível dar continuidade ao estudo, de preferência seguindo para próximas etapas como seu uso em humanos com o propósito de elucidar a sua aplicabilidade de forma terapêutica.

Além disso, é passivo a realização de outras análises que possam verificar se não há alterações ao longo do tempo, de modo que comprometa a eficácia dos filmes ao aplicar no tecido lesionado.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRAMOV, Y. et al. Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 1, p. 80–86, 2007.
- ANA RITA LANCINI STUMPF. Perfil De Citocinas Pró- E Anti-Inflamatória E Da Proteína C-Reativa No Tratamento Do. p. 1–77, 2014.
- ANTONIO, E. et al. Chitosan modified poly(lactic acid) nanoparticles increased the ursolic acid oral bioavailability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 133–142, 2021.
- ARANAZ, I. et al. Chitosan based films as supports for dual antimicrobial release. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 402–410, 2016.
- ARAÚJO, A. A. et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 12, p. 1104–1111, 2013.
- AYLA, Ş. et al. Prunus spinosa L. Meyvelerinin deneysel yara iyileşmesi üzerine etkileri. **Medeniyet medical journal**, v. 32, n. 3, p. 152–158, 2017.
- AZEVEDO, L. C.; DE SÁ, A. S. C.; FUNGARO, D. A. Propriedades Do Amido E Suas Aplicações Em Biopolímeros. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, p. 351, 2018.
- AZEVEDO, M. M. et al. Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: An intricate interrelationship. **British Journal of Nursing**, v. 29, n. 5, p. S6–S13, 2020.
- AZUMA, K. et al. **Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials**. [s.l: s.n.]. v. 6
- BASU, A. et al. On the use of ion-crosslinked nanocellulose hydrogels for wound healing solutions: Physicochemical properties and application-oriented biocompatibility studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 299–308, 2017.
- BEDIAN, L. et al. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 837–846, 2017.
- BEDNARCZYK-CWYNAR, B. et al. Strong and long-lasting antinociceptive and anti-inflammatory conjugate of naturally occurring oleanolic acid and aspirin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. JUL, p. 1–18, 2016.
- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015.
- BORGATI, T. F.; DE SOUZA FILHO, J. D.; DE OLIVEIRA, A. B. A Complete and Unambiguous ¹H and ¹³C NMR Signals Assignment of para-Naphthoquinones, ortho- And para-Furanonaphthoquinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 6, p. 1138–1149, 2019.
- CALIRI, M. H. L. et al. Consenso NPUAP 2016 - Classificação das lesões por pressão adaptada culturalmente para o Brasil. **SOBEST - Associação Brasileira de Estomaterapia e SOBENDE - Associação Brasileira de Enfermagem em Dermatologia**, p. 1–4, 2016.
- CÂMARA, M. V. S. DA; FELIX, C. A.; CORGOZINHO, M. M. Enfermagem no contexto da infecção da ferida cirúrgica: revisão integrativa. v. 14, 2022.
- CAMPANI, V. et al. Chitosan gel to treat pressure ulcers: A clinical pilot study. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 6–13, 2018.
- CAPELLA, S. DE O. et al. Lesões cutâneas traumática em pequenos animais: características e tratamentos. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 2, p. 459–467, 2020.
- CHAMBERS, E. S. Skin barrier immunity and ageing. p. 116–125, 2020.
- DA FERNANDA CAMILA FERREIRA SILVA, C. et al. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 204–208, 2015.

- DA SILVA, A. V. et al. Therapies applied in the treatment of injuries by burns of third degree and variable extension: An integrative review. **Medicina (Brazil)**, v. 53, n. 4, p. 456–463, 2020.
- DE ARAGÃO TAVARES, E. et al. Chitosan membrane modified with a new zinc(II)-vanillin complex improves skin wound healing in diabetic rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 1–13, 2019.
- DÍEZ-PASCUAL, A. M.; DÍEZ-VICENTE, A. L. Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 2631–2644, 2015.
- DILLER, R. B.; TABOR, A. J. The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. **Biomimetics**, v. 7, n. 3, p. 14–16, 2022.
- DING, Y. J. et al. Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish. **Toxins**, v. 7, n. 1, p. 97–109, 2015.
- DINH, C. H. L. et al. Bardoxolone methyl prevents fat deposition and inflammation in the visceral fat of mice fed a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 1–8, 2015.
- DUQUE, A. P. D. N. et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128–138, 2016.
- DUTRA, J. A. P. et al. Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 11–23, 2017.
- EL-SAYED, N. N. E. et al. Synthesis, antiphospholipase A2, antiprotease, antibacterial evaluation and molecular docking analysis of certain novel hydrazones. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1–17, 2016.
- ESKANDARINIA, A. et al. Cornstarch-based wound dressing incorporated with hyaluronic acid and propolis: In vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 216, n. August 2018, p. 25–35, 2019.
- FERREIRA, R. G. S. et al. Physicochemical characterization and biological activities of the triterpenic mixture α,β -amyrenone. v. 22, n. 2, p. 1–9, 2017a.
- GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A. et al. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 7, p. 644–651, 2016.
- HAJJI, S. et al. Structural analysis, and antioxidant and antibacterial properties of chitosan-poly (vinyl alcohol) biodegradable films. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 15, p. 15310–15320, 2016.
- HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.
- HEIDEGGER, H. et al. The prostaglandin EP3 receptor is an independent negative prognostic factor for cervical cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1–10, 2017.
- HODON, J. et al. Design and synthesis of pentacyclic triterpene conjugates and their use in medicinal research. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 111653, 2019.
- HSIANG, C. Y. et al. Glycyrrhizin, silymarin, and ursodeoxycholic acid regulate a common hepatoprotective pathway in HepG2 cells. **Phytomedicine**, v. 22, n. 7–8, p. 768–777, 2015.
- HUANG, X.-B. et al. Neuroprotective effects of tenuigenin on neurobehavior, oxidative stress, and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Brain Circulation**, v. 4, n. 1, p. 24, 2018.

- ISAH, M. B. et al. A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases. **Parasitology**, v. 143, n. 10, p. 1219–1231, 2016.
- JENDRZEJEWSKA, I. Application of X-Ray Powder Diffraction for Analysis of Selected Dietary Supplements Containing Magnesium and Calcium. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. September, p. 1–12, 2020.
- JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS UCHOA; CARNEIRO, J. **Histologia básica: Texto e atlas**. 13^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- KAMOUN, E. A. et al. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 38–47, 2015.
- KANSU-CELIK, H. et al. Prostaglandin E2 induction of labor and cervical ripening for term isolated oligohydramnios in pregnant women with Bishop score ≤ 5 . **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 80, n. 3, p. 169–172, 2017.
- KAYGUSUZ, H. et al. Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymerfilms: A novel and potential wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1161–1165, 2017.
- KIM, S. Y.; NAIR, M. G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. **Immunology and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 258–267, 2019.
- LIMA, E. M. et al. Triterpenes from the protium heptaphyllum resin – Chemical composition and cytotoxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 399–407, 2014.
- LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In: **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 3–31.
- LORDANI, T. V. A. et al. Therapeutic effects of medicinal plants on cutaneous wound healing in humans: a systematic review. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- LOZANO-NAVARRO, J. I. et al. Chitosan-starch films with natural extracts: Physical, chemical, morphological and thermal properties. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2018.
- MARTELLI, A. et al. Microcorrente no processo de cicatrização: revisão da literatura. **Archives of Health Investigation**, v. 5, n. 3, p. 134–139, 2016.
- MARTINS, A. F. M. et al. Perfil Epidemiológico De Lesões Cutâneas Crônicas De Pacientes Internados. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 15, n. 1, 2021.
- MARTINS, N. L. P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. SUPPL.3, p. 66–75, 2006.
- MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, T. E. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. **Biopolymers**, v. 82, n. 2, 2006.
- MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 87, 2017.
- MENDES HOEPERS, S. et al. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. Willd (Euphorbiaceae) leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 251–255, 2015.
- MOGOŞANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127–136, 2014.
- MOREIRA, M. B. Uso de bleomicina em queloides e cicatrizes hipertróficas: revisão da literatura Educação Médica. v. 8, n. 2, p. 97–101, 2016.
- NETA, N. B. D. et al. Biomembranas à base de quitosana e aplicação na cicatrização de úlceras cutâneas. **Revista FAESF**, v. 3, p. 4–10, 2019.
- NOSENKO, M. A.; AMBARYAN, S. G.; DRUTSKAYA, M. S. Proinflammatory Cytokines

- and Skin Wound Healing in Mice. **Mol Biol (Mosk)**, v. 53, n. 5, p. 741–754, 2019.
- NOUR, S. et al. A review of accelerated wound healing approaches: biomaterial- assisted tissue remodeling. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 10, 2019.
- NOWICKA-SANS, B. et al. Identification and characterization of BMS-955176, a second-generation HIV-1 maturation inhibitor with improved potency, antiviral spectrum, and Gag polymorphic coverage. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 3956–3969, 2016.
- OKUR, M. E. et al. Novel insight into wound healing properties of methanol extract of Capparis ovata Desf. var. palaestina Zohary fruits. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 10, p. 1401–1413, 2018.
- OSHIRO JUNIOR, J. A.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. **Revista Materia**, v. 19, n. 1, p. 24–32, 2014.
- PEREIRA, A. C. A. et al. Healing: Use of collagen matrix. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, n. 4, p. 274–277, 2019.
- PEREIRA, J. R. et al. Chitosan film containing mansoa hirsuta fraction for wound healing. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, 2020.
- QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **Chinese Journal of Traumatology - English Edition**, v. 20, n. 4, p. 189–193, 2017.
- RIBEIRO, J. C. V. et al. Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. **Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.
- ROCHA E SILVA, L. F. et al. In vivo evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 398–402, 2015.
- RODRIGUES, M. et al. Wound healing: A cellular perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 2019.
- ROOHI et al. Microbial Enzymatic Degradation of Biodegradable Plastics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 5, 7 jul. 2017.
- ROSALEM, P. F. et al. Leaf anatomy of Protium ovatum and its antiproliferative potential in cervical cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 6, p. 673–678, 2017.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–1275, 1995.
- SALVADOR, J. A. R. et al. Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 95–130, 2017.
- SANTOS, TIAGO LOPES DOS; CERÁVOLO, MARINARA KORT; ANDREAZZI, MARCIA APARECIDA; SANTOS, JOSÉ, M. G. DOS. MECANISMO DE CICATRIZAÇÃO VISANDO TRATAMENTOS ALTERNATIVOS EM FERIDAS NA EQUINOCULTURA. p. 11, 2021.
- SAYARI, N. et al. Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 163–171, 2016.
- SENA, C. N.; BRANDÃO, M. L. Curativos em queimaduras : Revisão da prática brasileira Burns dressing : Review of Brazilian practice Vendaje en quemaduras : Revisión de la práctica brasileña. v. 20, n. 1, p. 53–59, 2021.
- SERRA, M. B. et al. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- SHANKAR, S.; WANG, L. F.; RHIM, J. W. Preparation and properties of carbohydrate-based composite films incorporated with CuO nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v.

169, p. 264–271, 2017.

SHARMA, V. K.; MAZUMDAR, B. Feasibility and characterization of gummy exudate of *Cochlospermum religiosum* as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 776–786, 2013.

SILVA, D. R. V. DOS P.; MOREIRA, K. F. G. Intervenção De Enfermagem Na Avaliação E Tratamento De Feridas Em Uma Estratégia De Saúde Da Família. p. 1–15, 2020.

SILVA, M. M. et al. O Uso Crônico de Anti-Inflamatórios não-esteroidais e seus Efeitos Adversos. **Cadernos da Medicina - UNIFESO**, v. v. 2, p. 90–100, 2019.

SILVA, S. DE L. et al. Classificação, fatores de risco, fisiopatologia e complicações cicatriciais das lesões por pressão: uma síntese narrativa. **Conjecturas**, v. 22, n. 9, p. 24–35, 2022.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (United Kingdom)**, v. 35, n. 9, p. 473–477, 2017.

SUN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 163, p. 81–91, 2017.

SUT, S. et al. New Drugs from Old Natural Compounds: Scarcely Investigated Sesquiterpenes as New Possible Therapeutic Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1241–1258, 9 abr. 2018.

TREMORI, T. M. et al. Classificação comparada das lesões de ordem mecânica segundo a traumatologia forense no exame de corpo de delito em animais. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 7, n. 2, p. 20–25, 2018.

ÜSTÜNDAL -OKUR, N. et al. Novel nanostructured lipid carrier-based inserts for controlled ocular drug delivery: Evaluation of corneal bioavailability and treatment efficacy in bacterial keratitis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 11, p. 1791–1807, 2015.

VAN DEN BROEK, L. A. M. et al. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237–242, 2015.

WANG, P. H. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 2, p. 94–101, 2018.

WANG, W. et al. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, 2020.

WANG, Y. et al. Tripartite motif-containing 28 bridges endothelial inflammation and angiogenic activity by retaining expression of TNFR-1 and -2 and VEGFR2 in endothelial cells. **FASEB Journal**, v. 31, n. 5, p. 2026–2036, 2017.

WOBST, I. et al. R-flurbiprofen traps prostaglandins within cells by inhibition of multidrug resistance-associated protein-4. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 2017.

WOŹNIAK, Ł.; SKĄPSKA, S.; MARSZAŁEK, K. Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20614–20641, 2015.

WU, P. et al. Synthesis and evaluation of novel triterpene analogues of ursolic acid as potential antidiabetic agent. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.

XIAO, S. et al. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 3, p. 951–976, 2018.

XU, G. B. et al. Hepatoprotective natural triterpenoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 691–716, 2018.

ZHANG, D.-M. et al. Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 6, p. 1127–1155, nov. 2015.

ZOU, Q.; LI, J.; LI, Y. Preparation and characterization of vanillin-crosslinked chitosan

therapeutic bioactive microcarriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 736–747, 2015.

ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 99229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br

**CERTIFICADO**

Natal (RN), 06 de fevereiro de 2020.

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da atividade cicatrizante de filmes a base de quitosana incorporados com α,β -Amirenona”**, protocolo **080/2019**, **CERTIFICADO n° 210.080/2019**, sob a responsabilidade de Adley Antonini Neves de Lima - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada, após adequações, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

VIGÊNCIA DO PROJETO	DEZEMBRO 2021					
Relatório	Janeiro 2022					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade:		
				M	F	Total
<i>Mus musculus</i>	Swiss	8-10 semanas	25-35 g	90	0	90
Origem	Biotério do Centro de Ciências da Saúde – UFRN					
Manutenção	Biotério do Centro de Ciências da Saúde – UFRN					

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. O **descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.**

Alianda Matra Cornélio da Silva
 Vice-Coordenadora da CEUA-UFRN
 Gestão 2019-2020

APÊNDICES

ARTIGO SUBMETIDO

16/05/23, 16:03

Gmail - Confirm co-authorship of submission to Journal of Drug Delivery Science and Technology



Ulana Tavares <ulanatavares@gmail.com>

Confirm co-authorship of submission to Journal of Drug Delivery Science and Technology

1 mensagem

Journal of Drug Delivery Science and Technology <em@editorialmanager.com>

15 de maio de 2023 às 21:37

Responder a: Journal of Drug Delivery Science and Technology <support@elsevier.com>

Para: Ulana Cristina de Araújo Tavares <ulanatavares@gmail.com>

This is an automated message.

Journal: Journal of Drug Delivery Science and Technology

Title: Anti-inflammatory and healing evaluation of chitosan based-films with α,β -amyrenone triterpene

Corresponding Author: Professor Ádley Antonini Neves de Lima

Co-Authors: Ulana Cristina de Araújo Tavares; Juliana Maria Nascimento dos Santos; Sávio Gorgônio Paes de Bulhões; Lucas Gabriel de Medeiros da Silva; Verônica da Silva Oliveira; Emanuella de Aragão Tavares; Raimundo Fernandes de Araújo Júnior; Valéria Costa da Silva; Gerlane Coelho Bernardo Guerra; Emerson Silva Lima; Valdir Florêncio da Veiga Júnior; Attilio Conventi

Manuscript Number: JDDST-D-23-01485

Dear Ulana Cristina de Araújo Tavares,

The corresponding author Professor Ádley Antonini Neves de Lima has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Journal of Drug Delivery Science and Technology.

Submission Title: Anti-inflammatory and healing evaluation of chitosan based-films with α,β -amyrenone triterpene

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: [Yes, I am affiliated.](#)

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

Journal of Drug Delivery Science and Technology
Anti-inflammatory and healing evaluation of chitosan based-films with α,β -amyrenone
triterpene
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	JDDST-D-23-01485
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Chitosan films; triterpenes; α,β -amyrenone; anti-inflammatory; cicatrization
Corresponding Author:	Ádley Antonini Neves de Lima Natal, Rio Grande do Norte BRAZIL
First Author:	Ulana Cristina de Araújo Tavares
Order of Authors:	Ulana Cristina de Araújo Tavares Juliana Maria Nascimento dos Santos Sávio Gorgônio Paes de Bulhões Lucas Gabriel de Medeiros da Silva Verônica da Silva Oliveira Emanuella de Aragão Tavares Raimundo Fernandes de Araújo Júnior Valéria Costa da Silva Gertane Coelho Bernardo Guerra Emerson Silva Lima Valdir Florêncio da Veiga Júnior Atílio Converti Ádley Antonini Neves de Lima
Abstract:	α,β-Amyrenone (ABAME) is a mixture of natural isomers belonging to the class of triterpenes, which has great potential because of its biological activities, mainly the anti-inflammatory one. Chitosan films are increasingly used for topical use because they enable a gradual release of the drug, in addition to many other advantages. Therefore, the objective of this study was to develop chitosan films incorporating ABAME, aiming at the topical application in the treatment of cutaneous lesions. ABAME films were evaluated by physicochemical techniques and in vivo healing assays. Thermal analysis and FTIR demonstrated ABAME incorporation into the chitosan matrix. The results of XRD showed characteristic halos of amorphous compounds, indicating ABAME amorphization by chitosan. SEM images confirmed its homogeneous incorporation into the chitosan matrix, with partial loss of the crystallinity of pure ABAME. In the in vivo tests, the groups (CF1, CF2 and CF5) treated with chitosan-ABAME films exhibited a more efficient and faster regeneration process than the other groups, mainly after 7 and 10 days of treatment. In the histopathological tests, the chitosan-ABAME films showed a reduction in inflammatory infiltrates, greater neovascularization, re-epithelialization, and absence of necrosis and costal points when compared to the untreated group and blank chitosan film. Additionally, the CF1, CF2 and CF5 groups showed a reduction in the NTF-α and IL-1β cytokines levels, as well as an increase in that of IL-10, compared to the untreated group after 7 and 14 days. The films incorporating ABAME into chitosan matrix were very efficient in the wound healing process, thanks to the anti-inflammatory properties of the active component; therefore, they could be used as a potential delivery system for topical applications.
Suggested Reviewers:	José Lamartine Soares Sobrinho joselamartine@hotmail.com