



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

FELLIPE FERNANDES SANTOS

**ANÁLISE ANTI-INFLAMATÓRIA E MICROBIOLÓGICA DE FILMES
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA CONTENDO PENTOXIFILINA**

**CAMPINA GRANDE
2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

FELLIPE FERNANDES SANTOS

**ANÁLISE ANTI-INFLAMATÓRIA E MICROBIOLÓGICA DE FILMES
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA CONTENDO PENTOXIFILINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia Generalista.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart De Lima Damasceno.

**CAMPINA GRANDE
2018**

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

S237a Santos, Fellipe Fernandes.
Análise anti-inflamatória e microbiológica de filmes poliméricos de quitosana contendo pentoxifilina [manuscrito] / Fellipe Fernandes Santos. - 2018.
33 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Prof. Dr. Bolivar Ponciano Goulart de Lima Damasceno", Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Pentoxifilina. 2. Filme polimérico. 3. Quitosana. 4. Cicatrização. I. Título

21. ed. CDD 615.329

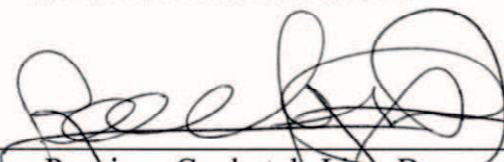
FELLIPE FERNANDES SANTOS

ANÁLISE ANTI-INFLAMATÓRIA E MICROBIOLÓGICA DE FILMES
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA CONTENDO PENTOXIFILINA

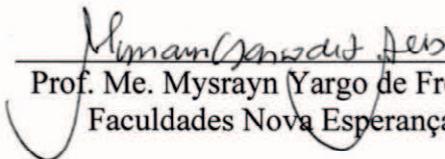
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia do
Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia Generalista.

Aprovado em: 10/12/2018.

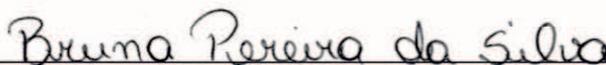
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis
Faculdades Nova Esperança (FACENE)



Prof. Me. Bruna Pereira da Silva
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

RESUMO

A quitosana é um polímero produto da reação de desacetilação da quitina, encontrada frequentemente na natureza. Ela vem sendo amplamente estudada e utilizada no desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas tópicas e despertando grande interesse a indústria farmacêutica devido a sua biocompatibilidade e propriedades bioadesiva, biodegradável, antibacteriana e antifúngica, além de ser atóxica. A pentoxifilina é um fármaco derivado da metilxantina, amplamente utilizado como agente hemorreológico em tratamentos de doenças vasculares e também apresenta uma atividade anti-inflamatória relevante. O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de filmes poliméricos de quitosana contendo pentoxifilina e a avaliação da atividade anti-inflamatória e microbiológica para uso tópico em lesões cutâneas de camundongos. Nesses estudos, três tipos de filmes de quitosana foram desenvolvidos: filmes brancos (sem pentoxifilina) e filmes contendo 10 e 20 mg de pentoxifilina. As feridas cutâneas foram realizadas em 5 grupos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) e tratados com os filmes de quitosana com e sem pentoxifilina, solução salina estéril (0,9%) como controle negativo e pomada como controle positivo. A avaliação das feridas cutâneas foi realizada por meio da observação macroscópica dos aspectos clínicos das feridas, sinais flogísticos (edema, hiperemia, formação de crosta, etc.), análise morfométrica da área da ferida e análise estatística. Já a análise microbiológica foi efetuada pelo método de esgotamento por estrias com o propósito de isolar e identificar microrganismos presentes na área lesionada dos animais durante o ensaio. Os ensaios dos filmes de quitosana com 20 mg de pentoxifilina demonstraram efeito anti-inflamatório e cicatrizante ao decorrer do tratamento, sendo a redução do tamanho da área lesionada facilmente observada. Ademais, a atividade microbiológica dos filmes de quitosana e da pentoxifilina transcorreu de forma favorável, inibindo com êxito a manutenção e proliferação de agentes patógenos, responsáveis por processos inflamatórios. Conseqüentemente, os resultados obtidos pelo estudo foram de grande importância para o tratamento de feridas devido a atividade anti-inflamatória e microbiológica da quitosana com pentoxifilina ter sido bem evidenciada.

Palavras-Chave: Cicatrização; Inflamação; Quitosana; Pentoxifilina; Filme Polimérico.

ABSTRACT

Chitosan is a polymer product of the deacetylation reaction of chitin, often found in nature. It has been widely studied and used in the development of new topical therapeutic applications and arousing great interest to the pharmaceutical industry due to its biocompatibility and bioadhesive, biodegradable, antibacterial and antifungal properties, besides being non-toxic. Pentoxifylline is a drug derived from methylxanthine, widely used as a haemorrhoid agent in vascular disease treatments and also has a relevant anti-inflammatory activity. The objective of this study was the development of polymeric chitosan films containing pentoxifylline and the evaluation of anti-inflammatory and microbiological activity for topical use in cutaneous lesions of mice. In these studies, three types of chitosan films were developed: white films (without pentoxifylline) and films containing 10 and 20 mg of pentoxifylline. The cutaneous wounds were performed in 5 groups of Swiss mice (*Mus musculus*) and treated with chitosan films with and without pentoxifylline, sterile saline solution (0.9%) as a negative control and ointment as a positive control. The evaluation of the cutaneous wounds was performed through macroscopic observation of the clinical aspects of the wounds, phlogistic signs (edema, hyperemia, crust formation, etc.), morphometric analysis of the wound area and statistical analysis. The microbiological analysis was performed by the Stretch Depletion method with the purpose of isolating and identifying microorganisms present in the injured area of the animals during the test. The chitosan films with 20 mg of pentoxifylline showed an anti-inflammatory and healing effect during the treatment, and the reduction of the size of the injured area was easily observed. In addition, the microbiological activity of chitosan and pentoxifylline films proceeded favorably, successfully inhibiting the maintenance and proliferation of pathogenic agents responsible for inflammatory processes. Consequently, the results obtained by the study were of great importance for the treatment of wounds due to the anti-inflammatory and microbiological activity of chitosan with pentoxifylline was well evidenced.

Keywords: Healing; Inflammation; Chitosan; Pentoxifylline; Polymer Film.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Filmes desenvolvidos neste estudo (A: filme branco; B: Filme com pentoxifilina – 10mg; C: filme com pentoxifilina – 20mg).....	22
Figura 2 - Avaliação do tamanho das feridas cutâneas	23
Figura 3 – Fotos de Feridas Cutaneas.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento utilizado nos diferentes grupos no período de 14 dias.	20
Tabela 2 - Bactérias encontradas nas feridas tratadas com FBr nas três coletas.	26
Tabela 3 - Bactérias encontradas nas feridas tratadas com F2 nas três coletas.	26
Tabela 4 - Bactérias encontradas nas feridas tratadas com salina (controle negativo) nas três coletas.	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Pele e Inflamação.....	11
2.2 Filmes Poliméricos	12
2.3 Quitina e Quitosana	13
2.3.1 Quitina	13
2.3.2 Quitosana	14
2.4 Pentoxifilina.....	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Material.....	18
4.2 Desenvolvimento dos Filmes.....	18
4.3 Estudo <i>in vivo</i>	19
4.3.1 Feridas Cutâneas.....	19
4.3.2 Grupos e Tratamentos.....	19
4.3.3 Análise Microbiológica das Feridas Cutâneas.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Desenvolvimento dos Filmes.....	22
5.2 Análise morfométrica das feridas cutâneas	23
5.3 Estudo Microbiológico	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXO	34

1. INTRODUÇÃO

A pele humana é a principal proteção do corpo humano contra infecções e mudanças ambientais, tendo também um papel importante na manutenção da homeostasia corporal. Ademais, devido a pele ser o órgão mais acessível e exposto do corpo, ela é diretamente afetada por fatores físicos, químicos e agentes microbiológicos (GOTTRUP, 2004), e atua como uma barreira de micro e macromoléculas devido a sua baixa permeabilidade (RENATA et al, 2016). Em razão da importância do tecido epitelial, torna-se evidente que lesões devem ser evitadas ou tratadas adequadamente, caso ocorram.

Assim, quando há lesão na pele, cascatas complexas de reações biológicas ocorrem com o intuito de regenerar a estrutura tecidual e reestabelecer o seu funcionamento (ENOCH, 2007). Entretanto, apesar da pele possuir uma capacidade regenerativa acentuada, a utilização de curativos para acelerar o processo de cicatrização é recomendável (MACNEIL, 2007).

Logo, um curativo ideal deve fornecer um ambiente úmido, permitir a troca de gases e agir como uma barreira contra microrganismos externos. Porém, dificuldades na remoção de curativos tradicionais, compostos de fiapos, algodão e gazes sintéticas, podem levar a processos de cicatrização incompletos ou até mesmo provocar o aparecimento de novas lesões, limitando significativamente a sua utilização (JOSHI, 2009). Consequentemente, o uso de curativos biodegradáveis e bioativos, como filmes poliméricos, é altamente desejável, já que induz a cicatrização de feridas e promove a deposição da matriz extracelular, além de ser facilmente removidos (BHATIA, 2016).

Outrossim, a utilização de biofilmes poliméricos, como os produzidos à base de quitosana, proporciona alternativas viáveis ao uso de curativos, formulações tópicas e transdérmicas convencionais. Os filmes podem atuar como carreadores de fármacos e auxiliar no processo de cicatrização, atuando como uma matriz de liberação sustentada e permitindo a rápida absorção do princípio ativo no estrato córneo (MCAULEY et al., 2015).

A despeito da quitosana, trata-se de um material amplamente usado na formulação de hidrogéis e filmes poliméricos, podendo ser utilizada nos processos regenerativos da pele como um curativo biodegradável devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e atividade imunoestimuladora (SOUZA et al., 2009). Ademais, a quitosana também apresenta propriedades antibióticas, antifúngicas, hemostáticas (PERIAYAH, et al, 2013), analgésicas e cicatrizantes (SINGLA, et al., 2001), além de promover a redução na formação de cicatrizes.

Portanto, a sua aplicação como filme polimérico em associação a fármacos com ação anti-inflamatória, como a pentoxifilina, é extremamente vantajosa (DENG, 2007).

Compete ainda destacar que a pentoxifilina, derivada da metilxantina, é amplamente utilizada na medicina humana e veterinária devido as suas propriedades anti-inflamatórias e efeitos hemorreológicos. A sua atividade biológica consiste em diminuir a viscosidade sanguínea por reduzir a concentração plasmática de fibrinogênio no sangue e consequentemente promover a atividade fibrinolítica (ALI, 2012).

Sendo assim, o processo de cicatrização tecidual pode ser beneficiado pelas atividades farmacológicas da pentoxifilina (SAMLASKA; WINFIELD, 1994). Por conseguinte, a sua incorporação a filmes poliméricos a base de quitosana para auxiliar nos processos de cicatrização de lesões cutâneas é extremamente promissor. Desse modo, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade anti-inflamatória e microbiológica de filmes poliméricos a base de quitosana contendo pentoxifilina.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pele e Inflamação

A pele é o maior tecido do corpo humano, com aproximadamente dois metros quadrados de tamanho. Ela é considerada a barreira primária do corpo, responsável pela proteção de órgãos e tecidos contra agentes infecciosos externos e também pela regulação e manutenção da temperatura corpórea, através do isolamento térmico e da transpiração. Lesões cutâneas podem comprometer a integridade da pele, tornando-a susceptível a agentes infecciosos e às mudanças fisiológicas que podem alterar a homeostasia do corpo e desencadear processos inflamatórios e infecções (GEESON; BERG et al, 1991).

Por conseguinte, a preservação da pele é de suma importância, sendo necessário que danos e traumas a este órgão, resultantes de ação externa física ou química, sejam imediatamente aliviados através do uso de curativos que auxiliem na regeneração rápida do tecido, mantendo o ambiente lesionado relativamente úmido, prevenindo infecções, diminuindo a dor, permitindo a troca de gases e removendo o excesso de exsudado, o que resulta em uma cicatrização rápida e adequada (DÍEZ -PASCUAL; DÍEZ- VINCENT et al, 2015).

As lesões de pele ocorrem com determinada frequência durante a vida de um ser humano, sendo elas comumente o resultado de acidentes traumáticos ou incisões cirúrgicas, que podem levar a imobilidade do indivíduo ou a consequências mais graves quando associadas a outras doenças, como a diabetes ou obesidade, ocasionando um alto custo econômico e social para a sociedade. (SEM et al., 2009).

Com isso, o tratamento de feridas é uma prática milenar que vem sendo aperfeiçoada ao longo dos anos. Técnicas primitivas utilizadas para auxiliar o processo de cicatrização e elaboração de curativos empregavam o uso de folhas e tecidos sobre a pele e a aplicação de pomadas naturais feitas de ervas e gordura animal com o intuito de reduzir a dor e prevenir a infecção. Certamente, essas estratégias ainda são utilizadas nos dias atuais, mas por serem extremamente rudimentar, são incapazes de induzir uma cicatrização eficiente em lesões crônicas e cortes profundos, sendo necessário a utilização de estratégias mais modernas para evitar a contaminação da área lesionada por agentes infecciosos e impedir a formação de cicatrizes permanentes. Por consequência, é evidente a necessidade de uma constante inovação nas terapias e tecnologias empregadas na prática da regeneração tecidual,

aprimorando cada vez mais, o auxílio à regeneração rápida das propriedades intrínsecas da pele (DIEGELMANN et al, 2004).

Estímulos biológicos nocivos relacionados ao contato com agentes agressores externos devido a traumas e lesões, são capazes de ativar mecanismos complexos de adaptação celular, que buscam impedir ou reduzir os danos provocados pela agressão. Quando essas adaptações são insuficientes, ocorre a morte celular e, conseqüentemente, a necrose tecidual, que dependendo do estágio da lesão, podem ou não ser revertidas (MAJNO; JORIS et al, 1995).

Portanto, estímulos biológicos de defesa são fatores importantes, que provoca alterações complexas da vascularização da derme humana proveniente de uma resposta imunológica geral e inespecífica dos tecidos vascularizados. Esse mecanismo de defesa é conhecido como inflamação e ocorre com a finalidade de reduzir os danos teciduais através da diluição, destruição ou confinamento do agente infeccioso (MITCHELL; COTRAN et al, 2003a).

No entanto, as alterações ocasionadas à vasculatura epitelial pelo processo inflamatório pode dificultar ou impedir a ação de fármacos administrados por via oral, enfatizando assim, a importância de sistemas carreadores de fármacos que possibilitam a aplicação tópica direta no local lesionado. Ademais, os sistemas carreadores de fármacos apresentam vantagens significantes no tratamento de lesões como a redução de efeitos colaterais e a versatilidade nos meios de aplicação, possibilitando a administração da dosagem adequada de fármaco na área lesionada, acelerando então, o processo de cicatrização. Em virtude das vantagens supracitadas, há um crescimento significativo na área de desenvolvimentos de sistemas e plataformas que disponibilizam alternativas viáveis aos meios de aplicação de fármaco, como é o caso dos filmes poliméricos, que auxiliarão no processo de cicatrização de feridas (BOATENG et al, 2008).

2.2 Filmes Poliméricos

Filmes poliméricos são comumente usados como carreadores de fármacos e possui características extremamente vantajosas tornando-o uma alternativa viável para a administração de fármacos. O uso de polímeros biológicos para o desenvolvimento de produtos eco-sustentáveis, como filmes, vem recebendo grande interesse acadêmico e comercial devido a sua demasiada disponibilidade, características físico-químicas permissíveis de alteração e biodegradabilidade (GUNA et al, 2017).

De todas as formulações disponíveis, filmes poliméricos solúveis, que se aderem a pele somente na presença de uma pequena quantidade de água, são extremamente promissores para o carreamento tópico de fármacos (PADULA, et al, 2007). Além disso, filmes hidrossolúveis são facilmente removidos da pele, tornando a sua aplicação em tecidos lesionados vantajoso. Ademais, alterações adicionais no sistema permite a aplicação do filme em condições oclusivas, beneficiando também, o carreamento do fármaco (FEMENIA-FONT et al, 2006).

Além da sua utilização como sistema carreador de fármaco, filmes poliméricos hidrofílicos, tanto natural quanto sintético, podem atuar na aceleração da regeneração dérmica do tecido lesionado. Isso ocorre devido a determinadas propriedades físico-químicas dos materiais poliméricos, como o alto teor de água e biocompatibilidade, e possibilita a assimilação das características oriundas do tecido pelo filme (DÍES-PASCUAL; DÍEZ-VINCENTE, 2015).

Os polímeros naturais investigados para aplicações de cicatrização de feridas incluem polissacarídeos alginatos, condroitina, quitosana e quitina, celulose, dextrana e heparina, proteoglicanos e proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, queratina e fibroína de seda) (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014; HU et al, 2014; JAYAKUMAR; PRABAHARAN; KUMAR; NAIR; TAMURA, 2011; VOICU et al, 2016). Todavia, materiais biomédicos a base de quitosana se destacam entre os outros devido as suas propriedades distintas, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antibiótica e ausência de toxicidade (AHMED; ALJAEID 2016; KONG; CHEN; XING; PARK, 2010; RAAFAT; SAHL, 2009). Essas características são desejáveis na formulação de um filme ideal, que também deve ser flexível, elástico e macio, porém, resistente à quebra ocasionada pelo estresse resultante da área de aplicação (GARCÍA et al, 2017).

Desta forma, filmes de quitosana dispõe de uma variedade de características que possibilita o seu uso em uma diversidade de aplicações biomédicas (HOSSEINI et al, 2013).

2.3 Quitina e Quitosana

2.3.1 Quitina

A quitina, poli (β - (1 \rightarrow 4) -N-acetil-D-glucosamina) é um polissacarídeo natural, identificado pela primeira vez em 1811, pelo químico francês Henri Braconnot (ARIAS et al,

2004). Ela é um polímero, rico em nitrogênio, derivado de uma variedade de animais marítimos, insetos e microrganismos. Uma característica importante da quitina são os seus grupos de hidroxilas primários e secundários e seus grupamentos de amina primários, pois possibilitam que uma variedade de mudanças químicas seja realizadas de acordo com a aplicação desejada (I. Aranaz et al, 2010).

2.3.2 Quitosana

A quitosana foi descoberta em 1859 por Roget (PATRULEA et al, 2015). Devido a suas propriedades físico-químicas e biológicas, ela é altamente adequada para ser utilizada como curativo no tratamento terapêutico de queimaduras severas ou úlceras cutâneas, além de apresentar uma alta capacidade de formação de filmes e possuir características mucoadesivas que permite a sua utilização em várias vias de administração. Por consequência, o estudo da quitosana e suas aplicações cresce no meio acadêmico e o interesse comercial fomenta sua importância (ANDREANI et al, 2015).

A quitosana também é conhecida como quitina desacetilada. Ela é constituída de unidades β -(1-4) D-glucosamina e N-acetil-D-Glicosamina ligadas, distribuídas aleatoriamente. Apesar de suas características físico-químicas, a quitosana possui atividade antibiótica intrínseca, um alto peso molecular e a presença de vários grupos químicos funcionais que possibilitam modificações estruturais diversas, tornando a quitosana uma substância extremamente versátil (SHIH et al, 2012) e a relacionando intimamente com as características físico-químicas encontradas na taxonomia marítima (RHAZI et al., 2000).

O desenvolvimento de filmes poliméricos a base de quitosana é possível devido ao seu grupamento amina (NH_2), que se altera para NH_3^+ quando entra em contato com um meio ácido, e sofre protonação, possibilitando então, a formação de interações eletrostáticas com os grupos aniônicos. A característica física dos filmes poliméricos a base de quitosana de atuar como barreira é afetada diretamente pelo grau de desacetilação e peso molecular (XU et al, 2005).

Outra propriedade físico-química importante da quitosana, provenientes dos seus grupamentos aminas e hidroxilas, é a sua alta hidrofilicidade e capacidade de sorção de íons metálicos. Tais características possibilitam uma diversidade de aplicações para quitosana, atuando na produção de alimentos como um estabilizante e no tratamento de água como um agente floculante (RINAUDO, 2006).

Na área biomédica e farmacêutica, a quitosana possui uma série de aplicações biológicas de grande interesse terapêutico. Ela contribui na ativação e proliferação de células inflamatórias no tecido epitelial granular (ALEMDAROGLU et al, 2006), auxilia na reorganização da arquitetura histológica de tecido lesionado (MUZARELLI et al, 1989), e acelera o processo regenerativo alterando o funcionamento dos macrófagos (BALASSA; PRUDDEN et al, 1978). As propriedades biológicas encontradas na quitosana viabiliza a formulação de filmes poliméricos para serem utilizados, associados a outros fármacos, como curativo, pois a sua atividade tem demonstrado uma redução substancial, tanto no tempo de regeneração tecidual, quanto na formação de cicatrizes quando utilizados em animais (PAUL; SHARMA, 2004).

Embora possua uma ampla atividade biológica e possa ser utilizado na elaboração de diversos produtos, as delimitações da quitosana são notáveis e incluem: a alta sorção de água, pouca estabilidade mecânica e fácil solubilidade em condições ácidas, limitando suas aplicações (PADAKI et al, 2011). Porém, o interesse atual em matéria prima com atividade antibiótica e cicatrizante, que seja biocompatível como corpo humano e biodegradável, além da sua ampla disponibilidade e baixo custo, torna a quitosana de extremo interesse para a formulação de filmes poliméricos (CHENG et al, 2003).

Portanto, é importante ressaltar que a formação de filmes de quitosana, forma sistemas de liberação de fármacos contendo os mais diferentes tipos de fármacos, entre eles alguns anti-inflamatórios como pentoxifilina, que é objeto desse estudo.

2.3.3 Pentoxifilina

A pentoxifilina é um derivado hidrofílico da metilxantina, que é constituída por dois anéis e uma parte alifática, com um grupamento cetona próximo à extremidade, e atua como um inibidor não seletivo da fosfodiesterase aumentando os níveis intracelulares de adenosina monofosfato (cAMP) (ESSAYAN et al, 2001).

Inicialmente, a pentoxifilina foi utilizada como um agente hemorreológico no tratamento de distúrbios circulatórios como doenças vasculares periféricas (SAMLASKA; WINFIELD et al, 1994). Atualmente, uma variedade de estudos científicos comprovou a eficácia da pentoxifilina no tratamento tanto de doenças vasculares, quanto em doenças inflamatórias incluindo dermatoses purpúricas pigmentadas, como a doença de Schamberg, hanseaníase tipo 2, psoríase, cicatrizes hipertróficas e morfeia, reações de hipersensibilidade

alérgica, necrobiose lipoídica e também como adjuvante no tratamento da leishmaniose cutânea e mucocutânea (LESSA et al., 2001; BÁFICA et al., 2003; SADEGHIAN; NIFOROUSHADEH, 2006).

A pentoxifilina pode ser administrada via oral ou intravenosa, porém, é comum a presença de efeitos colaterais notáveis na administração. Entre os distúrbios provenientes do seu uso estão as disfunções gastrointestinais como dispepsia, náusea, vômito, inchaço e gases e as alterações variadas no sistema nervoso central, podendo ser dores de cabeça, tontura, tremores, ansiedade e confusão. (SAMLASKA; WINFIELD, 1994; ZARGARI, 2008; ÇAKMAK et al, 2012).

Ademais, assim como a maioria dos fármacos administrados por via oral, a pentoxifilina passa por uma série de alterações resultantes do metabolismo de primeira passagem hepática. Logo, foi observado que a biodisponibilidade do fármaco diminui substancialmente para níveis plasmáticos de aproximadamente 20-30%. A administração parenteral pode ser realizada com o intuito de melhorar a biodisponibilidade do fármaco e diminuir alguns de seus efeitos colaterais. Porém, o uso intravenoso desse medicamento é um método invasivo e doloroso, que requer a atuação de um profissional de saúde capacitado, ocasionando uma baixa adesão do paciente ao tratamento (TEKSIN et al, 2009).

Com isso, o desenvolvimento de sistemas carreadores para aplicações tópicas desse medicamento, seja ele uma dispersão coloidal ou um filme polimérico, torna-se excepcionalmente promissor. A incorporação da pentoxifilina à um sistema carreador de uso tópico inviabiliza o metabolismo de primeira passagem, com conseqüente melhoria da sua biodisponibilidade, e redução de reações adversas devido à ação ser tópica e não sistêmica (YEWALE et al, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver filmes poliméricos de quitosana e avaliar a atividade anti-inflamatória dos filmes para uso tópico.

3.2 Objetivos Específicos

- Aplicar o método de evaporação para desenvolver os filmes de quitosana contendo pentoxifilina.
- Testar diferentes concentrações de pentoxifilina incorporados em filmes para avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* do filme obtido em feridas cutâneas induzidas em camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Pentoxifilina
- Quitosana - Sigma Aldrich

4.2 Desenvolvimento dos Filmes

A elaboração das formulações de filmes poliméricos de quitosana com pentoxifilina foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

A técnica de evaporação do solvente (SANTANA et al., 2014) foi utilizada no desenvolvimento da formulação. A aplicação desta técnica consistiu na dissolução da quitosana (1% m/v) em uma solução de ácido acético (1% v/v), seguida por agitação magnética durante o período de 24 horas, sem interrupções. A seguir, a solução foi filtrada a vácuo com o intuito de remover qualquer material insolúvel presente, obtendo-se então, uma solução polimérica de quitosana de 1% (m/v).

Com isso, uma alíquota de 5 mL de solução de quitosana foi retirada por meio de uma pipeta automática regulável, colocada em uma placa de Petri e, em seguida, inserida em uma incubadora ou *shaker* (Tecnal, mod TE-420, Piracicaba, São Paulo, Brasil), onde foi homogeneizada (60 rpm) por um período de 24 horas. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em estufa de circulação de ar (TECNAL, TE-394/2, Piracicaba, São Paulo, Brasil) à temperatura constante de 50 °C, durante 24 horas, ocasionando a evaporação do ácido acético residual contido na solução. Após a conclusão do período de secagem, obteve-se os filmes brancos, compostos somente por quitosana (FBr), que foram retirados cuidadosamente das placas com o auxílio de pinças.

Para obter os filmes de quitosana contendo o fármaco, soluções aquosas de pentoxifilina contendo 10 mg (F1) e 20 mg (F2)/mL foram preparadas. A metodologia de preparação dos filmes de quitosana incorporados pelo fármaco foi a mesma utilizada subsequentemente na preparação dos filmes brancos, distinguindo-se do procedimento descrito anteriormente devido a adição de 1 mL de pentoxifilina, em ambas concentrações previamente mencionadas, aos filmes poliméricos. Essa adição ocorre antes do período de incubação de 24 horas.

4.3 ESTUDO *IN VIVO*

Nesse estudo, camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas foram obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB. Esses animais pesavam entre 25 a 35 g, foram mantidos em temperatura ambiente de 22 °C, umidade relativa de 60-80%, ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso livre a água e ração.

Todos os experimentos realizados foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios, normas e considerações éticas aprovadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB (FCM/CESED).

4.3.1 Feridas Cutâneas

Nesse ensaio, feridas cutâneas experimentais foram realizadas em animais previamente anestesiados por uma solução de cetamina 100 mg/kg e xilazina 0,05 mg/kg. Uma tricotomia de aproximadamente 16 mm² foi realizada na região dorsal de cada animal, seguido de uma antissepsia local com clorexidina 4% e duas excisões circulares de 7 mm de diâmetro na pele do animal utilizando um punch dermatológico estéril. Os fragmentos de pele foram retirados da área lesionada e o *panniculus carnosus* foi exposto.

4.3.2 Grupos e Tratamentos

Os camundongos foram divididos de modo aleatório em 5 grupos experimentais, com 7 animais em cada grupo:

grupo 0 (G0) – controle negativo;

grupo 1 (G1) – com filme branco (FBr);

grupo 2 (G2) – com filme F1;

grupo 3 (G3) – com filme F2;

grupo 4 (G4) – controle positivo com pomada de Dipropionato de betametasona com sulfato de gentamicina.

Após a realização da ferida (dia 0), as lesões cutâneas foram limpas diariamente com uma solução salina estéril 0,9% e os tratamentos tópicos devidamente aplicados em cada animal. Fotos das lesões foram realizadas nos dias 0, 2, 6, 10 e 14 com o objetivo auxiliar a avaliação clínica e possibilitar a execução de uma análise morfométrica. As aplicações tópicas dos diferentes tratamentos de acordo com cada grupo são descritas na tabela abaixo:

Tabela 1 - Tratamento utilizado nos diferentes grupos no período de 14 dias.

Grupo	Tratamento	Duração
G0	200 µl de solução salina estéril 0,9%	
G1	FBr	
G2	F1 (1,82 mg PTX)	11 dias
G3	F2 (3,64 mg PTX)	
G4	Dipropionato de betametasona com sulfato de gentamicina	

A eutanásia dos animais ocorreu no 11º dia após a realização das feridas. Esta prática foi realizada utilizando halotano 3%, anestesiando o animal, e seguido de um deslocamento vertical efetuado com o intuito de evitar o sofrimento animal e cumprir o código de ética estabelecido para experimentos com animais.

4.3.3 Avaliação das feridas cutâneas

4.3.3.1 Aspectos clínicos das feridas cutâneas

Os aspectos clínicos da cicatrização das feridas foram realizados através da observação de sinais flórgísticos macroscópico, como edema, hiperemia e a formação de crostas e exsudato. Essa análise ocorreu nos dias 0, 2, 6, 10 e 11 após a realização das lesões.

4.3.3.2 Análise morfométrica das feridas cutâneas

Para a obtenção das imagens das feridas, a câmera fotográfica digital (Nikon® D5300 24,2 MP com lente Tamron® 16-300mm F/3,5-6,3 Di II VC PZD MACRO) foi utilizada nos dias 0, 2, 6, 10 e 14 após a realização da lesão, dispondo de uma distância fixa padrão de 15 cm do objeto. Através da utilização do software ImageJ® 1.51j8 (disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>) (TANG et al., 2014; KOLUMAM et al., 2017), em escala graduada

no lado da ferida, foi possível medir a área das lesões (mm²). A equação abaixo foi aplicada para a obtenção da área residual.

$$\text{Área residual da ferida} = \frac{\text{Área atual da ferida}}{\text{Área inicial da ferida}} \times 100$$

4.3.3.3 *Análise estatística*

Os dados obtidos foram expressos como a média EPM (Erro Padrão Médio) e as diferenças entre os grupos foram averiguadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo *post hoc* Teste de Neuman – Keuls. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas expressivas.

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS FERIDAS CUTÂNEAS

Essa análise foi realizada com o intuito de isolar as bactérias presentes nas feridas cutâneas dos camundongos, possibilitando então, a identificação dos microrganismos presentes. Primeiramente, foram coletadas as amostras das áreas lesionadas de três animais de cada grupo nos dias 2, 6 e 9, sendo empregados para coleta *swabs* estéreis em meio Stuart. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba (LAC-UEPB) para serem inoculadas. A inoculação ocorreu em caldo BHI no período de 24 horas, permitindo o crescimento bacteriano. Posteriormente, um *swab* incorporado no caldo BHI foi utilizado para o semeio em placas de Petri através do método de esgotamento por estrias, seguido de repique em cinco meios de cultura (Ágar Sangue, Agar CLED, Ágar Mac-Conkey, Ágar EMB e Ágar Mueller-Hinton). As amostras foram, então, incubadas a 37^oC por 24 horas.

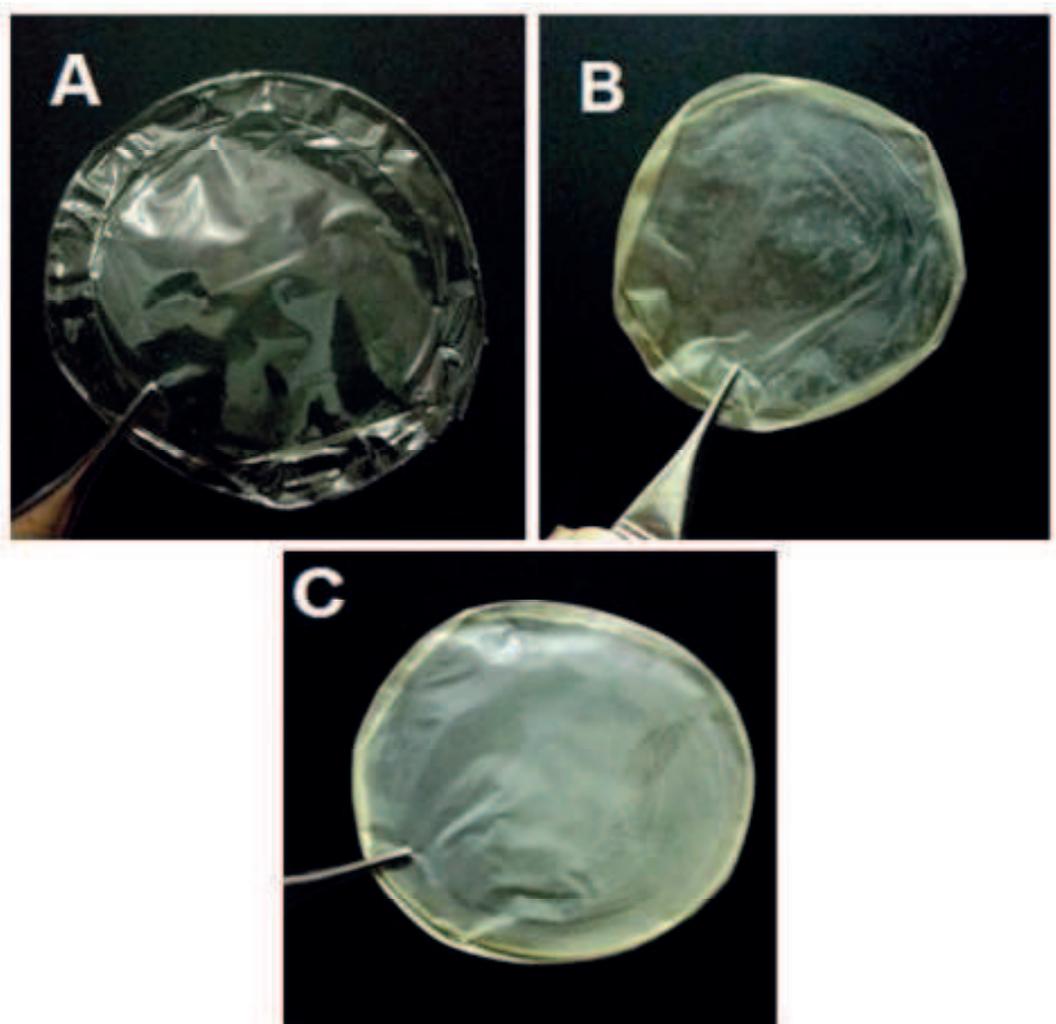
Após o período de incubação das placas, a observação de características distintas entre as colônias permitiu a classificação colônias Gram-positivas e negativas. O crescimento microbiológico e morfologia de cada colônia foi avaliado e os testes de catalase, coagulase e identificação em tubos de vidro foram realizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES

Os três tipos de filmes desenvolvidos no estudo estão representados na figura abaixo

Figura 1 -Filmes desenvolvidos neste estudo (A: filme branco; B: Filme com pentoxifilina – 10mg; C: filme com pentoxifilina – 20mg).

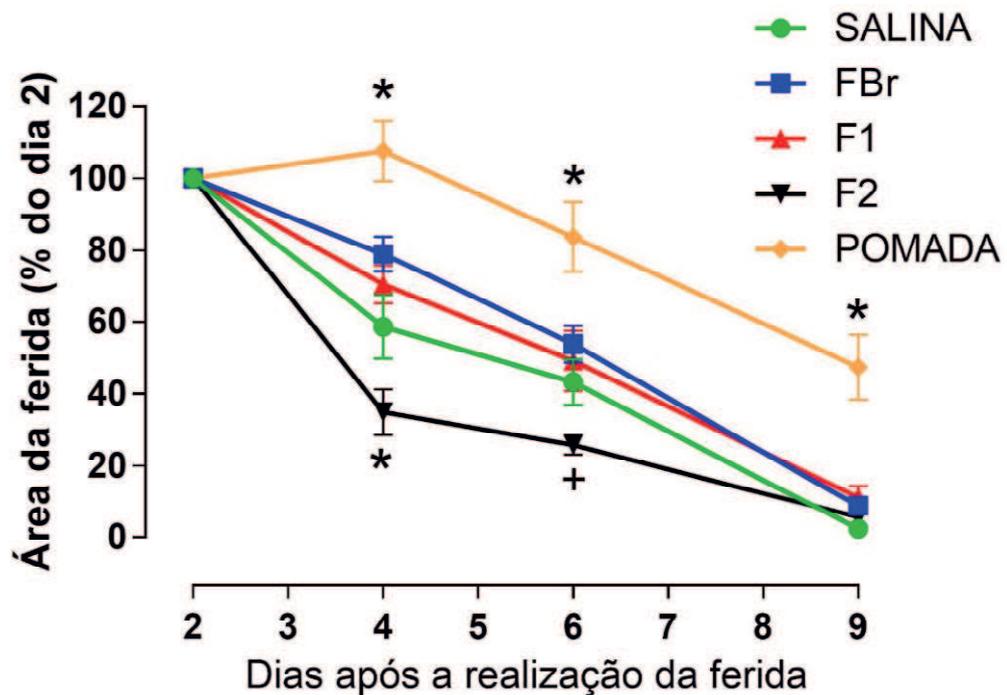


A imagem A é representada pelo filme de quitosana sem pentoxifilina (FBr). Ele pode ser descrito como um filme de aspecto homogêneo e totalmente translúcido, característica intrínseca do próprio polímero utilizado na formulação. O filme evidenciado na figura 1B representa o filme polimérico de quitosana que, após dissolvido em meio aquoso, foi incorporado com 10 mg de pentoxifilina (F1). O aspecto leitoso amarelado apresentado é

característico da incorporação do fármaco no filme. A seguir, é possível observar que o filme C (F2) tem um aspecto macroscopicamente homogêneo e uma aparência leitosa e opaca mais intensa que o filme B devido à presença de uma maior concentração de pentoxifilina no filme.

5.2 ANALISE MORFOMÉTRICA DAS FERIDAS CUTÂNEAS

Figura 2 - Avaliação do tamanho das feridas cutâneas



A análise morfométrica foi realizada através da avaliação da redução na área da ferida (%) nos dias 4, 6, e 9, possibilitando assim, a comparação do processo regenerativo após a utilização da solução salina (Grupo 0), filmes de quitosana sem pentoxifilina (Grupo 1), filmes de quitosana contendo pentoxifilina em concentrações de 10 (Grupo 2) e 20 (Grupo 3) mg e pomada de Dipropionato de betametasona com sulfato de gentamicina (Grupo 4).

Através da observação do gráfico e das fotos, algumas comparações notáveis podem ser realizadas, sendo possível destacar o baixo rendimento de cicatrização no grupo 4 quando comparado aos demais e a atuação farmacológica acentuada do grupo 3, contendo 20 mg de pentoxifilina, na redução da área lesionada. O grupo 0, 1 e 2 obtiveram resultados consideravelmente parecidos, com peculiaridades que serão discutidas a seguir.

O grupo 0 obteve um resultado satisfatório, tendo a segunda maior redução percentual da área lesionada entre os dias 2 a 8, e superando o grupo 3 no dia 9, concluindo o estudo com o maior percentual de redução.

Nos primeiros 4 dias após a realização da ferida, podemos verificar que o perfil de redução da área lesionada do grupo 0, se assemelha com os do grupo 1, 2 e 3 e difere de maneira significativa do grupo 4. Ademais, nota-se uma alteração perceptível na inclinação da reta do grupo 0 do dia 4 ao dia 6, que representa uma diminuição considerável na intensidade de regeneração tecidual durante esses 2 dias, seguida de um aumento na atividade cicatrizante do dia 6 ao dia 9.

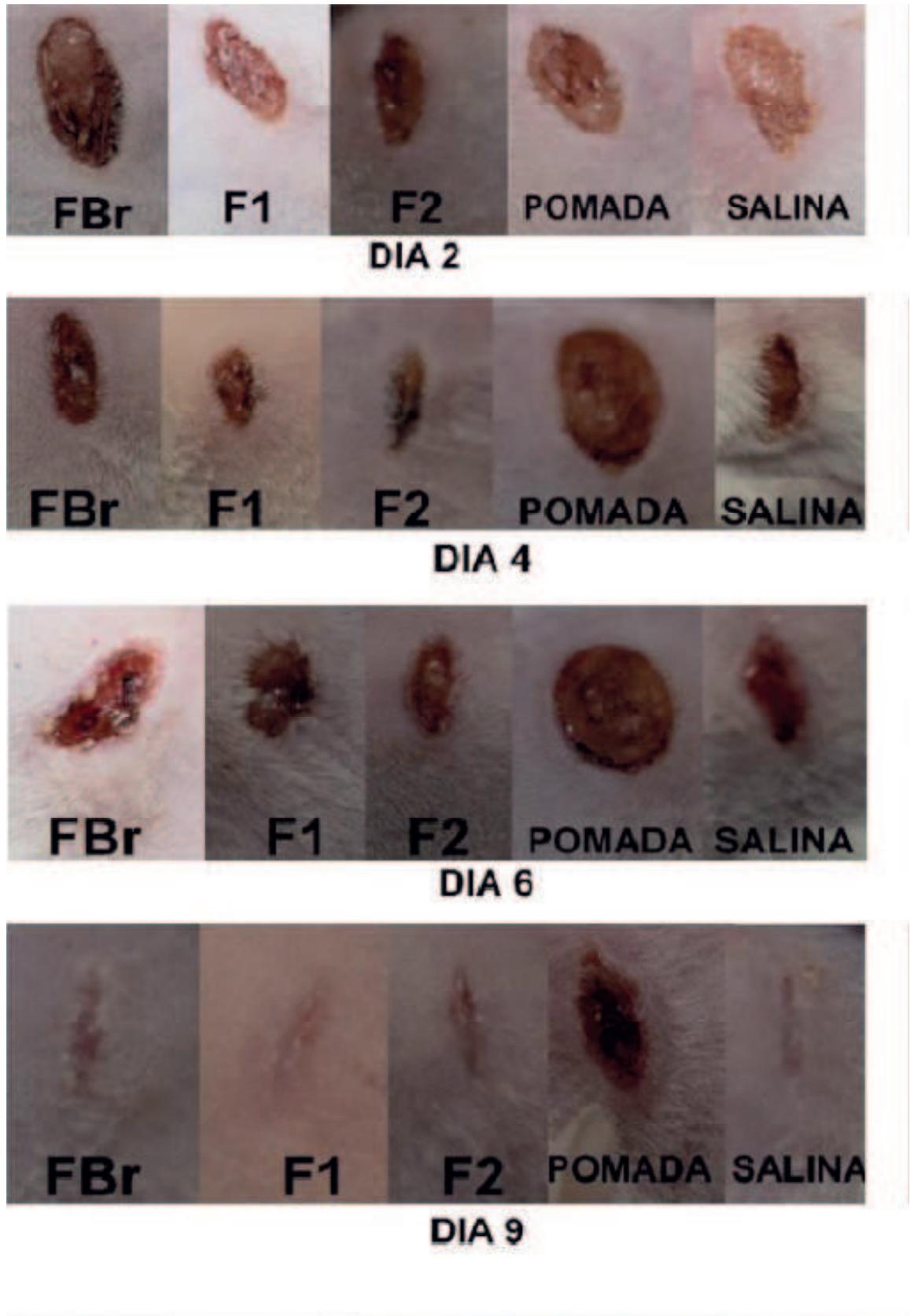
O grupo 3, apresentou uma redução percentual proeminente durante os primeiros 3 dias após a lesão. Porém, o seu rendimento diminuiu de forma semelhante ao grupo 0 após o dia 4, mantendo o percentual de redução da área lesionada relativamente constante até a conclusão do ensaio.

É importante ressaltar que, apesar de ter um rendimento na cicatrização semelhante ao grupo 0, o grupo 3 é capaz de proteger a área lesionada de agentes externos, evitando possíveis infecções.

Os grupos 1 e 2 tiveram o percentual de redução da ferida semelhantes, não tendo, entre eles, uma significância estatística relevante.

O grupo 4 teve o menor rendimento na redução das feridas, chegando a 50% no final dos 9 dias, percentagem inferior aos demais grupos. Ela apresentou um comportamento anômalo durante os primeiros 3 dias, aumentando o percentual da área ao invés de diminuí-lo. Após o dia 4, uma redução no tamanho das lesões é evidenciada, porém, de forma consideravelmente inferior aos outros sistemas. Torna-se oportuno salientar que ao concluir o estudo, o grupo 4 foi o único a não cicatrizar completamente, destacando assim, as vantagens claras na utilização dos filmes de quitosana com pentoxifilina no processo regenerativo de lesões epiteliais.

Figure 3 – Fotografias das Feridas Cutâneas



5.3 ESTUDO MICROBIOLÓGICO

As tabelas 2, 3 e 4 apresentam as bactérias identificadas durante cada período de coleta, bem como o tratamento com os filmes FBr, F2 e a salina utilizados nos camundongos.

Tabela 2 - Bactérias encontradas nas feridas tratadas com FBr nas três coletas.

AMOSTRA	PRIMEIRA COLETA	SEGUNDA COLETA	TERCEIRA COLETA
FBr (Camundongo 1)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter gergoviae</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Citrobacter freundii</i>	- <i>Hafnia alvei</i>
FBr (Camundongo 2)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter gergoviae</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
FBr (Camundongo 3)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter gergoviae</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Citrobacter freundii</i>	Nenhuma bactéria

Tabela 3 - Bactérias encontradas nas feridas tratadas com F2 nas três coletas.

AMOSTRA	PRIMEIRA COLETA	SEGUNDA COLETA	TERCEIRA COLETA
F2 (Camundongo 1)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i>
F2 (Camundongo 2)	<i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
F2 (Camundongo 3)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	Nenhuma bactéria

Tabela 4 - Bactérias encontradas nas feridas tratadas com salina (controle negativo) nas três coletas.

AMOSTRA	PRIMEIRA COLETA	SEGUNDA COLETA	TERCEIRA COLETA
Salina (Camundongo 1)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
Salina (Camundongo 2)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter gergoviae</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Salina (Camundongo 3)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Relacionados aos resultados obtidos pela utilização dos filmes brancos (FBr), podemos observar a presença dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter gergoviae* em todos os camundongos na realização da primeira coleta. O *Staphylococcus aureus* permaneceu presente nos três camundongos durante a segunda coleta, mas foi efetivamente inibido na terceira coleta, possivelmente, devido ao tempo de tratamento com o filme. Observa-se também, a presença de *Citrobacter Freundii* na segunda coleta e da *Hafnia alvei* na terceira. Logo, devido a presença das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter gergoviae* no trato gastrointestinal desses animais ser comum, é provável que a contaminação evidenciada nos filmes seja decorrente da presença das fezes nas gaiolas dos camundongos durante o período da análise. A presença das demais bactérias em diferentes dias da análise e os resquícios fecais encontrados na área lesionada desses animais, reforça a tese de contaminação devido a excretos deixados na gaiola.

No que se refere a presença de microrganismos nos animais tratados com filmes de quitosana contendo 20 mg de pentoxifilina (F2), é notável a presença das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, e *Escherichia coli* durante o período de análise. Por se tratar de seres comumente encontradas no intestino animal, a contaminação do filme por *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes* pode ter ocorrido através do contato com as fezes dos camundongos. Ademais, o contato da área lesionada com urina dos animais durante o ensaio pode explicar a presença da *Escherichia coli* nas coletas. Ao analisar os efeitos antibióticos dos filmes F2, é possível notar a inibição da *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*, desempenhadas durante a segunda e terceira coleta dos filmes. Outrossim, a

bactéria *S. aureus* apresentou resistência ao tratamento com os filmes contendo pentoxifilina durante a primeira e segunda coleta, contudo, a sua inibição também foi evidenciada na realização da terceira coleta.

A despeito dos resultados obtidos do grupo salina, a presença dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae* e *Escherichia coli* foi novamente relatada, corroborando com a tese de contaminação devido ao contato com as fezes animais. A salina apresentou atividade inibitória para *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae* e *Escherichia coli*, porém, a bactéria *Staphylococcus aureus* exibiu resistência ao tratamento durante todas as coletas.

Diante os dados supracitados, torna-se oportuno ressaltar a inibição do *Staphylococcus aureus* pela utilização do FBr e F2 como vantajosos em relação ao grupo salina, visto que o microrganismo *S. aureus* é responsável pela maioria das infecções epiteliais ocorridas em seres humanos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo realizado os dados apresentados neste trabalho, é possível afirmar que a atividade anti-inflamatória e microbiológica dos filmes poliméricos de quitosana com pentoxifilina apresentaram resultados satisfatórios, visto que foi evidenciado um aumento significativo na redução da área lesionada e uma atividade inibitória adequada contra microrganismos comumente associados a infecções epiteliais. Logo, esse sistema pode representar avanços relevantes às aplicações terapêuticas que dispõe da quitosana e pentoxifilina como auxiliares dos processos de regeneração tecidual de feridas cutâneas.

REFERENCIAS

- AHMED, T. A., & ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design Development and Therapy**, 10, p.483, 2016.
- ALEMDAROGLU, C., DEGIM, Z., CELEBI, N., ZOR, F., OZTURK, S., ERDOGAN, D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns** 32, p. 319-327, 2006.
- ALI, F.N. T.L. **Carman Medical management for chronic atherosclerotic peripheral arterial disease** **Drugs**, 72 (16), p. 2073-2086, 2012.
- ANDREANI, T., MIZIARA, L., LORENZON, E.N., DE SOUZA, A.L., KIILL, C.P., FANGUEIRO, J.F., GARCIA, M.L., GREMIAO, P.D., SILVA, A.M., SOUTO, E.B. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. **European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics : Official Journal of the Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik** e. V 93, p. 118- 126, 2015.
- ARANAZ, I., R. HARRIS, R., A. HERAS, A. Chitosan amphiphilic derivatives. **Chemistry and applications**, *Curr. Org. Chem.* 14 (3), p. 308-330, 2010.
- ARIAS, J.L., NEIRA-CARRILLO, A., ARIAS, J. I., ESCOBAR, C., BODERO, M., DAVID, M., et al. Sulfated polymers in biological mineralization: A plausible source for bio-inspired engineering. **Journal of Materials Chemistry**, 14, p. 2154-2160, 2004.
- BÁFICA, A., OLIVEIRA, F., FREITAS, L.A., NASCIMENTO, E.G., BARRAL, A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. **International Journal of Dermatology**. 42, p. 203-237, 2003.
- BALASSA, L., PRUDDEN, J. Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration. In proceedings of the first international conference on chitin/chitosan. **National Technical Information: Springfield**, VA, p. 296-305, 1978.
- BHATIA, S. **Natural Polymer Drug Delivery Systems** Springer. P. 96-102, 2016.
- BOATENG, J.S., MATTHEWS, K.H., STEVENS, H.N.E., ECCLESTON, G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 97, p. 2892-2923, 2008.
- ÇAKMAK, S.K., ÇAKMAK, A., GONUL, M., KILIÇ, A., GUL, U. Pentoxifylline use in dermatology. **Inflammation. Allergy Drug Targets** 11, p. 422-432, 2012.
- CHATTOPADHYAY, S., & RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, 101(8), 821–833, 2014.

CHENG, M., J. DENG, J., F. YANG, F., Y. GONG, Y., N. ZHAO, N., X. ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, **biomaterials** 24, p. 2871 – 2880, 2003.

DENG C-M, HE L-Z, ZHAO M, YANG D, LIU Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrates Polymer**; 69(3): p. 583-589, 2007.

DIEGELMANN, R.F., EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, **Frontier Bioscience**. 9, p.283-289, 2004.

DÍEZ-PASCUAL, A. M., & DÍEZ-VICENTE, A. L. Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. **Biomacromolecules**, 16(9), p. 2631–2644, 2015.

ENOCH, S., LEAPER, D.J. Basic science of wound healing, **Surgery** 26, p. 31-37, 2007.
ESSAYAM, D.M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 108, p. 671 – 680, 2001.

FEMENIA-FONT, A., *et al.* Bioadhesive monolayer film for the in vitro transdermal delivery of sumatriptan. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 95, p. 1561-1569, 2006

GARCÍA, M.C., ALDANA, A.A., TÁRTARA, L.I, ALOVERO, F., STRUMIA, M.C., MANZO, R.H., *et al.*, Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. **Carbohydrate Polymers**. 175, p. 75-86, 2017.

GEESON, J.C. e BERG, R.A. **Biochemistry of skin, bone and cartilage**. In: **GLASGOLD, A.I. e SILVER, F.H. Applications of biomaterials in facial plastic surgery**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.

GOTTRUP, F. **A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds**, *Am J Surg*. 187, p. 38s-43s, 2004.

GUNA, V.K, ILANGO VAN, M., GANGADHARAI AH, A.M, REDDY, N. Water hyacinth: a unique source for sustainable materials and products, *ACS Sustain. Chemical Engineering*. 5 (6), p. 4478-4490, 2017.

HOSSEINI, S.F., REZAEI, M., ZANDI, M., GHAVI, F.F. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films, **Food Chemistry**. 136, p. 1490-1495, 2013.

JOSHI, M., PURWAR, R. Purwar Composite dressings for wound care
S. Rajendran (Ed.), **Advanced Textiles for Wound Care**, Elsevier, p. 275-288, 2009.

LESSA, H.A., MACHADO, P., LIMA, F., CRUZ, A.A., BACELLAR, O., GUERREIRO, J., CARVALHO, E.M., 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Hyg. 65, 87-89.

MACNEIL, S. Process and opportunities for tissue-engineering skin, **Nature** 455 p. 874-880, 2007.

MAJNO, G., JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death|| , **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MCAULEY, W.J. , CASERTA, F., HOBOKEN, N.J. Film-forming and heated systems R.F. Donnelly, T.R.R. Singh (Eds.), **Novel delivery systems for transdermal and intradermal drug delivery**, John Wiley & Sons, United States, p. 97-107, 2015.

MITCHELL, R. N., COTRAN, R. S. “Acute and Chronic Inflammation|| . In: Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L. (eds), **Robbins Basic Pathology**, 7 ed., chapter 2, Philadelphia, W. B. Saunders, 2003.

MUZARELLI, R. Amphoteric derivatives of chitosan and their biological significance. Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. **Elsevier Applied Science**, London and New York, p. 87-99, 1989.

PADAKI, M., ISLOOR, A.M., FERNANDES, J., PRABHU, K.N. **New polypropylene supported chitosan NF-membrane for desalination application**, *Desalination* 280 (1), p. 419-423, 2011.

PADULA, C. *et al.* Bioadhesive film for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Dermatology**, 17, p. 309-312, 2007.

PATRULEA, V., OSTAFE, V., BORCHARD, G., & JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Phamaceutics and Biophamaceutics**, 97, p. 417-426, 2015.

PAUL, W., SHARMA, C.P. **Chitosan and alginate wound dressings: a short review**. *Trends biomater. Artif. Organs* 18, p. 18-23, 2004.

PERIAYAH MH, HALIM AS, HUSSEIN AR, MAT SAAD AZ, ABDUL RASHID AH, NOORSAL K. In vitro capacity of different grades of chitosan derivatives to induce platelet adhesion and aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**; 52, p. 244-249, 2013.

RENATA, C.V., TATIELE, K., SILVIA, G.S. *et al.* Drug transport across skin S. Muro (Ed.), Drug delivery across physiological barriers, **Taylor and Francis Group LLC**, p. 132-134, 2016.

RHAZI, M., DESBRIÈRES, J., TOLAIMATE, A., ALAGUI, A., & VOTTERO, P. Investigation of different natural sources of chitin: Influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. **Polymer International**, 49(4), p. 337-340, 2000.

RINAUDO, M. **Chitin and chitosan: properties and applications**, **Prog. Polym. Sci.** 31 (7), p. 603- 632, 2006.

SADEGHIAN, G., NILFOROUSHZADEH, M.A. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**. 45, p. 819-821, 2006.

SAMLASKA, C.P., WINFIELD, E.A. Pentoxifylline. **Journal of the American Academy of Dermatology** 30, 603-621, 1994.

SEN, C.K., GORDILLO, G.M., ROY, S., KIRSNER, R., LAMBERT, L., HUNT, T.K., GOTTRUP, F., GURTNER, G.C., LONGAKER, M.T. Human skin Wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair Regen**. 17, p. 763-771, 2009.

SHIH, H., LIN, C.-C. Cross-linking and degradation of step-growth hydrogels formed by thio-ene photoclick chemistry, **Biomacromolecules** 13 (7) p. 2003-2012, 2012.

SINGLA A, CHAWLA M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 2001; 53(8), p. 1047-1067, 2001.

SOUZA, R.D., ZAHEDI, P., ALLEN, C.J., MILLER, M.P. Biocompatibility of injectable chitosan-phospholipid implant systems. **Biomaterial**, 30 (23-24), p. 3818-3824, 2009.

TEKSIN, Z.S., AGABEYOGLU, I., YAMAC, K. Bioavailability of pentoxifylline- chitosan oral matrix tablet in healthy subjects. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**. Availab. 1, 115–120, 2009.

XU, Y.X., KIM, K.M., HANNA, M.A., NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization, **Industrial Crops and Products**. 21, p. 185- 192, 2005.

YEWALE, C., BARADIA, D., VHORA, I., MISRA, A. Proteins: emerging carrier for delivery of cancer therapeutics. **Expert Opinion on Drug Delivery**. 10, p. 1429–1448, 2013.

ZAGARI, O. **Pentoxifylline: a drug with wide spectrum applications in dermatology**. **Dermatol**. Online J. 14, 2, 2008.

8. ANEXO

**PARECER**

NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 0076022022018

CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012

DATA DO PARECER: 22/02/2018

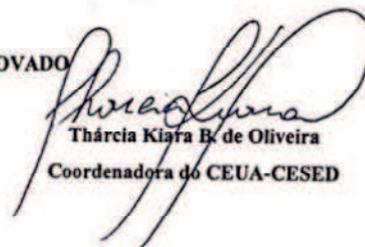
1. Pesquisador Responsável: João Walter de Souza da Silveira

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA/CICATRIZANTE DA APLICAÇÃO TÓPICA DE FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA CONTENDO PENTOXIFILINA OU DE NANOEMULSÕES CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI

2. Considerações: Este projeto 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 nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 22/02/2018.

Vigência do Projeto	2018
Espécie / linhagem	Camundongos Swiss (Mus musculus)
Nº de animais	56
Peso / idade	25 e 35g /
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	BIOTÉRIO CESED

3. Parecer Final: APROVADO


Thárcia Klara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED

