UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Vetorização de compostos 5-nitro-heterocíclicos com atividade frente a microrganismos multirresistentes

Obtenção de nanopartículas carregadas e avaliação da atividade antimicrobiana

Laura Freitas de Andrade

Dissertação de Mestrado

Orientador
Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares

Co-orientador
Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Vetorização de compostos 5-nitro-heterocíclicos com atividade frente a microrganismos multirresistentes

Obtenção de nanopartículas carregadas e avaliação da atividade antimicrobiana

Laura Freitas de Andrade

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Versão corrigida de Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Orientador
Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares

Co-orientador
Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo
2018

Laura Freitas de Andrade

Vetorização de compostos 5-nitro-heterocíclicos com atividade frente a microrganismos multirresistentes
Obtenção de nanopartículas carregadas e avaliação da atividade antimicrobiana

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares

orientador/presidente:

_____

_____

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

_____

Prof. Dr. Koiti Araki

_____

Profa. Dra. Camila Areias de Oliveira

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

Dedico este trabalho a meu Jesus, que me trouxe sempre bom ânimo para que eu pudesse concluir esse desafio.

Dedico também ao meu marido Jônatas, que me trouxe amor e compreensão em toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares pela orientação, confiança e amizade que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente. Foi uma honra realizar esse projeto com você!

Ao meu co-orientador Marco Antônio Stephano por toda ajuda, discussões e amizade.

Aos colegas de laboratório Carolina, Leonardo, Jéssica, Amanda, Adelson e Fanny. Obrigada pelas discussões, aprendizado e amizade.

Ao técnico João Murayama por todo suporte durante os experimentos e pelos momentos de descontração, que deixam nossos dias mais leves.

Aos professores Dr. Leandro Barbosa e Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pelas discussões e aprendizado.

À Profa. Dra. Iolanda M. Cuccovia por me permitir utilizar o DLS.

Ao técnico Gledson, pela ajuda com o liofilizador. Ao técnico Alexandre e a Profa. Dra. Juliana pela ajuda com o DSC.

Aos colegas Alexsandra, Natália, Richard, Sybille e Camila. Obrigada pelas discussões preciosas, desabafos e amizade.

Aos demais colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica que cruzei nesta jornada, trocando experiências e momentos de descontração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À minha família e amigos que em todos os momentos trouxe o suporte e apoio que precisei. Especialmente minha mãe e pai, que sempre me ensinaram que o sucesso não vem através de abrir mão da saúde e da paz, mas sim cultivando momentos em família e levando as coisas de uma forma leve.

À Deus, que me guia em tantos desafios apenas para revelar o quanto Ele é bom!

“O fruto sempre age, mas não age no sentido da felicidade para aqueles que o arrancam em causa própria”.

As Crônicas de Nárnia
C. S. Lewis.

Sumário

RESUMO I
ABSTRACT II
1 INTRODUÇÃO 1
2 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 RESISTÊNCIA MICROBIANA 3
2.2 ESTRUTURA DA PELE 6
2.3 QUEIMADURAS E OUTRAS LESÕES DA PELE 7
2.3.1 Morbidade que acometem os pacientes queimados e com outras lesões de pele 8
2.4 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS 10
2.4.1 Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos 11
2.5 NITROCOMPOSTOS 13
2.5.1 Nifuroxazida 15
2.6 TRANSPORTE DE FÁRMACOS 18
2.6.1 Matrizes poliméricas como transportadores de fármacos 21
2.7 QUITOSANA: FORMAS E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS 22
2.8 NANOPARTÍCULAS 25
2.8.1 Nanopartículas de quitosana 28
2.8.2 Caracterização de nanopartículas poliméricas 29
2.9 LIOFILIZAÇÃO 32
3 JUSTIFICATIVA 35
4 OBJETIVOS 37
4.1 Objetivos gerais 37
4.2 Objetivos Específicos 37
5 MATERIAIS E MÉTODOS 38
5.1 SÍNTESE DO COMPOSTO 38
5.1.1 ETAPA A: Esterificação de Fisher 39
5.1.2 ETAPA B: Hidrazinólise 39
5.1.3 ETAPA C: Obtenção de bases de Schiff 40
5.1.4 Identificação dos compostos 40
5.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA (*Nps-H* e *Nps-Cs*) . 40

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS 44
5.3.1 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) ... 44
5.3.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%) 44
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 45
5.4.1 Preparo do inóculo e determinação de resistência 45
5.4.2 Determinação da atividade antibacteriana 47
5.5 ANÁLISES TÉRMICAS 50
5.5.1 Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry - DSC) 50
5.5.2 Criomicroscopia 50
5.7 LIOFILIZAÇÃO 51
5.8 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). 51
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
6.1 Síntese e Identificação dos análogos 52
6.1.1 Obtenção do benzoato de metila 52
6.1.2 Obtenção e identificação da benzidrazida 53
6.1.3 Obtenção de Base de Schiff 54
6.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS 57
6.2.1 Experimentação empírica 57
6.2.2 Planejamento fatorial para otimização do processo de obtenção das nanopartículas de quitosana com o análogo *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida* (*Nps-H*) 60
6.3 ENSAIO BIOLÓGICO 72
6.3.1 Determinação da resistência das cepas de *S. aureus* 72
6.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima 73
6.4 ANÁLISES TÉRMICAS 75
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 89
REFERÊNCIAS 90

Índice de Figuras

Figura 1 – Formas de propagação de microrganismos multirresistentes 4
Figura 2 - Estrutura da pele e seus anexos 7
Figura 3 – Evolução da introdução de antimicrobianos na terapêutica versus o aparecimento das resistências bacterianas. 11
Figura 4 - Etapas da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos 12
Figura 5 - Subestrutura fundamental dos nitrocompostos mais utilizados na terapêutica. 14
Figura 6 - Rota aeróbia e anaeróbia do mecanismo de ação dos nitrocompostos. ..15
Figura 7 - estrutura química da nifuroxazida 15
Figura 8 - Mecanismos de liberação de fármacos 22
Figura 9 - Estrutura química da quitosana. 22
Figura 10 - Diferentes formações de PEC. 23
Figura 11 – Formas de dispersão de fármacos em nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. 25
Figura 12 - Mecanismos de liberação do fármaco das nanopartículas no endotélio 27
Figura 13 - Potencial zeta (ζ) de uma partícula. 31
Figura 14 - Rota geral de síntese do análogo *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* 39
Figura 15 - Esquema geral de preparação das *Nps-H*. 42
Figura 16 - Curva de calibração em espectrofotômetro para o composto a 370 nm. 45
Figura 17 – Cultivo e obtenção de inóculos de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus.* 47
Figura 18 – Representação do esquema utilizado para determinação da atividade antimicrobiana de *C-H*, *Nps-H* e *Nps-Cs* em microplaca. 49
Figura 19 - Exemplo de determinação da concentração inibitória mínima. 49
Figura 20 - *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida*. 52
Figura 21 - Mecanismo de formação de ésteres por esterificação de Fischer.....52
Figura 22 - Mecanismo da reação de hidrazinólise 53
Figura 23 - Mecanismo de reação para obtenção das bases de Schiff. 55
Figura 24 - Espectro de RMN ^{1}H do composto *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida* 56

Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C composto N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno) benzidrazida 57
Figura 26 – Diâmetro por intensidade das nanopartículas obtidas a partir do experimento empírico 59
Figura 27 – Diâmetros médios por intensidade das *Nps-H* dos experimentos do planejamento fatorial. 62
Figura 28 - Diagrama de Pareto: Avaliação de influência de variáveis de concentração de NaCl e Polissorbato *80* (Tween 80) e interação [NaCl]*[Tween *80*] na caracterização de *Nps-H.* 64
Figura 29 - Superfície de Resposta para a avaliação da influência das concentrações de NaCl e Polissorbato 80 (Tween 80) nas respostas estudadas. 64
Figura 30 - Estrutura de uma micela com fármaco hidrofóbico 68
Figura 31 - Tamanho por número das micelas com composto, micelas sem composto e micelas com composto na presença de 0,9% de NaCl 69
Figura 32 - Curva de calibração em espectrofotômetro em diferentes concentrações de Polissorbato 20 a 200 nm para determinação da EE% do tensoativo. 70
Figura 33 - Possível formação das nanopartículas e encapsulação do composto com e sem NaCl no sistema. 72
Figura 34 - Ensaio de disco-difusão frente as cepas *ORSA e hVISA.* 72
Figura 35 - Concentração inibitória mínima do composto livre (*C-H*), das nanopartículas com composto (*Nps-H*) e das nanopartículas vazias (*Nps-Cs*) frente às cepas de *Staphylococcus aureus.* 74
Figura 36 – Temperaturas de transição vítrea e Temperaturas eutéticas.....77
Figura 37 - Determinação das temperaturas de colapso das amostras por microscópio óptico acoplado à câmara de liofilização. 78
Figura 38 - Aparência dos *cakes* dos produtos liofilizados *Nps-H*, *Nps-H* glicina, lactose e sacarose a 2,5%, 5% e 10%. 80
Figura 39 - Colóides resultantes da ressuspensão dos *cakes* liofilizados. 82
Figura 40 - Estruturas químicas dos excipientes utilizados no processo de liofilização.....84

Figura 41 - Representação das interações entre as moléculas de glicina e as *Nps-H.* 84
Figura 42 - Análise de DSC do pico de decomposição da quitosana 86
Figura 43 - Imagens de MEV das *Nps-Cs* (A) e *Nps-H* (B) recorbertas com platina.87
Figura 44 – Imagem MEV das *Nps-H* liofilizadas. 88

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida frente a diferentes cepas de Staphylococcus. 16
Tabela 2 - Exemplos de sistemas de liberação de fármacos. 19
Tabela 3 - Planejamento fatorial das nanopartículas de quitosana carregadas 43
Tabela 4 - Planejamento fatorial para obtenção das nanopartículas de quitosana com o composto (*Nps-H*) variando a concentração de NaCl e Polissorbato *80*. 61
Tabela 5 - Concentração de composto disponível para nanoencapsulação após filtração. 67
Tabela 6 - Tamanho e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas com e sem Polissorbato *20*. 69
Tabela 7 - Avaliação da EE% de Polissorbato *20* com e sem NaCl. 70
Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima do C-H, *Nps-H* e *Nps-Cs* frente às cepas de S. aureus ATCC 29213, hVISA e ORSA. 74
Tabela 9 - Comportamento térmico das *Nps-H* com diferentes excipientes. 79
Tabela 10 - Características das *Nps-H* após ressuspensão do produto liofilizado. .. 83

RESUMO

ANDRADE, Laura Freitas de. **Vetorização de compostos 5-nitro-heterocíclicos com atividade frente a microrganismos multirresistentes. *Obtenção de nanopartículas carregadas e avaliação da atividade antimicrobiana*.** 2018. 110 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Pacientes com queimaduras e outras lesões cutâneas de grande extensão apresentam alta propensão a infecções multirresistentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é a obtenção de nanopartículas de quitosana carregadas com composto derivado de 5-nitro-heterocíclico com estrutura análoga à nifuroxazida, *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-benzidrazida* (*C-H*), que apresentou importante atividade frente a diversas cepas de bactérias multirresistentes. Por sua vez, a quitosana é um biopolímero com atividade antimicrobiana, analgésica, regeneradora tecidual e que, mediante contato com exsudato de lesões cutâneas forma filmes hidrogéis protetores no local de aplicação, sendo estas atividades importantes para a prevenção e tratamento de infecções e da exsudação excessiva de lesões de grande extensão. As nanopartículas de quitosana carregadas com o composto (*Nps-H*) foram obtidas pelo método de gelificação iônica com tripolifosfato de sódio como agente reticulante, variando a concentração de NaCl e polissorbato 80 do sistema, orientada por análise fatorial. As *Nps-H* obtidas foram caracterizadas por *Dynamic Light Scattering* (DLS) para determinação do tamanho, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ). A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por espectrofotometria UV/VIS a 370 nm por método indireto. Entre os experimentos desenvolvidos, aquele que apresentou os melhores resultados resultou em partículas de tamanho médio de 321 d.nm, IPD 0,18, Pζ +37 mV e EE% de 48%. A morfologia e superfície das *Nps-H* foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e mostraram que as *Nps-H* são esféricas e de superfície irregular. A partir da obtenção e caracterização das *Nps-H* determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) das *Nps-H*, do composto livre (*C-H*) e das nanopartículas de quitosana vazias (*Nps-Cs*) por método colorimétrico e microdiluição frente às cepas de *Staphylococcus aureus ATCC 29213*, *hVISA* e *ORSA*. As *Nps-H* apresentaram atividade bastante superior comparando-se ao *C-H* e as *Nps-Cs* frente às cepas de *S. aureus* estudadas. Com vista à preparação de uma formulação farmacêutica estável, partiu-se para a liofilização das *Nps-H* e com esse objetivo realizou-se análises térmicas das *Nps-H* por *Differential Scanning Calorimetric* (DSC) para determinação das temperaturas de transição vítrea e eutética (*Tg'* e *Teut*) e análise por criomicroscopia para determinação da temperatura de colapso (*Tcol*). Amostras de *Nps-H* com lio/crioprotetores glicina, lactose e sacarose a diferentes concentrações foram liofilizadas a -40 ºC a 100 mTorr. As amostras de *Nps-H* com lactose e sacarose ambas a 2,5% e 5% demonstraram preservar as características originais das *Nps-H* após o processo de liofilização. Observou-se, com os resultados obtidos neste trabalho que as *Nps-H* representam uma promissora alternativa na prevenção e tratamento de pacientes com lesões cutâneas infeccionadas por bactérias multirresistentes e no controle da exsudação excessiva, principalmente por suas atividades terapêuticas em conjunto, diminuindo a mortalidade e morbidade desses quadros.

Palavras-chave: Nifuroxazida. Nanopartículas. Quitosana. Antimicrobiano.

ABSTRACT

ANDRADE, Laura Freitas de. **Vectorization of 5-nitro-heterocyclic compounds with activity against multiresistant microorganisms. Obtaining of loaded nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity**. 2018. 110 p. Dissertation (Master's Degree in Biochemical-Pharmaceutical Technology) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Patients with burns and others extensive skin lesions show high propension to multiresistant infections. In this context, the aim of this project is to obtain chitosan nanoparticles carried with 5-nitro-heterocyclic derivate with structure analogue to nifuroxazide *N'-((5-nitrofuran-2-yl) methylene)-2-benzhydrazide*, that showed important activity against multiresistant bacteria strains. In its turn, the chitosan is a biopolymer with antimicrobial, analgesic, tecidual regenerator activities and by contact with excessive burns and extensive skin lesions exsudate process, form protective hydrogel films on place of application, being these activities important to infection and excessive exsudate treatment and prevention of extensive burns and lesions. The chitosan nanoparticles carried with compound (*Nps-H*) were obtained by ionic gelation method with sodium tripolyphosphate as crosslinker agent, varing the NaCl and polysorbate 80 concentrations in the system, oriented by factorial analyze. The *Nps-H* obtained were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) to size determination, polydispersion index (PDI) and zeta potential (ζ-P). The encapsulation efficiency (EE%) were determined by spectrophotometry UV/VIS at 370 nm by indirect method. Bepolissorbato the experiments developed, the one who showed the best results, resulted in particles with size of 321 d.nm, PDI of 0,18, ζ-P of +37 mV and EE% of 48%. The *Nps-H* morphology and surface were analyzed by Scanning Electronic Microscopy (SEM) and showed that *Nps-H* are spherical and with irregular surface. Starting of *Nps-H* obtain and characterization were determined the *Nps-H*, free compound (*C-H*) and empty chitosan nanoparticles (*Nps-Cs*) Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) by colorimetric method and microdilution against Staphylococcus aureus ATCC 29213, ORSA and hVISA strains. The *Nps-H* showed the superior activity comparing to C-H and *Nps-H* against all strains tested. With a view to preparation of stable pharmaceutic formulation, started to *Nps-H* freeze-drying and with this aim, were realized *Nps-H* thermal analyzes by Differential Scanning Calorimetric (DSC) to determine glass transition and euthetic temperatures (*Tg'* and *Teut*) and the cryomicroscopy analyze to determine collapse temperature (*Tcol*). The *Nps-H* samples with lyo/cryoprotectants as glycine, lactose and sucrose at different concentrations were lyophilized at -40 ºC at 100 mTorr. The *Nps-H* samples with lactose and sucrose both at 2,5% and 5% demonstrated to preserve the original *Nps-H* characteristics after freeze-drying process. Were observed, with the results obtained in this project that *Nps-H* represent the promising alternative to prevention and treatment of patients with infected skin lesions by multiresitant bacteria and to control of excessive exudate process, mainly by their therapeutic activities combined, decreasing the mortality and morbidity of these cases.

Keywords: Nifuroxazide. Nanoparticles. Chitosan. Antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

As infecções por microrganismos, atualmente, têm sido uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde (OMS), principalmente por muitas infecções se tornarem resistentes ao redor do mundo, pelo tratamento inadequado no âmbito hospitalar; pelo uso excessivo de antimicrobianos na agricultura; pela disseminação das infecções pelos profissionais da saúde e assim, causam cerca de 700 mil óbitos em âmbito global por infecções multirresistentes (WHO, 2014, CDC, 2017).

Muitas lesões de pele causadas por queimaduras, diabetes, deficiência circulatória, entre outras causas; são contaminadas por bactérias multirresistentes ou que passam a adquirir multirresistência, podendo causar sepse e amputações de membros, demonstrando alta morbidade e mortalidade (GREENHALGH, 2017). Neste contexto, o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos e novas formas farmacêuticas são essenciais para o combate dessas formas multirresistentes de infecções, propiciando desta forma, o tratamento mais adequado a esses quadros.

Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com estrutura análoga à nifuroxazida têm se mostrado potencialmente superior a antimicrobianos usuais, como a vancomicina, no combate a infecções causadas por microrganismos multirresistentes como as cepas *Meticilin Resistant Staphylococcus aureus* (*MRSA), Heterogeneous vancomiciyn intermediate Staphylococcus aureus (hVISA)* e *Oxacilin Resistant Staphylococcus aureus* (*OXA-R)* (ZORZI, 2013; SILVA NETO, 2017).

Ainda que esses compostos sejam bastante ativos, eles possuem alta lipofilicidade, o que compromete suas biodisponibilidades e tornam-se inviáveis para administração. Neste sentido, a busca por sistemas de liberação e distribuição para fármacos lipofílicos têm avançado nos últimos anos, visando aumentar a biodisponibilidade desses fármacos *in vivo*, reduzir efeitos adversos e otimizar os tratamentos convencionais (CHUNG *et al*., 2004, RAMASAMY *et al*., 2017).

Para alcançar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico adequados, são necessários ajustes farmacotécnicos, como a associação com polímeros, formação de nanopartículas, misturas de solventes e o uso de surfactantes (FLORENCE; ATWOOD, 2003; DURÁN *et al*., 2010; FONSECA, 2012).

Nos sistemas de liberação de fármacos, diversos sistemas de transporte têm sido estudados para moléculas lipofílicas, como a latenciação de fármacos, sistemas emulsionados, as nanopartículas poliméricas, as ciclodextrinas, tais sistemas que propiciam o aumento da biodisponibilidade desses compostos e pode reduzir efeitos adversos (RAUTIO *et al*., 2008; TIWARI, *et al*., 2012).

Entre as nanopartículas poliméricas mais estudadas estão as nanopartículas de quitosana (JAYAKUMAR *et al*., 2010; ALJEBORYL, ALSAMAN, 2017). A quitosana é um biopolímero natural com diversas ações terapêuticas, como analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, antihiperlipidêmica, entre outras; além de características físico-químicas importantes, como a formação de hidrogéis e filmes protetores (ALJEBORYL, ALSAMAN, 2017).

Diversos estudos de fármacos inclusos em nanopartículas de quitosana como antivirais, antineoplásicos, antimicrobianos e imunomoduladores demonstraram aumento em sua biodisponibilidade e aumento da atividade biológica em comparação ao fármaco isolado (CARONI, 2009, BARBI, 2011, KANG *et al*; 2015, LIMA, 2013, NEVES, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho apresenta a proposta de unir a atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* com caráter de multirresistência do composto *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* de estrutura análoga à nifuroxazida, em nanopartículas de quitosana que apresentam ações terapêuticas importantes, propiciando a utilização desse composto para aplicação em lesões cutâneas infeccionadas por bactérias multirresistentes. A proposta apresenta como principal fundamento o aumento da biodisponibilidade do composto antimicrobiano e a formação de filme protetor de quitosana em feridas e queimaduras, protegendo de outros patógenos e auxiliando na diminuição do processo de exsudação em lesões de grande extensão.

2 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

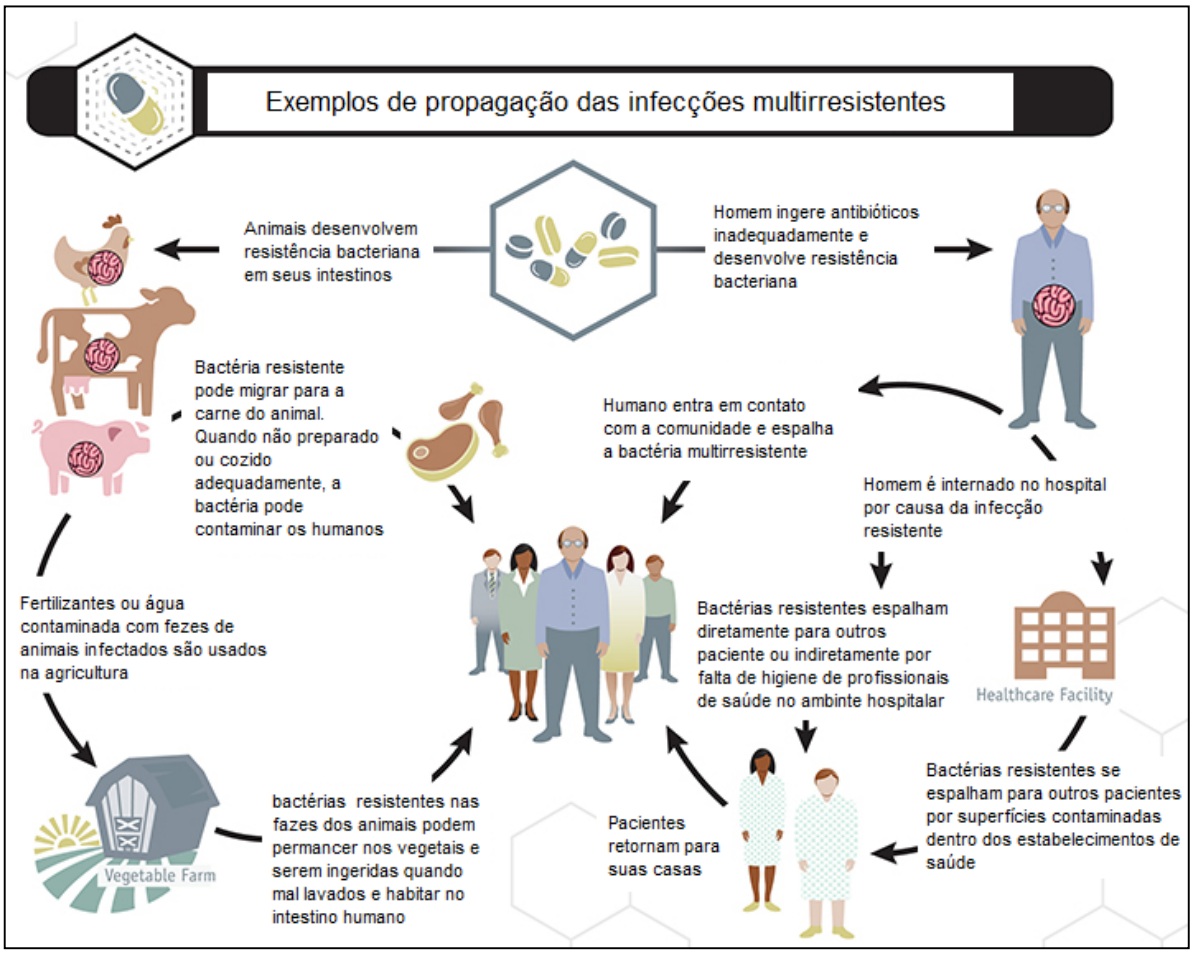
2.1 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Conforme dados reportados por Control Disease Center (2017), cerca de 2 milhões de pessoas nos Estados Unidos adquirem infecção multirresistente e cerca de 23 mil pessoas morrem em decorrência dessas infecções. Em âmbito global, cerca de 700 mil pessoas morrem por causa de infecções multirresistentes (WHO, 2014). A OMS, estima que 50 a 60% das infecções hospitalares são ocasionadas por microrganismos multirresistentes (WHO, 2014). No Brasil, os estudos epidemiológicos acerca de infecções hospitalares e de incidência de resistência bacteriana são limitados, porém, esses estudos estão sendo incentivados pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e o Ministério da Saúde (ANVISA, 2017).

Em estudo realizado por Jim O'Neil, em 2016, estima-se que em 2050 haverá cerca de 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo causadas por infecções multirresistentes, correspondente a 1 morte a cada 3 segundos, o que resulta em extrema preocupação para os órgãos de saúde de todo o mundo (REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016).

Ressalta-se que as causas atribuídas à resistência de microrganismos aos tratamentos atualmente disponíveis estão relacionadas, principalmente, ao excesso de prescrições, indicação e utilização incorreta de antimicrobianos, como dose e duração do tratamento; contato com antimicrobianos de forma indireta, como o consumo de bovinos, suínos e frangos tratados com antibióticos; por água contaminada com bactérias e antimicrobianos provenientes de processos industriais; entre outras formas (Figura 1) (WHO, 2014; CDC, 2017).

Figura 1 – Formas de propagação de microrganismos multirresistentes



Fonte: Adaptado de CDC (2017).

Existem dois mecanismos de desenvolvimento de resistência bacteriana que são a resistência natural e a resistência adquirida. O mecanismo de resistência natural ocorre por mutação espontânea de um gene bacteriano, independente dos fatores de exposição. Este mecanismo é bem menos comum que o mecanismo de resistência adquirida, que por sua vez, envolve fatores externos de propagação por exposição da bactéria a antimicrobianos, que induz uma resposta de adaptação bacteriana. A resposta de adaptação pode ocorrer de diversas formas, como aquisição de bombas de efluxo do antimicrobiano, aquisição de genes que codificam enzimas que inativam o antimicrobiano, alteração da estrutura celular como paredes e citoplasma, alterando o acesso do antimicrobiano ao conteúdo intracelular (BLAIR *et al*., 2014; VENTOLA, 2015).

Dentre as bactérias multirresistentes mais comuns citam-se as bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e *Enteroccocus*. Os primeiros casos

de resistência de *Staphylococcus aureus* foram reportadas em 1942, em que foram encontradas cepas resistentes à penicilina, um agente beta-lactâmico inibidor da biossíntese de parede celular bacteriana. A resistência resulta da indução do desenvolvimento de beta-lactamases, enzima que provocam a abertura do anel beta-lactâmico das penicilinas e, consequentemente, a sua inativação (VENTOLA, 2015).

Neste cenário, foram desenvolvidas alternativas à penicilina, resultando em novas gerações de penicilinas resistentes à beta-lactamase, como a meticilina e a oxacilina (VENTOLA, 2015). Todavia, por razão da disseminação das infecções no âmbito hospitalar, as cepas de *Staphylococcus aureus* tornaram-se resistentes a meticilina (*Methicilin resistant S. aureus - MRSA*) e, atualmente, 20 a 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* foram identificadas como resistentes a esse antimicrobiano na América Latina (WHO, 2014). Nesse contexto, outros antimicrobianos como a vancomicina, que também atua por inibição da biossíntese de parede bacteriana, inibindo as ligações nas subunidades de ácido N-acetilmurânico e N-acetilglucosamina das bactérias, tornando a parede celular bacteriana deficiente e promove a lise celular, apresentou-se como alternativa para o emprego em âmbito hospitalar, porém, ainda assim foram encontradas cepas de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (*Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus - VISA*) e com resistência total à vancomicina (*Vancomycin resistant Staphylococcus aureus - VRSA*) (WHO, 2014; VENTOLA, 2015).

Além do gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus*, várias outras bactérias e fungos têm apresentado importância clínica em relação às infecções hospitalares e multirresistência. Um exemplo são as bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos, por apresentarem a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), como as bactérias *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Serratia marcensces, Pseudomonas aeruginosa, Acinobacter baumanni e Enterobacter clocae* (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Outro exemplo é o fungo do gênero *Candida spp*., em que algumas cepas apresentaram resistência aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, como os derivados azólicos como o fluconazol, cetoconazol e itraconazol, que são inibidores da biossíntese do ergosterol, que impede a formação da parede celular (MORSCHHAUSER, 2016).

No contexto apresentado em relação à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos, destaca-se a necessidade do planejamento e desenvolvimento de

novos antimicrobianos, com potencial atividade frente a infecções multirresistentes (REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016). O investimento associado a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos não tem sido o suficiente para suprir a necessidade deste cenário alarmante das infecções multirresistentes. Isso se deve a pouco retorno que esses medicamentos têm para a indústria, como: tempo curto de tratamento (7 a 10 dias); restrições quanto ao uso, como alguns de uso exclusivamente hospitalar e injetáveis; utilização terapêutica limitada, devido ao aparecimento de resistência e muito investimento associado a alto risco de mercado (WHO, 2011).

Neste sentido, é necessário o incentivo para a descoberta de novas moléculas e formas farmacêuticas que diminuam o aparecimento de resistências, que tenham baixa toxicidade, perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos adequados a fim de contornar este cenário alarmante (REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016).

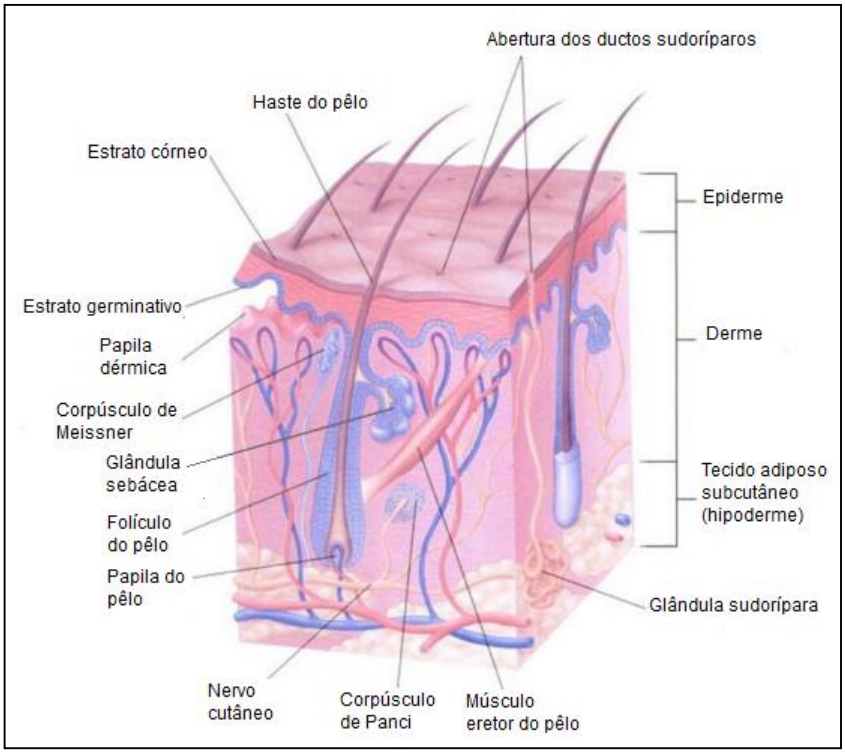
2.2 ESTRUTURA DA PELE

A pele humana é um órgão do sistema tegumentar responsável por manter uma barreira de proteção ao nosso corpo, impedindo fatores de risco à exposição com o meio ambiente, como infecções e algumas lesões; tendo a função de regular a temperatura corporal e a homeostase hidroelétrica; e é responsável pela atividade dos sentidos (MOORE, 2014; PATTERSON, 2016).

A estrutura da pele (Figura 2) é composta por camadas que apresentam diferentes funções, e são elas: 1- Epiderme: camada mais externa da pele, composta por tecido delgado de epitélio escamoso estratificado, em que as células firmemente ligadas estão arranjadas em muitas camadas. As camadas mais internas possuem o estrato germinativo, que realizam mitose e essas novas células vão aproximando-se da parte externa do epitélio estratificado, chamada de estrato córneo, e passam a incorporar a queratina como proteína de composição. A barreira de proteção deve-se principalmente à capacidade de autorreparação desse tecido, mantendo uma barreira efetiva frente a infecções. A camada celular mais profunda da epiderme é composta por melanócitos, responsáveis pela produção de melanina (MOORE, 2014; PATTERSON, 2016) e 2- Derme: camada mais profunda da pele, composta por tecido

conectivo, em que as células encontram-se mais afastadas que as da epiderme, com fibras de colágeno com característica resistente nos intervalos. Na derme estão presentes os neurônios sensoriais, como o *corpúsculo de Panci* (sensação de pressão); *corpúsculo de Meissner* (toque leve); *terminações nervosas livres* (dor) e *bulbos terminais de Krause* (tato, vibração e calor) (MOORE, 2014; PATTERSON, 2016).

Figura 2 - Estrutura da pele e seus anexos



Fonte: Adaptado de Thibodeau e Patton (2002).

2.3 QUEIMADURAS E OUTRAS LESÕES DA PELE

As queimaduras são feridas traumáticas ocasionadas por agente térmico, químico ou elétrico. As queimaduras danificam a estrutura da pele comprometendo suas funções, podendo danificar seus anexos e outros órgãos dependendo de sua extensão e profundidade, podendo atingir músculos e tendões (PATTERSON, 2016).

As queimaduras podem ser classificadas, de acordo com sua profundidade, em queimadura de 1° grau, caracterizada por queimaduras leves, acometendo apenas a epiderme; queimadura de 2° grau, acometendo a epiderme e parte da derme,

caracterizado pela formação de flictenas e, por fim, queimadura de 3° grau, que acomete todas as estruturas da pele (PATTERSON, 2016).

Há diversas alterações fisiológicas locais e sistêmicas que ocorrem quando o paciente é acometido por queimaduras. A resposta local se caracteriza pela perda das funções normais da pele, como proteção a infecções, perda de calor corpóreo, desequilíbrio hemodinâmico pela perda de água, eletrólitos e proteínas e a mudança da aparência e da sensibilidade da pele (KECK *et al*., 2009, PATTERSON, 2016).

Com o calor no momento da queimadura, proteínas são desnaturadas e ocorre perda da integridade da membrana plasmática das células e após esse fenômeno, rapidamente há recrutamento de mediadores inflamatórios envolvidos no processo de necrose do tecido (KECK *et al*., 2009; PATTERSON, 2016).

Outras lesões de pele são atribuídas a pacientes com diabetes; com problemas de má circulação sanguínea, com insuficiência cardiorrespiratória; com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); com doenças autoimunes e com impetigo; entre outras lesões sujeitas a infecções e/ou com caráter necrosante (HOLT *et al*., 2017).

2.3.1 Morbidade que acometem os pacientes queimados e com outras lesões de pele

As lesões cutâneas expostas apresentam grande risco de infecção em presença de patógenos do ambiente hospitalar ou por translocação bacteriana. Os tecidos acometidos pelas queimaduras grau 2 e 3 e por outras lesões profundas que acometem a derme (com os anexos da pele), são caracterizados por hipóxia local, que ocorre pela trombose ocasionada pelo trauma, dificultando a cicatrização e, além disso, a presença de tecidos necróticos facilitam o desenvolvimento de infecções por patógenos que necessitam de pouco oxigênio para sua sobrevivência, como as bactérias anaeróbias e aeróbias facultativas, por exemplo, o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*. A presença desses patógenos eleva a probabilidade de desenvolvimento de sepse, que está relacionada a altas taxas de mortalidade (HIDALGO *et al*., 2016).

Em estudo realizado no Hospital Regional Asa do Norte na cidade de Brasília (DF) por Kretzschmar (2016), 186 pacientes queimados foram analisados e cerca de 15% desses pacientes apresentaram sepsemia, parte por bactérias multirresistentes como *Staphylococcus aureus, Acinobacter baumanni, Enterobacter cloacae,*

Klebsiella pneumoniae e *Pseudomonas aeruginosa*. Outro estudo realizado na Unidade de Terapia Intensiva do Centro de Tratamento de Queimados do Hospital Universitário de Londrina por Coutinho *et al*. (2015) analisou 171 pacientes, em que cerca de 67% apresentou pelo menos um episódio de sepse e 43% desses pacientes vieram a óbito.

A necrose presente nos tecidos acometidos pela queimadura e por outras lesões ocasionadas por má circulação sanguínea caracterizadas por isquemia local, dificulta a chegada de antimicrobianos no local por via sistêmica, sendo necessária a utilização de agentes antimicrobianos tópicos (HIDALGO *et al*., 2016). Além das infecções locais, a morbidade dessas lesões também está relacionada ao desequilíbrio volêmico, pela grande perda de líquidos no processo de exsudação, ocorrendo perda hídrica, juntamente com importantes componentes sanguíneos, como a albumina, vitaminas e minerais (GUO; XIA, 2014).

2.3.1.1 Tratamento tópico das queimaduras e outras lesões

Sabe-se que alguns agentes tópicos auxiliam na reconstituição dos tecidos, podendo ser antimicrobianos ou não (ROWAN *et al*., 2015). No contexto dos antimicrobianos tópicos, um dos mais utilizados é a sulfadiazina de prata, que tem a função de combater a infecção local e auxiliar na secção de tecidos necrosados (ROWAN *et al*., 2015). A sulfadiazina de prata possui amplo espectro de ação, tanto em bactérias gram-negativas como *Escherichia coli, Klebisiella sp. e Pseudomonas aeruginosa*, quanto em bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas multirresistentes como a *MRSA* (ROSEN *et al*., 2015; ROWAN *et al*., 2015).

A atividade antimicrobiana da sulfadiazina de prata está associada à sua ação na membrana e na parede celular microbiana, promovendo o rompimento das mesmas. O íon prata (Ag^+) é liberado lentamente e seu efeito está associado a sua ligação às hélices do DNA bacteriano (FRANCO, *et al*., 2008).

Conforme dados da literatura (ROSEN *et al*., 2015), a sulfadiazina de prata apresenta toxicidade frente à queratinócitos em concentrações abaixo da usual e retarda o processo de cicatrização por diminuir a expressão de citocinas inflamatórias em camundongos. Esses dados demonstram que a sulfadiazina de prata deve ser

utilizada com cautela em lesões sem sinais de epitelização, pois a mesma pode dificultar o processo de cicatrização.

Outros tratamentos são utilizados em menor escala, como o creme de gentamicina 0,1% e o creme de nitrofurazona 0,2%. Esses medicamentos também de uso tópicos apresentam menor eficácia em relação a sulfadiazina de prata 1% e relata-se que o creme de nitrofurazona 0,2% ocasiona dores na aplicação, além de ser tóxico aos queratinócitos (FERREIRA *et al*., 2003; ROWAN *et al*., 2015).

Outros tratamentos são utilizados para auxiliar na reepitelização da pele, como o mel e a papaina, que promovem cicatrização mais rápida em relação aos pacientes que utilizam sulfadiazina de prata 1% (ROWAN *et al*., 2015). Existem os substitutos e pele que são utilizados em situações de espera de enxertos definitivos e em queimaduras e lesões profundas e extensas. Os substitutos de pele podem ser de origem animal; sintético e de derivados orgânicos e devem possuir as propriedades de aderência, transporte de vapor d'água, baixa alergenicidade e toxicidade, capacidade homeostática e ação antibacteriana (FRANCO, *et al*., 2008; PACHUAU, 2015).

2.4 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

O setor farmacêutico é um dos setores que mais investem em pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) e, segundo a Pharmaceutical Research and Manufactures of America (Phrma, 2014), as companhias farmacêuticas investiram cerca de 51,1 bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, cerca de 5.000 novos fármacos estão em desenvolvimento no mundo, cerca de 3.500 estão nos Estados Unidos.

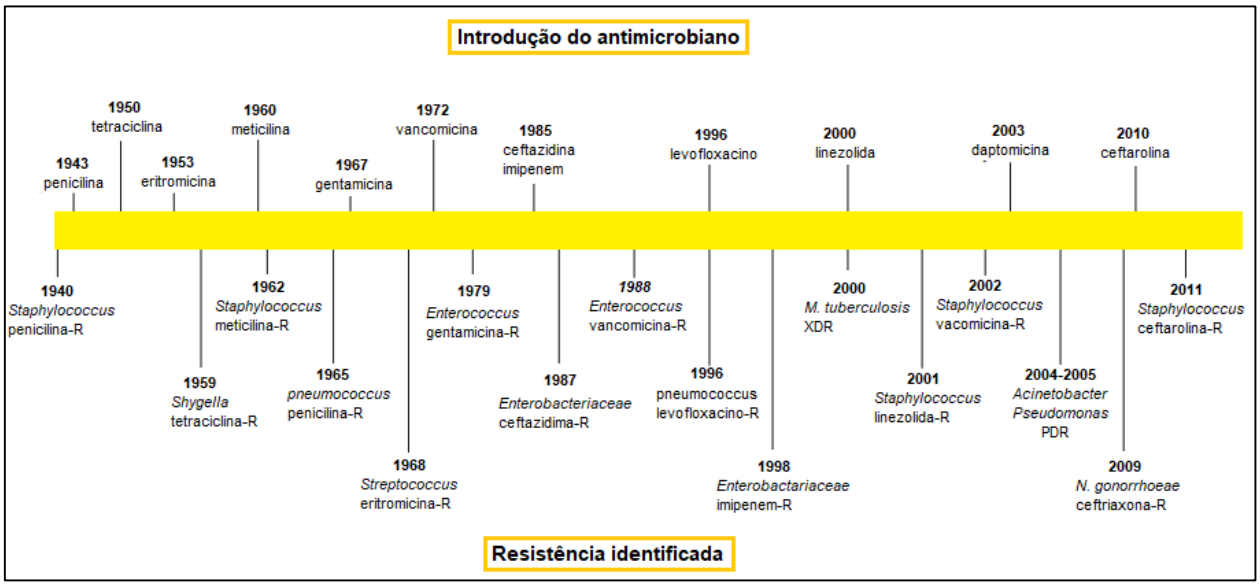
O desenvolvimento de novos fármacos no Brasil não é tão expressivo, contribuindo com apenas 0,2% em 2010 do capital total investido em PD&I de novos fármacos. As etapas de P&D de novos fármacos até sua inserção no mercado levam em média cerca de 10 a 15 anos (Pharma, 2014).

No âmbito do planejamento e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, seu início ocorreu por Paul Ehrlich, considerado o "pai" da quimioterapia, em que desenvolveu o fármaco salvarsan para o tratamento de sífilis em 1910. Anos mais tarde, em 1928, Alexandre Fleming descobriu a penicilina,

substância antibiótica proveniente de culturas do fungo de gênero *Penicillium*. Assim, a penicilina foi introduzida na terapêutica em 1940, durante a segunda guerra mundial (CHOPRA, 2013, CDC, 2013).

A partir desse evento, o desenvolvimento de novos antimicrobianos aumentou significativamente, com a introdução de antimicrobianos semi-sintéticos, uma vez que em 1940 já foram encontradas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina. Introduziu-se as penicilinas de segunda e terceira geração, posteriormente as cefalosporinas, tetraciclinas, os aminoglicosídeos, as fluorquinolonas e a linezolida (CHOPRA, 2013, CDC, 2013), conforme mostra a Figura 3.

Figura 3 – Evolução da introdução de antimicrobianos na terapêutica versus o aparecimento das resistências bacterianas.



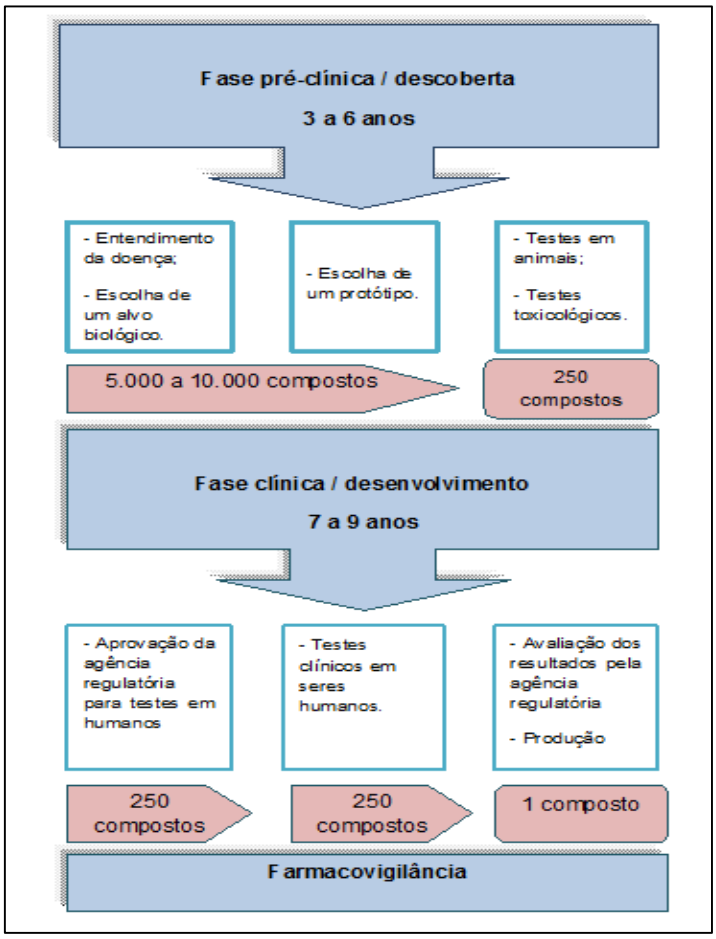
R: Resistente; PDR: Pan-drug resistant (pan-resistência a fármacos); XDR: Extensively drug resistant (extensivamente resistente a fármacos).

Fonte: Adaptado de CDC (2013).

2.4.1 Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é dividido em duas grandes fases que são a fase pré-clínica/descoberta e clínica/desenvolvimento, conforme a Figura 4 (ANVISA, 2010; MONTANARI *et al*., 2011; PHARMA, 2014).

Figura 4 - Etapas da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos



Fonte: Adaptado de Montanari *et al*. (2011).

A Figura 4 mostra todas as etapas citadas para a PD&I em fármacos, desde o descobrimento de uma molécula, que leva de 3 a 6 anos, começando com uma faixa de 5 mil a 10 mil candidatos à fármacos e culminando em aproximadamente 250 candidatos; a fase clínica que se caracteriza por testes *in vivo* em voluntários humanos sadios que demanda cerca de 7 a 9 anos, culminando em apenas 1 fármaco farmacologicamente aceito pelo órgão regulatório; até a fase de farmacovigilância, em que o fármaco é avaliado conforme as notificações de efeitos adversos percebidos pela comunidade (MONTANARI *et al*., 2011).

O planejamento racional de fármacos pode ser realizado a partir de um grupo de moléculas com determinada atividade ou a partir de um composto protótipo que necessita de modificações estruturais ou farmacotécnicas para melhor desempenho farmacocinético e/ou farmacodinâmico. As modificações realizadas em uma molécula bioativa pode ser realizada a partir da identificação de compostos com determinado

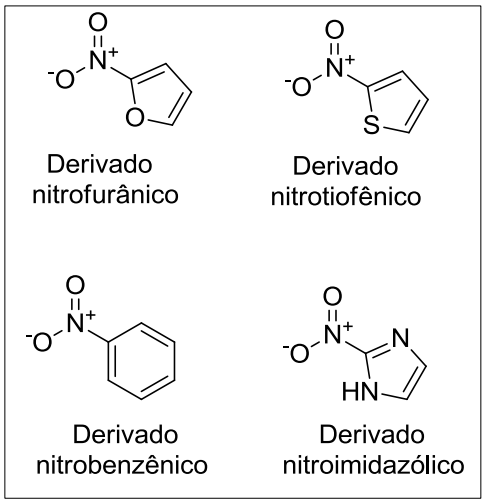
efeito biológico de forma aleatória (varredura sistemática); identificação das possibilidades de tratamento de ativos amplamente utilizados em medicinas populares ou na observação de eventos adversos que possam ser aproveitados como efeitos terapêuticos; o estudo dos sítios ativos e compartimentos biológicos que permita o desenvolvimento de moléculas seletivas para esses sítios e a otimização de fármacos ou compostos bioativos, melhorando seus aspectos físico-químicos, farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos (MONTANARI *et al*., 2011).

2.5 NITROCOMPOSTOS

Os nitrocompostos possuem diversas aplicações farmacêuticas, entre elas citam-se as atividades como anti-hipertensivos (nifedipina, nitredipina, nisoldipina); antianginosos (dinitrato de isossorbida, nitroglicerina); anti-inflamatórios (nimesulida); sedativos hipnóticos (nitrazepam); anti-histamínicos (ranitidina); antibacterianos (cloranfenicol, metronidazol, nitrofural, nifuroxazida); antineoplásicos (nitacrina); e antiparasitários (metronidazol, tinidazol, secnidazol, benznidazol e nifurtimox) (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009). Os nitrocompostos têm recebido atenção especial quanto a suas ações antineoplásicas, antibacterianas e antiparasitárias (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Dentre os nitrocompostos que apresentam atividade biológica, os de maior relevância são os derivados nitrofuranos; nitrotiofenos; nitrobenzenos e os nitroimidazóis (Figura 5). Esses compostos são utilizados como protótipos em diferentes grupos de pesquisa focando o planejamento e desenvolvimento de fármacos, otimizações moleculares, favorecendo a atividade biológica, principalmente frente a células cancerígenas, bacterianas, parasitárias e fúngicas (ROLDÁN, *et al*., 2008; OLENDER *et al*., 2009; PATTERSON; WYLLIE, 2014, RAGNUM *et al*., 2015).

Figura 5 - Subestrutura fundamental dos nitrocompostos mais utilizados na terapêutica.



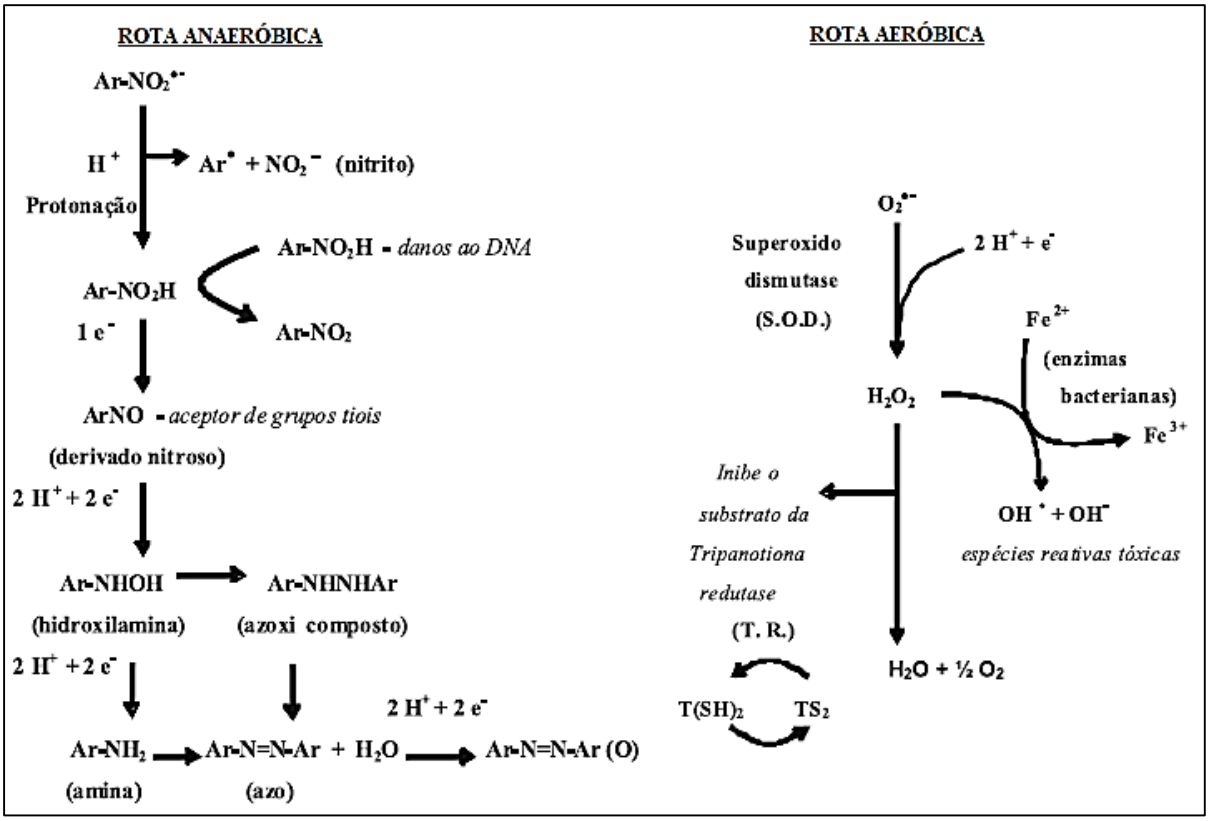
Fonte: Paula, Serrano e Tavares (2009).

Entre os efeitos tóxicos relacionados aos nitrocompostos, destacam-se os problemas gastrointestinais como estomatites, diarréia e náuseas; além de outros como dermatites, polineurites e discrasias sanguíneas. Esses efeitos são agravados com o aumento da dose e decorrentes do grau de hipersensibilidade do usuário. Acredita-se que a toxicidade dos nitrocompostos está relacionada a danos causados ao DNA, supostamente ocasionados por radicais intermediários altamente reativos, como Ar-NO_2H, OH° e OH^- (MULLER; SCHILDKNECHT; MULLER, 2013).

O mecanismo de ação dos nitrocompostos está relacionado principalmente à redução do grupo nitro (NO_2^-) por duas rotas distintas: a via aeróbia e a via anaeróbia. Nos dois casos, o grupo nitro ($ArNO_2$) passa pelo processo de redução, gerando o radical nitro ânion ($ArNO_2\bullet^-$). Na via aeróbica, o oxigênio reage com o ânion nitro, dando origem ao ânion superóxido ($O_2\bullet^-$) que posteriormente é convertido pela enzima superóxido dismutase (S.O.D.) em peróxido de hidrogênio, que reage com enzimas ferrodoxinas, formando hidroxila radicalar (OH•) e íon hidroxila (OH^-), que podem ligar-se a proteínas, lipídeos e até mesmo ao DNA, ocasionando danos biológicos à célula, sendo tóxica para células bacterianas e parasitárias. Na via anaeróbica, o ânion nitro é transformado em derivado nitroso (ArNO), a partir da interrupção da cadeia respiratória, havendo mudança no fluxo normal de elétrons e interferindo na degradação de carboidratos na transposição de H^+ e na produção de energia. Esse processo gera o intermediário hidroxilamino (ArNHOH), que interage com o DNA de microrganismos, podendo levá-los à morte (MULLER; SCHILDKNECHT; MULLER, 2013; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Outro mecanismo de ação associado aos nitrocompostos é caracterizado pela ligação de grupos tióis de enzimas essenciais de alguns parasitas e bactérias com intermediários do processo de biorredução do grupo nitro (MULLER; SCHILDKNECHT; MULLER, 2013; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

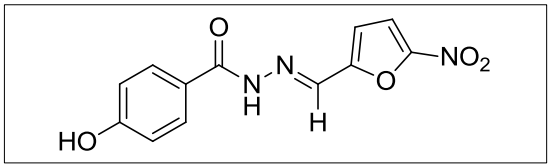
Figura 6 - Rota aeróbia e anaeróbia do mecanismo de ação dos nitrocompostos.



Fonte: Paula; Serrano e Tavares (2009).

2.5.1 Nifuroxazida

Figura 7 - estrutura química da nifuroxazida



Fonte: NCBI (2018).

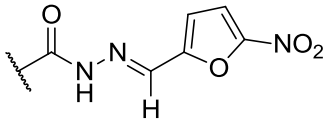
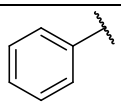
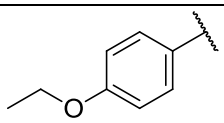
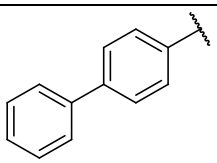
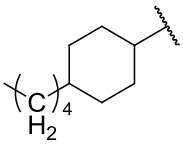
Estudos demonstram que a maioria dos compostos 5-nitrofurânicos e seus derivados apresentam amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-

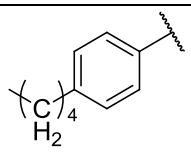
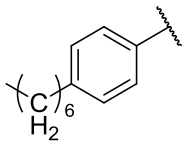
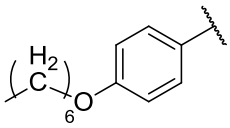
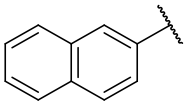
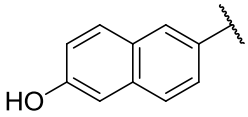
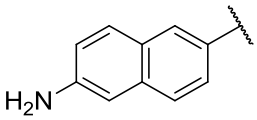
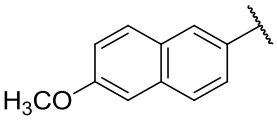
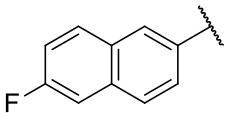
positivas e Gram-negativas e alguns protozoários, como o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.* (PAGE, 2008; KUHLMANN; FLECKENSTEIN, 2017).

A nifuroxazida é um composto nitrofurânico conhecido por sua ação antibacteriana (NCBI, 2018) e utilizado como protótipo no presente trabalho. Assim, derivados 5-nitrofurânicos, análogos à nifuroxazida foram estudados frente a cepas de *Staphylococcus aureus ATCC, OXA-R* e *hVISA; e Staphyloccocus epidermidis* multirresistente (*MDR*), e foram encontrados resultados promissores, em que muitos dos análogos apresentaram boa atividade (Tabela 1).

No processo de desenvolvimento deste trabalho, o análogo não substituído *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-benzidrazida* foi utilizado para construção de um modelo de obtenção das nanopartículas, por sua fácil obtenção sintética e seu baixo custo.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida frente a diferentes cepas de Staphylococcus.

				
	IC_{90} (µM)			
Composto	***S.aureus* *ATCC 29213***	***S. aureus* OXA-R**	***S. aureus* *hVISA***	***S. epidermidis* MDR**
	1,23	3,02	6,10	4,80
	0,84	1,14	2,20	1
	0,74	1,81	2,66	1,29
	0,99	2,08	3,67	2,88

Continuação da Tab. 1				
	0,9	1,54	1,72	1,12
	1,4	1	3,64	2,6
	2,28	0,54	3,56	1,10
	0,62	0,77	3,22	1,81
	0,66	1,27	1,35	0,62
	0,31	0,52	0,82	0,74
	0,42	1,09	1,68	0,77
	0,94	1,68	2,80	1,3
Nitrofurantoína	5,26	8,2	13,14	8,46
Nifuroxazida	2,39	5,37	7,22	4,36
Oxacilina	1,14	0	0	12,66
Vancomicina	0,31	0,5	0,88	1,4

*OXA-R: Oxacilina resistente; *hVISA*: *S. aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina; MDR: multirresistente.

Fonte: Silva Neto (2017).

Ainda que a atividade dos compostos análogos da nifuroxazida seja elevada frente as células bacterianas, parasitárias e fúngicas, estudos realizados por Palace-Berl (2017), concluíram que alguns análogos testados não mostraram citotoxicidade frente a células renais de macacos Rhesus LLC-MK_2, em que o IC_{50} frente a essa linhagem celular foi acima de 100 µM. Estudos realizados por Fernandes *et al*., (2012), testaram alguns análogos e concluíram que abaixo da concentração de 4 µg/mL, os análogos não demonstraram citotoxicidade, inclusive o análogo não substituído *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-benzidrazida.*

Os compostos em estudo possuem alta lipofilicidade, necessitando de estratégias farmacotécnicas para sua administração, entre as técnicas conhecidas com essa finalidade, destacam-se a mistura de solventes, como glicerol e água, propilenoglicol, álcool etílico, entre outros; uso de ciclodextrinas como agentes de solubilização por formação de complexos; formação de sais de fármaco; associação dos fármacos com polímeros hidrofílicos; formação de nanopartículas poliméricas, lipossomas ou nanocristais; entre outros (DURÁN *et al*., 2010; FONSECA, 2012; RAMASAMY *et al*., 2017).

2.6 TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Alguns fármacos possuem características físico-químicas, organolépticas, toxicológicas e/ou farmacodinâmicas incompatíveis para a aplicação clínica. Entre elas citam-se problemas farmacocinéticos, toxicidade elevada, baixa estabilidade química, odor e paladar desagradáveis; dor no local de administração e difícil preparo farmacêutico (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014, RAMASAMY *et al*., 2017).

Com o objetivo de melhorar a aplicação clínica desses fármacos, diversas tecnologias vêm sido estudadas no sentido de ajudar no transporte de fármacos, como a latenciação de fármacos; sistemas liberação com uso de nanotecnologia como o uso de sistemas lipossomais, poliméricos, micelares, complexos com ciclodextrinas, nanoemulsões e uso de produtos biotecnológicos (enzimas, proteínas e anticorpos monoclonais) (REIS; MARTINHO; DAMGÉ, 2011, ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014). Alguns exemplos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Exemplos de sistemas de liberação de fármacos.

Sistema de liberação	Estrutura do transportador	Fármaco	Administração
Micropartículas	Quitosana/TPF* Celulose/Eudragit Quitosana/Eudragit	Felodipina[1] Ondasetron[2] Predinisolona[3]	Oral
Nanoemulsões	Quitosana/Labrafil/Polissorbato80/Lecitina Transcutol/Polissorbato80/Labrafil	Artesunato[4] Indometacina[5]	Oral Transdérmica
Lipossomas	DPFC/SHFC/Colesterol/PEG-FE/Folato PEG-FE*	Doxorrubicina[6]	Intravenosa
Latenciação	Fosfo-oxi-metil/Fármaco	Fluconazol[7]	Intravenosa
Nanopartículas	Quitosana/TPF Quitosana/TPF	Albendazol[8] Prata[9]	Oral Tópica

*TPF: tripolifosfato de sódio; DPFC: 1,2-dipalmitoil-glicerol-fosfatidilcolina; SHFC: soja hidrogenada fosfatidilcolina; PEG-FE: polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina.

1 Park *et al*. (2002).

2 Nidhi *et al*. (2016).

3 Oosechi, Onishi e Machida (2008).

4 Tran *et al*. (2015).

5 Shakeel, Ramadan e Ahmed (2009).

6 Gaber (2002).

7 Rautio *et al*. (2008).

8 Kang *et al*. (2015).

9 Paula (2013).

Os transportadores de fármacos possuem o objetivo de modificar a farmacocinética de um determinado fármaco, bem como sua biodistribuição e/ou sua seletividade, podendo torna-lo menos tóxico, melhorar sua ação biológica e diminuir os seus efeitos colaterais (TIWARI, *et al*., 2012).

Nos últimos anos, alguns fármacos com transportadores foram aprovados pelos órgãos regulatórios, como lipossomas de anfotericina B (AmBisome®) para Leishmaniose e infecçoões fúngicas; copolímero de neocarzinostatina (Zinostatin Stimalamer®) e lipossoma de doxorrubicina (Doxyl®/Caelyx®) para carcinoma hepático; proteínas peguiladas como o PEG-interferon alfa para hepatite C, micropartículas de PLGA com o ativo leuprolida para câncer de próstata (Lupron Depot®); nanopartículas de vincristina para o tratamento de câncer (Marqibo®); nanopartículas de daunorrubicina também para o tratamento de neoplasias

(DaunoXome®); micropartículas de morfina para efeito analgésico e diminuição de toxicidade (DepoDur®); transportadores transdérmicos com hidroxipropilcelulose e estradiol para efeito anticoncepcional (Estraderm®); entre outros (ALLEN; CULLINS, 2004; ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014).

Alguns sistemas são estudados para o transporte de fármacos em lesões cutâneas, com o objetivo de aumentar a cicatrização e combater infecções. Dentre os sistemas matriciais para o transporte de fármacos em lesões, estão os hidrogéis, os hidrocolóides, filmes de alginato, adesivos semipermeáveis, filmes de poliuretano, filmes biotecnológicos, substitutos de pele e outros. Entre os agentes terapêuticos inclusos nesses sistemas de transporte de fármacos estão os antimicrobianos, fatores de crescimento celular e anti-inflamatórios (BOATENG *et al*., 2008).

Entre as formas de transportadores de ativos para lesões cutâneas, estão as micropartículas, que devido a pequena escala de tamanho (1 a 1000 µm), apresenta diversas características como resposta biológica diferenciada, bioadesividade, intumescimento (dependendo da matriz) e maior superfície de contato, que carregando ativos terapêuticos, promovem a melhora das lesões (PACHUAU, 2015). Micropartículas de PLGA carregadas simultaneamente com clorexidina, um antimicrobiano hidrofóbico e o fator de crescimento celular PDGF-BB demonstraram nos estudos a sustentação por 50 dias e 8 semanas de liberação *in vitro* e de bioatividade respectivamente, além da diminuição das infecções em ratos (JIANG; ZHANG; BREY, 2013).

Nanopartículas poliméricas, nanofibras, nanoemulsões e lipossomas também são amplamente estudados para o tratamento de lesões cutâneas. As nanopartículas, devido a pequena escala de tamanho, apresentam características diferenciadas, como maior superfície de contato, maior distribuição tecidual, aumento da biodisponibilidade e diminuição da toxicidade de ativos, entre outros. Essas características, juntamente com os ativos terapêuticos promovem a regeneração e tratamento tecidual (PACHUAU, 2015). Nanopartículas de ZnO e gentamicina incorporados em hidrogel de quitosana demonstraram ser efetivos no combate a infecções por *Pseudomonas aerugionosa* e *Staphylococcus aureus*, promovendo o aumento da cicatrização, analgesia e efeito calmante (VASILE *et al*., 2014). Nanovesículas contendo quercetina e curcumina foram efetivos como

antiinflamatórios e na diminuição de radicais livres que geram o aumento de úlceras, inibindo a enzima *12-O-tetradecanoilforbol acetato* (TPA) (CASTANGIA *et al*., 2014).

Além de micropartículas e nanopartículas, os filmes poliméricos também têm sido estudados no tratamento de lesões teciduais, principalmente por suas características de intumescimento, mantendo a umidade e hidratação tecidual importante para os fatores de cicatrização do tecido, a sustentação da concentração de ativos no local e diminui o processo de exsudação excessiva em lesões de grande extensão. Filmes de hidrogel de PEG-PCL-PEG incorporado com curcumina foram estudados no tratamento de lesões em camundongos e observou-se o aumento significativo da reparação tecidual, com a diminuição do processo de exsudação (GONG *et al*., 2013).

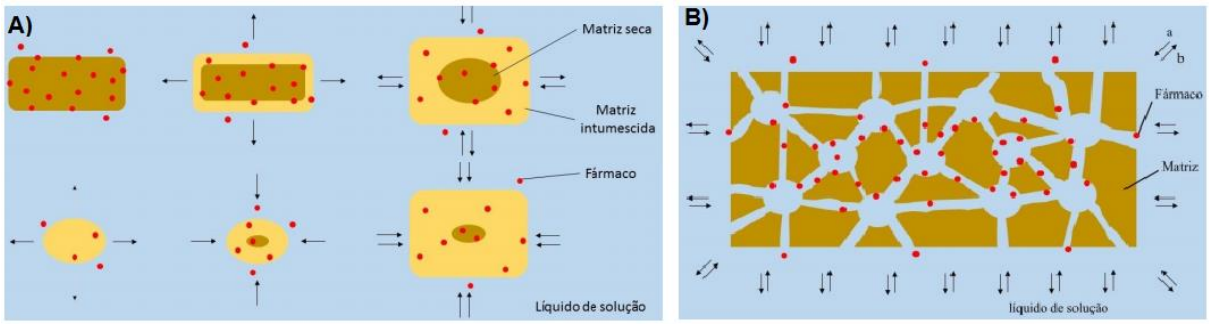
2.6.1 Matrizes poliméricas como transportadores de fármacos

As matrizes poliméricas têm obtido destaque como transportadoras de fármacos, por propiciarem o aumento da dissolução de fármacos lipofílicos em meios biológicos, a liberação controlada e prolongada de fármacos, por favorecerem a proteção dos fármacos (sistemas de revestimento) e por que a maioria dos polímeros utilizados para essa finalidade são biodegradáveis e atóxicos (HOARE; KOHANE, 2008; SHIT; SHAH, 2014).

Existem dois tipos de matrizes poliméricas: as hidrofóbicas e hidrofílicas. As matrizes hidrofóbicas são insolúveis em água, como metacrilato de amônio, parafina e cloreto de polivinila. O mecanismo de liberação está associado à liberação do fármaco disperso em poros do polímero, em que o meio de liberação penetra nos poros da matriz e dissolve o fármaco, podendo ocorrer de forma conjunta à erosão da matriz (ABU-DIAK; ANDREWS; JONES, 2011). O mecanismo de liberação de fármacos nas matrizes hidrofílicas como a quitosana, a hidroxipropilmetilcelulose e o alginato de sódio está associado ao entumecimento e hidratação da rede polímérica que leva a liberação prolongada do fármaco contido na matriz. Primeiramente, após a administração, o meio de liberação penetra nos poros do polímero e realiza interações intermoleculares com o polímero, tornando o polímero mais maleável, e assim, provoca o intumescimento da matriz polimérica (PUNDIR; BADOLA; SHARMA, 2017). Nesta etapa, o fármaco presente nas regiões mais externas da matriz é liberado

rapidamente. Esse processo ocorre de fora para dentro da matriz, que vai intumescendo progressivamente e simultaneamente, as regiões mais externas sofrem erosão (LIECHTY *et al*., 2010).

Figura 8 - Mecanismos de liberação de fármacos



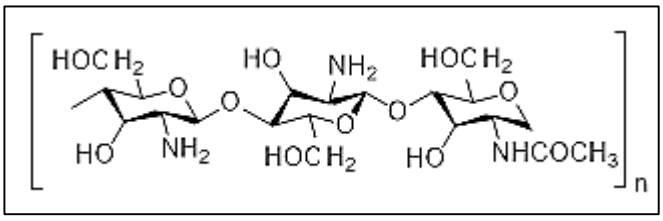
A) matrizes poliméricas hidrofílicas e B) matrizes poliméricas hidrofóbicas.

Fonte: Adaptado de Liechty *et al*. (2010).

2.7 QUITOSANA: FORMAS E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

A quitosana é um copolímero natural, biodegradável, abundante e atóxico. A quitosana atraiu o interesse industrial em diversas áreas, principalmente na biotecnologia e na medicina. Biopolímero constituído por unidades de D-glicosamina e D-glicoacetamida por ligações β-(1 > 4) glicosídicas, a quitosana pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino ou através de hidrólise enzimática, mas como não é totalmente desacetilada, as unidades acetiladas e desacetiladas apresentam-se de forma aleatória sem organização nas unidades. É importante determinar o grau de desacetilação, pois essa característica altera a solubilidade, *pK*a e viscosidade da quitosana. Além disso, um elevado grau de desacetilação aumenta a possibilidade de degradação do polímero (SHUKLA *et al*., 2013).

Figura 9 - Estrutura química da quitosana.



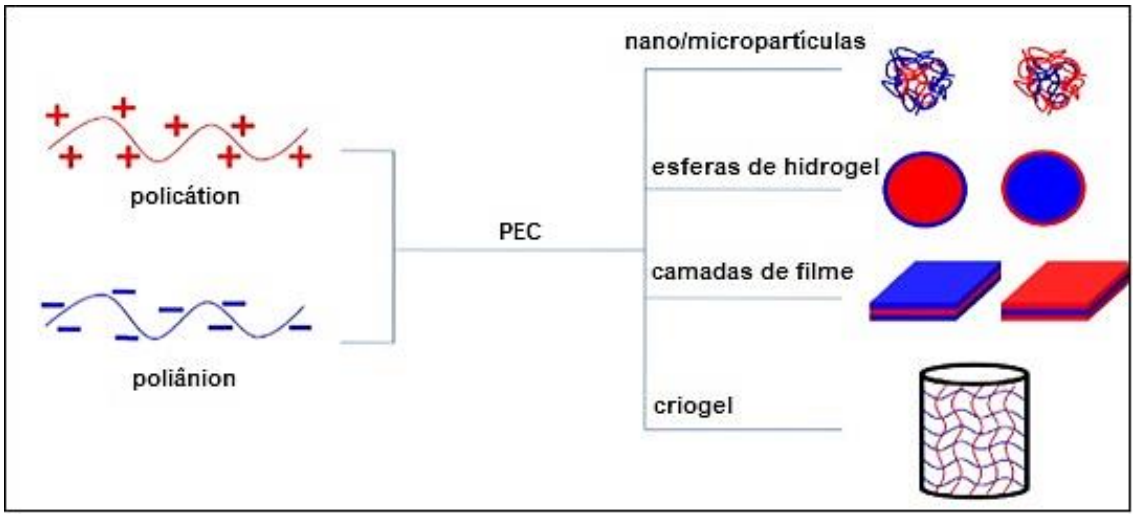
Fonte: Shukla *et al*. (2013).

As características físico-químicas da quitosana dependem, principalmente, do peso molecular e o grau de desacetilação do polímero, em que o valor de pKa dependem estritamente desses parâmetros, além da força iônica e a neutralização das cargas das aminas primárias (SHUKLA *et al*., 2013).

Sendo um policátion, a quitosana se caracteriza por possuir grupos amínicos livres, ser solúvel em meio ácido e insolúvel em pH acima de 6,5. As aminas primárias da quitosana são protonadas em meio ácido, promovendo a formação de hidrogéis e, além disso, forma soluções viscosas e biofilmes quando ligada a poliânions, como o tripolifosfato de sódio (TPF), formando um complexo polieletrolítico (PEC) (DAMIAN *et al*., 2005).

A formação de PEC ocorre de forma espontânea e a força de formação de PEC está associada ao aumento da entropia pela liberação de contra-íons (SCHATZ *et al*., 2004). A formação do complexo PEC está associada a ligações por Forças de Coulomb entre cargas opostas, levando a uma condensação iônica interpolimérica e concomitantemente à liberação dos contra-íons (SCHATZ *et al*., 2004).

Figura 10 - Diferentes formações de PEC.



Fonte: Adaptado de Luo e Wang (2004).

No contexto das ciências e tecnologia farmacêutica, a quitosana apresenta diversas aplicações, tais como:

1- Atividade antimicrobiana: A quitosana e a quitina provocam a inibição de diversos microrganismos, como *E. coli, S. epidermidis, P. aeruginosa, S. aureus, Candida albicans,* entre outras. Essa ação está relacionada às ligações das terminações

amínicas da quitosana com grupos aniônicos desses microrganismos e a ação pode ser diferente para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (CHEUNG *et al*., 2015);
2- Efeito analgésico: A quitosana possui potente ação analgésica tópica, pela captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação, além de absorver a bradicinina (mediador inflamatório e de dor) no local da inflamação (CHEUNG *et al*., 2015).
3- Aceleração da cicatrização: A quitosana possui um efeito imunomodulador por atrair os macrófagos ao local, estimulando a cicatrização local e, além disso, isso a torna biodegradável no organismo. A ação cicatrizante também está relacionada à regeneração do tecido conjuntivo e à reepitelização, essenciais para o tratamento de feridas profundas e queimaduras (CHEUNG *et al*., 2015).
4- Efeito Coagulante: A quitosana possui atividade significativa na homeostase, de forma independente da cascata de coagulação, com a atividade de reduzir o tempo de coagulação sanguínea e agregar plaquetas, devido à interação dos grupos amino livres com eritrócitos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).
5- Tratamento de Osteoartrite: Os monômeros da quitosana e da quitina têm sido estudados para o tratamento da osteoartrite. Monômeros glicosamina estimulam a biossíntese de peptídeoglicanos que auxiliam na manutenção do tecido conjuntivo e estabilizam membranas, melhorando o quadro pela regeneração tecidual;
6- Efeito hipolipidêmico: A quitosana possui uma importante atividade na redução do colesterol sanguíneo e outros lipídeos por sua capacidade de ligar-se à lipídeos da dieta e diminuir sua absorção intestinal.
7- A quitosana também possui propriedade mucoadesiva que está relacionada com seu caráter catiônico, uma vez que o muco possui estruturas aniônicas, sendo uma propriedade interessante na liberação controlada de fármacos e de produtos biotecnológicos, como vacinas, pela adesão do polímero nas mucosas, liberando o fármaco ou o antígeno de forma prolongada (BARBI, 2011; NEVES, 2013).

A quitosana está presente em diversas linhas de pesquisa que demonstram uma gama de aplicações, como a latenciação de fármacos; uso de microesferas para transporte controlado de fármacos e maior biocompatibilidade de fármacos com os fluídos biológicos; liberação transdérmica e desenvolvimento de vacinas (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006, GONZALES, 2015, CHEUNG *et al*., 2015).

2.8 NANOPARTÍCULAS

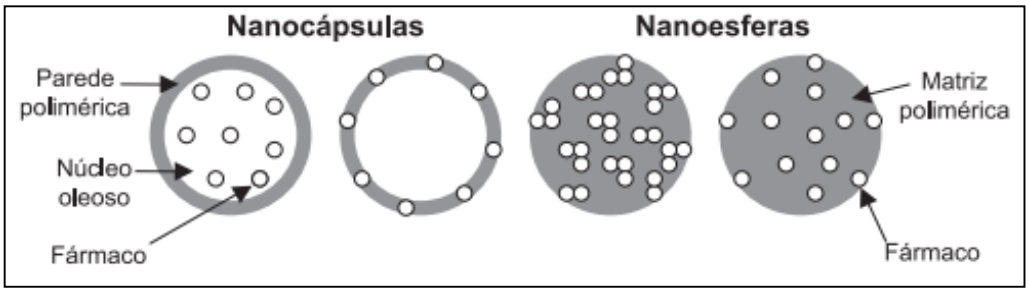
A nanotecnologia tem sido um dos principais focos de pesquisas atuais, principalmente por sua gama de aplicações industriais. O termo nanotecnologia é utilizado para correlacionar a tecnologia com elementos em escalas nanométricas, a fim de criar novos materiais, produtos e processos (BHUSHAN, 2017).

Em nanotecnologia, de forma geral, as nanopartículas são definidas como partículas que possuem o diâmetro menor que 1 µm. Devido à pequena escala de tamanho, elas possuem grande área superficial e muitos átomos e camadas por área superficial próximos, tornando-as com características físico-químicas únicas em relação ao composto ou partícula em tamanhos acima dessa escala, como exemplo a velocidade de dissolução e o aumento da reatividade (BHUSHAN, 2017).

As nanopartículas podem ser compostas por diferentes materiais como polímeros, metais, óxidos metálicos, cerâmicas, silicatos, carbono e biomoléculas; e podem apresentar diferentes morfologias, como esferas, cilindros, tubos e plaquetas (PATHAK; THASSU, 2009; BHUSHAN, 2017).

As nanopartículas poliméricas em ciências farmacêuticas apresentam o tamanho de 10 a 1000 nm e são destinadas a diversas aplicações, como a formação de hidrogéis, bioadesivos e no sistema de liberação controlada de fármacos, podendo diferir entre si na sua composição e formação estrutural. Existem as nanocápsulas, em que o fármaco está encapsulado em um núcleo oleoso ou adsorvido na parede polimérica e existem as nanoesferas, em que o fármaco está disperso na matriz polimérica, adsorvido ou retido na matriz (PATHAK; THASSU, 2009).

Figura 11 – Formas de dispersão de fármacos em nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: Guterres, *et al*. (2003).

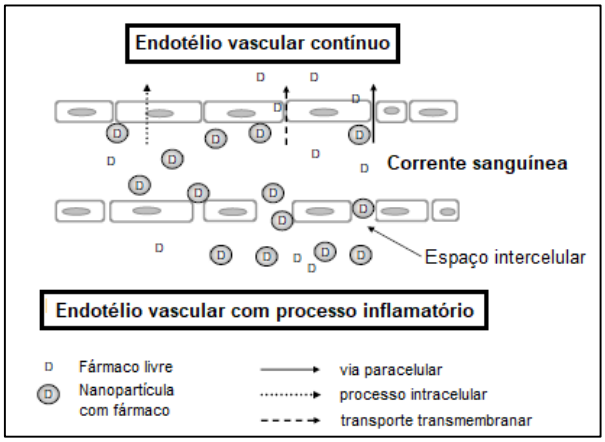
Diversos parâmetros são importantes em relação às características das nanopartículas poliméricas que influenciam em sua estabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica. Os parâmetros mais importantes são tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia. Em ciências farmacêuticas, os parâmetros característicos de cada sistema dependem da forma de administração e do alvo terapêutico (PATHAK, THASSU, 2009).

Dependendo do objetivo de aplicação terapêutica, o controle de tamanho e índice de polidispersão das nanopartículas são essenciais para uma boa distribuição das nanopartículas pelo organismo ou uma ação local, e/ou a seletividade por um determinado órgão (GAUMET, *et al*., 2008).

Para os sistemas de entrega de antígenos como vacinas, por exemplo, o tamanho e a composição das nanopartículas são essenciais para a apresentação do antígeno para o sistema imunológico, em que a nanopartícula contendo o antígeno necessita ser fagocitada pelo macrófago para liberação no antígeno no ambiente lisossomal e ser apresentado aos linfócitos, podendo apresentar o tamanho de 150 a 300 nm e podem se acumular no fígado e no baço (GONZALES, 2015, ZHAO *et al*., 2014).

O acúmulo de nanopartículas em um determinado órgão depende do espaço intercelular do tecido e do endotélio vascular, que em algumas condições patológicas este espaço pode estar alterado. Para ultrapassar o endotélio vascular, a nanopartícula deve apresentar no máximo 150 nm. Em condições patológicas como tumores sólidos, o processo de angiogênese característico desses tumores propicia irregularidade dos espaços intercelulares do endotélio vascular, em que as nanopartículas com até 200 nm podem ultrapassar essa barreira (GAUMET *et al*., 2008).

Figura 12 - Mecanismos de liberação do fármaco das nanopartículas no endotélio



Fonte: Adaptado de Gaumet *et al*. (2008).

Para o uso exclusivamente tópico em que não se deseja a distribuição sistêmica das nanopartículas, as partículas devem ter tamanho maior que os espaços intercelulares do epitélio e em condições de lesões cutâneas e queimaduras mais profundas, o ideal é que as nanopartículas sejam maiores do que os espaços do endotélio em processos inflamatórios, ou seja, maior que 200 nm, para que não sejam absorvidas e, portanto, não tenham distribuição sistêmica (GAUMET *et al*., 2008).

Em relação a importância do controle do índice de polidispersão em um sistema de liberação nanométrico, deve-se buscar a uniformidade de distribuição de tamanhos no sistema para biodistribuição e atividade adequada das nanopartículas, em que o tamanho destas não devem diferir muito entre si em um sistema, o que pode ser observado pelo baixo índice de polidispersão (GAUMET *et al*., 2008). Outro parâmetro importante em relação às nanopartículas são suas cargas superficiais. Em sistemas com componentes com cargas, a estabilidade dos sistemas coloidais está intimamente relacionada a essas cargas superficiais, o que pode ser avaliado pelo potencial zeta (ζ). Estudos mostram que nanopartículas de potencial zeta inferior a +30 mV ou superior a -30 mV não permanecem estáveis, pois as cargas não são repulsivas o suficiente para manter as partículas separadas, resultando na formação de agregados (SANCHÉZ-DOMINGUES; RODRIGUEZ-ABREU, 2016).

2.8.1 Nanopartículas de quitosana

Dentro do contexto das nanociências, as pesquisas com micro e nanopartículas poliméricas de quitosana têm crescido consideravelmente, devido à baixa toxicidade, boa estabilidade, baixo custo, diferentes propriedades farmacêuticas e alta biocompatibilidade (LIMA, 2013). Estudos realizados com micropartículas de quitosana com tetraciclina demonstram resultados promissores em relação à liberação controlada do fármaco, aumento da absorção e aumento da atividade antimicrobiana (CARONI, 2009). Outros estudos realizados por KANG *et al*. (2015), demonstraram que nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPF) carregadas com albendazol apresentaram-se como potencial agente anticancerígeno, além de se constituírem em formulação com boa estabilidade. Estudos realizados por Barbi (2011) demonstraram que nanopartículas de quitosana e TPF carregadas com zidovudina sintetizadas para admistração nasal apresentaram boa atividade antiviral e propriedade mucoadesiva (BARBI, 2011).

Neste contexto, as características das nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio possuem diversas aplicações, por sua característica de formar filmes, controlar a liberação de fármacos, possuir baixa toxicidade, por suas características antimicrobianas, cicatrizantes e antiinflamatórias, demonstrando as vantagens da aplicação dessas nanopartículas em queimaduras e outras feridas, como mostra estudos realizados em modelos experimentais de queimadura em camundongos, em que evidenciou-se a ação cicatrizante das nanopartículas de quitosana (NEVES, 2013).

As propriedades físico-químicas e morfológicas das nanopartículas, como potencial zeta, índice de polidispersão, tamanho, morfologia e eficiência de encapsulação de ativos são dependentes de diversos parâmetros do processo de obtenção das nanopartículas, como a massa molecular da quitosana, concentração e proporção de quitosana e TPF, adição de eletrólitos no sistema, adição de cossolventes e surfactantes, temperatura, pH, concentração de ácido inorgânico, velocidade e tempo de agitação, velocidade de gotejamento do TPF na solução de quitosana, volume da gota de TPF e do uso de adjuvantes como co-solventes e surfactantes.

Conforme estudos de Fan *et al*., (2012), o aumento das concentrações de quitosana e TPF aumentaram o tamanho das nanopartículas e do índice de polidispersão, resultado do aumento das ligações entre as cadeias de quitosana e TPF. Os limites de concentrações de quitosana e TPF neste estudo para formação de partículas em nanoescala foram de 2,0 mg/mL e 1,0 mg/mL respectivamente. Estudos realizados pelos mesmos autores no mesmo artigo mostraram que o aumento da temperatura do sistema de 25 ºC para 60 ºC, proporcionou a diminuição do diâmetro das nanopartículas de quitosana/TPF de 200 nm para 130 nm e do índice de polidispersão de 0,11 para 0,05. Porém, estudos realizados por Sipoli *et al*. (2015 a) não evidenciaram mudança significativa no tamanho e no IPD com o aumento da temperatura.

Sipoli *et al*., (2015 b) realizaram estudos de obtenção de nanopartículas de quitosana/TPF variando o pH do sistema. O grupo observou que em meio ácido (entre 4 e 5), as nanopartículas são menores, com cerca de 150 nm e em pH acima de 5,5 as nanopartículas apresentaram tamanhos maiores em cerca de 300 nm.

Foram realizados estudos variando a concentração do surfactante polissorbato 80 na obtenção de nanopartículas de quitosana/sulfato de sódio por Fonseca (2015). O aumento da concentração de polissorbato 80 aumentou o tamanho das partículas e do IPD e também aumentou a estabilidade das nanopartículas em temperatura ambiente.

Há muitos outros estudos a respeito do comportamento das nanopartículas de quitosana variando-se os componentes e fatores do sistema, porém, muitos fatores ainda precisam ser estudados e confirmados, devido à alta complexidade e muitas variáveis desse sistema coloidal.

2.8.2 Caracterização de nanopartículas poliméricas

Existem diferentes formas de caracterização das nanopartículas poliméricas, dentre as mais importantes estão a determinação do tamanho médio da partícula, índice de polidispersão (PDI), microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (MEV e MET), potencial zeta (ζ) e determinação da associação do fármaco às nanopartículas (GUTERRES *et al*., 2003, RAMALHO; PEREIRA, 2016).

O tamanho médio das partículas é determinado por meio do diâmetro hidrodinâmico médio, pelo espalhamento de luz dinâmica. O DLS (*Dinamic Light Scattering*) é um equipamento que mede a intensidade de luz espalhada por uma partícula, levando em consideração o movimento browniano e a equação de Stokes-Einstein. O método ilumina as partículas com luz *laser* que analisa as flutuações de intensidade de luz dispersa. Os diâmetros médios e IPD são definidos a partir de funções de autocorrelação, utilizando análise cumulativa (GUTERRES *et al*., 2003, NEVES, 2013). Segue-se a equação de Stokes-Einstein, utilizada para o cálculo de análise cumulativa.

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta dh}$$

Equação 1: Equação de Strokes-Einstein

Em que: *D* é a constante de difusão; *k* é a constante de Boltzmann; *T* é temperatura; *η* é viscosidade; *dh* é diâmetro da partícula.

O índice de polidispersão determina a heterogeneidade de distribuição de tamanhos das nanopartículas no sistema, podendo variar de 0 a 1. Este índice está associado ao número de populações de diferentes tamanhos em um sistema, assim, quanto maior o número de populações com diferentes tamanhos no sistema, maior é índice de polidispersão, também determinado por DLS em função do índice de correlação (NEVES, 2013).

A MEV tem a função de avaliar a morfologia, a integridade das nanopartículas e fenômenos de superfície, além da determinação da distribuição de tamanho das mesmas. A técnica é caracterizada por uma varredura de elétrons que percorrem a superfície da amostra, mostrando a superfície das estruturas em três dimensões. A MET se caracteriza por uma microscopia com capacidade de avaliar diferentes membranas, visualização de camadas e morfologias. O equipamento lança um feixe de elétrons que ultrapassam a amostra, mostrando camadas interiores das partículas (GUTERRES *et al*., 2003).

O potencial zeta (ζ) é um método de eletroforese que está associado à medição do potencial da superfície das nanopartículas. Esse potencial é medido em função da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície das partículas, ou em função da adsorção das espécies iônicas presentes na solução coloidal (GUTERRES *et al*.,

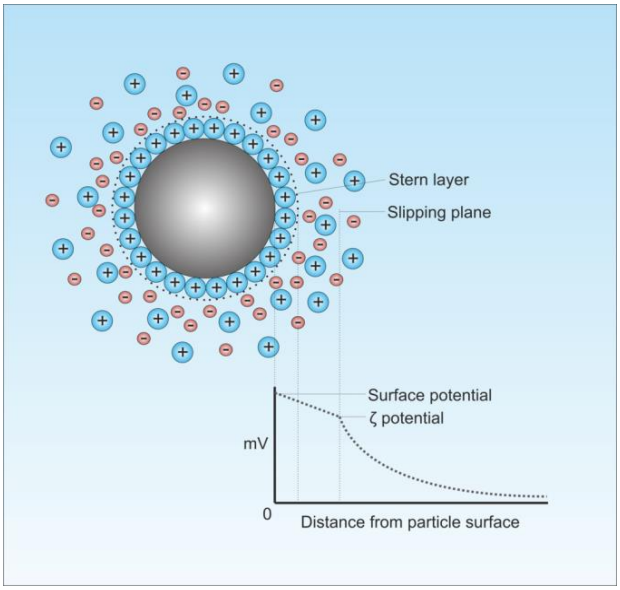
2003). A medição é realizada por determinação da mobilidade eletroforética (U_E), aplicando a equação de Henry (Equação 2). A U_E é determinada por ensaio de eletroforese sobre a amostra, em que mede a velocidade das partículas a laser usando o Laser Doppler Velocimetry (LDV). Segue-se a equação de Henry, que determina a mobilidade eletroforética das partículas.

$$UE = \frac{\varepsilon \zeta f(\kappa R)}{1{,}5\eta}$$

Equação 2: Equação de Henry

Em que: ζ é o potencial zeta das partículas; η é a viscosidade do meio; *f(kR)* é a função de Henry e *R* é o raio da partícula.

Figura 13 - Potencial zeta (ζ) de uma partícula.



Fonte: Guterres *et al*. (2003).

A determinação da associação do fármaco às nanopartículas pode ser realizada por espectrofotometria ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Existem duas formas para determinar a eficiência de encapsulação, sendo a forma indireta (equação 3) pela medida da concentração do fármaco livre (não associado) no sobrenadante da suspensão coloidal após centrifugação e, posteriormente, calcula-se a diferença entre as concentrações de fármaco livre e fármaco total; ou por ultrafiltração, em que separa-se a fase aquosa dispersante da suspensão coloidal e a concentração de fármaco livre é determinada no ultrafiltrado, pela diferença entre o total e livre; ou de forma direta (equação 4) pela quebra das nanopartículas, liberando

o fármaco no meio (GUTERRES *et al*., 2003). Segue-se as equações de determinação da EE% por método indireto e direto, respectivamente.

$$EE\% = \frac{[\text{fármaco inicial}] - [\text{fármaco final}]}{[\text{fármaco inicial}]} \times 100$$

Equação 3: Eficiência de encapsulação da forma indireta
Em que: [fármaco inicial] é a concentração inicial do fármaco para encapsulação nas nanopartículas; e [fármaco final] é a concentração do fármaco no sobrenadante.

$$EE\% = \frac{[\text{fármaco final}]}{[\text{fármaco inicial}]} \times 100$$

Equação 4: Eficiência de encapsulação da forma direta
Em que: [fármaco inicial] é a concentração inicial do fármaco para encapsulação nas nanopartículas; e [fármaco final] é a concentração do fármaco que foi encapsulado

2.9 LIOFILIZAÇÃO

As nanopartículas dispersas como colóides estão inseridas em um sistema dinâmico, conhecido como movimento Browniano. Desta forma, as nanopartículas estão a todo momento colidindo e assim, formando pequenos agregados que sedimentam visualmente e, além disso, condições físico-químicas do colóide como pH, temperatura e hidrólise de polímeros, podem prejudicar a estabilidade físico-química das nanopartículas (ABDELWAHED *et al*., 2006).

Neste contexto, a liofilização é uma importante ferramenta para o aumento da estabilidade das nanopartículas pela retirada da água no sistema, (ABDELWAHED *et al*., 2006). Essa técnica de secagem permite que a amostra permaneça estável, pois retira a água pelo processo de sublimação, ou seja, retira a água congelada em forma de vapor. Esse processo de retirada de água do estado sólido para o gasoso reduz a possibilidade de agregação das partículas, o que ocorre em maior parte no estado líquido, devido às colisões das partículas (ABDELWAHED *et al*., 2006).

Para manter a integridade das nanopartículas durante e após o processo de liofilização, são utilizados alguns excipientes que são os crioprotetores e os lioprotetores. Os crioprotetores têm a função de manter as nanopartículas separadas

durante o processo de congelamento com o aumento da viscosidade do sistema, diminuindo o processo de agregação. Os lioprotetores são responsáveis por substituir as ligações de hidrogênio realizadas pela água. Geralmente os criprotetores e os lioprotetores são açúcares ou aminoácidos, como glicose, sacarose, lactose, trealose, manitol, maltose, frutose, glicerol, sorbitol e glicina (PATEL *et al*., 2017).

Alguns parâmetros são importantes para manter a integridade e estabilidade de nanopartículas poliméricas e também no comportamento dos diferentes crio/lioprotetores, como a temperatura de transição vítrea (*Tg'*); a temperatura eutética (*Teut*) e temperatura de colapso (*Tcol*). A temperatura de transição vítrea (*Tg'*) é definida como a transição de um estado cristalino para um estado amorfo de um sólido como um polímero e a temperatura eutética (*Teut*) de um sistema com mais de um componente é determinada pela temperatura de decomposição isotérmica de uma fase líquida em duas fases sólidas durante a solidificação e reação inversa durante o processo de fusão. A adição de um componente a um outro componente faz com que a faixa de fusão se modifique, em que a temperatura eutética é a menor temperatura de fusão das duas combinações (ABDELWAHED *et al*., 2006).

O conhecimento dessas temperaturas é importante para um bom processo de liofilização e obtenção de um produto íntegro e estável, pois estão relacionados à temperatura de colapso (*Tcol*), que ocorre quando a viscosidade do material diminui com o aumento da temperatura e consequentemente, o material não consegue se sustentar, pois os cristais de gelo dendríticos adjacentes foram sublimados no processo de liofilização, colapsando o material e além disso, o colapso da amostra impede a sublimação total da água, com fechamento dos poros de saída de água na amostra, aumentando significativamente a umidade residual, portanto, o processo de liofilização ideal precisa ser abaixo dessas temperaturas (TATTINI JUNIOR; PARRA; PITOMBO, 2006).

A liofilização é dividida em três estágios: congelamento, secagem primária e secagem secundária. Na etapa de congelamento há a formação de cristais de gelo continuamente, resultando no aumento da concentração coloidal e aumento da viscosidade, com formação de sólidos cristalinos ou amorfo-cristalino. Na etapa de secagem primária, que ocorre em temperaturas abaixo da temperatura de colapso do produto, em que toda a estrutura está congelada, ocorre a sublimação da água livre congelada por pressão reduzida e após esse fenômeno, há formação de poros que

eram ocupados pelos cristais de gelo. Os poros formados são importantes para que ocorra a sublimação de toda a água livre e a água ligada, diminuindo a possibilidade de colapso do produto. Na etapa de secagem secundária ou etapa de dessorção, há a remoção da água “ligada” ao produto que não foi sublimada na secagem primária, que ocorre geralmente em temperaturas superiores à da secagem primária também sob pressão reduzida, sendo esta etapa importante para a estabilidade do produto, que deve ter baixa umidade residual (ABDELWAHED *et al*., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Diante do cenário de alta mortalidade e morbidade associados aos quadros de lesões cutâneas infeccionadas, devido a muitos quadros evoluírem para sepse, necrose e amputações, a dificuldade do tratamento das infecções por via sistêmica e a falta de tratamentos tópicos adequados e efetivos frente a essas infecções, cria-se a necessidade do planejamento e desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas eficientes no tratamento dessas lesões (item 2.3.1).

Os compostos 5-nitro-furânicos de estrutura análoga a nifuroxazida, mostram-se ser importante alternativa no tratamento de infecções multirresistentes, conforme apresentado no item 2.5.1, porém, devido à alta hidrofobicidade desses compostos, se torna necessário adotar estratégias farmacotécnicas que aumentem sua dissolução e biodisponibilidades *in vivo*.

Neste contexto, sabe-se que o uso de polímeros vem sendo amplamente utilizados como transportadores de fármacos lipofílicos, por proporcionarem o aumento da biodisponibilidade desses fármacos, conforme discutido no 2.6 e 2.6.1. O polímero escolhido neste trabalho para transportar o análogo 5-nitro-furânico *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* (*C-H*), que foi escolhido no como análogo modelo para o desenvolvimento do sistema de liberação, foi a quitosana devido suas atividades terapêuticas e físico-químicas, como analgesia, promotora da cicatrização e restauração epitelial, antimicrobiana e pela capacidade de formação de filmes no local de aplicação em contato com o exsudato, conforme discutido no item 2.7.

O sistema de liberação escolhido no presente trabalho são as nanopartículas de quitosana (matriz polimérica), transportando o análogo *C-H*. A formação de nanopartículas promove atividade diferenciada, como discutido no item 2.8, principalmente relacionado ao aumento da biodisponibilidade do fármaco e maior superfície de contato dos componentes no local de aplicação, podendo potencializar a atividade da quitosana e do composto, conforme mostrou diversos estudos citados no item 2.8.1 em que houve aumento da biodisponibilidade e atividade de diversos fármacos.

No contexto apresentado, o presente trabalho se propõe a desenvolver uma alternativa para o tratamento de lesões cutâneas infeccionadas por bactérias multirresistes, unindo a atividade do composto *C-H* frente a diversas cepas de

Staphylococcus aureus como *ATCC 29213, ORSA* e *hVISA*, com nanopartículas de quitosana como transportador, que apresenta características terapêuticas e físico-químicas bastante interessantes para o tratamento de lesões cutâneas, podendo diminuir a mortalidade e morbidade associada a esses quadros.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

- Obtenção de nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio carregadas com composto *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* (*C-H*) com estrutura análoga à nifuroxazida e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* com caráter de multirresistência.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana/TPF carregadas com o composto *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* (*Nps-H*);
- Caracterização físico-química das *Nps-H*;
- Avaliação *in vitro* das *Nps-H* frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* (*ATCC 29213*, *hVISA* e *ORSA*)
- Estudos térmicos e liofilização das nanopartículas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SÍNTESE DO COMPOSTO

- Reagentes

- 5-nitro-2-furaldeído (Sigma Aldrich Chemical Company, Inc.)
- Ácido benzóico (Sigma Aldrich Chemical Company, Inc.)
- Ácido acético PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório)
- Ácido sulfúrico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório)
- Hidrazina 80% (Merck Chemicals)
- Metanol PA anidro (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório)
- *N,N*-dimetilformamida (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório)
- Pentóxido de fósforo (Vetec Química Fina)

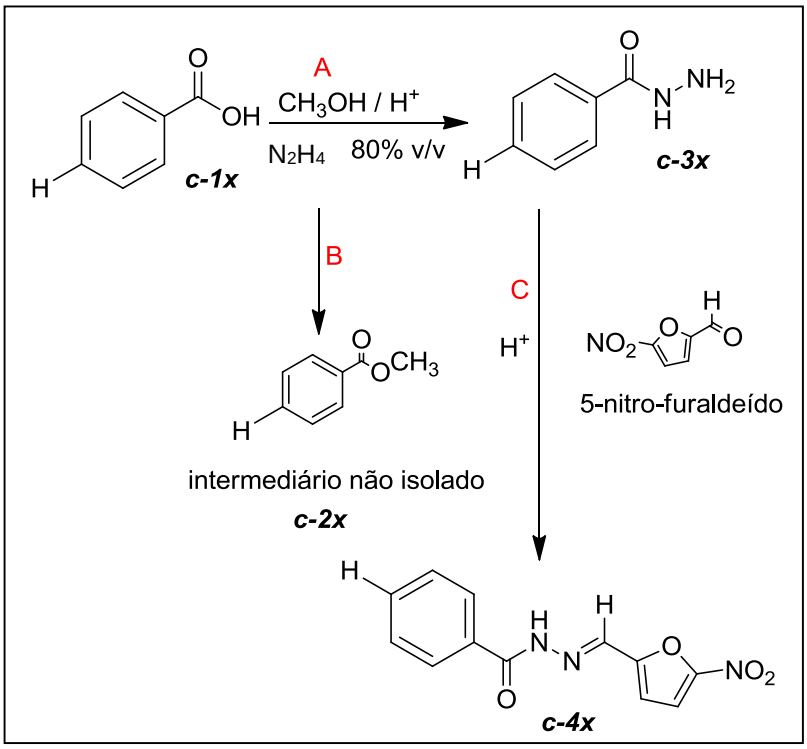
- Equipamentos

- Balança analítica (Ohaus)
- Bomba de Filtração à vácuo (Quimis)
- Chapa aquecedora com agitação magnetic (Quimis)
- Manta de aquecimento (Quimis).
- Espectrômetro Bruker (modelo Advance DPX-300 Mhz)

- Síntese química

O composto *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* foi sintetizado segundo a rota sintética descrita a seguir, desenvolvida por Tavares (1996) e reproduzida em diversos trabalhos (TAVARES, 1996; MASUNARI, 2006, ZORZI, 2013, JORGE, 2011; PALACE-BERL, 2017):

Figura 14 - Rota geral de síntese do análogo *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida*



Fonte: Tavares (1996).

5.1.1 ETAPA A: Esterificação de Fisher

Na reação de esterificação de Fisher, o carbono carbonílico sofre ataque do par de elétrons presente no oxigênio do álcool metílico, gerando éster como produto e água como produto de desdobramento. Para isso utilizou a proporção de 0,01 mol de ácido carboxílico, dissolvidos em metanol anidro em excesso, adicionando-se ácido sulfúrico PA (1,0 mmol), para agir como catalisador. Manteve-se em refluxo por 4 horas.

5.1.2 ETAPA B: Hidrazinólise

A reação de hidrazinólise, ocorre por ataque nucleófilo ao carbono carbonílico, introduzindo grupo amínico. Após resfriar o sistema, adicionou-se ao meio reacional 10 mL de hidrato de hidrazina 80% (v/v), mantendo em agitação e refluxo por 30 minutos à 1 hora. Após o período, resfriou-se o sistema até a faixa entre 4 a 8°C, para

que ocorra a cristalização da hidrazida formada, que foi filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo.

5.1.3 ETAPA C: Obtenção de bases de Schiff

Nesta reação ocorre ataque nucleófílico da amina primária ao carbono carbonílico deficiente em elétrons, em meio ácido, liberando uma molécula de água. Em seguida, há desprotonação da imina, obtendo-se a base de Schiff.

A condução desta reação ocorreu pela adição de 0,01 mol de 5-nitro-2-furfuraldeído em solução de ácido sulfúrico PA, água, ácido acético PA e álcool metílico PA, na proporção de 8:7:8:20 v/v. Aqueceu-se o meio reacional adicionando-se, aos poucos, a hidrazida formada na etapa anterior sob agitação magnética. Diminuiu-se a temperatura adicionando água destilada e, assim, observou-se a formação de sólido amorfo que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado de dimetilformamida (DMF) à 60 ºC, conforme técnica descrita por Pavia *et al*., (2009). Deixou-se em temperatura ambiente por 1 a 2 dias até cristalização, filtrou-se e lavou-se os cristais recolhidos com água destilada que foram secos em dessecador em presença de pentóxido de fósforo.

5.1.4 Identificação dos compostos

A identificação do composto foi realizada através da leitura dos espectros de RMN-^{1}H e RMN-^{13}C no laboratório de análise instrumental/FCF/USP. A determinação de faixa de fusão foi utilizada como critério de pureza dos compostos.

5.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA (*Nps-H* e *Nps-Cs*)

- Reagentes

- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich Chemical Company, Inc.);
- Ácido acético PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório);
- Hidróxido de Sódio (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório);
- Álcool etílico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório);
- Polissorbato 80 (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório);

- Polissorbato 20 (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório);
- Tripolifosfato de sódio (TPF) (Sigma Aldrich Chemical Company, Inc.);
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório);
- Água ultrapurificada (Milli-Q® Integral Water Purification System - Merck Millipore).

- Equipamentos

- Agitador magnético (TE0851-Tecnal)
- Espectrofotômetro UV/VIS (Hitach U-1900)
- DLS (NanoZetaSizer - Malvern UK Instrumments)
- Centrífuga para eppendorf (Hettich centrifugen - Micro220)
- Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta (650 FEG, FEI)

- Obtenção de nanopartículas de quitosana com o composto *N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-benzidrazida* (*Nps-H*) e nanopartículas de quitosana vazias (*Nps-Cs*).

O método de obtenção das nanopartículas foi baseado no método de gelificação iônica, recomendado por diversos trabalhos (CALVO, 1997; GUTERRES *et al*., 2003, KANG *et al*., 2015; NEVES, 2013). A quitosana de baixo peso molecular, por ter cadeias poliméricas menores, propiciam a formação de partículas com menor IPD e dependendo das condições reacionais, partículas menores que quitosanas de médio e alto peso molecular (GUTERRES *et al.,* 2003). As *Nps-H* foram preparadas na proporção de quitosana/ TPF de 3:1 da seguinte forma:

Dissolveu-se a quitosana de baixo peso molecular em ácido acético 1%, e acertou-se o pH da solução com hidróxido de sódio 1 M para o pH 5,2 e obteve-se a concentração final de 2 mg/mL de quitosana. A solução foi mantida sob agitação magnética por aproximadamente 2 horas.

O volume de 6 mL da solução de quitosana foi colocado em béquer de 25 mL e adicionaram-se 0,5 mL de álcool etílico PA como co-solvente para auxiliar na solubilização do nitrocomposto e 15 mg de Polissorbato *20*, importante no sistema para manter a estabilidade coloidal e a solubilização do nitrocomposto. Esse sistema foi homogeneizado sob agitação magnética.

Dissolveu-se o nitrocomposto em solução de álcool etílico PA, sob o abrigo da luz obtendo-se a concentração de 1 mg/mL e gotejou-se vagarosamente 0,2 mL dessa

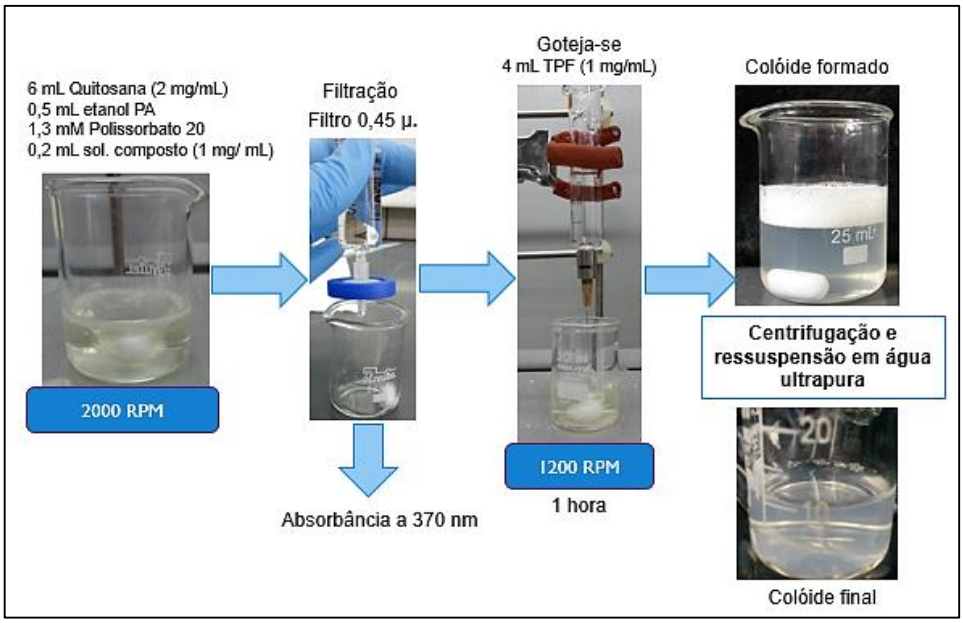
solução na solução de quitosana sob vigorosa agitação (2.000 RPM). Filtrou-se em membrana 0,45 µm para descartar possíveis resquícios de quitosana e compostos insolúveis. Mediu-se a absorbância em espectrofotômetro a 370 nm (comprimento de onda de absorção do composto) antes e depois da filtração para obter exatidão da perda de composto no processo de filtração.

Preparou-se uma segunda solução pela dissolução do poliânion (agente reticulante) tripolifosfato de sódio (TPF) em água, obtendo a concentração de 1 mg/mL, filtrou-se em membrana de 0,45 µm e gotejou-se o filtrado na solução de quitosana, usando seringa com agulha de vazão de 1,5 mL/min, sob agitação magnética a 1.200 rpm à 25 ºC. Após o gotejamento, a solução continuou nas mesmas condições de agitação por mais 1 hora. Após alguns minutos de agitação, é possível observar a formação do sistema coloidal.

Um volume de 1 mL do sistema coloidal foi adicionado a eppendorf com 20 µL de glicerol, este com a finalidade de auxiliar na separação das partículas e formar uma camada de suporte no fundo. Este sistema foi centrifugado 2 vezes a 13.000 *g* por 15 min a 25 ºC e, após esse procedimento, retirou-se a camada sobrenadante e ressuspendeu-se as nanopartículas em água ultrapura.

As *Nps-Cs* foram preparadas da mesma forma e com os mesmos componentes, porém sem a etapa de adição do composto.

Figura 15 - Esquema geral de preparação das *Nps-H*.



Fonte: O autor (2018).

Antes de encontrar um experimento que resultasse nos parâmetros adequados para obtenção das nanopartículas foram realizados experimentos de forma empírica, com diversas modificações dos parâmetros experimentais e após encontrar as variáveis do processo, realizou-se planejamento experimental fatorial (Tabela 3). O experimento descrito e apresentado anteriormente (Figura 15) é o experimento base do planejamento fatorial, em que foram modificadas as concentrações de NaCl e a concentração de Polissorbato 80 nas soluções de quitosana e TPF como variáveis do planejamento fatorial, mantendo as concentrações dos demais reagentes descritos e apresentados na Figura 15. As diferentes concentrações de Polissorbato 80 foram adicionadas juntamente com o Polissorbato 20 no sistema, porém este último sem variação de sua concentração.

Neste contexto, o planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que visa estabelecer as interferências de um processo em diferentes respostas, com o objetivo de entender e estabelecer as variáveis de um processo em suas respostas. Assim, realizou-se um estudo das variáveis “concentração de NaCl” e “concentração de Polissorbato 80” em diferentes respostas, como tamanho da partícula, índice de polidispersão, EE% e potencial zeta das partículas, visando otimizar os parâmetros de obtenção das nanopartículas.

Tabela 3: Planejamento fatorial das nanopartículas de quitosana carregadas

Experimento	**NaCl (%)**	**Polissorbato 80 (%)**
1	0	0,2
2	0,9	0,1
3	0,45	0,1
4	0,9	0,2
5	0	0,1
6	0	0
7	0,9	0
8	0,45	0,2
9	0,45	0

Fonte: O autor (2018).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram caracterizadas através da determinação do tamanho médio da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta (ζ), eficiência de encapsulação das nanopartículas, morfologia e superfície.

5.3.1 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ)

As medidas de tamanho e índice de polidispersão das partículas foram obtidas por espalhamento da luz dinâmica (*dynamic light scattering* – DLS). O tamanho médio das partículas foi obtido por valores de intensidade de sinal e por número de nanopartículas; o índice de polidispersão pelo índice de correlação do espalhamento de luz dinâmico, em ângulo de 173º, sem diluição da amostra. O potencial zeta (ζ) foi determinado pela medida da mobilidade eletroforética das partículas por dispositivo DIPCEL.

As medições de tamanho e índice de polidispersão por DLS foram feitas com atenuador automático à 25 ºC. Os diâmetros médios e os índices de polidispersão foram estimados por funções de autocorrelação com análise cumulativa.

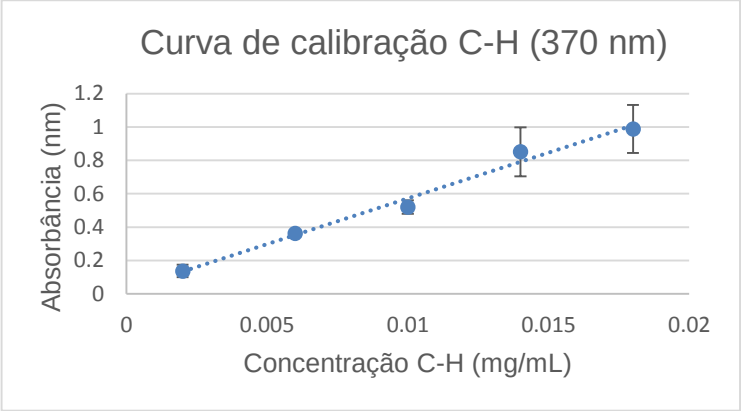
O potencial zeta (ζ) foi calculado pela mobilidade eletroforética das nanopartículas, medindo a velocidade das partículas a *laser* usando *Laser Doppler Velocimetry* (LDV). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

5.3.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%)

Para determinação da associação do fármaco às nanopartículas, foi realizada varredura e a construção de curva de calibração para o composto testado, em espectrofotômetro UV/VIS à 370 nm.

A curva de calibração foi realizada a partir do composto solubilizado em etanol PA na concentração de 1 mg/mL e então diluído em diferentes concentrações em soluções de sobrenadante de nanopartículas vazias, preparadas conforme o item 5.2. Os sobrenadantes com concentrações conhecidas de composto simulam o sobrenadante das Nps-H, com concentração de composto a serem determinadas (teste).

Figura 16 - Curva de calibração em espectrofotômetro para o composto a 370 nm.



Fonte: O autor (2018).

A eficiência de encapsulação do composto nas nanopartículas foi determinado de forma indireta, ou seja, pela leitura do sobrenadante do colóide e aplicou-se o valor da absorbância na fórmula encontrada na curva de calibração do composto (Figura 16).

Assim, determinou-se a quantidade de composto no sobrenadante e posteriormente a eficiência de encapsulação por método indireto pela seguinte fórmula:

$$EE\% = \frac{[\text{composto inicial}] - [\text{composto final}]}{[\text{composto inicial}]} \times 100$$

Equação 3: Eficiência de encapsulação das nanopartículas de quitosana

Em que: [composto inicial] é a concentração inicial do composto para encapsulação nas nanopartículas; e [composto final] é a concentração do composto no sobrenadante calculada pela equação definida pela curva de calibração do composto.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.4.1 Preparo do inóculo e determinação de resistência

As cepas utilizadas para determinação da atividade antimicrobiana foram *Staphylococcus aureus ATCC 29213*, *hVISA* (heterogeneous intermediate vancomicyn *S. areus*) e *ORSA* (oxacilin resistant *S. aureus*).

Os inóculos foram preparados a partir de colônias congeladas em glicerol a -18 ºC. Separadamente, as colônias de *Staphylococcus aureus ATCC 29213*, *hVISA* e *ORSA* foram descongeladas em temperatura ambiente e então ressuspensas em 5 mL de caldo Mueller-Hington e as culturas foram cultivadas em tubo fechado e inclinado a 35 ºC por 24 horas em estufas B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). Após esse período, as concentrações das culturas foram diluídas em caldo Mueller-Hington conforme a escala Mc Farland de turbidez, em que se mediu-se a turbidez das culturas equivalentes a 1.10^8 UFC/mL em espectrofotômetro a 580 nm, resultando na absorbância de 0,08 a 0,1 (ANVISA, 2003).

A resistência das cepas foi confirmada por meio do teste em disco difusão, utilizando ágar Mueller-Hington como meio de cultura e discos de vancomicina (30 µg) e oxacilina (1 µg) (ANVISA, 2003).

Com um *swab*, realizou-se o plaqueamento da cultura em ágar Mueller-Hington, espalhando a cultura com o *swab* em todos os sentidos da placa. Aplicou-se os discos de vancomicina 30 µg e oxacilina 1 µg na superfície das placas que foram seladas e incubadas a 35 ºC por 24 horas. Após o período de crescimento, mediu-se o campo ao redor dos discos de antimicrobianos com paquímetro, ou seja, o halo em que não houve crescimento bacteriano.

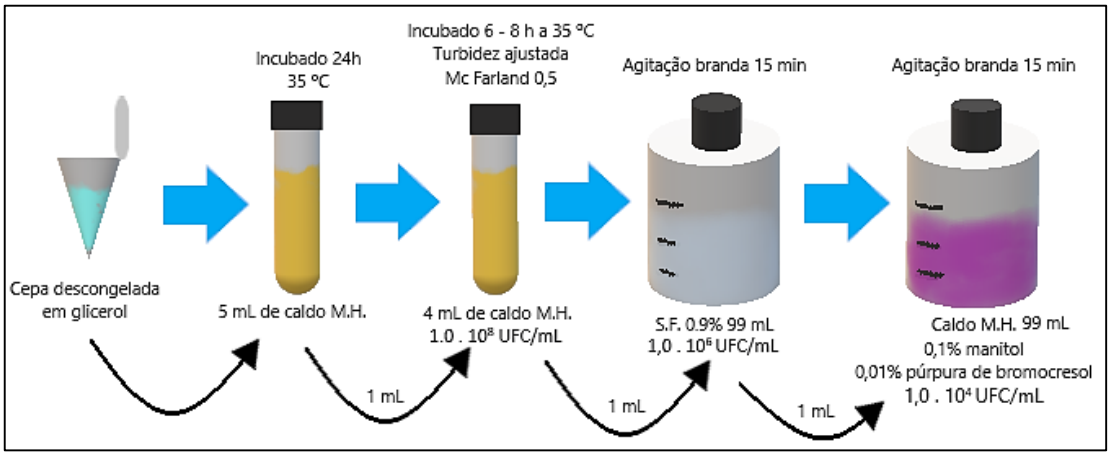
Para o ensaio biológico (Figura 17), os inóculos foram preparados separadamente a partir de culturas cultivadas em caldo Mueller-Hington a 35 ºC por 24 horas. Cerca de 1 mL dessas culturas foram ressuspensas em 4 mL de caldo Mueller Hington e então incubadas em B.O.D. a 35 ºC por 6 a 8 horas. As culturas resultantes foram diluídas com caldo Mueller-Hington para obter a turbidez de 0,5 da escala Mc Farland (ANVISA, 2003).

Após o ajuste, o volume de 1 mL das culturas foi transferido para 99 mL de solução fisiológica 0,9%, ajustando a concentração dos inóculos para $1,0.10^6$ UFC/mL. Para ressuspender de forma homogênea e desfazer possíveis aglomerados celulares, as suspensões bacterianas obtidas foram mantidas sob agitação magnética branda por 15 minutos.

1 mL da suspensão bacteriana obtida anteriormente foi adicionada sobre 99 mL de caldo Mueller-Hington com 0,01% de corante púrpura de bromocresol e 0,1% de manitol. A concentração final desta suspensão foi estimada em $1,0.10^4$. Agitou-se brandamente esta suspensão bacteriana em agitador magnético por 15 minutos. Este

inóculo foi utilizado para a determinação da atividade das *Nps-H*, *Nps-Cs* comparativamente ao composto livre frente às cepas multirresistentes.

Figura 17 – Cultivo e obtenção de inóculos de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus.*



Fonte: O autor (2018).

O corante púrpura de bromocresol foi utilizado como indicador de crescimento bacteriano, indicando que a bactéria realiza o metabolismo da fonte de carboidrato do meio (manitol). O corante modifica sua coloração de acordo com o pH do meio, com o crescimento bacteriano e o metabolismo do carboidrato. Com isso, as bactérias geram como metabólito o ácido pirúvico e assim, o indicador muda sua coloração de roxo (pH acima de 6,8) para amarelo (pH abaixo de 5,2) (TIPPETT; ZELEZNICK; ROBB, 1970).

Esse indicador foi utilizado para indicar a concentração inibitória mínima, ou seja, indica a concentração mínima de *Nps-H*, *Nps-Cs* e *C-H* necessária para inibir 100% do crescimento bacteriano. A necessidade do uso do indicador se deve à falta de confiabilidade de realizar a leitura dos ensaios por turbidimetria e espectrofotometria, uma vez que as nanopartículas estão em suspensão, podendo interferir nas leituras e interpretação dos resultados.

5.4.2 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada conforme a indicação do corante púrpura de bromocresol na concentração mínima necessária para inibir o crescimento

bacteriano. Realizou-se dois ensaios para cada cepa para determinação da atividade antibacteriana do composto livre, das *Nps-H* e *Nps-Cs* em microplacas de 96 poços.

Todas as amostras (composto livre, *Nps-H* e *Nps-Cs*) foram preparadas a partir da solução inicial com DMSO 8% e caldo Mueller-Hington com o dobro das concentrações de estudo em placas de poço profundo.

Para o ensaio, pipetou-se 100 µL das amostras com o dobro da concentração para a microplaca e adicionou-se 100 µL do inóculo preparado com púrpura de bromocresol, dividindo as concentrações pela metade. Agitou-se e incubou-se as microplacas totalmente seladas por 18 horas a 35 ºC em estufa B.O.D. O primeiro ensaio foi realizado com intervalos de concentrações maiores, para determinar a faixa de atividade dos agentes com as seguintes concentrações de *C-H* livre e composto dentro das *Nps-H*: 4,14 µg/mL (16 µM), 2,07 µg/mL (8 µM), 1,04 µg/mL (4 µM), 0,52 µg/mL (2 µM), 0,26 µg/mL (1 µM), 0,13 µg/mL (0,5 µM) e 0,06 µg/mL (0,25 µM). As *Nps-Cs* foram testadas nas mesmas diluições.

Após a determinação da faixa de atividade, realizou-se outro ensaio com faixas de concentrações menores de *C-H* e *Nps-H*: 2,33 µg/mL (9 µM) a 0,03 µg/mL (0,1 µM) e as mesmas diluições para *Nps-Cs*, variando 0,5 µM entre as concentrações, conforme demonstrado na Figura 18.

As concentrações testadas de *Nps-H* foram baseadas nas concentrações de *C-H* livre, ou seja, a eficiência de encapsulação do composto nas nanopartículas foi utilizada como parâmetro para a concentração de *Nps-H* utilizada nos ensaios. As diluições de *Nps-Cs* foram as mesmas das *Nps-H*.

Figura 18 – Representação do esquema utilizado para determinação da atividade antimicrobiana de *C-H*, *Nps-H* e *Nps-Cs* em microplaca.

	Concentrações	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	11	12
A	Composto (µg/mL)	2,33	1,81	1,30	0,78	0,26	Nps (µg/mL)	145,5	113,2	80,86	48,52	16,17	C.P.	C. DMSO
B		2,20	1,68	1,17	0,65	0,13		137,5	105,1	72,77	40,43	8,086	CP.	C. DMSO
C		2,07	1,55	1,04	0,52	0,06		129,4	97,03	64,69	32,34	4,043	C.P.	C. DMSO
D		1,94	1,42	0,91	0,39	0,03		121,3	88,95	56,6	24,26	1,617	B. C.P.	C. DMSO
E	Composto (µg/mL)	2,33	1,81	1,30	0,78	0,26	Espaço vazio						C.N.	C. DMSO
	Nps (µg/mL)	65,70	51,12	36,51	21,91	7,30								
F	Composto (µg/mL)	2,20	1,68	1,17	0,65	0,13							C.N.	C. DMSO
	Nps (µg/mL)	62,07	47,47	32,86	18,26	3,65								
G	Composto (µg/mL)	2,07	1,55	1,04	0,52	0,06							C.N.	C. DMSO
	Nps (µg/mL)	58,42	43,82	29,21	14,61	1,83								
H	Composto (µg/mL)	1,94	1,42	0,91	0,39	0,03							C. N.	B. C. DMSO
	Nps (µg/mL)	54,77	40,16	25,26	10,95	0,73								

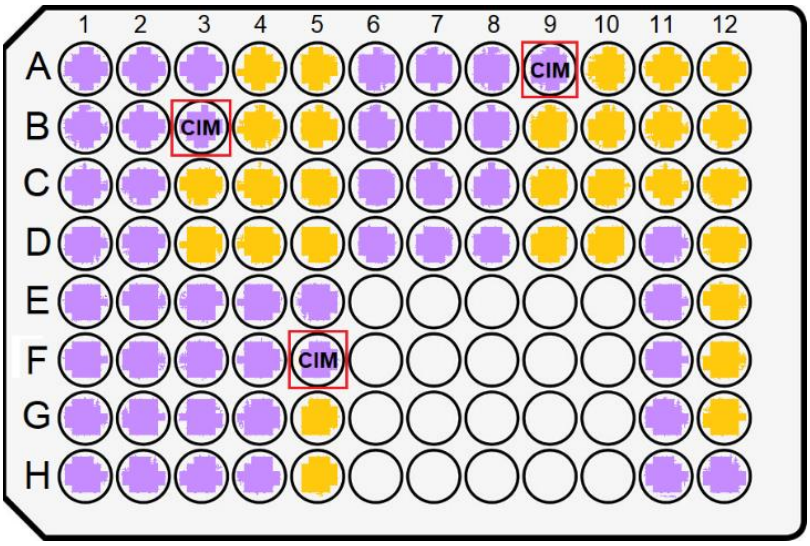
Composto livre Nps-H Nps-Cs

C.P. = controle positivo
B. C.P. = branco do controle positivo
C.N. = controle negativo
C. DMSO = controle positivo com 4% DMSO
B.C. DMSO = branco do controle positivo com 4% DMSO

Fonte: O autor (2018).

Decorridos 18 horas, analisou-se as microplacas identificando-se a concentração dos agentes testados que foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, as menores concentrações que o indicador está arroxeado, conforme o exemplo da Figura 19.

Figura 19 - Exemplo de determinação da concentração inibitória mínima.



Fonte: O autor (2018).

5.5 ANÁLISES TÉRMICAS

5.5.1 Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry - DSC)

Analisou-se as temperaturas de transição vítrea (*Tg'*) e temperatura eutética (*Teut*) das *Nps-H* com três diferentes tipos de excipientes, com função criprotetora e lioprotetora, em três concentrações, e foram eles: lactose, sacarose e glicina a 2,5%, 5% e 10%.

As *Nps-H* e *Nps-Cs* foram centrifugadas a 13.000 xg e ressuspensas com metade do volume de água ultrapura (0,5 mL) e adicionou-se a outra metade do volume (0,5 mL) com os excipientes preparados previamente com o dobro das concentrações (5%, 10% e 20%), resultando nas concentrações finais de 2,5%, 5% e 10%.

A execução das análises foi realizada no equipamento de DSC (Perkin Elmer precisely, DSC 4000). A calibração do equipamento foi realizada com água ultrapura (faixa de fusão 0 ºC e $\Delta H = 335\ Jg^{-1}$).

Pesou-se cerca de 8 mg de cada amostra em cadinhos de alumínio e foi submetida sob congelamento a -60 ºC e reaquecimento até 20 ºC a 10 ºC/min.

5.5.2 Criomicroscopia

As Nps-H foram analisadas em microscópio acoplado a módulo de liofilização, o Lyostat 2 com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). Colocou-se cerca de 5 µL amostras de *Nps-H* e *Nps-H* com glicina, lactose e sacarose nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% em lâminas de quartzo e foram colocadas em microscópio com lente objetiva com aumento de 100x. As amostras de nanopartículas foram submetidas sob congelamento a -60 ºC e reaquecimento para 10 ºC a 10 ºC/min e pressão de 100 mTorr. Foram analisadas as temperaturas de colapso (*Tcol*) das amostras.

5.7 LIOFILIZAÇÃO

A liofização das amostras de *Nps-H* e *Nps-H* com glicina, lactose e sacarose à 2,5%, 5% e 10% foram realizadas em liofilizador microprocessado com secador controlado de bandejas (FTS systems, TDS-00209-A). Pipetou-se 2 mL das *Nps-H* centrifugadas e ressuspensas em diferentes concentrações dos excipientes em frascos de vidro de 10 mL e foram parcialmente fechados com tampas de borracha, permitindo a saída de água do sistema.

Realizou-se o pré-congelamento das amostras a -40 ºC e o congelamento prosseguiu na mesma temperatura por 30 minutos. A secagem primária foi realizada a -40 ºC com pressão da câmara a 100 mTorr e temperatura do condensador a -90 ºC. A secagem secundária foi realizada a 10 ºC e pressão da câmara a 100 mTorr e temperatura do condensador a -90 ºC ± 1 ºC.

Determinou-se a umidade relativa das amostras liofilizadas no equipamento COMPUTRAC (Vapor Pro, Arizona Instruments) e posteriormente foram ressuspensas em água ultrapura para análises por DLS, com o objetivo de analisar as características das nanopartículas após o processo de liofilização.

5.8 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).

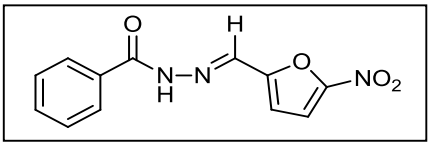
As amostras de *Nps-H* e *Nps-Cs* para análise em MEV foram preparadas a partir suspensão de nanopartículas, em que uma gota da suspensão foi colocada sobre uma lâmina de vidro e foram secas em dessecador na presença de pentóxido de fósforo. As amostras das *Nps-H* liofilizadas com glicina, lactose e sacarose a 5% foram preparadas a partir do produto liofilizado seco.

As amostras de MEV foram preparadas pelo Laboratório de Caracterização Tecnológica (Politécnica/Universidade de São Paulo), em que as amostras foram recobertas com platina em equipamento de recobrimento (Bal-tec, MED020) e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta 650 FEG, FEI) em voltagem de 5 kV.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese e Identificação do composto

Figura 20 - *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida*.



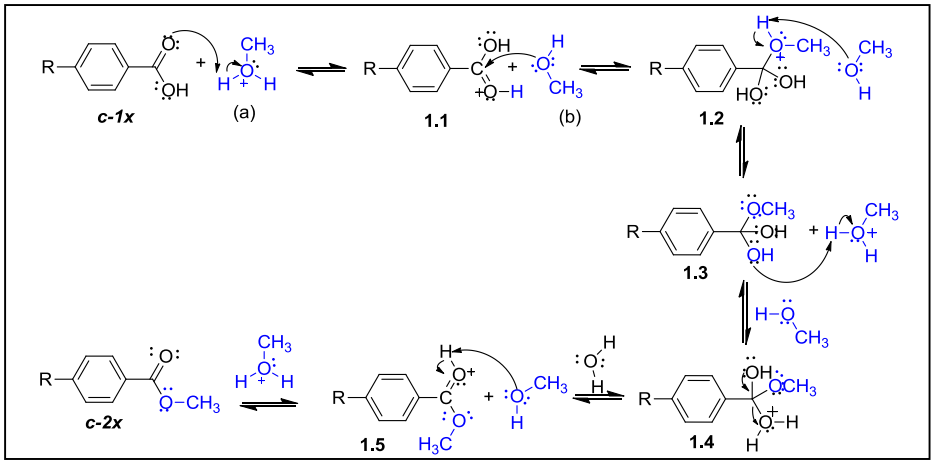
Fonte: Tavares (1996)

A síntese química do composto *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida* consistiu em 3 etapas, duas delas utilizando a técnica *one pot*, desenvolvida por Jorge (2011) a saber: obtenção de ésteres de ácidos benzóicos e conversão na respectiva benzidrazida e preparação da base de Schiff.

6.1.1 Obtenção do benzoato de metila

O benzoato de metila foi obtido aplicando-se o método de esterificação de Fisher. Apresenta-se na Figura 21 o mecanismo de reação envolvido nesta reação.

Figura 21 - Mecanismo de formação de ésteres por esterificação de Fischer



Fonte: Solomons e Fryhle (2012).

Na esterificação de Fischer, o carbono carbonílico do ácido carboxílico sofre protonação. Há doação de um próton proveniente da transferência de próton do ácido (catalisador) para o álcool. Essa protonação do ácido carboxílico provê um caráter

positivo à carbonila, favorecendo o ataque nucleófilo do álcool à carbonila. O ataque forma o íon alquiloxônio, que perde um próton, gerando um intermediário neutro. O oxigênio presente em uma das hidroxilas deste intermediário sofre protonação, resultando na perda de uma molécula de água, gerando a forma protonada do éster. A desprotonação do éster transforma-o em sua forma neutra (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

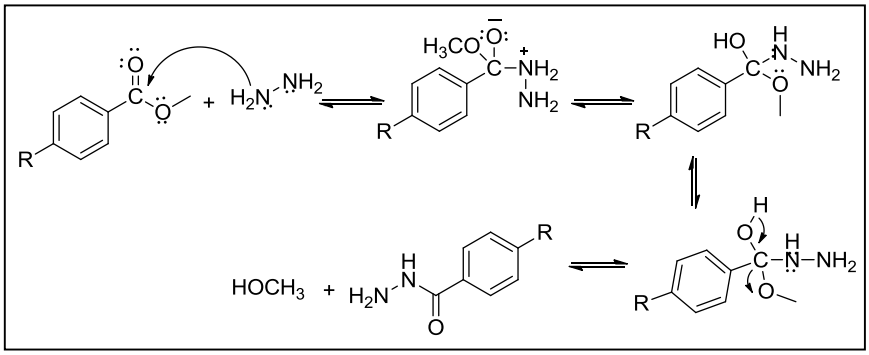
A reação de esterificação é reversível e está em equilíbrio estequiometricamente. Para aumentar a formação de produtos, a estratégia foi deslocar o equilíbrio em direção a formação dos produtos, aumentando a quantidade de um dos reagentes (SOLOMONS; FRYHLE, 2012). No caso, a opção escolhida foi utilizar excesso de metanol, por ter menor custo que os ácidos benzóicos e favorecer a etapa reacional subsequente de obtenção da benzidrazida (PALACE-BERL, 2017; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

. Jorge (2011) demonstrou que ésteres não isolados demonstraram maiores rendimentos comparados aos ésteres isolados. Além disso, o meio reacional utilizado (metanol e ácido sulfúrico) é propício para a reação de hidrazinólise, etapa subsequente (PALACE-BERL, 2017; SOLOMONS; FRYHLE, 2012), sendo estas as razões que levaram a opção por utilizar a técnica *on pot*, por isso o éster obtido não foi quantificado e identificado.

6.1.2 Obtenção e identificação da benzidrazida

A benzidrazida foi obtida a partir da reação de hidrazinólise, com mecanismo apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Mecanismo da reação de hidrazinólise



Fonte: Solomons e Fryhle (2012).

O meio reacional consistiu em metanol, ácido sulfúrico; o éster obtido, não isolado, e a hidrazina 80% para a reação. Na reação, o éster sofre substituição nucleofílica por adição-eliminação em carbono acílico. O carbono carbonílico que está deficiente de elétrons sofre o ataque nucleófilo da hidrazina, formando um intermediário que dissociado, forma as amidas e há eliminação de um grupo alcoxila (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

6.1.2.1 Rendimentos e identificação da benzidrazida

A reação *on pot* para obtenção da benzidrazida a partir do ácido benzóico resultou em rendimento (η), de 80,3%. Analisou-se a pureza da benzidrazida através de análise de faixa de fusão, comparando com dados da literatura.

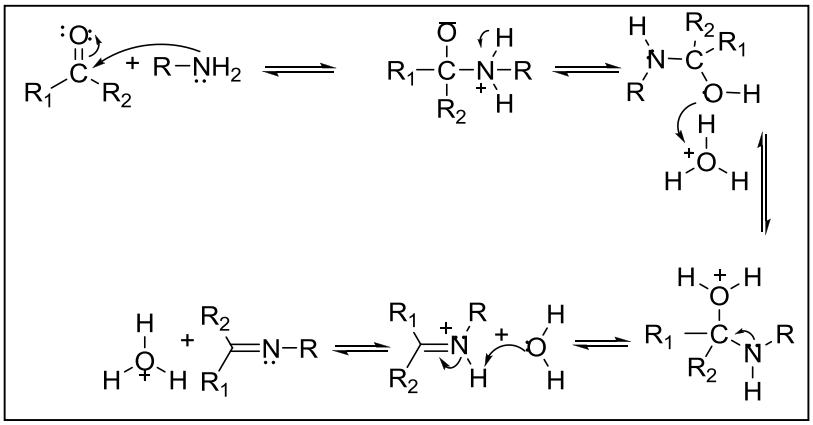
Benzidrazida:
η: $(80,3\%)_{exp.}$; $(67\%)_{lit.*}$
Faixa de fusão: $(108,2 – 110\ °C)_{exp.}$; $(111 – 113\ °C)_{lit*}$.
*Fonte: Beistein's (1979).

O rendimento para o composto obtido foi superior ao encontrado na literatura e a faixa de fusão encontra-se bem próxima à faixa estipulada pela literatura. A benzidrazida foi obtida e nesta condição foi utilizada na etapa subsequente.

6.1.3 Obtenção de Base de Schiff

O derivado azometínico, base de Schiff, foi obtido por meio da reação de condensação da benzidrazida obtida na etapa anterior com 5-nitro-2-furaldeído, reação que se dá através do mecanismo de adição nucleofílica para formação de ligação azometínica (SODERBERG, 2014).

Figura 23 - Mecanismo de reação para obtenção das bases de Schiff.



Fonte: Soderberg (2014).

Para formação da base de Schiff há, primeiramente, ataque nucleofílico da amina primária da benzidrazida ao carbono carbonílico proveniente do 5-nitro-2-furaldeído em meio ácido, que é deficiente em elétrons. Após o ataque, há formação de intermediários que propiciam a liberação de uma molécula de água. A desprotonação do intermediário imina completa a reação em sua forma neutra, a base de Schiff (SODERBERG, 2014).

6.1.3.1 Rendimentos e identificação da base de Schiff

A base de Schiff *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida* obtida apresentou η de 70% a partir da benzidrazida após recristalização em DMF apresentando a faixa de fusão aproximada à descrita na literatura.

- Base de Schiff: *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida*

η: $(70{,}0\%)_{exp.}$; $(86\%)_{lit.*}$

Faixa de fusão: $(221 – 222\ °C)_{exp.}$; $(214 – 215\ °C)_{lit*}$.

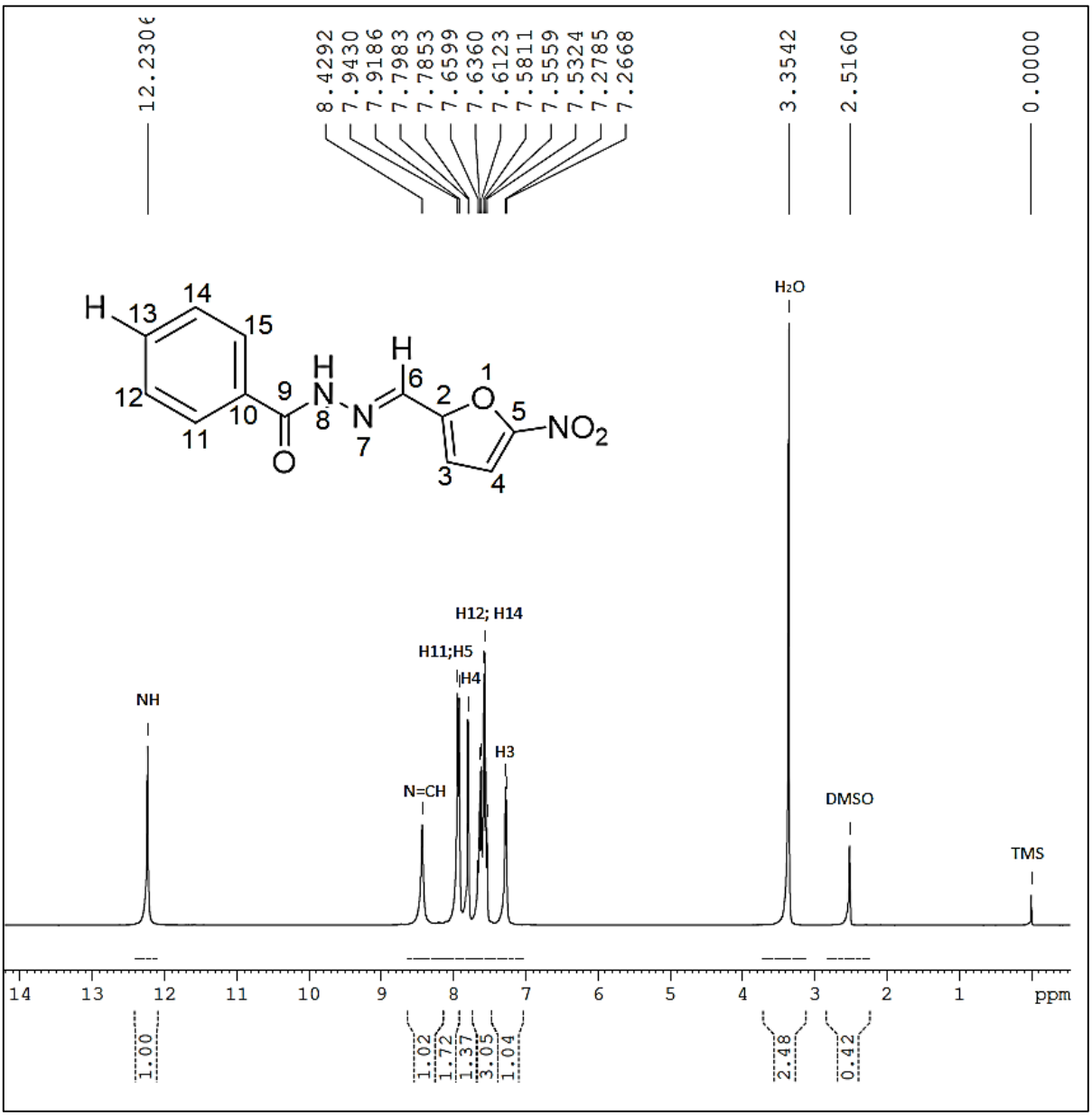
*Fonte: Beilstein's (1979).

O composto foi identificado por RMN ^{1}H e ^{13}C. As atribuições dos sinais foram realizadas e estão condizentes com a literatura (NING, 2011; PALACE-BERL, 2017), conforme demonstrado nos espectros.

- RMN H^1 com sinais característicos do grupo amino (–NH) (ppm 12,1) e do grupo azo (–N=CH) (ppm 8,4) e sinais da presença de dois hidrogênios aromáticos, benzênicos furânicos, entre 7 e 9 ppm.

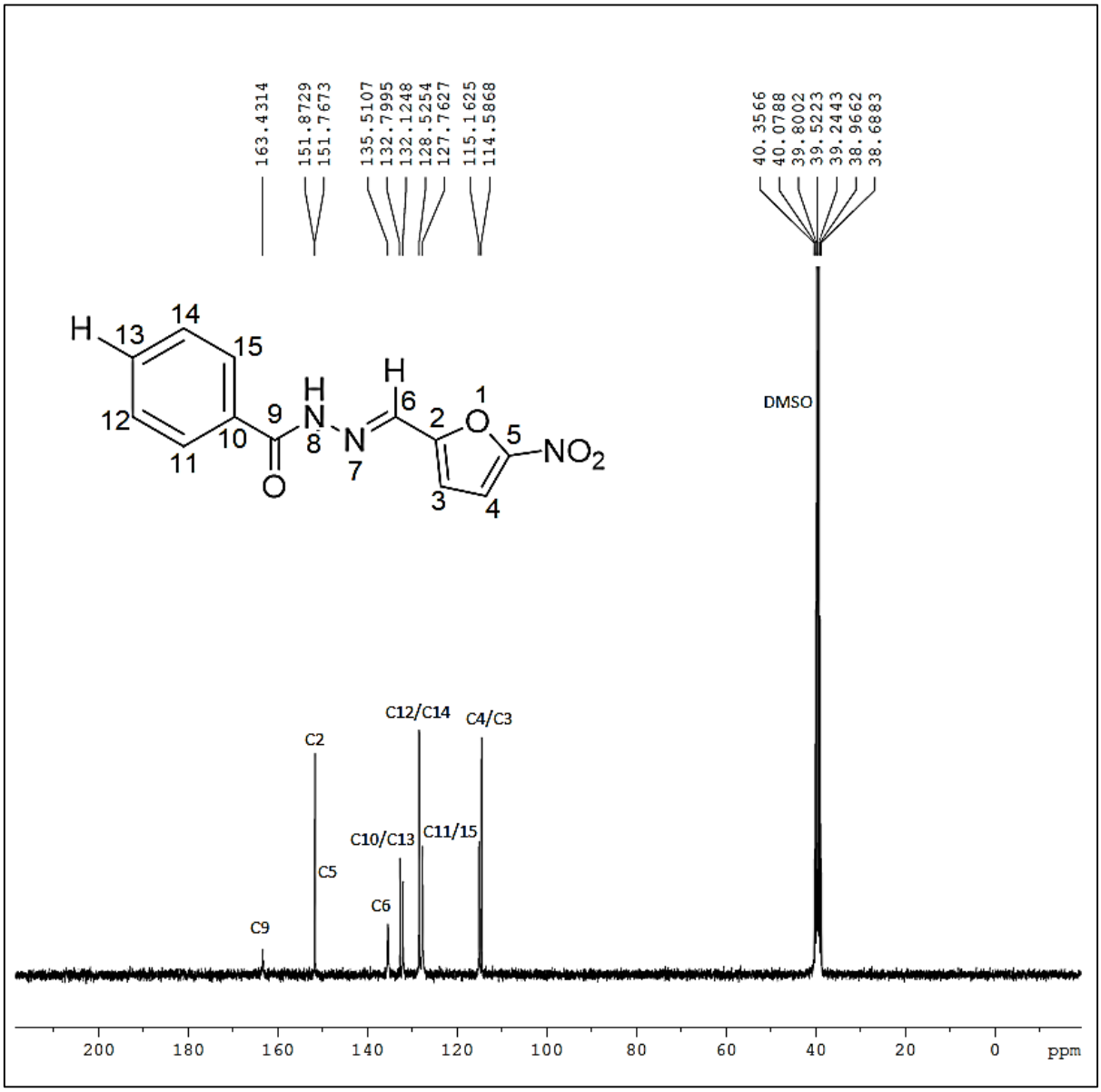
- RMN C^{13} com sinais característicos dos carbonos do anel aromático (ppm 132 -114); o carbono carbonílico de amida (ppm 163 – 162); o carbono azometínico (ppm 136 – 134); e o carbono do anel furânico (ppm 152 – 151).

Figura 24 - Espectro de RMN ^{1}H do composto *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida*



Fonte: O autor (2018).

Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C composto N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno) benzidrazida



Fonte: O autor (2018).

6.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

6.2.1 Experimentação empírica

Obteve-se nanopartículas de quitosana com o composto variando-se as concentrações de quitosana, surfactante, NaCl e tripolifosfato de sódio como forma de experimentação empírica. Observou-se que concentrações maiores de 2,5 mg/mL de quitosana formou agregados poliméricos (nanopartículas agregadas), portanto

optou-se por utilizar a concentração de 2 mg/mL, em que observou-se a formação de um colóide estável e sem agregados poliméricos.

O surfactante Polissorbato 80 foi utilizado com o objetivo de solubilização do composto hidrofóbico por solubilização micelar, em que o composto fica inserido no núcleo oleoso das micelas. O Polissorbato 20 se mostrou imprescindível na formulação por evitar agregados poliméricos, portanto, foi mantido na formulação e determinou-se uma concentração fixa para o Polissorbato 20 no sistema. O aumento da estabilidade coloidal promovida pelo Polissorbato 20 se deve à sua adsorção na superfície das nanopartículas, que por efeito estérico proporciona o aumento da distância de partículas próximas, em que há o enfraquecimento das forças de van der Waals entre elas, diminuindo a floculação (HORVOLGYI; KISS, 2008, DALTIN, 2011). Por ter uma cauda hidrofóbica maior que o Polissorbato 20, o Polissorbato 80 foi utilizado para promover maior solubilização do composto.

Além da solubilização do composto com os Polissorbatos 20 e 80, foi necessária a inserção etanol como cossolvente para auxiliar na solubilização e evitar a precipitação dos cristais do composto.

Na experimentação empírica, o NaCl demonstrou aumentar a opalescência do sistema e a estabilidade coloidal, conforme discutido no item 6.2.2. Além disso, o pH foi um fator determinante para a formação e estabilidade das nanopartículas. Em pH abaixo de 5,0 não houve formação coloidal, conhecido como efeito Tyndall, efeito característico de sistema coloidal que é a formação de suspensão opalescente (HORVOLGYI; KISS, 2008) e acima de pH 5,3 houve formação de agregados poliméricos, portanto, utilizou-se pH 5,2 como padrão para obtenção das nanopartículas e o sistema coloidal final (após adição de TPF) resultou em pH 5,5.

A melhor formulação encontrada de forma empírica que gerou os melhores resultados encontrados desta etapa, ou seja, sem a presença de agregações poliméricas visíveis e com maior estabilidade está descrita a seguir:

A solução de quitosana foi obtida a partir da massa de 12 mg de quitosana; o volume de 6mL de solução de 0,1% de ácido acético; NaCl 0.9%; 0,5 mL de etanol; 0,76 mL de NaOH para ajuste de pH; 0,2 mL da solução do nitrocomposto em etanol PA a 1 mg/mL; 0,1% Polissorbato *20* e 0,2% de Polissorbato *80* e o pH 5,2. A concentração final de quitosana é de 2 mg/mL.

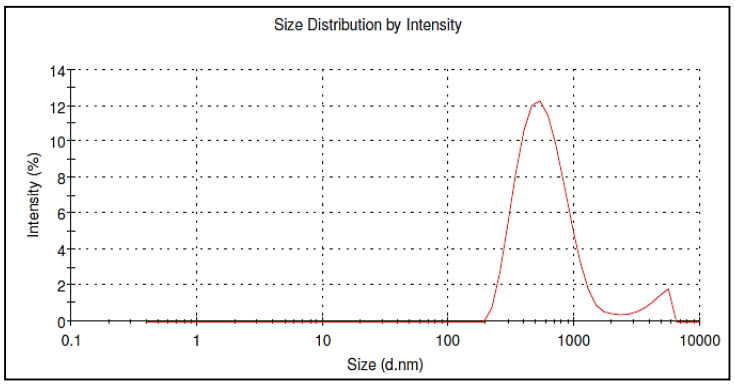
Separadamente, a solução de TPF foi obtida a partir de 4 mg de TPF em 4 mL de água ultrapura e 0,9% de NaCl, com pH 8,5, resultando na concentração de 1 mg/mL.

Filtrou-se as soluções e realizou-se a mistura das soluções por gotejamento lento (1,5 mL/min) da solução de TPF na solução de quitosana sob agitação de 1.200 RPM.

Os resultados obtidos com esse experimento foram os seguintes:

- **Tamanho médio (d.nm)**: 518,9 ± 75,3
- **PDI**: 0,236 ± 0,036
- **Potencial zeta (ζ):** 45,4 ± 3,45
- **EE%:** 9,10 ± 3,2

Figura 26 – Diâmetro por intensidade das nanopartículas obtidas a partir do experimento empírico



Fonte: O autor (2018).

O sinal mais significativo representa a maior população de nanopartículas e o segundo sinal à direita representa possivelmente uma pequena população de maior agregação polimérica em forma de micropartículas. Para a aplicação tópica que é o objetivo deste trabalho, a população de micropartículas não é um problema, uma vez que não se deseja distribuição sistêmica, mas apenas a ação local.

6.2.2 Planejamento fatorial para otimização do processo de obtenção das nanopartículas de quitosana com o análogo *N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-benzidrazida* (*Nps-H*)

O planejamento fatorial foi realizado para identificar as melhores condições para a obtenção das nanopartículas, como o tamanho, estabilidade e aumento da EE%. Os fatores escolhidos para o planejamento fatorial foram as variações de concentrações de NaCl e Polissorbato 80 nas soluções de quitosana e TPF. O NaCl mostrou mudança significativa na aparência e estabilidade dos colóides, em que observou-se que o aumento de NaCl tornava o colóide bastante estável comparando-se com os colóides sem surfactante e sem NaCl, além de o colóide obtido ser aparentemente mais opalescente do que os colóides sem NaCl, conforme a experimentação empírica realizada neste trabalho e em experimentos realizados em trabalhos anteriores (GONZALES, 2015). A concentração do surfactante Polissorbato 80 foi experimentado para avaliar sua influência na estabilidade dos colóides e por aumentar a solubilidade do composto, avaliar se altera a EE% pelas nanopartículas de quitosana (FÔNSECA, 2015; PARVEEN, MISRA, SAHOO, 2012).

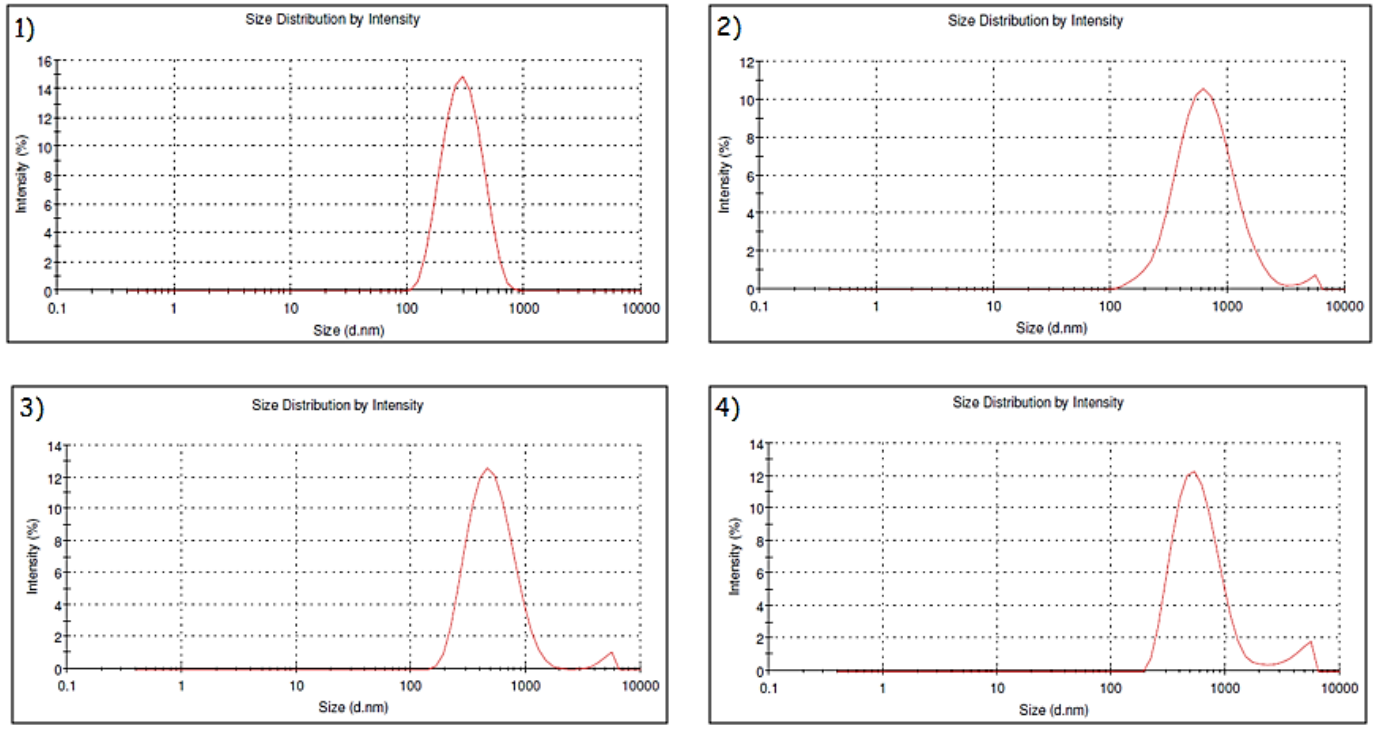
Na Tabela 4 apresenta-se os dados resultantes do planejamento fatorial.

Tabela 4 - Planejamento fatorial para obtenção das nanopartículas de quitosana com o composto (*Nps-H*) variando a concentração de NaCl e Polissorbato 80.

Experimento	**NaCl %**	Polissorbato **80 %**	**Índice de Polidispersão (PDI)**	**Tamanho por número (d.nm)**	**Tamanho por intensidade (d.nm)**	**Tamanho médio (d.nm)**	**Potencial Zeta (ζ)**	**Eficiência de Encapsulação %**
1	0	0,2	0,211 ± 0,110	188,83 ± 57,50	321,6 ± 29,81	277,16 ± 30,90	35,06 ± 7,07	41,11 ± 7,1
5	0	0,1	0,228 ± 0,029	260,40 ± 63,39	299,23 ± 8,60	297,70 ± 60,98	35,13 ± 7,88	42,28 ± 6,2
6	0	0	0,180 ± 0,004	241,40 ± 18,36	362,43 ± 19,90	321,50 ± 16,80	37,33 ± 5,79	48,07 ± 8,8
8	0,45	0,2	0,285 ± 0,087	320,56 ± 25,77	554,93 ± 28,85	496,63 ± 41,43	41,93 ± 2,72	28,6 ± 5,2
3	0,45	0,1	0,218 ± 0,018	308,20 ± 18,07	549,5 ± 45,23	460,76 ± 25,73	44,13 ± 2,04	26,54 ± 7,2
9	0,45	0	0,230 ± 0,036	326,90 ± 7,42	657,8 ± 78,50	523,06 ± 50,90	43,46 ± 0,51	8,2 ± 7,8
4	0,9	0,2	0,236 ± 0,036	355,63 ± 17,88	619,43 ± 83,51	518,93 ± 75,31	45,4 ± 3,45	9,10 ± 4,3
2	0,9	0,1	0,256 ± 0,029	325,40 ± 32,50	740,0 ± 38,50	581,86 ± 35,83	43,13 ± 2,40	27,09 ± 10,3
7	0,9	0	0,196 ± 0,040	359,70 ± 86,20	528,4 ± 51,40	457,90 ± 75,30	47,05 ± 0,63	3,78 ± 4,9

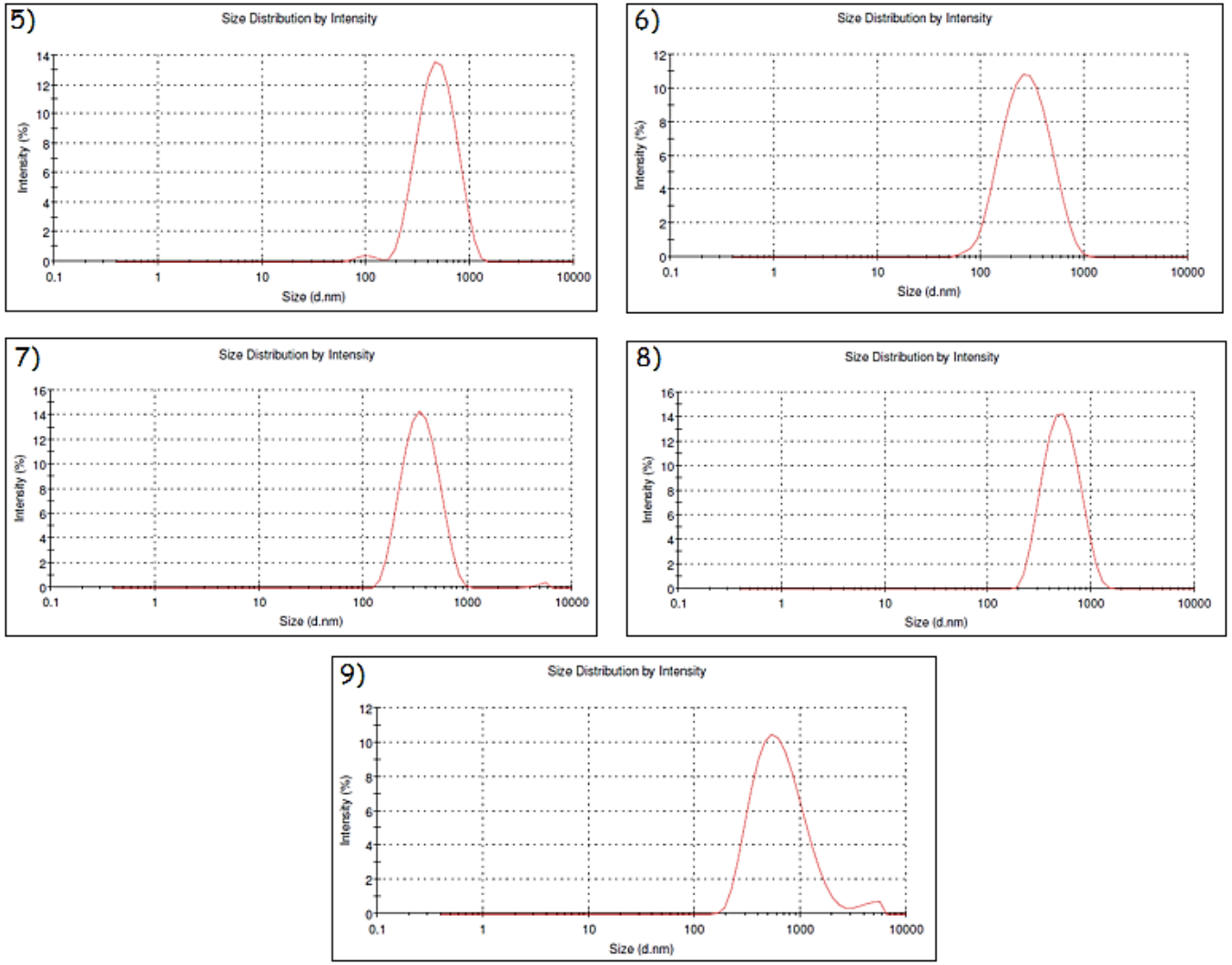
*os desvios de todas as medidas foram calculados pela média de experimentos realizados em triplicatas.

Figura 27 – Diâmetros médios por intensidade das *Nps-H* dos experimentos 1, 2, 3 e 4 do planejamento fatorial.



Fonte: O autor (2018)

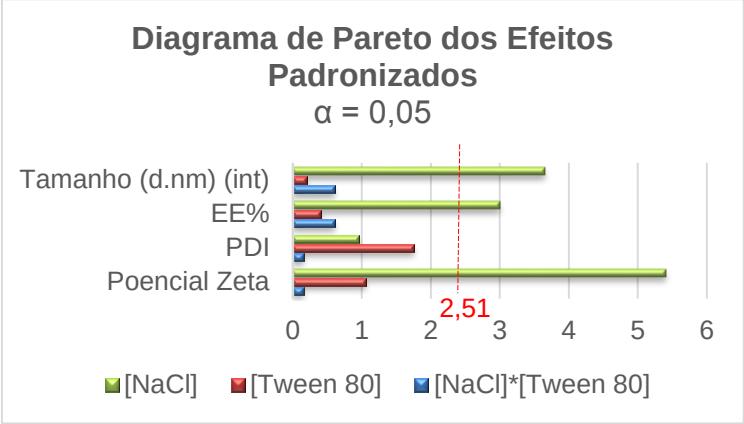
Cont. Figura 27 – Diâmetros médios por intensidade das *Nps-H* dos experimentos 5, 6, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial



:

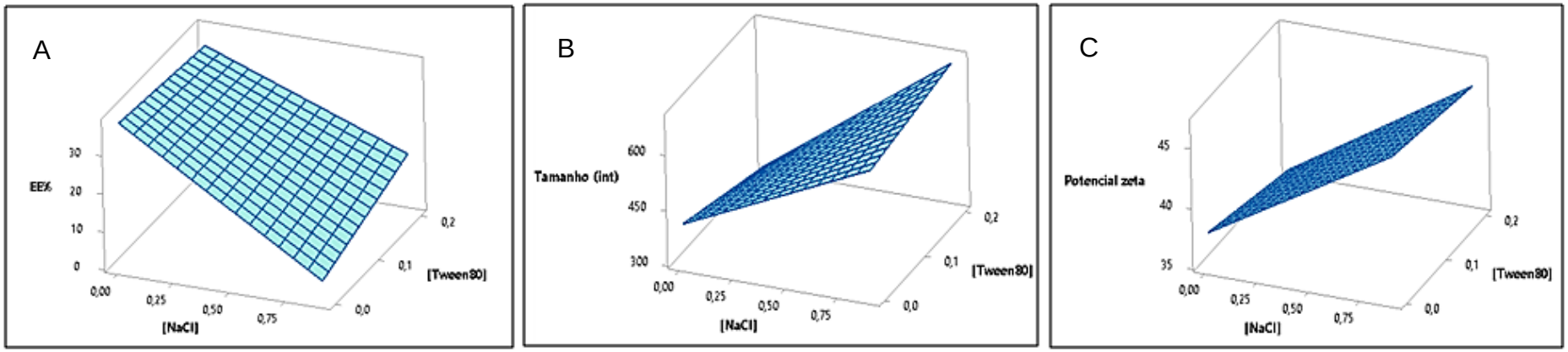
Fonte: O autor (2018).

Figura 28 - Diagrama de Pareto: Avaliação de influência de variáveis de concentração de NaCl e Polissorbato *80* (Tween 80) e interação [NaCl]*[Tween *80*] na caracterização de *Nps-H.*



Fonte: O autor (2018).

Figura 29 - Superfície de Resposta para a avaliação da influência das concentrações de NaCl e Polissorbato 80 (Tween 80) nas respostas estudadas.



Eficiência de encapsulação (EE%) (A), Tamanho por intensidade (B) e Potencial zeta (C).

Fonte: O autor (2018).

A respeito dos resultados demonstrados na Tabela 4, os índices de polidispersão se mostraram inferiores a 0,3, tendo em vista que nanopartículas para uso farmacêutico devem obedecer a uma homogeneidade de tamanho que permita liberação de fármaco e forma de ação homogênea, portanto, o índice de polidispersão recomendado é a que resulta em gráficos monomodais de tamanhos e no máximo bimodais com pouca variação de tamanhos no sistema, dependendo da aplicação farmacêutica do produto (SANCHÉZ-DOMINGUES; RODRIGUEZ-ABREU, 2016). Para a aplicação tópica no contexto deste trabalho, acredita-se que a homogeneidade de tamanhos no sistema não é um parâmetro muito relevante em termos de comprometimento da atividade farmacológica, uma vez que não se deseja a distribuição sistêmica das nanopartículas, mas apenas uma ação local.

O potencial zeta dos testes resultou em valores positivos acima de +30 mV, demonstrando a alta estabilidade dos colóides, devido à alta repulsão eletrostática entre as partículas (SANCHÉZ-DOMINGUES; RODRIGUEZ-ABREU, 2016).

Conforme os gráficos apresentados na Figura 27, observa-se pequena variação no tamanho das nanopartículas, em que as curvas se mostram estreitas em relação a variação de tamanho. Porém, os gráficos 2, 3. 4 e 9 mostraram pequeno sinal de uma população de nanopartículas maiores, perto de 1 µm. Esses sinais provavelmente são atribuídos a possíveis agregados poliméricos no sistema em pouca quantidade. Para o objetivo de aplicação das *Nps-H*, as nanopartículas não devem ter absorção sistêmica, mas apenas ação no local da lesão, assim, elas não necessitam ser muito pequenas e não há problema em haver alguns agregados poliméricos. As nanopartículas apresentaram o diâmetro maior que 200 nm, impossibilitando sua distribuição sistêmica (GAUMET *et al*., 2008).

O Diagrama de Pareto realizado demonstra os fatores que influenciam nas respostas estudadas, em que assume-se a probabilidade de significância de até 5% para as respostas. O Diagrama de Pareto mostra que três das quatro respostas (tamanho (d.nm), potencial zeta (ζ) e eficiência de encapsulação (EE%)) são influenciadas pela variação de NaCl com probabilidade de significância menor que 5% e conforme os gráficos de superfície é possível inferir que Tamanho (d.m) por intensidade e o potencial zeta aumentam e a EE% diminui conforme o aumento da concentração salina (NaCl) e o índice de polidispersão (PDI) não é influenciado significativamente por estes fatores.

Em relação ao aumento do tamanho das partículas com o aumento da concentração de NaCl, estudos realizados por Xiong *et al*. (2004) demonstram que a força iônica do sistema, induzida pela salinidade promove o aumento do tamanho das partículas devido à desestabilização das cargas das partículas pelo aumento da blindagem eletrostática, favorecendo o ajuntamento das cadeias de quitosana e assim, formação de nanopartículas de tamanhos maiores, além da força osmótica da água que ocasiona o entumecimento das nanopartículas. O aumento do tamanho das nanopartículas justifica o aumento da opalescência do sistema observado na experimentação empírica com o aumento da concentração de NaCl.

Os resultados do planejamento fatorial demonstraram que o aumento da concentração salina aumenta o potencial zeta (ζ), porém, alguns estudos realizados por Mao *et al*. (2000) e Xiong *et al*. (2004) demonstraram que o aumento da concentração salina no sistema causa uma blindagem nas cargas positivas da superfície da partícula, diminuindo o potencial zeta.

Os resultados apresentados nestes artigos podem estar se referindo à medida de potencial zeta realizada com as nanopartículas dispersas em solução salina, diferente das medidas realizadas neste trabalho, que foram obtidas em solução salina, porém lavadas com água ultrapura antes das medidas de potencial zeta. O aumento da força iônica ocasionada pelo aumento da concentração salina nas camadas de polímero das nanopartículas ocasiona diminuição do pH próximo às cargas superficiais, pelo aumento da solvatação na superfície das nanopartículas pela água, aumentando a protonação da quitosana nas superfícies das partículas e, consequentemente, aumento do potencial zeta (ζ) (IRIGOYEN *et al*., 2009). O aumento do potencial zeta com o aumento da concentração de NaCl justifica o porquê do aumento da estabilidade do sistema coloidal observado na experimentação empírica.

Em relação à eficiência de encapsulação, primeiramente, notou-se que o NaCl interfere diretamente na quantidade de composto que fica retido no filtro hidrofílico na etapa de filtração da solução de quitosana. Foram realizadas análises espectrofotométricas no UV/VIS a 370 nm em que se mediu a absorbância antes e depois da filtração da solução de quitosana com os devidos componentes de acordo com o planejamento fatorial (antes de adicionar o TPF). A Tabela 5 mostra a

porcentagem de composto que ficou retida no filtro nessa etapa e quanto realmente restou para encapsulação.

Tabela 5 - Concentração de composto disponível para nanoencapsulação após filtração.

Experimento	**NaCl (%)**	Polissorbato 80 **(%)**	**Composto retido no filtro (%)**	**Composto disponível para encapsulação (%)**
1	0	0,2	0	100
2	0,9	0,1	5,72	94,27
3	0,45	0,1	19,14	80,85
4	0,9	0,2	0	100
5	0	0,1	8,08	91,92
6	0	0	7,15	92,50
7	0,9	0	39,30	60,70
8	0,45	0,2	12,28	87,71
9	0,45	0	44,20	55,79

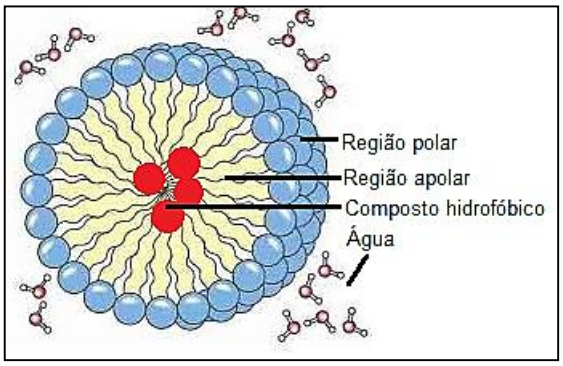
Fonte: O autor (2018).

Analisando a Tabela 5, pode-se inferir que os experimentos com maior concentração salina e sem Polissorbato 80 (experimento 7 e 9) demonstraram a maior retenção do composto no filtro. A eficiência de encapsulação do composto foi calculada descontando a quantidade de composto retida no filtro.

Baseando-se na literatura, O Polissorbato 20 e o Polissorbato 80 estão acima da CMC (concentração micelar crítica) no sistema, ou seja, supõe-se que esteja ocorrendo a formação de micelas de Polissorbato 20 (CMC = 60 μM) e Polissorbato 80 (CMC = 12,2 μM).

O composto testado, com caráter hidrofóbico, possui afinidade com a porção hidrofóbica da cadeia carbônica dos surfactantes na solução, podendo estar inserido no interior das micelas, conforme a Figura 30.

Figura 30 - Estrutura de uma micela com fármaco hidrofóbico



Fonte: Adaptado de Daltin (2011).

As micelas de Polissorbato 20 e Polissorbato 80 podem estar arranjadas de forma mista, além disso, espera-se que cadeias lipofílicas maiores como o Polissorbato *80*, proporcione maior solubilização do composto lipofílico (DALTIN, 2011).

Neste contexto, a passagem do composto hidrofóbico pelo filtro hidrofílico só é possível pela solubilização micelar, o que é dificultado pela presença de NaCl.

A grande diferença na eficiência de encapsulação com 0,9% NaCl (experimento 7) = 3% e sem NaCl (experimento 6) = 48%, demonstra que o efeito do NaCl é negativo para a EE%.

O Polissorbato *80* não monstrou interferência nas características finais das *Nps-H*, desta forma, concluiu-se os estudos com o Polissorbato 20 que está na solução base de quitosana na concentração 1,15 mM, que se mostra essencial para a estabilidade das *Nps-H* e solubilização do composto sem a presença de NaCl, condições experimentais referentes ao Experimento 6 (0% NaCl e 0% Polissorbato 80).

Para o entendimento desses resultados, foram realizados experimentos complementares que demonstrassem a importância das micelas de Polissorbato 20 na encapsulação do composto pelas nanopartículas de quitosana e o que o NaCl interfere nessa encapsulação. Os experimentos foram realizados para evidenciar que há adsorção do surfactante nas nanopartículas, bem como a encapsulação das micelas contendo o composto pelas nanopartículas de quitosana.

A Tabela 6 demonstra que há grande aumento do diâmetro das nanopartículas obtidas com Polissorbato *20* em relação a nanopartículas sem ele, evidenciando a

encapsulação de micelas e monômeros do surfactante nas nanopartículas de quitosana.

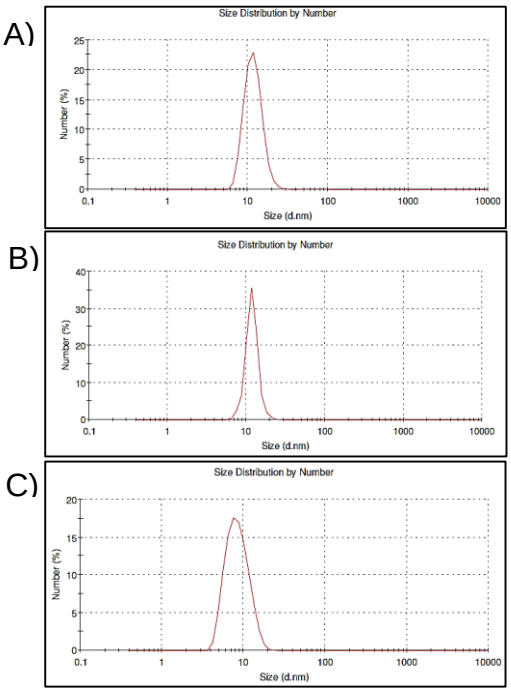
Tabela 6 - Tamanho e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas com e sem Polissorbato 20.

Experimento	Tamanho médio (d.nm)	PDI
NPs vazias s/ T20	209,2 ± 1,7	0,157 ± 0,02
NPs vazias c/ T20	320,2 ± 3,1	0,202 ± 0,01
Nps-H c/ T20 (Exp. 6)	321,5 ± 3,2	0,180 ± 0,01

* Os desvios foram calculados baseando-se na média de três medidas do equipamento (DLS).

As estruturas micelares de Polissorbato 20 foram identificadas no sistema por DLS antes da adição do TPF, ou seja, 1,15 mM de Polissorbato 20 na solução base de quitosana e o tamanho das micelas por número com composto e sem composto no sistema foi ambas de 11,9 d.nm e micelas com composto na presença de 0,9% de NaCl nesta solução foi de 8,6 d.nm.

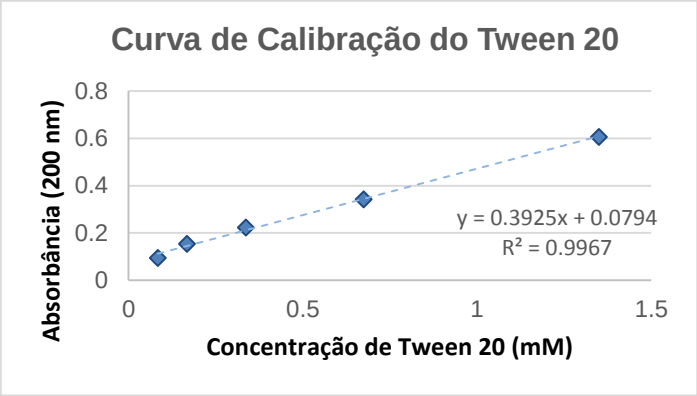
Figura 31 - Tamanho por número das micelas com composto (A), micelas sem composto (B) e micelas com composto na presença de 0,9% de NaCl (C)



Fonte: O autor (2018).

Além disso, para comprovar a adsorção de Polissorbato 20 nas nanopartículas, calculou-se a eficiência de encapsulação para o Polissorbato 20 (concentração inicial de 1,6 mM) na presença de NaCl e sem NaCl. Foi construída uma curva de calibração a 200 nm em espectrofotometria UV que foi construída adicionando diferentes concentrações de Polissorbato 20 no sobrenadante de nanopartículas vazias sem o tensoativo como componente da formulação. A eficiência de encapsulação foi calculada pelo método indireto (Equação 3).

Figura 32 - Curva de calibração em espectrofotômetro em diferentes concentrações de Polissorbato 20 a 200 nm para determinação da EE% do tensoativo.



Fonte: O autor (2018).

Tabela 7 - Avaliação da EE% de Polissorbato 20 com e sem NaCl.

Experimento	EE% do Polissorbato *20*
Nps-Cs com NaCl	91,6%
Nps-Cs sem NaCl	87,0%

Fonte: O autor (2018).

Sabe-se que os surfactantes não-iônicos como os polissorbatos, não possuem cargas verdadeiras na porção hidrofílica, portanto, possui baixa interação com outros componentes da formulação, porém, podem realizar interações de van der Waals e serem adsorvidos na superfície de polímeros, devido à presença dos grupos ricos em oxigênio na região polar da cadeia polioxietilenica dos polissorbatos, como adsorção em sílicas e quitosana com cargas positivas (DALTIN, 2011).

A EE% do Polissorbato 20 com e sem NaCl demonstra que não há interferência deste sal na adsorção do Polissorbato 20. Assim, podemos inferir que o NaCl não interfere na encapsulação do composto pela diminuição da encapsulação das micelas

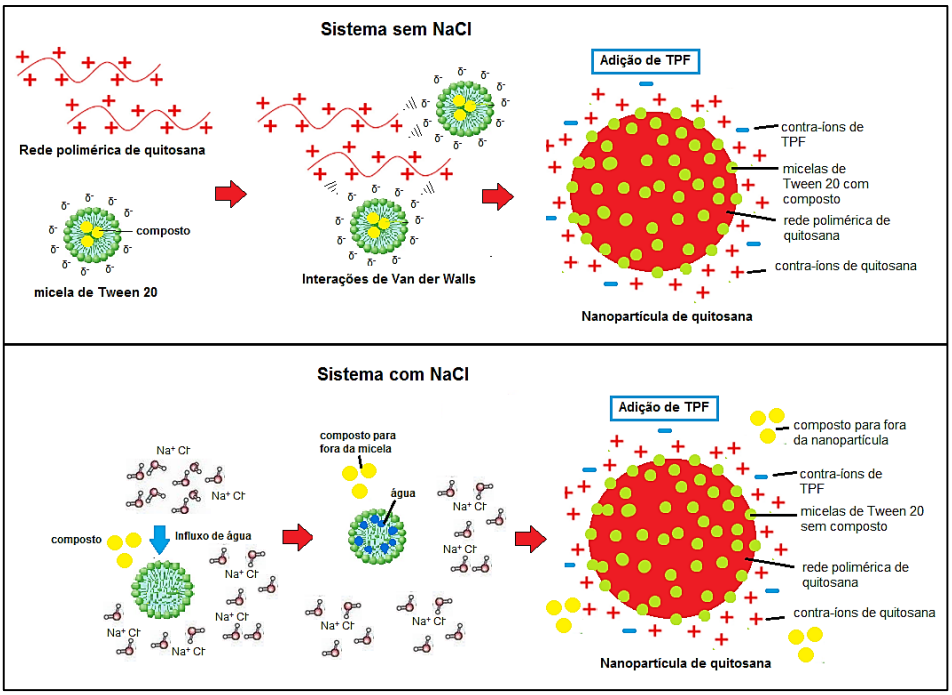
+ composto pelas nanopartículas. Outro mecanismo está envolvido na diminuição da EE% do composto testado na presença de NaCl, que ainda não são conclusivos. Contudo, podemos acrescentar algumas hipóteses no momento:

Na presença de NaCl o composto hidrofóbico fica para fora das micelas e fica retido no filtro hidrofílico e assim, sua encapsulação é dificultada uma vez que existe interação dos grupos etoxilados da micela com as cargas positivas da quitosana e sem estar inserido na micela, o composto é pouco encapsulado.

Conforme estudos realizados por Molina-Bolivar, Charlton e Doherty (2000) e Aguiar e Ruiz (2001) na presença de eletrólitos de maior força iônica como NaCl e KCl, micelas de Triton X-100 (surfactante não-iônico) sofrem um fenômeno físico não termodinâmico, mas hidrodinâmico. A micela aumenta de volume, pela agregação de mais monômeros da solução para a formação micelar e ao mesmo tempo, há um influxo de água, para dentro da micela, de forma hidrodinâmica. Esse fenômeno ocorre por que a desidratação das cabeças polares, ocasionada pela solvatação dos íons dos eletrólitos pela água, torna a superfície polar da micela ligeiramente rugosa e flexível, devido ao colapso das cadeias polares ocasionada pela presença de eletrólitos, possibilitando o influxo de água, que não é regido termodinamicamente, mas sim hidrodinamicamente. Neste contexto, é possível que esse influxo de água lance o composto apolar para fora da micela e até mesmo o impeça de entrar, efeito conhecido como *salting-out,* diminuindo sua interação e encapsulação nas nanopartículas da quitosana, comparando-se com o composto inserido no núcleo micelar (Figura 33).

Vale ressaltar, no entanto, que a discussão a respeito da influência do NaCl na EE% do composto ainda não são conclusivos, carecendo de estudos mais aprofundados.

Figura 33 - Possível formação das nanopartículas e encapsulação do composto com e sem NaCl no sistema.



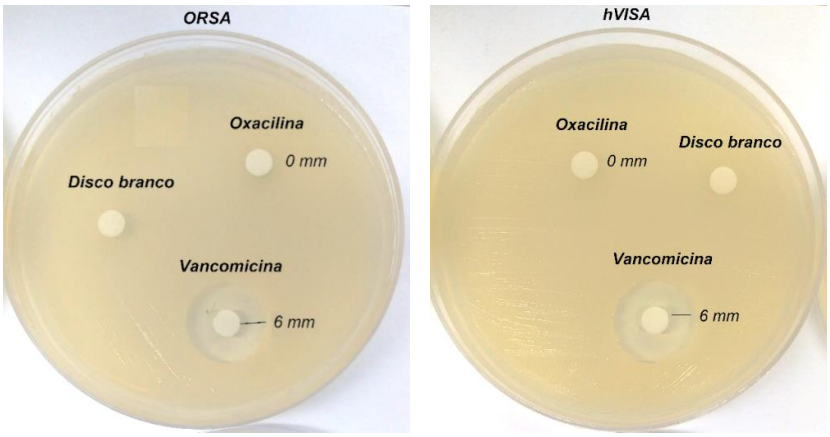
Fonte: O autor (2018).

6.3 ENSAIO BIOLÓGICO

6.3.1 Determinação da resistência das cepas de *S. aureus*

Determinou-se a resistência das cepas de *S. aureus hVISA* e *ORSA* pelo método de disco-difusão utilizando os discos de vancomicina 30 µg e oxacilina 1 µg.

Figura 34 - Ensaio de disco-difusão frente as cepas *ORSA e hVISA.*



Fonte: O autor (2018).

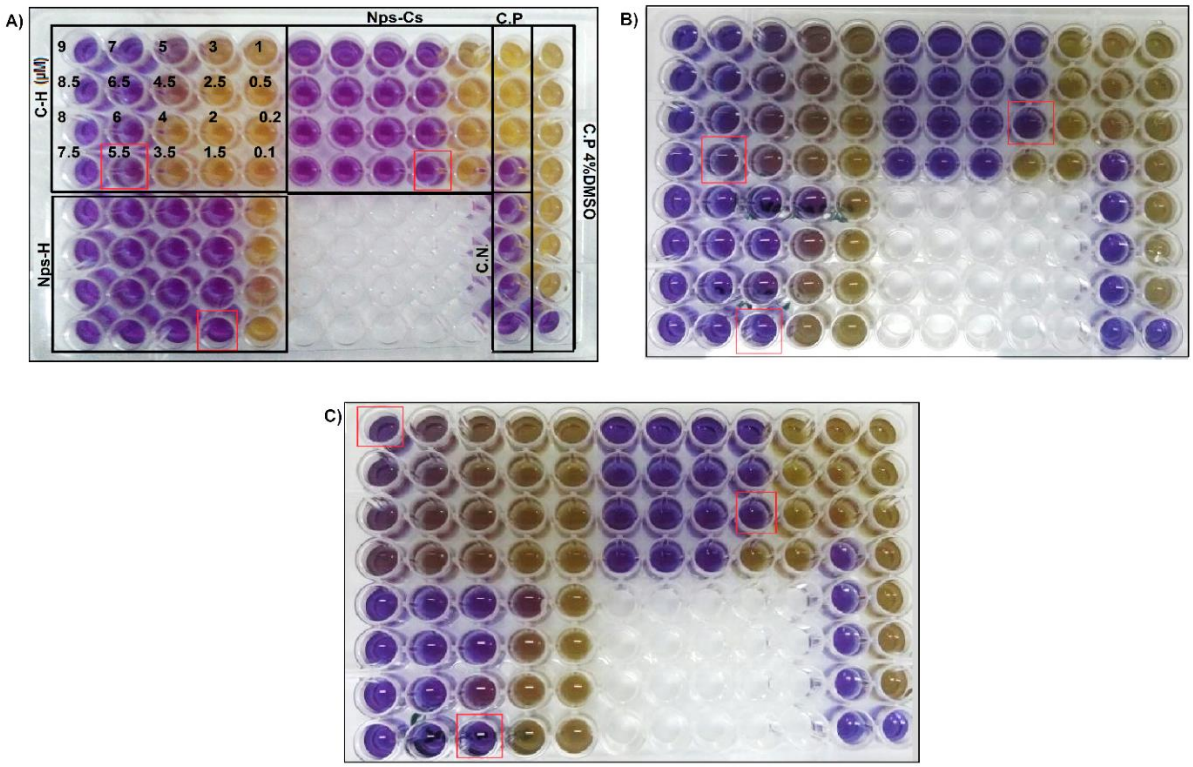
Conforme normas da ANVISA (2003), para classificar cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* a oxacilina, o halo de inibição deve ser menor que 10 mm, para cepas de resistência intermediárias o halo deve estar entre 11 e 12 mm e para cepas sensíveis o halo deve estar acima de 13 mm. Conforme a Figura 34, não houve halos de inibição para oxacilina 1 µg, demonstrando que as cepas *ORSA* e *hVISA* são totalmente resistentes à oxacilina.

Para classificar cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* à vancomicina, segundo a ANVISA (2003), os halos de inibição devem ser menores que 17 mm e para cepas sensíveis, os halos devem ser maiores que 21 mm. Os halos de inibição apresentaram o tamanho de 6 mm para ambas as cepas, demonstrando o caráter de resistência das cepas frente à vancomicina 30 µg.

6.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima do composto livre, das *Nps-H* e das *Nps-Cs* frente às cepas de *S. aureus ATCC 29213, hVISA* e *ORSA* utilizando o corante púrpura de bromocresol como indicador de crescimento bacteriano e manitol como fonte de carboidrato. A variação de coloração está relacionada com a mudança de pH do meio pela formação de ácido pirúvico, proveniente do metabolismo do carboidrato, mudando a cor de roxo para amarelo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a última concentração em que não houve crescimento bacteriano (último poço roxo).

Figura 35 - Concentração inibitória mínima do composto livre (*C-H*), das nanopartículas com composto (*Nps-H*) e das nanopartículas vazias (*Nps-Cs*) frente às cepas de *Staphylococcus aureus.*



(A) *ATCC 29213*; (B) *hVISA* e (C) *ORSA*. Todas as microplacas obedecem ao mesmo layout e a CIM está demarcada em vermelho.

*Todos os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 8 – Concentração Inibitória Mínima do C-H, *Nps-H* e *Nps-Cs* frente às cepas de S. aureus ATCC 29213, hVISA e ORSA.

Concentração inibitória mínima (µg/mL)				
Cepa	***C-H***	***Nps-H Conc. C-H***	***Nps-H* Conc. Nps**	***Nps-Cs***
ATCC 29213	1,42 – 1,55	0,42 – 0,52	10,95 – 14,61	24,26 – 40,43
hVISA	1,42 – 1,55	0,78 – 0,91	14,61 – 21,91	24,26 – 32,34
ORSA	2,20 – 2,33	0,65 – 0,78	18,26 – 21,91	24,26 – 32,34

Fonte: O autor (2018).

C-H: composto isolado; *Nps-H*: nanopartículas de quitosana com composto; *Nps-Cs*: nanopartículas de quitosana vazias.

Pode-se inferir que, conforme os resultados apresentados na Tabela 8, a ação antimicrobiana do composto foi aumentada quando encapsulado nas nanopartículas

de quitosana. Os resultados apontam que a atividade das *Nps-H* é aproximadamente 2 vezes maior que das *Nps-Cs* frente a *S. aureus ATCC 29213*, *hVISA* e *ORSA* em relação a concentração total de nanopartículas e aproximadamente 60 vezes mais ativo que as *Nps-Cs* em relação a concentração composto. Além disso, o composto encapsulado nas *Nps-H* se mostrou 2 a 3 vezes mais ativo que o composto livre (*C-H*) frente as cepas testadas.

Com os resultados apresentados, pode-se dizer também que há, possivelmente, uma ação antimicrobiana sinérgica do composto e da quitosana frente às cepas. O mecanismo dessa ação pronunciada ainda é desconhecido, porém pode-se supor que o composto pode ser melhor apresentado ao seu alvo se inserido nas nanopartículas, devido a escala nanométrica e o aumento da dispersão e disponibilidade do composto neste sistema, podendo propiciar maior permeabilidade nas células bacterianas. Essa permeabilidade pode ser atribuída a maior interação das cargas da quitosana com as membranas bacterianas, liberando o composto diretamente na célula bacteriana ou a liberação do composto e desagregação das cadeias de quitosana no meio e assim exerceram sua atividade antibacteriana de forma conjunta, resultando em uma atividade mais pronunciada.

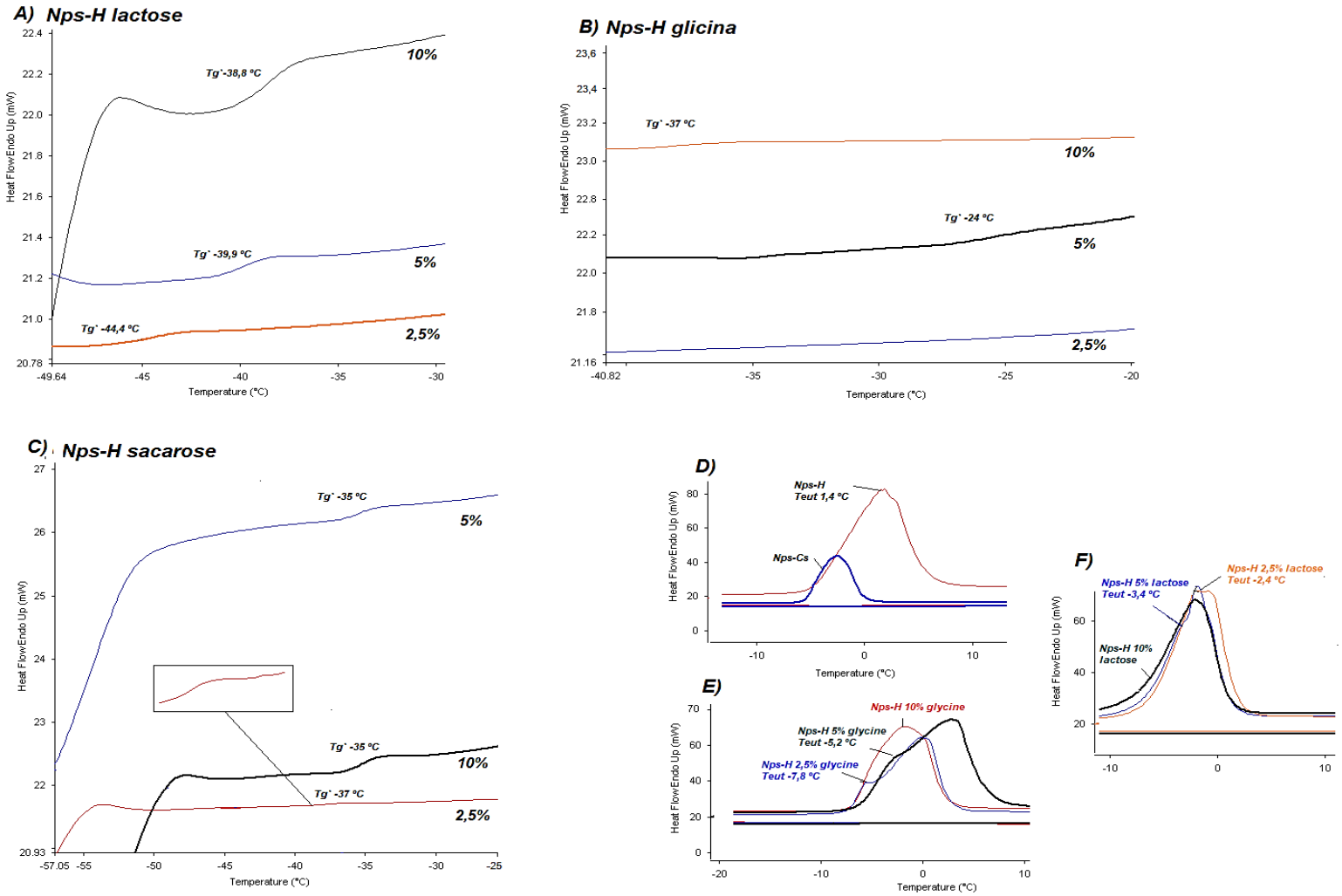
A ação sinérgica entre a quitosana e o composto nas *Nps-H* é resultado de importância considerável quando se diz respeito à resistência bacteriana, pois agentes de ação conjunta com distintos mecanismos de ação podem reduzir significativamente o aparecimento de mecanismos de resistência bacteriana, pois as respostas celulares de resistência são cercadas e inibidas de formas distintas pelos dois agentes antimicrobianos (BOLLENBACK, 2015).

6.4 ANÁLISES TÉRMICAS

Para o processo de liofilização, é necessário estabelecer alguns parâmetros físicos, como as temperaturas de transição vítrea, temperatura de colapso e temperatura eutética (*Tg'*, *Tcol* e *Teut*), visando um processo de liofilização eficiente, com produto final de baixa umidade residual e sem colapso da estrutura. Para determinação dessas temperaturas, foram realizadas as análises de DSC e a Criomicroscopia.

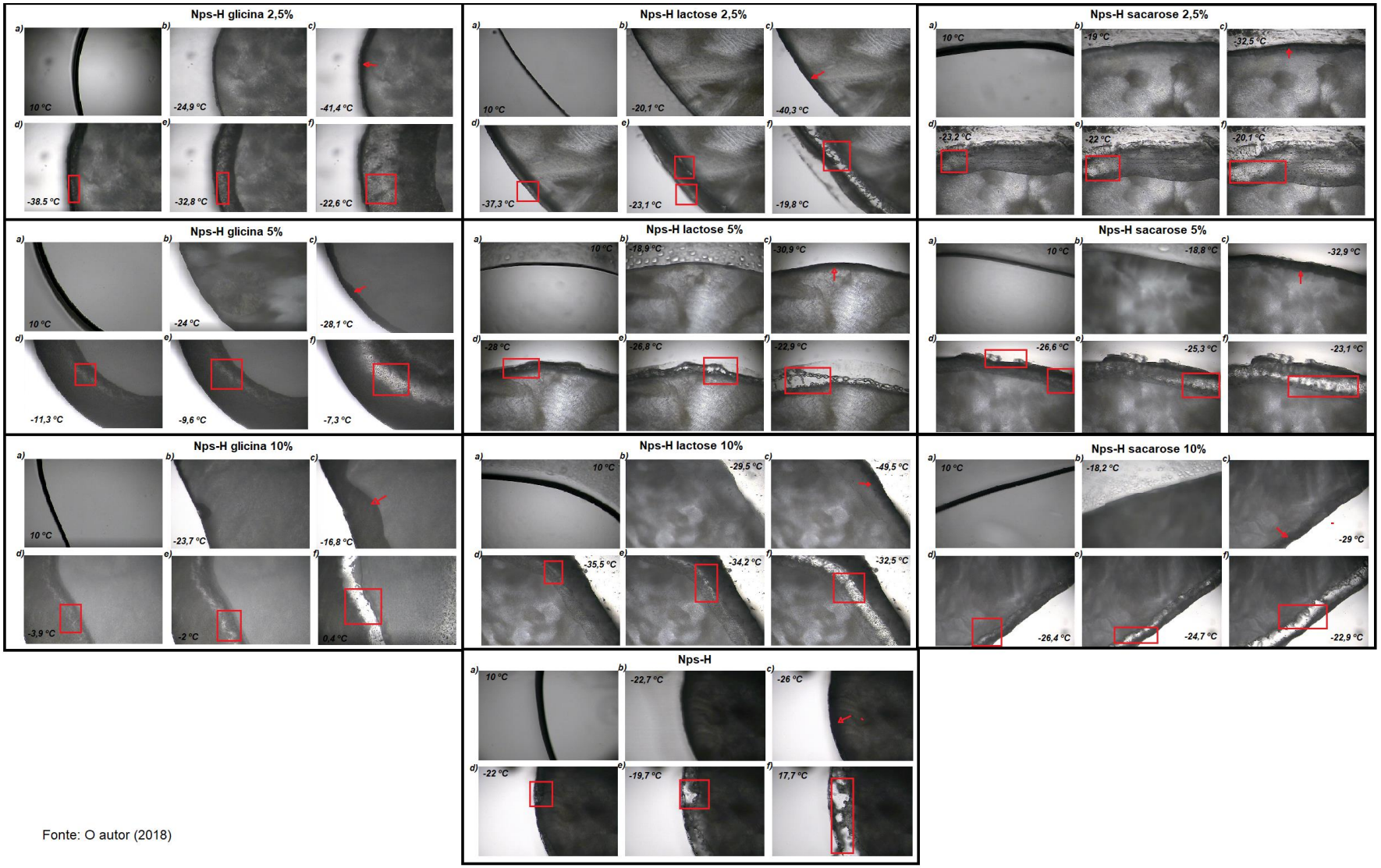
As análises de DSC foram realizadas para a determinação das temperaturas de transição vítrea e temperaturas eutéticas das amostras de *Nps-H* e *Nps-H* com diferentes excipientes escolhidos para o processo de liofilização (glicina, lactose e sacarose) em diferentes concentrações cada, a saber: 2,5%, 5% e 10%.

Figura 36 – Temperaturas de transição vítrea (A, B e C) e Temperaturas eutéticas (D, E e F).



Fonte: O autor (2018).

Figura 37 - Determinação das temperaturas de colapso das amostras por microscópio óptico acoplado à câmara de liofilização.



Fonte: O autor (2018)

a)amostra líquida; b) amostra congelada; c) camada liofilizada; d) microcolapso; e) macrocolapso e f) colapso total. Fonte: O autor (2018)

A amostra de glicina 5% apresentou a maior temperatura de transição vítrea e a amostra de glicina 10% a maior temperatura de colapso. Sabe-se que, a secagem primária deve ocorrer abaixo da temperatura de transição vítrea e da temperatura de colapso da amostra, com o objetivo de manter a estrutura seca do *cake* íntegra. Secagens que ocorrem acima da *Tg'* e *Tcol* podem ocasionar o colapso da estrutura devido à alta mobilidade da água acima dessas temperaturas, proporcionando a desestabilidade da estrutura (JENNINGS, 2008).

Tabela 9 - Comportamento térmico das *Nps-H* com diferentes excipientes.

Excipiente	Concentração (%)	*Teut* (°C)	*Tg'* (°C)	*Tcol* (°C)
Lactose	10%	-	-38.8	-35.5
	5%	-3.4	-39.9	-28.0
	2,5%	-2.4	-44.4	-37.3
Sacarose	10%	-	-35.0	-26.4
	5%	-	-35.0	-26.6
	2,5%	-	-37.0	-23.2
Glicina	10%	-	-37.0	-3.9
	5%	-5.2	-24.0	-11.3
	2,5%	-7.8	-	-38.5
Água	-	1.4	-	-24.3

(-) amostras que não apresentaram comportamento térmico

Fonte: O autor (2018).

Sabe-se que, quanto maior as temperaturas de transição vítrea e de colapso em maior temperatura pode ocorrer a secagem primária, economizando tempo e custos do processo (JENNINGS, 2008). Neste contexto, pode-se dizer que as amostras de melhor custo benefício para o processo de liofilização são as amostras de *Nps-H* em glicina 5% e 10%.

6.5 LIOFILIZAÇÃO DAS *Nps-H*

Com o objetivo de obter uma formulação de maior estabilidade físico-química e microbiológica, que mantenham as características do sistema coloidal, optou-se por liofilizar as *Nps-H*. A liofilização retira a água do sistema pelo processo de sublimação, mantendo as características originais do produto.

As amostras de *Nps-H* e *Nps-H* com glicina, lactose e sacarose, ambas nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% foram liofilizadas a -40 ºC à 100 mTorr e foram mantidas sob pressão reduzida nos *vials*. A Figura 38 mostra a aparência dos *cakes* resultantes do processo de liofilização.

Figura 38 - Aparência dos *cakes* dos produtos liofilizados *Nps-H*, *Nps-H* glicina, lactose e sacarose a 2,5%, 5% e 10%.

Fonte: O autor (2018).

Os *cakes* de glicina apresentam aparências elegantes e uniformes, sem craquelamentos ou encolhimentos. Os *cakes* de lactose apresentam o fenômeno de vulcanização, ou seja, formação de um pequeno pico no centro do *cake*. Além disso, observou-se leve encolhimento e craquelamento das amostras de lactose. As amostras de sacarose apresentaram acentuado craquelamento.

O encolhimento e craquelamento dos *cakes* ocorre devido à perda de volume do *cake* em que há afastamento das paredes do *vial*, podendo ser a primeira manifestação de colapso, porém, a maioria dos encolhimentos não estão associados a esse colapso (PATEL *et al*., 2017).

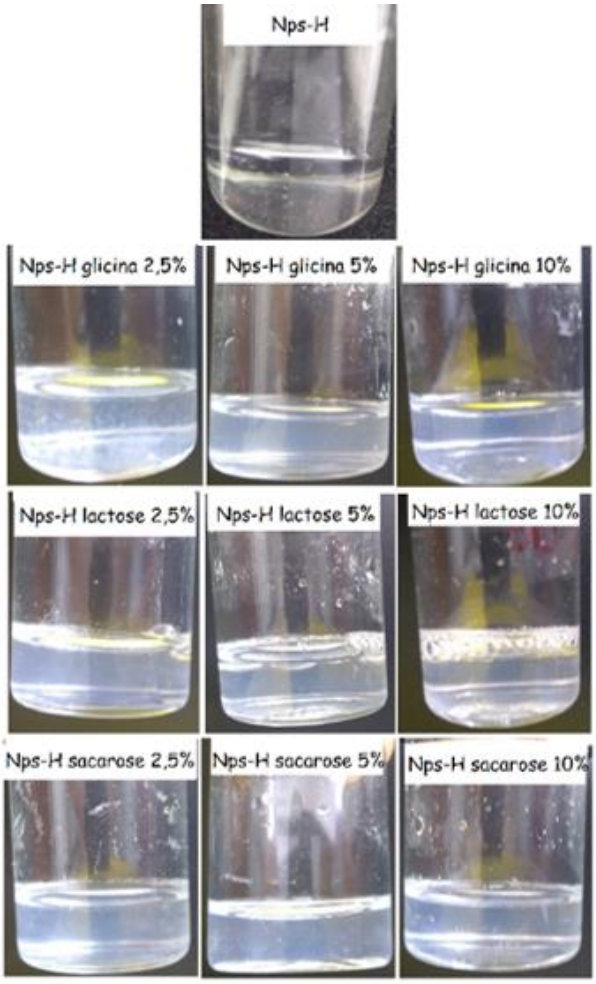
O encolhimento e o craquelamento estão associados ao mesmo fenômeno físico, porém com manifestações de aparência distintas. O encolhimento ocorre quando há presença de água não congelada no sistema e na secagem primária, a saída de água não congelada ocasiona um estresse que promove a contração ou craquelação do *cake*. O encolhimento ocorre quando há concentrações menores de excipientes e o craquelamento ocorre com concentrações maiores de excipiente. Esse fenômeno é explicado pelo aumento da fragilidade do excipiente em altas concentrações (PATEL *et al*., 2017).

O fenômeno de vulcanização aparece como um pequeno pico no centro e em cima do *cake* e ocorre dependendo do supercongelamento e o método de solidificação da matriz (de baixo para cima ou congelamento radial), impactando na formação dos cristais de gelo e na aparência dos *cakes*. O mecanismo de formação dos vulcões é a expansão da matriz congelada no interior do congelamento radial. Se a matriz congelada não se adere as paredes do *vial*, a expansão não ocorre para os lados e sim para cima, formando o pequeno pico (PATEL *et al*., 2017).

Em geral, a qualidade do *cake* não é interferida pelo encolhimento, craquelamento e a presença de “vulcões”. Esses problemas são considerados aceitáveis, pois normalmente não estão associadas ao colapso do produto. O único fator limitante para o encolhimento e o craquelamento é o possível desmanche do *cake* no transporte e manuseio dos produtos (PATEL *et al*., 2017).

Os *cakes* liofilizados foram ressuspensas em água ultrapura para avaliação das características das *Nps-H* após o processo de liofilização, conforme demonstrado na Figura 39 e Tabela 10.

Figura 39 - Colóides resultantes da ressuspensão dos *cakes* liofilizados.



Fonte: O autor (2018).

Tabela 10 - Características das *Nps-H* após ressuspensão do produto liofilizado.

Amostras liofilizadas	Tamanho médio (d.nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	Umidade Residual (%)
Nps-H	Não ressuspendeu	-	-	3,5
Nps-H glicina 2,5%	607,0 ± 21,5 (agregados)	0,765 ± 0,19	+12,9 ± 4,75	3,55
Nps-H glicina 5%	352,4 ± 5,23 (agregados)	0,440 ± 0,09	+16,4 ± 4,64	2,49
Nps-H glicina 10%	305,1 ± 3,24	0,251 ± 0,021	+20,3 ± 4,31	2,18
Nps-H lactose 2,5%	295,5 ± 4,21	0,239 ± 0,034	+31,1 ± 5,31	3,67
Nps-H lactose 5%	299,2 ± 2,49	0,228 ± 0,018	+29,7 ± 4,24	2,80
Nps-H lactose 10%	336,7 ± 3,29	0,259 ± 0,016	+20,9 ± 4,68	1,38
Nps-H sacarose 2,5%	317,4 ± 2,23	0,233 ± 0,019	+33,0 ± 6,26	5,41
Nps-H sacarose 5%	331,1 ± 4,5	0,229 ± 0,035	+31,8 ± 5,13	3,73
Nps-H sacarose 10%	347,1 ± 2,56	0,253 ± 0,024	+22,6 ± 4,39	3,13
Amostra antes da liofilização				
Nps-H originais	321,50 ± 16,80	0,180 ± 0,004	37,33 ± 5,79	-

Fonte: O autor (2018).

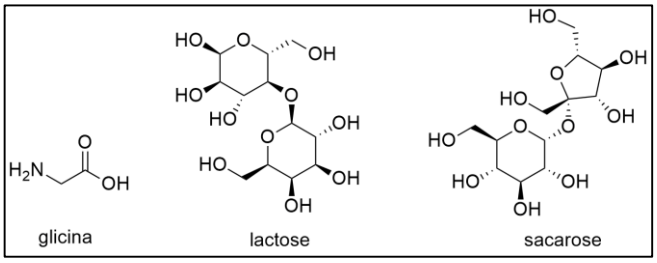
Conforme mostra a Tabela 10, todas as amostras de *Nps-H* lactose e sacarose ressuspensas demonstraram que os excipientes preservaram as características e estabilidade físico-químicas das *Nps-H*, ainda que nas concentrações maiores (10%), o potencial zeta foi diminuído significativamente, provavelmente devido à alta interação dos excipientes com as partículas, blindando as cargas positivas da quitosana.

Os *cakes* de *Nps-H* e *Nps-H* glicina 2,5% e 5% resultaram na formação de agregados após ressuspensão, alterando significativamente as características originais das *Nps-H*. O motivo para a autoagregação das partículas na amostra de *Nps-H* após ressuspensão se deve ao fato de que as *Nps-H* não possuem um excipiente substituto para a água para realizar interações intermoleculares, promovendo a agregação das partículas.

O efeito de autoagregação nas amostras de *Nps-H* glicina 2,5% e 5% se deve provavelmente, ao fato de que a glicina está ionizada. Esta ionização em pH neutro

possibilita interações intermoleculares mais fortes do grupo carboxila negativamente carregado da glicina com as nanopartículas positivas, o que não ocorre com os excipientes lactose e sacarose que não estão ionizados e então realizam apenas interações de hidrogênio com as partículas pela presença das hidroxilas (Figura 40).

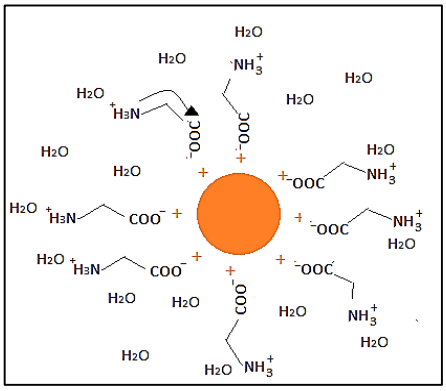
Figura 40 - Estruturas químicas dos excipientes utilizados no processo de liofilização.



Fonte: Solomons e Fryhle (2012).

As interações iônicas realizadas entre a carboxila da glicina e as aminas protonadas das *Nps-H*, provavelmente envolvem toda a superfície das partículas e as aminas ionizadas da glicina circuncidam a superfície para fora. A amina protonada da glicina possui uma força iônica positiva menor, devido a atração do próton amínico pelo grupo carboxila negativo. Esse fenômeno é uma hipótese do motivo pelo qual o potencial zeta pode ter diminuído conforme mostra os resultados na Tabela 10.

Figura 41 - Representação das interações entre as moléculas de glicina e as *Nps-H.*



Fonte: O autor (2018).

Em relação à umidade residual, altas taxas de umidade residual em produtos liofilizados levam à instabilidade e baixa conservação do produto. Na etapa de secagem primária, toda a água livre é retirada, porém a água “ligada” é retirada apenas na secagem secundária, sendo esta última etapa, essencial para preservação

do produto. Amostras liofilizadas de boa qualidade não devem exceder 5% de umidade residual.

Exceto a amostra *Nps-H* sacarose 2,5% (5,4% de umidade residual), todas as amostras se mostraram dentro do limite aceitável de umidade residual para produtos liofilizados (TATTINI JUNIOR; PARRA; PITOMBO, 2006).

Em relação ao uso de açucares como sacarose e lactose como excipientes em formulações antimicrobianas, deve-se ressaltar que o uso desses açucares não são contraindicados no que se diz respeito a possibilidade de favorecer o aumento do crescimento bacteriano e assim, promover a piora das infecções. Estudos realizados por Collins *et al*., (2011) mostraram que o uso de açucares conjuntamente com agentes antimicrobianos proporciona a diminuição da reincidência de infecções multirresistentes. O mecanismo proposto para isto é que as bactérias latentes em uma infecção podem não ser atingidas pelos antimicrobianos. Os açucares por sua vez, podem promover o estímulo de crescimento dessas bactérias latentes que, tornando-se bactérias viáveis, ficam susceptíveis aos agentes antimicrobianos (CAIN, 2011).

Neste ponto de vista, espera-se que os excipientes utilizados neste trabalho possam ser uma ferramenta de auxílio no combate da reincidência das infecções multirresistentes.

6.6 ANÁLISE DE MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV)

As *Nps-H* e *Nps-Cs* foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura e foram observadas diferenças de tamanho entre elas, em que as *Nps-Cs* variam aproximadamente de 360 d.nm a 750 d.nm e as *Nps-H* variam de 240 d.nm a 650 d.nm. Além disso, foram observadas diferenças na morfologia e superfície das *Nps-H* e *Nps-Cs*.

As *Nps-Cs* apresentam morfologia de bordas regulares e totalmente esféricas e superfície lisa. As *Nps-H* apresentam morfologia de bordas mais irregulares, sem muita definição, embora possam ser classificadas como nanopartículas esféricas. Além disso, as *Nps-H* apresentam superfície aparentemente mais enrugada. Essas imagens demonstram mais uma evidencia de que o composto está nas *Nps-H*, podendo estar no interior e/ou na superfície das nanopartículas (Figura 43). Os

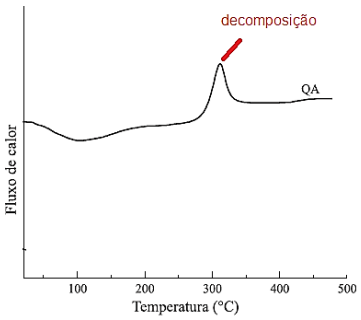
diâmetros das *Nps-H* analisados nas imagens de MEV (média de aproximadamente 450 d.nm) demonstram que as *Nps-H* são maiores do que os diâmetros analisados por DLS (média de 321 d.nm). As *Nps-Cs* nas imagens de MEV são maiores (média de aproximadamente de 450 d.nm) do que os diâmetros analisados por DLS (320 d.nm).

Além das análises das *Nps-H* e *Nps-Cs*, realizou-se as análises de morfologia da formação amorfa ou cristalina dos excipientes após o processo de liofilização. Os cristais de sacarose são bem formados e definidos, os cristais de glicina, embora mostre uma certa organização, apresentam aparência pseudo-amorfa. Já a lactose apresenta estrutura amorfa, sem organização definida, como mostra a Figura 44.

As organizações dos cristais dos diferentes excipientes demonstram alterar a estrutura do *cake*, em que a estrutura mais cristalina e rígida da sacarose resultou em *cakes* craquelados. Pode-se dizer que a organização mais “dura” e rígida dos cristais dificultam a formação dos poros para a saída de água, resultando no craquelamento do *cake* maior umidade residual, como a amostra de *Nps-H* sacarose 10% que obteve a umidade residual superior a 5%. A primeira imagem de (A) apresentou manchas que poderiam ser nanopartículas nos cristais de sacarose, porém como mostra a aproximação da imagem, são apenas manchas do recobrimento da amostra. Não foi possível detectar as nanopartículas com os excipientes liofilizados, pois as estruturas dos excipientes são bastante volumosas comparando-se às nanopartículas, ocupando grande parte do campo de visão.

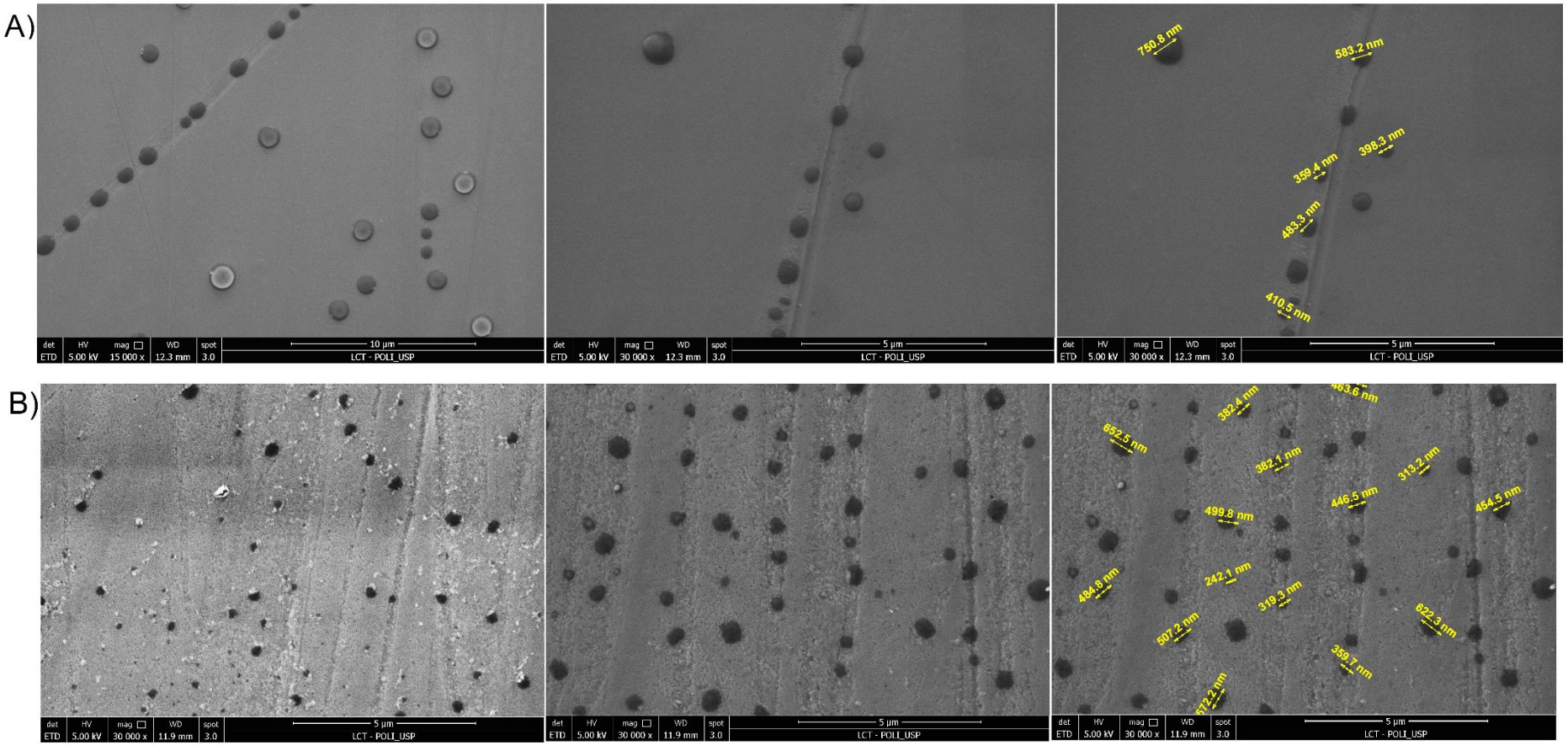
É importante ressaltar que o feixe de elétrons que passa pela amostra no processo de leitura apresenta temperatura bastante elevada, porém não altera a morfologia das partículas por fusão, uma vez que a quitosana não funde, apresentando apenas temperatura de decomposição a 300 ºC (SHENDE; YADAVA, PATIL, 2014).

Figura 42 - Análise de DSC do pico de decomposição da quitosana



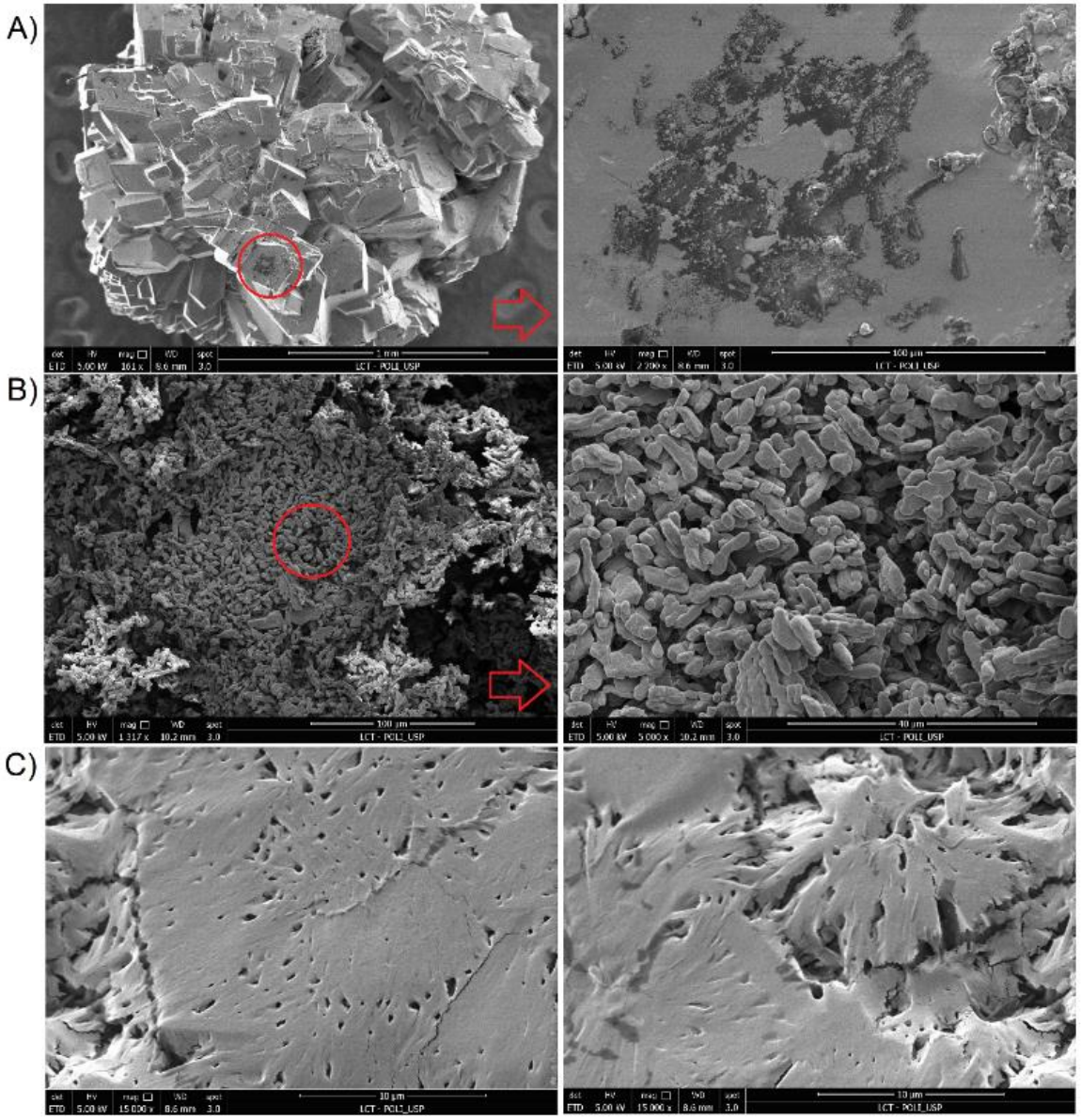
Fonte: Shende, Yadava e Patil (2014).

Figura 43 - Imagens de MEV das *Nps-Cs* (A) e *Nps-H* (B) recorbertas com platina.



Fonte: O autor (2018).

Figura 44 – Imagem MEV das *Nps-H* liofilizadas.



A) sacarose 5%; B) glicina 5% e C) lactose 5%.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção das *Nps-H* foi otimizada por meio do planejamento fatorial, que propiciou o entendimento do sistema, como a influência da concentração de NaCl negativamente na EE% do composto testado, positivamente no potencial zeta e no aumento do tamanho das nanopartículas e o papel importante do Polissorbato *20* na solubilização do composto por solubilização micelar. O experimento 6 foi considerado ideal para obtenção das *Nps-H*, com EE% de 48%, potencial zeta de 37,4 mV, baixo índice de polidispersão (0,18) e tamanho médio de 321,5 d.nm pelo DLS.

A atividade antimicrobiana das *Nps-H* se mostrou potencialmente superior a atividade do composto livre (*C-H*) e das *Nps-Cs* frente a todas as cepas testadas, demonstrando uma ação sinérgica entre o composto e as nanopartículas de quitosana, demonstrando que as *Nps-H* é uma formulação com potencial uso em queimaduras infeccionadas por bactérias multirresistentes do gênero *Staphylococcus aureus*.

A etapa de liofilização das *Nps-H* se mostrou mais adequada com o uso dos excipientes lactose (2,5% e 5%) e sacarose (2,5% e 5%), por manterem as características originais das nanopartículas, como tamanho, IPD e potencial zeta, além dos *cakes* formados serem considerados aceitáveis em qualidade.

As análises por MEV demonstrou que as *Nps-H* se diferem das *Nps-Cs* em relação à morfologia e superfície, evidenciando que o composto tem influência na estrutura das nanopartículas.

Com os resultados apresentados neste trabalho, o composto com atividade pronunciada frente às cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes somado à quitosana como matriz polimérica das nanopartículas com suas diversas atividades farmacoterapêuticas e físico-químicas, mostram que as *Nps-H* são um importante passo no desenvolvimento de formulações com potencial atividade antimicrobiana frente a cepas multirresistentes no tratamento de pacientes com queimaduras infeccionadas por esses microrganismos, por tratar as infecções, promover a proteção da lesão e a diminuição da perda de líquidos pela formação de filme polimérico no local, proporcionar ação analgésica, ação cicatrizante, reduzir agravamento dos quadros como sepse e amputações e assim, proporcionando a diminuição da morbidade e mortalidade.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. *et al*. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p.1688-1713, 2006.

ABU-DIAK, O.A.; ANDREWS, G.P.; JONES, D.S. Hydrophobic Polymers of Pharmaceutical Significance. **Fundamentals And Applications Of Controlled Release Drug Delivery,** Boston, p. 47-73, 2011.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **CNCIRAS**: Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Brasília: Anvisa, 2017. 84 p

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **CLSI M2-A8**: Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8 ed. São Paulo: Anvisa, 2003. 58 p.

ALJEBORYL, A.M.; ALSAMAN, T.M. Chitosan nanoparticles: review articlein. **Imperial Journal Of Interdisciplinary Research.** p. 233-242. 2017.

ALLEN, T.M.; CULLINS, P.R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science,** v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.

ALMEIDA, C.C. *et al*. Pé diabético: Recomendações para o diagnóstico, profilaxia e tratamento. In: ALMEIDA, Carlos Costa *et al*. **Cirurgia Vascular.** Sociedade Portuguesa de Cirurgia, p. 2-21, 2006.

ALONSO, M.J.; SANCHEZ, A.; CAMPOS, A.M. Chitosan Nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal Of Pharmaceutics,** v. 1, n. 224, p.159-168, 2001.

ANSELMO, A.C.; MITRAGOTRI, S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, v. 190, p.15-28, 2014.

ANVISA/ MS, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Medicamentos novos** 2010. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 jan 2016.

BARBI, M.S. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para adminstração nasal de zidovudina**. 2011. 108 f. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia-Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011.

BEILSTEIN'S Handbuch der Organischen Chemie. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1979.

BHUSHAN, B. **Springer Handbook of Nanotechnology.** 4. ed. Columbus: Springer, 2017. 1698 p.

BLAIR, J.M. A. *et al*. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p.42-51, 2014.

BOATENG, J.S. *et al*. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 97, n. 8, p.2892-2923, 2008.

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion In Microbiology,** v.27, 2015.

CAIN, C. Sweetening antibiotic treatments. **Science-business Exchange**, v. 4, n. 23, p.1-2, 2011.

CALVO, P. *et al*. Novel hidrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 63, n. 1, p.125-132, 1997.

CARONI, A.L.P.F. **Estudos de adsorção de tetraciclina em partículas de quitosana.** 2009. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

CASTANGIA, I. *et al*. Fabrication of quercetin and curcumin bionanovesicles for the prevention and rapid regeneration of full-thickness skin defects on mice. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 3, p.1292-1300, 2014.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). Antibiotic/Antimicrobial resistance ,2017.Disponível em: < https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>. Acesso em 23 dez 2017.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Healthcare-associated Infections**. 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/HAI/surveillance/>. Acesso em 14 jan 2016.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Healthcare-associated Infections**.2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/masstrauma/factsheets/public/burns.pdf> Acesso em 05 jan 2016.

CDC (Control Disease Center). U.S. Department of Health and Human Services for Disease Control and Prevention. Anbibiotic Resistance threats in the United States, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>. Acesso em 11 Abril 2018.

CHARLTON, I.D.; DOHERTY, A.P. Electrolyte-Induced Structural Evolution of Triton X-100 Micelles. **The Journal of Physical Chemistry B,** v. 104, n. 34, p.8327-8332, 2000.

CHEUNG, R. *et al*. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p.5156-5186, 2015.

CHOPRA, I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**, v. 68, p. 496-505, 2013.

CHUNG, M. *et al*. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 41, n. 2, p.155-180, 2005.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COUTINHO, J.G.V. *et al*. Estudo de incidência de sepse e fatores prognósticos em pacientes queimados. **Revista Brasileira Queimaduras**, v. 14, n. 3, p.193-197, 2015.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAMIAN, C. *et al*. Quitosana: um polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p.195-205, 2005.

DEGOBERT, G. *et al*. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 58, n. 15, p.1688-1713, 2006.

DURÁN, N. *et al*. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova,** Campinas, v. 33, p.151-158, 2010.

FAN, W. *et al*. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B**: **Biointerfaces**, v. 90, p.21-27, 2012.

FERNANDES, M.B. *et al*. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Toxicology In Vitro**, v. 26, n. 3, p.535-540, 2012.

FERREIRA, E., *et al*. Curativo do paciente queimado: uma revisão da literatura. **Revista de Escola de Enfermagem da USP**. São Paulo. v. 37, p.44-51, 2003.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia.** São Paulo. Edusp, 2003, 732 p.

FONSECA, G.D. **Micropartículas contendo nanopartículas de quitosana usando sulfato de sódio e genipina para liberação modificada da triancinolona: obtenção. caracterização e estudo em células tumorais.** 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

FONSECA, L.B. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Praziquantel para o tratamento da esquistossomose.** 2012. 233 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FRANCO, D. et al. Feridas Cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista Col. Brasileiro de Cirurgia**, v. 35, n. 3, p.203-206, ago. 2008.

GABER, M.H. Modulation of Doxorubicin Resistance in Multidrug-resistance Cells by Targeted Liposomes Combined with Hyperthermia. **The Journal Of Biochemistry, Molecular Biology And Biophysics,** v. 6, n. 5, p.309-314, 2002.

GAUMET, M. *et al*. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p.1-9, 2008.

GONG, C. *et al*. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 34, n. 27, p.6377-6387, 2013.

GONZALES, R.S. Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

GRAGNANI, A., *et al*. Análise microbiológica em queimaduras. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 20, n. 4. p. 237 – 240, 2005.

GREENHALGH, D.G. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. **Burns & Trauma**, v. 5, n. 1, p.1-10, 2017.

GUO, Z.; XIA, Z. Burn Shock. **Chinese Burn Surgery**, p.31-56, 2014.

GUTERRES, S.S. *et al*. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

HIDALGO, F. *et al*. Infections in critically ill burn patients. **Medicina Intensiva**, v. 40, n. 3, p.179-185, 2016.

HOARE, T.R.; KOHANE, D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer,** v. 49, n. 8, p.1993-2007, 2008.

HOLT, R.I.G. *et al* (Ed.). **Diabetes.** 5. ed: John Wiley, 2017. 1086 p.

HOO, C.M. *et al*. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal Of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 1, p.89-96, 2008.

HÓRVÖLGYI, Z.; KISS, E. (Ed.). **Colloids for Nano- and Biotechnology.** Siófok: Springer, 2008. 234 p.

IRIGOYEN, J. *et al*. Specific ζ-Potential Response of Layer-by-Layer Coated Colloidal Particles Triggered by Polyelectrolyte Ion Interactions. **Langmuir,** v. 25, n. 6, p.3374-3380, 2009.

JANES, K.A. *et al*. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release,** v. 73, n. 2-3, p.255-267, 2001.

JAYAKUMAR, R. *et al*. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p.227-232, 2010.

JENNINGS, T. **Lyophilization: introduction and basic principles**. New York: Informa, 2008. 646 p.

JIANG, B.; ZHANG, G.; BREY, E.M. Dual delivery of chlorhexidine and platelet-derived growth factor-BB for enhanced wound healing and infection control. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 2, p.4976-4984, 2013.

JORGE, S.D. **Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*.** São Paulo, 2011. 326 p. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KANG, B. *et al*. Exploring the preparation of Albendazole-loaded Chitosan-Tripolyphosphate nanoparticles. **Materials,** v. 8, n. 1, p.486-498, 2015.

KAO, K. *et al*. **Chitosan-Based Hydrogels:** Functions and Aplications. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2012. 512 p.

KECK, M. *et al*. Pathophysiology of burns. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 159, n. 13-14, p.327-336, 2009.

KRETZSCHMAR, A.K.M. **Incidência e tratamento da SEPSE em pacientes vítimas de queimaduras internados no Hospital Regional da Asa Norte** - DF. 2016. 34 f. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Universidade de Brasília, Brasília, 2016

KUHLMANN, F. M.; FLECKENSTEIN, J.M. Antiparasitic Agents. **Infectious Diseases**, Elsevier. p.1345-1372, 2017.

LIECHTY, W.B. *et al*. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, n. 1, p.149-173, 2010.

LIMA, L.A. **Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina.** 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências dos Materiais, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LUKEHART, C.M.; SCOTT, R.A. (Ed.). **Nanomaterials:** Inorganic and bioinorganic perspectives. New Haven. Wiley, 2005, 840 p.

LUO, Y., WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v.64, p.353-367, 2014.

MACEDO, J.L., *et al*. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados**. Revista Brasileira de Cirurgia,** v. 32, n. 4. p. 173 – 177, 2005.

MAO, H. *et al*. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal Of Controlled Release**, v. 70, p.399-421, 2000.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures**. 4 ed. New York: John Wiley, 2001, 1512 p.

MASUNARI, A., TAVARES, L.C. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***.* v. 42, p. 461-471, 2006.

MOLINA-BOLÍVAR, J.A.; AGUIAR, J.; RUIZ, C.C. Growth and Hydration Of Triton X-100 Micelles In Monovalent Alkali Salts: A Light Scattering Study. **The Journal Of Physical Chemistry B,** v. 106, n. 4, p.870-877, 2002.

MONTANARI, C.A. *et al* (Org.). **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. São Paulo: Edusp, 2011, 732 p.

MONTANARI, C.A. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva no Desenvolvimento da Farmacoterapia. **Química Nova,** v. 18, p. 56-64, 1995.

MOORE, K.L. Anatomia orientada para a clínica. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 1136 p.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in Candida albicans – an example of microevolution of a fungal pathogen. **Journal Of Microbiology**, v. 54, n. 3, p.192-201, 2016.

MÜLLER, J.; SCHILDKNECHT, P.; MÜLLER, N. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in Giardia lamblia: characterization of a novel nitroreductase (GlNR2). **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p.1781-1789, 2013

NAGARAJAN, R.; HATTON, T.A. **Nanoparticles:** synthesis, stabilization, passivation and functionalization. Washington: Acs Symposium Series 996, 2008, 449 p.

National Center for Biotechnology International. **Nifuroxazide.** 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nifuroxazide>. Acesso em: 02 fev. 2018

NEVES, A.L.P. **Preparação e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana Incorporadas com Zinco com Potencial Atividade Cicatrizante e Antimicrobiana.** 2013. 150 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

NIDHI *et al*. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review. **Saudi Pharmaceutical Journal,** v. 24, n. 4, p.458-472, 2016.

NORDMANN, P., CUZON, G., NAAS, T., The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infection Disturbies**., v.9, p. 228-236, 2009.

OLENDER, D. *et al*. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 645- 652, 2009.

OOSEGI, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Gastrointestinal distribution and absorption behavior of Eudragit-coated chitosan–prednisolone conjugate microspheres in rats with TNBS-induced colitis. **International Journal Of Pharmaceutics,** v. 348, n. 1-2, p.80-88, 2008.

PACHUAU, L. Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing. **Expert Opinion On Drug Delivery**, v. 12, n. 12, p.1895-1909, 2015.

PAGE, S.W. Antiparasitic drugs. **Small Animal Clinical Pharmacology**, Elsevier. p.198-260, 2008.

PALACE-BERL, F. **Planejamento de fármacos anti-T.cruzi:** Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade biológica in vitro e estudos de relação estrutura atividade. 2017. 375 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Tecnoogia Bioquímico-farmacêutico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PARK, H.J. *et al*. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics,** v. 249. p. 165-174. 2002.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** v. 8, n. 2, p.147-166, 2012.

PATEL, S.M. *et al*. Lyophilized Drug Product *Cake* Appearance: What Is Acceptable? **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 7, p.1706-1721, 2017.

PATHAK, W.; THASSU, D. (Ed.). **Drug Delivery nanoparticles:** formulation and characterization. Nova Iorque: Informa, 2009. 393 p.

PATTERSON, J.W. **Weedon's skin pathology.** 4. ed. Churchill Livingstone Elsevier, 2016. 1219 p.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289, 2014.

PAULA, F.R., SERRANO, S.H.P., TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**. v. 32, p. 1013-1020, 2009.

PAULA, L.B. **Nanopartículas poliméricas e de prata:** Avaliação da toxicidade in vitro e do processo de cicatrização em animais submetidos à queimadura térmica. 2013. 193 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PAVIA, D.L; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; ENGEL, R.G. **Química orgânica experimental**: técnicas de escala pequena. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009

Pharma, PHARMACEUTICAL RESEARCH AND MANUFACTURERS OF AMERICA. **Pharmaceutical Industry Profile** 2014. Washington, DC: Pharma. Disponível em:<HTTP://www.pharma.org/profiles_and_reports>. Acesso em 08 jan 2016.

PUNDIR, S.; BADOLA, A.; SHARMA, D. Sustained release matrix technology and recent advance in matrix drug delivery system: a review. **International Journal Of Drug Research And Technology**, v. 3, n. 1, p.12-20, 2017.

QI, L. *et al*. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles**. Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p.2693-2700, 2004.

RAGNUM, H.B. *et al*. The tumour hypoxia marker pimonidazole reflects a transcriptional programme associated with aggressive prostate câncer. **British Journal of Cancer,** v. 112, p. 382-390, 2015.

RAGONHA, A.C.O., *et al*. Avaliação microbiológica de coberturas de sulfadiazina de prata 1%, utilizadas em queimaduras**. Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 13, n. 4, p. 514 – 521. 2005.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p.76-83, 2009.

RAMALHO, M.J.; PEREIRA, M.C. Preparation and Characterization of Polymeric Nanoparticles: An Interdisciplinary Experiment. **Journal Of Chemical Education**, v. 93, n. 8, p.1446-1451, 2016.

RAMASAMY, T. *et al*. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review. **Journal Of Controlled Release**, v. 258, p.226-253, 2017.

RAUTIO, J. *et al*. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 3, p.255-270, 2008.

REIS, C.P.; MARTINHO, N.; DAMGÉ, C. Recent Advances in Drug Delivery Systems. **Journal Of Biomaterials And Nanobiotechnology.** v. 6, n. 2. p. 510-526. 2011.

REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016, Hm Government. **Tackling drug-resistant infections globally:** Final Report and recomendations. Hm Government, 80 p. 2016.

REZA, M.S.; QUADIR, M.A.; HAIDER, S.S. Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 6, p.282-291, 2003.

ROLDÁN, M.D. *et al*. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p.474-500, 2008.

ROSEN, J. *et al*. Silver Sulfadiazine Retards Wound Healing in Mice via Alterations in Cytokine Expression. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 5, p.1459-1462, 2015.

ROSSI, L.A., *et al*. Déficit do volume de líquidos: perfil e características definidoras no paciente portador de queimadura. **Ver-latino americano de enfermagem**, v. 6, n. 3, p 85-94, 1998.

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

SANCHÉZ-DOMINGUES, M.; RODRÍGUEZ-ABREU, C. (Ed.). **Nanocolloids:** Meeting point for scientists and technologists. Oxford. Elsevier, 2016. 514 p.

SANTOS, A.L., *et al*. *Staphylococcus aureus* visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 43. n. 6, p. 413 – 423, 2007.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 1. p. 64 – 70. 2004.

SCHATZ, C.*et al*. Formation and proprieties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers, **Latarjet**, v. 20, n. 2, p.7766-7778, 2004.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W.; AHMED, M.A. Investigation of true nanoemulsions for transdermal potential of indomethacin: characterization, rheological characteristics, andex vivoskin permeation studies. **Journal Of Drug Targeting,** v. 17, n. 6, p.435-441, 2009.

SHENDE, P.T.; YADAVA, S.K.; PATIL, P.S. Development and characterization of chitosan nanoparticles containing erthromycin estolate. **International Journal Of Pharmaceutical Applications**. v. 5, n. 1, p.1-7, jul. 2013.

SHIT, S.C.; SHAH, P.M. Edible Polymers: Challenges and Opportunities. **Journal Of Polymers**, v. 2014, p.1-13, 2014.

SHUKLA, S.K. *et al*. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 59, p.46-58, 2013.

SILVA NETO, A. L. **Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente a microrganismos multirresistentes. Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2016. 274f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

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

SILVA, S.C.S.P. *et al*. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against Leishmania (Leishmania) infantum promastigotes and intracellular amastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 163, p.68-75, 2016.

SIPOLI, C.C. *et al*. Chitosan nanoparticles produced with the gradual temperature decrease technique for sustained gene delivery. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p.114-121, 2015. (a)

SIPOLI, C.C. *et al*. Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p.65-73, 2015. (b)

SMOOT, E.C, *et al*., In vitro toxicity testing for antibacterials against human keratinocytes. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 87, n. 5, p. 917-924, 1991.

SNYDER, L., CHAMPNESS, W. Molecular genetics of bacteria. 4ed. Washington: John Wiley & sons Ltda. 2004.

SODERBERG,T. **Imine (Schiff base) formation.** 2014. Disponível em: <https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map:_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/11:_Nucleophilic_carbonyl_addition_reactions/11.6:_Imine_(Schiff_base)_formation>. Acesso em: 04 abr. 2018.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Organic Chemistry**. 8 ed. New York: John Wile & Sons, v. 1, 2005, 1344 p.

SUBRAHMAYAM, M. Honey dressing versus boiled potato peel in the treatment of burns: a prospective randomized study. **Burns**, v. 22, n. 6, p. 491-493, 1996.

TATTINI JUNIOR, V.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p.127-136, 2006.

TATTINI, V.J. **Efeito da liofilização sobre a estrutura da mudança de fase da albumina bovina modificada por reação com metoxi-polietilenoglicol.** 2004. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TAVARES, L.C. *et al*. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados do 5-nitro-2-furfurilideno. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.32, n.1, p. 44-48, 1999.

TAVARES, L.C. PENNA, T.C. AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide analogs. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 136, pt 1, p.244-249, 1996.

THIBODEAU, G. A.; PATTON, K.T. **Estrutura e Funções do Corpo Humano**. 11ed. São Paulo: Manole, 2002.

TIPPETT, L.O., ZELEZNICK, L.D., ROBB, C.A. Modification of the microtiter technique for antimicrobial drug susceptibility testing by incorporation of indicators. **Appl. Microbiology**. v. 20, p. 342-345, 1970.

TIWARI, G. *et al*. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal Of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p.2-11, 2012.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo. Atheneu, 2004.

TRAN, T.H. *et al*. Development and Evaluation of Artesunate-Loaded Chitosan-Coated Lipid Nanocapsule as a Potential Drug Delivery System Against Breast Cancer. **Aaps Pharmscitech,** v. 16, n. 6, p.1307-1316, 2015.

VASILE, B.S. *et al*. Synthesis and characterization of a novel controlled release zinc oxide/gentamicin–chitosan composite with potential applications in wounds care. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p.161-169, 2014.

VENTOLA, C. L. Antibiotic Resistance Crisis: Causes and Threats. **Pharmacy And Therapeutics**, v. 40, n. 4, p.277-283, 2015.

VILLIERS, M.M. *et al*. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 1, n. 63, p.701-715, 2011.

WANG, L., KHOR, L.L. Chitosan–alginate–CaCl2 system for membrane coat application. **Journal of pharmaceutical sciences**. v.90, n.8, p.1134-1142, 2001.

WARD, R.S, SAFLE, J.R. Topical agents in burn and wound care. **Physical Therapy**, v. 75, n. 6, p. 526-38, 1995.

WEISSLEDER, R.; NAHRENDORF, M.; PITTET, M.J. Imaging macrophages with nanoparticles. **Nature Materials,** v. 13, n. 2, p.125-138, 2014.

WHO, World Health Organization, Antimicrobial discovery and development <http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antibicrobials/en/>. Acesso em: 20 mar 2018.

WHO, World Health Organization, **Prevention of hospital-acquired infections.** 2014**.** Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/>. Acesso em 06 de jan de 2016.

XIONG, C. *et al*. Novel Polyeletrolyte Carboxymethyl Konjac Glucomman - Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery. **Macromolecular Rapid Communications,** v. 25, n. 1, p.954-958, 2004.

ZHAO, L. *et al*. Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p.327-337, 2014.

ZORZI, R.R., *et al*. Exploring 5-nitrofuran derivatives against nosocomial pathogens: Synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2844-2854, 2014.