



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JÉSSICA BASSETTO CARRA

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS  
BIOADESIVOS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, EFICÁCIA E  
SEGURANÇA DA FORMA FARMACÊUTICA**

---

Londrina  
2023

JÉSSICA BASSETTO CARRA

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS  
BIOADESIVOS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, EFICÁCIA E  
SEGURANÇA DA FORMA FARMACÊUTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Marcela Maria Baracat

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C312d Carra, Jessica Bassetto .

Desenvolvimento de filmes poliméricos bioadesivos e avaliação da qualidade, eficácia e segurança da forma farmacêutica / Jessica Bassetto Carra. - Londrina, 2023.

140 f. : il.

Orientador: Marcela Maria Baracat.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Filmes poliméricos - Tese. 2. Planejamento fatorial - Tese. 3. Atividade anti-herpética - Tese. 4. Atividade antiacne - Tese. I. Baracat, Marcela Maria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

JÉSSICA BASSETTO CARRA

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS  
BIOADESIVOS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, EFICÁCIA E  
SEGURANÇA DA FORMA FARMACÊUTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marcela Maria Baracat  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas  
Universidade de São Paulo - USP

---

Profa. Dra. Rúbia Casagrande  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Mônica Freiman de Souza Ramos  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Londrina, 24 de março de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por essa oportunidade.

À minha família, principalmente à minha irmã Caroline Bassetto Carra e meus pais Solange Maria Bassetto Carra e José Augusto Carra, que sempre me apoiaram.

Aos meus amigos Marciéli Fabris, Gabrielle Cristina Calegari e Ricardo Luís Nascimento de Matos por todo o apoio nesse período, acompanhando os dias de luta e de glória.

À minha orientadora professora doutora Marcela Maria Baracat. Sinto-me extremamente grata por ter trabalhado tantos anos ao lado de uma excelente profissional, que me proporcionou muito conhecimento e amizade.

Aos professores doutores Rúbia Casagrande, Sandra Regina Georgetti, Renê Oliveira do Couto, Doumit Camilios-Neto, Nilton Syogo Arakawa e Ligia Carla Faccin Galhardi, por todas as vezes que me socorreram e sanaram as dúvidas.

Aos muitos colegas e amigos do laboratório que sempre estiveram dispostos a ajudar e colaboraram muito para o projeto, principalmente Maria Laura Goussain Darido, Briani Gisele Bigotto, Kamila Byanca Baldin Wessel, Ismael Rodrigues Amador e Giovana Nicolete Pereira.

Aos alunos de iniciação científica Pietra Mitiko Tateyama Pattini, Bianca Larissa Masquetti, Beatriz da Silva Tavares, Willian Teruhiko Yamanaka Inagaki e Alan Benedito Morais por toda dedicação ao auxiliar nos experimentos.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Centro de Pesquisa e Pós-graduação (CEPPOS) por terem sido minha segunda casa nos últimos anos.

Ao laboratório de Bioquímica e Biotecnologia Microbiana (LBBM), pela produção de ramnolipídeos. Aos laboratórios de Virologia (LAVIR), Patologia Animal e de Bacteriologia Básica e Aplicada, pelas análises *in vitro* e *in vivo*. Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos (LABSLiF) da UEM pela avaliação, *ex vivo*, da força bioadesiva. Aos Laboratórios de Química Prebiótica, Espectroscopia (ESPEC), de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) e de tecnologia do Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos pelas análises de caracterização físico-química.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao programa de pós-graduação em química pela oportunidade.

Aos professores doutores Marcos Luciano Bruschi, Osvaldo de Freitas, Rúbia Casagrande e Mônica Freiman de Souza Ramos, pela disponibilidade de corrigir o trabalho e contribuir para minha formação.

Gostaria de agradecer também a todas pessoas que contribuíram de alguma forma ao longo dessa caminhada.

*Quando faltar motivação exerça a disciplina.  
(Mychel Keppler)*

## RESUMO

CARRA, Jéssica Bassetto. **Desenvolvimento de filmes poliméricos bioadesivos e avaliação da qualidade, eficácia e segurança da forma farmacêutica**. 2023. 140 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

O herpes e a acne são doenças causadas por microrganismos, vírus e bactéria, respectivamente, e atingem milhares de pessoas no mundo. Os tratamentos utilizados em ambas as enfermidades selecionam cepas resistentes. Assim, torna-se necessário buscar tratamentos alternativos, como os estudos de princípios ativos de origem natural: compostos isolados de plantas, como a quercetina, que possui atividade antiviral; e os biossurfactantes produzidos por bactérias, como os ramnolipídeos, que apresentam atividade antimicrobiana. Esses agentes ativos podem ser incorporados em dispersões precursoras de filmes poliméricos, que são formas farmacêuticas biocompatíveis com a pele, que podem possuir menor risco de irritação e são bioadesivos. Desta forma, mantém o agente ativo por mais tempo no local de liberação e não precisam ser reaplicados com a mesma frequência de outros tipos de formulações. O presente trabalho teve como objetivos desenvolver filmes poliméricos bioadesivos contendo quercetina para serem utilizados como produtos anti-herpéticos e, filmes poliméricos bioadesivos contendo ramnolipídeos com ação antiacne e, avaliar a qualidade, eficácia e segurança das formas farmacêuticas. A quercetina, na forma livre, foi avaliada quanto a citotoxicidade e atividade anti-herpética e os resultados mostraram que esse agente ativo possui atividade antiviral em concentrações baixas e atóxicas. Foram desenvolvidas quinze formulações e com base nas propriedades mecânicas (força de bioadesão e resistência à dobra), liberação da quercetina, variação de massa da formulação e dosagem da quercetina, a formulação n° 8 foi escolhida e caracterizada físico-quimicamente; também se realizou o estudo da estabilidade acelerada do filme polimérico. Essas formulações apresentaram aspecto homogêneo; propriedades mecânicas elásticas, pH semelhante ao da pele humana, bioadesividade, liberaram o agente ativo e foram estáveis físico-quimicamente. Realizou-se também os estudos de citotoxicidade e atividade antiviral *in vivo*, que mostrou que o filme polimérico contendo quercetina é promissor e seguro no tratamento dos processos inflamatórios causados pelo vírus

HSV-1. Os ramnolipídeos, na forma livre, possuem grande potencial para serem utilizados no tratamento da acne por apresentarem atividade antimicrobiana contra o *Cutibacterium acnes* em concentrações baixas e seguras, demonstradas pelos ensaios de concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e hemólise. Foram obtidos quatro filmes com diferentes concentrações de ramnolipídeos que foram avaliados quanto ao aspecto visual, variação de massa, espessura, densidade, solubilidade, pH, transmissão de vapor de água, propriedades mecânicas (resistência à dobra, força de bioadesão, módulo de Young, resistência à tração e alongamento na ruptura), microscopia eletrônica de varredura e infravermelho. Os resultados mostraram que essas formulações apresentaram aspecto homogêneo; propriedades mecânicas elásticas; pH semelhante ao da pele humana e bioadesividade. Os filmes poliméricos contendo ramnolipídeos foram eficazes frente ao *C. acnes*, no ensaio *in vitro*, nas três concentrações testadas (0,1; 0,2 e 0,3%, m/m), sendo o filme de maior concentração (0,3%, m/m), o mais favorável, por apresentar maior atividade antimicrobiana. Dessa forma, os filmes poliméricos obtidos nessa pesquisa são formas farmacêuticas promissoras para serem utilizadas nos respectivos tratamentos estudados, podendo se obter bioprodutos eficazes e seguros, que, no futuro, possam ser comercializados.

**Palavras-chave:** biossurfactante; flavonoide; formulação; planejamento fatorial; propriedades mecânicas.

## ABSTRACT

CARRA, Jéssica Bassetto. **Development of bioadhesive polymeric films and evaluation of the quality, efficacy, and safety of the pharmaceutical form.** 2023. 140 p. Thesis (Doctorate in Chemistry) – Center for Exact Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2023.

Herpes and acne are diseases caused by microorganisms, viruses, and bacteria, respectively, and affect thousands of people worldwide. The treatments used in both diseases select resistant strains. Thus, it becomes necessary to seek alternative treatments, such as studies of active principles of natural origin: compounds isolated from plants, such as quercetin, which has antiviral activity; and biosurfactants produced by bacteria, such as rhamnolipids, which have antimicrobial activity. These active agents can be incorporated into precursor dispersions of polymeric films, which are pharmaceutical forms that are biocompatible with the skin, may have a lower risk of irritation, and are bioadhesive. In this way, it keeps the active agent longer at the release site and does not need to be reapplied with the same frequency as other types of formulations. The present work aimed to develop bioadhesive polymeric films containing quercetin to be used as antiherpetic products, and bioadhesive polymeric films containing rhamnolipids with antiacne action, and to evaluate the quality, efficacy, and safety of pharmaceutical forms. Quercetin, in free form, was evaluated for cytotoxicity and antiherpetic activity and the results showed that this active agent has antiviral activity at low, nontoxic concentrations. Fifteen formulations were developed and based on the mechanical properties (bioadhesion strength and folding endurance), quercetin release, formulation mass variation, and quercetin dosage, formulation n° 8 was chosen and characterized physicochemically; the study of the accelerated stability of the polymeric film was also carried out. These formulations presented a homogeneous aspect; elastic mechanical properties, pH similar to human skin, bioadhesiveness, released the active agent, and physicochemical stability. Cytotoxicity and *in vivo* antiviral activity studies were also carried out, which showed that the polymeric film containing quercetin is promising and safe in the treatment of inflammatory processes caused by the HSV-1 virus. Rhamnolipids, in free form, have great potential to be used in the treatment of acne because they have antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes* at low and safe concentrations, demonstrated by

the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, and hemolysis assays. Four films with different concentrations of rhamnolipids were obtained and evaluated for visual appearance, mass variation, thickness, density, solubility, pH, water vapor transmission, mechanical properties (folding endurance, bioadhesion strength, Young's modulus, tensile strength, and elongation at break), scanning electron microscopy and infrared. The results showed that these formulations had a homogeneous appearance; elastic mechanical properties; pH similar to human skin and bioadhesiveness. Polymeric films containing rhamnolipids were effective against *C. acnes*, in the *in vitro* assay, at the three concentrations tested (0.1; 0.2, and 0.3%, m/m), with the film having the highest concentration (0.3%, m/m), the most favorable, as it has greater antimicrobial activity. Thus, the polymeric films obtained in this research are promising pharmaceutical forms to be used in the respective treatments studied, with the possibility of obtaining effective and safe bioproducts, which, in the future, can be commercialized.

**Key-words:** biosurfactant; flavonoid; formulation; factorial design; mechanical properties.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

---

<b>Figura 1.1</b>	–	Representação do vírus HSV-1.....	17
<b>Figura 1.2</b>	–	Replicação do vírus HSV-1 na célula.....	17
<b>Figura 1.3</b>	–	Migração do vírus HSV-1 da pele/mucosa para sistema nervoso periférico .....	18
<b>Figura 1.4</b>	–	Estrutura química da quercetina .....	19
<b>Figura 1.5</b>	–	Processo de formação da acne .....	20
<b>Figura 1.6</b>	–	Estrutura química de ramnolipídeos.....	22
<b>Figura 1.7</b>	–	Diferença na estrutura da parede celular em bactérias Gram negativas e Gram positivas.....	24
<b>Figura 1.8</b>	–	Representação do método “casting” .....	26
<b>Figura 1.9</b>	–	Estrutura química do Kollicoat® IR.....	30
<b>Figura 1.10</b>	–	Estrutura química do glicerol.....	30
<b>Figura 1.11</b>	–	Estrutura química do PVP.....	30
<b>Figura 1.12</b>	–	Estrutura química do P407.....	31
<b>Figura 1.13</b>	–	Formação do conjugado caseína/pectina.....	33

### Capítulo 2

---

<b>Figura 2.1</b>	–	Sistema de cor CIELab.....	63
<b>Figura 2.2</b>	–	Características macroscópicas dos 15 filmes poliméricos (F1 a F15) obtidos utilizando o planejamento fatorial $3^3$ Box-Behnken compostos por Kollicoat® IR, glicerol, PVP, P407 e microcápsulas contendo quercetina.....	73
<b>Figura 2.3</b>	–	Resultados do perfil de liberação dos quinze filmes analisados (F1 a F15).....	76
<b>Figura 2.4</b>	–	Comparação do perfil de liberação dos filmes F6 (●) e F8 (■)....	78
<b>Figura 2.5</b>	–	MEV do (A) filme com quercetina microencapsulada, do (B) filme branco, da (C) microcápsula com quercetina, da (D) microcápsula branca e da (E) quercetina.....	82
<b>Figura 2.6</b>	–	Perfil de degradação térmica obtido por DSC do (-) filme com quercetina e do (-) filme branco nos intervalos de temperatura	

	de (A) -60 a 50 °C e (B) 20 a 450 °C.....	83
<b>Figura 2.7</b>	– FTIR dos (A) filmes sobrepostos com Kollicoat® IR, dos (B) filmes sobrepostos com PVP, dos (C) filmes sobrepostos com P407.....	85
<b>Figura 2.8</b>	– Filmes (A) com quercetina e (B) sem fármaco armazenados no tempo zero da estabilidade; e filmes armazenados durante sete dias: com quercetina nas temperaturas de (C) 4, (D) 25 e (E) 40 °C e branco nas temperaturas de (F) 4, (G) 25 e (H) 40 °C.....	86
<b>Figura 2.9</b>	– Filmes armazenados durante 14 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.....	87
<b>Figura 2.10</b>	– Filmes armazenados durante 30 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.....	88
<b>Figura 2.11</b>	– Filmes armazenados durante 60 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.....	89
<b>Figura 2.12</b>	– Filmes armazenados durante 90 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.....	90
<b>Figura 2.13</b>	– Filmes armazenados durante 180 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.....	91
<b>Figura 2.14</b>	– Panorama geral da estabilidade físico-química dos filmes poliméricos em relação a (A) resistência à dobra e (B) teor de quercetina.....	92
<b>Figura 2.15</b>	– Resultados da irritação dérmica após oito dias de aplicação da formulação: (A) grupo controle e (B) grupo teste.....	94
<b>Figura 2.16</b>	– Resultados da atividade antiviral do filme com quercetina: (A) panorama geral, (B) análise do quarto dia e (C) análise do oitavo dia.....	95
<b>Figura 2.17</b>	– Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo	

	controle viral ao longo dos oito dias de tratamento.....	96
<b>Figura 2.18</b>	– Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo tratado com aciclovir (controle positivo) ao longo dos oito dias de tratamento.....	97
<b>Figura 2.19</b>	– Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo tratado com filme branco ao longo dos oito dias de tratamento..	98
<b>Figura 2.20</b>	– Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo tratado com filme com quercetina ao longo dos oito dias de tratamento.....	99
<b>Figura 2.21</b>	– Resultados da irritação dérmica: (A) score de irritação dérmica e (B) imagem representativa da análise histológica da pele dos animais tratados com filme com quercetina corada em Hematoxilina e Eosina (grupo teste).....	100
<b>Figura 2.22</b>	– Alterações recorrentes observadas na pele de camundongos infectados com o vírus HSV-1: (A) hiperplasia epidérmica, (B) inflamação da epiderme e (C) inflamação da derme; e (D) fragmento de pele sem alterações (pele íntegra).....	101
<b>Figura 2.23</b>	– Resultados quantitativos da análise histológica da atividade antiviral realizados no oitavo dia.....	102

### Capítulo 3

---

<b>Figura 3.1</b>	– Características macroscópicas dos filmes poliméricos contendo diferentes concentrações de ramnolipídeos: (A) 0,0%, (B) 0,1%, (C) 0,2% e (D) 0,3%.....	125
<b>Figura 3.2</b>	– MEV da superfície dos filmes com ramnolipídeos nas concentrações: (A) 0,0%, (B) 0,1%, (C) 0,2% e (D) 0,3%.....	128
<b>Figura 3.3</b>	– FTIR dos (A) quatro filmes poliméricos com 0,0%, 0,1%, 0,2% e 0,3% de ramnolipídeos sobrepostos e (B) o filme sem ativo (0,0%, m/m) sobreposto com Kollicoat® IR e PVP.....	129
<b>Figura 3.4</b>	– Teste de difusão em ágar RCM dos filmes poliméricos com 0,0; 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m) de ramnolipídeos.....	131
<b>Figura 3.5</b>	– Teste de difusão em caldo RCM dos filmes poliméricos com 0,0; 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m) de ramnolipídeos.....	132

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

---

- Tabela 1.1** – Expoente  $n$  da equação de Korsmeyer-Peppas e mecanismo de liberação do fármaco..... 35

### Capítulo 2

---

- Tabela 2.1** – Matriz do planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken com fatores codificados e seus níveis para a obtenção das 15 dispersões poliméricas (F1 a F15)..... 57
- Tabela 2.2** – Matriz do planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken com fatores codificados e seus níveis resultando em 15 formulações (F1 a F15) e os resultados das variáveis dependentes: resistência à dobra (RD), força de bioadesão (FB), variação de massa (VM), dosagem dos teores de quercetina (TQ) e teste de liberação (L)..... 74
- Tabela 2.3** – Parâmetros cinéticos da liberação da quercetina das formulações 6 e 8..... 78
- Tabela 2.4** – Resultados da caracterização do filme polimérico 8 obtidos nas análises de cor (luminosidade, coordenada vermelho/verde e coordenada amarelo/azul), espessura, densidade, pH, solubilidade, permeação de vapor de água e propriedades mecânicas (módulo de Young, resistência a tração e alongamento na ruptura)..... 80
- Tabela 2.5** – Parâmetros cinéticos de degradação do F8 sob as condições de armazenamento em 4, 25 e 40 °C..... 93

### Capítulo 3

---

- Tabela 3.1** – Resultados da concentração inibitória mínima dos ramnolipídeos frente a *C. acnes*..... 124
- Tabela 3.2** – Resultados da caracterização físico-química e das propriedades mecânicas dos filmes poliméricos nas quatro

concentrações de ramnolipídeos estudadas (0,0; 0,1; 0,2 e  
0,3%, m/m)..... 126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica de 50%
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
HSV-1-AR	Herpes Simplex Virus sorotipo 1 cepa AR
HSV-1-KOS	Herpes Simplex Virus sorotipo 1 cepa KOS
IS	Índice de Seletividade
LB	Luria-Bertani
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de dimetil tiazol-difeniltetrazólio
P407	Poloxamer 407
PEG	Polietilenoglicol
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RCM	<i>Reinforced Clostridial Medium</i>
Tg	Temperatura de transição vítrea
TVA	Transmissão de Vapor de Água
UR	Umidade Relativa

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 - INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>1.3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
1.3.1 HERPES E QUERCETINA.....	16
1.3.2 ACNE E RAMNOLIPÍDEOS.....	20
1.3.3 FILMES POLIMÉRICOS.....	24
1.3.4 MICROCÁPSULAS.....	31
1.3.5 MODELOS CINÉTICOS.....	33
1.3.5.1 Ordem Zero.....	33
1.3.5.2 Primeira Ordem.....	34
1.3.5.3 Korsmeyer-Peppas.....	34
1.3.5.4 Hixon – Crowell.....	36
1.3.5.5 Higuchi.....	36
1.3.5.6 Weibull.....	37
1.3.5.7 Logistic.....	38
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 2 - DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS CONTENDO QUERCETINA PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TÓPICA ANTI-HERPÉTICA.....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
2.2.1 MATERIAIS.....	51
2.2.1.1 Reagentes.....	51
2.2.1.2 Equipamentos.....	51
2.2.2 ANÁLISE ANTI-HERPÉTICA E CITOTÓXICA DO COMPOSTO.....	52
2.2.2.1 Células e Vírus.....	52

2.2.2.2	Citotoxicidade.....	53
2.2.2.3	Titulação Viral.....	53
2.2.2.4	Ensaio Antivirais.....	54
2.2.2.4.1	Ensaio simultâneo.....	54
2.2.2.4.2	Testes de identificação do mecanismo de ação.....	54
2.2.3	OBTENÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	55
2.2.4	OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS.....	56
2.2.5	ASPECTO VISUAL.....	58
2.2.6	RESISTÊNCIA À DOBRA.....	58
2.2.7	AVALIAÇÃO, <i>EX VIVO</i> , DA FORÇA BIOADESIVA.....	58
2.2.7.1	Preparação da Pele de Suíno.....	58
2.2.7.2	Análise.....	59
2.2.8	VARIAÇÃO DE MASSA.....	59
2.2.9	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE QUERCETINA .....	59
2.2.10	TESTE DE LIBERAÇÃO.....	60
2.2.10.1	Solubilidade da Quercetina.....	60
2.2.10.2	Estudo de Liberação.....	60
2.2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL .....	61
2.2.12	CARACTERIZAÇÃO DA MELHOR FORMULAÇÃO DE FILME POLIMÉRICO.....	62
2.2.12.1	Cor.....	62
2.2.12.2	Espessura.....	63
2.2.12.3	Densidade.....	63
2.2.12.4	pH da Superfície.....	64
2.2.12.5	Solubilidade em Água.....	64
2.2.12.6	Transmissão de Vapor de Água (TVA).....	65
2.2.12.7	Propriedades Mecânicas.....	66
2.2.12.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dos filmes poliméricos, microcápsulas e quercetina.....	66
2.2.12.9	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	66
2.2.12.10	Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	67
2.2.13	ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES POLIMÉRICOS.....	67

2.2.14	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXIDADE DO FILME.....	68
2.2.15	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	68
2.2.16	ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	69
2.2.16.1	Determinação da Toxicidade do Composto.....	69
2.2.16.2	Ensaio antiviral.....	69
2.2.16.3	Análise histológica.....	70
2.2.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
<b>2.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
2.3.1	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE E DO ENSAIO ANTIVIRAL DA QUERCETINA.....	71
2.3.2	OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS.....	72
2.3.3	CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO SELECIONADO (Nº 8).....	79
2.3.3.1	MEV da superfície dos filmes poliméricos, microcápsulas e quercetina.....	81
2.3.3.2	DSC.....	82
2.3.3.3	FTIR.....	84
2.3.4	ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES POLIMÉRICOS.....	85
2.3.5	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FILME COM QUERCETINA.....	93
2.3.6	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FILME COM QUERCETINA.....	94
<b>2.4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>102</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>
	<b>Capítulo 3 - DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS CONTENDO RAMNOLÍPÍDEOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TÓPICA ANTIACNE.....</b>	<b>109</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>110</b>
<b>3.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>113</b>
3.2.1	MATERIAIS.....	113

3.2.1.1	Microrganismos.....	113
3.2.1.2	Reagentes.....	113
3.2.1.3	Equipamentos.....	113
3.2.2	OBTENÇÃO DOS RAMNOLIPÍDEOS.....	114
3.2.3	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> ANTIMICROBIANA.....	115
3.2.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXIDADE.....	116
3.2.5	OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS.....	116
3.2.6	ASPECTO VISUAL.....	117
3.2.7	VARIAÇÃO DE MASSA.....	117
3.2.8	ESPESSURA.....	118
3.2.9	DENSIDADE.....	118
3.2.10	PH DA SUPERFÍCIE.....	118
3.2.11	SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	119
3.2.12	TRANSMISSÃO DE VAPOR DE ÁGUA (TVA).....	119
3.2.13	RESISTÊNCIA À DOBRA.....	120
3.2.14	AVALIAÇÃO, <i>EX VIVO</i> , DA FORÇA BIOADESIVA.....	120
3.2.14.1	Preparação da Pele de Suíno.....	120
3.2.14.2	Análise.....	121
3.2.15	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	121
3.2.16	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	122
3.2.17	INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)....	122
3.2.18	TESTE ANTIMICROBIANO <i>IN VITRO</i> DOS FILMES.....	122
3.2.19	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	123
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>123</b>
3.3.1	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ENSAIO ANTIMICROBIANO E DA CITOTOXICIDADE.....	123
3.3.2	OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS.....	124
3.3.3	MEV.....	127
3.3.4	FTIR.....	128
3.3.5	TESTE ANTIMICROBIANO <i>IN VITRO</i> DOS FILMES POLIMÉRICOS..	130
<b>3.4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>132</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>133</b>

<b>Capítulo 4 - CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>138</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>139</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>139</b>

## Capítulo 1

---

### INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA

---

## 1.1 INTRODUÇÃO

O herpes e a acne são doenças causadas por microrganismos e atingem milhares de pessoas no mundo. O herpes é causada pelo vírus, HSV-1, que causa feridas, dor, queimação, coceira, febre e dor de cabeça (DEMIR *et al.*, 2020); enquanto a acne é causada por bactéria, *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*, anteriormente *Propionibacterium acnes*), que causa espinhas, cravos, pápulas, pústulas ou nódulos (GUPTA *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2007).

Outro ponto que essas doenças tem em comum, é o fato dos tratamentos convencionais utilizados selecionam cepas resistentes, impulsionando a busca por novos fármacos. Os estudos de princípios ativos de origem natural vêm ganhando espaço nos últimos anos por comumente apresentarem baixa toxicidade e podem ser de baixo custo. A quercetina pode ser extraída de várias plantas, sendo encontrada em folhas, flores e frutos (HOSSEINI *et al.*, 2021); e os ramnolipídeos são obtidos predominantemente por *Pseudomonas aeruginosa* (JADHAV *et al.*, 2018).

É interessante que esses agentes ativos sejam incorporados em formulações para serem utilizados no tratamento das doenças citadas, como os filmes poliméricos, que podem ser flexíveis, biocompatíveis com a pele, não tóxicos, de fácil utilização e podem possuir menor risco de irritação (GARCÍA *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2011; KATHE e KATHPALIA, 2017; OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014).

Além disso, essa forma farmacêutica pode aumentar a biodisponibilidade do fármaco (HAAS e LEHR, 2002), promover liberação modificada do agente ativo (KUMAR *et al.*, 2014) e oferecer propriedade bioadesiva, que é a capacidade de materiais, polímeros naturais e sintéticos, de aderir ao tecido biológico (SAHA *et al.*, 2020), aumentando o tempo de contato do fármaco com o local de ação, o que reduz a frequência de reaplicação do medicamento (KATHE e KATHPALIA, 2017).

Assim, o presente trabalho compreende o desenvolvimento de filmes poliméricos bioadesivos com o intuito de inovar nos tratamentos aplicados para herpes e acne. Essa tese foi dividida em quatro capítulos. O capítulo 1 apresenta a introdução geral, objetivos do trabalho e revisão da literatura. Nos capítulos 2 e 3, foram

apresentados o desenvolvimento e avaliação das respectivas formulações farmacêuticas. E o capítulo 4 apresenta a conclusão geral do trabalho apresentado.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes poliméricos bioadesivos contendo quercetina para serem utilizados como produtos anti-herpéticos e filmes poliméricos bioadesivos contendo ramnolipídeos como produtos antiacne e avaliar a qualidade, eficácia e segurança das formas farmacêuticas.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar atividade *in vitro* anti-herpética da quercetina;
- Desenvolver os filmes poliméricos bioadesivos e incorporar a quercetina na forma farmacêutica;
- Caracterizar físico-quimicamente o filme contendo quercetina;
- Analisar a capacidade bioadesiva da formulação;
- Avaliar a segurança (toxicidade) da formulação, *in vivo*, pelo ensaio de irritação dérmica;
- Analisar a eficácia, *in vivo*, da quercetina presente no filme polimérico pelo ensaio antiviral;
- Analisar a estabilidade físico-química do filme contendo quercetina;
- Analisar a eficácia (atividade *in vitro* antiacne) e segurança (capacidade de causar hemólise) dos ramnolipídeos;
- Desenvolver os filmes poliméricos bioadesivos e incorporar os

- ramnolípídeos na forma farmacêutica;
- Caracterizar físico-quimicamente o filme contendo ramnolípídeos;
  - Analisar a capacidade bioadesiva da formulação;
  - Analisar a atividade antiacne, *in vitro*, dos filmes contendo ramnolípídeos.

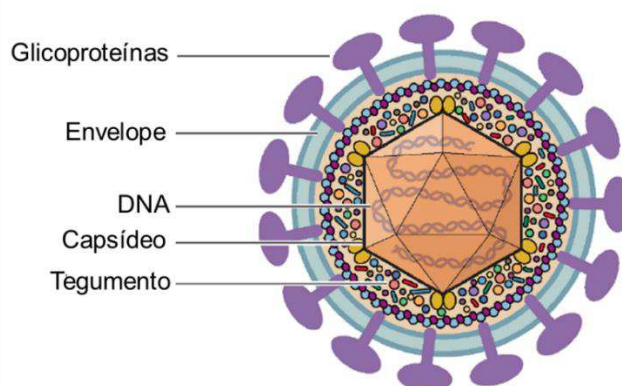
## 1.3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.3.1 HERPES E QUERCETINA

O herpes é uma doença sem cura que atinge de 50 a 90% da população mundial (KOUJAH, SURYAWANSHI e SHUKLA, 2019; SZCZUBIAŁKA, PYRC e NOWAKOWSKA, 2016). Sua transmissão ocorre por contato direto com a pessoa infectada, com as lesões infectadas ou com sangue (SZCZUBIAŁKA, PYRC e NOWAKOWSKA, 2016). Essa doença é causada pelo Herpes simplex virus-1 (HSV-1), que possui DNA de fita dupla protegido por um capsídeo icosaédrico cercado por uma camada proteica denominada tegumento e é envolto em um envelope contendo glicoproteínas virais (Figura 1.1) (KOUJAH, SURYAWANSHI e SHUKLA, 2019; ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021).

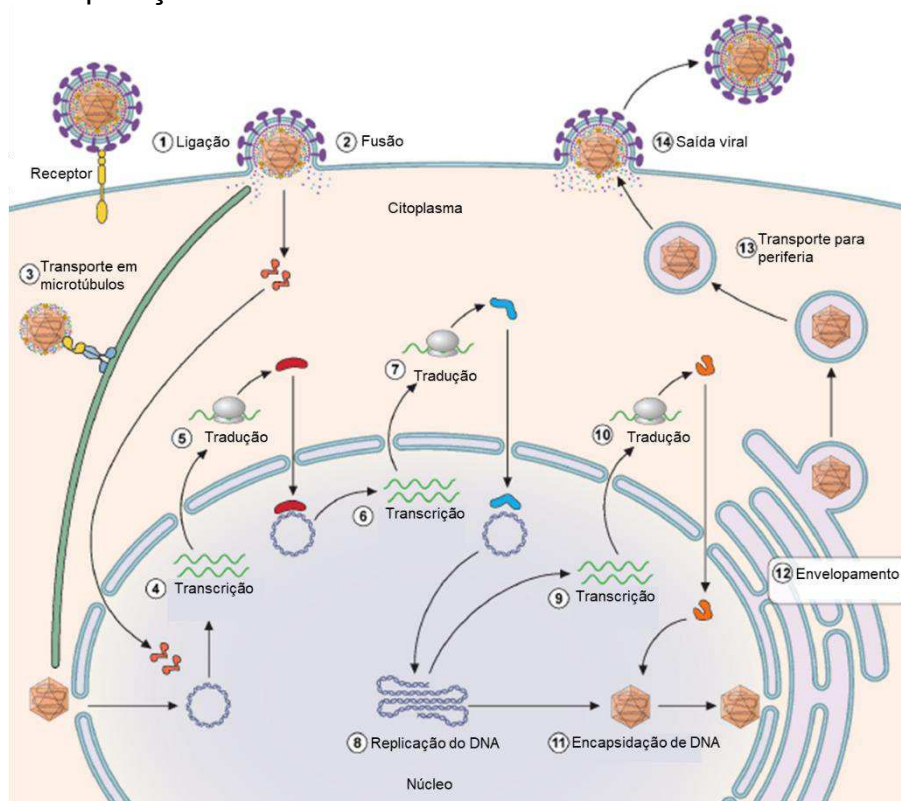
O HSV-1 primeiramente infecta as células epiteliais da mucosa ou da pele por intermédio das glicoproteínas que fazem a ligação com os receptores da superfície celular (Figura 1.2) e auxiliam a fusão do envelope com a membrana plasmática causando a penetração do capsídeo no citoplasma. Posteriormente, o capsídeo é transportado em microtúbulos para a membrana nuclear, onde ocorre a liberação do DNA do HSV-1 no núcleo. Após os processos de transcrição e tradução, o DNA é replicado e encapsidado, envelopado e liberado da célula via exocitose para uma nova infecção (DUARTE *et al.*, 2021; KOUJAH, SURYAWANSHI e SHUKLA, 2019; SZCZUBIAŁKA, PYRC e NOWAKOWSKA, 2016).

**Figura 1.1** – Representação do vírus HSV-1.



**Fonte:** adaptado de ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021.

**Figura 1.2** – Replicação do vírus HSV-1 na célula.

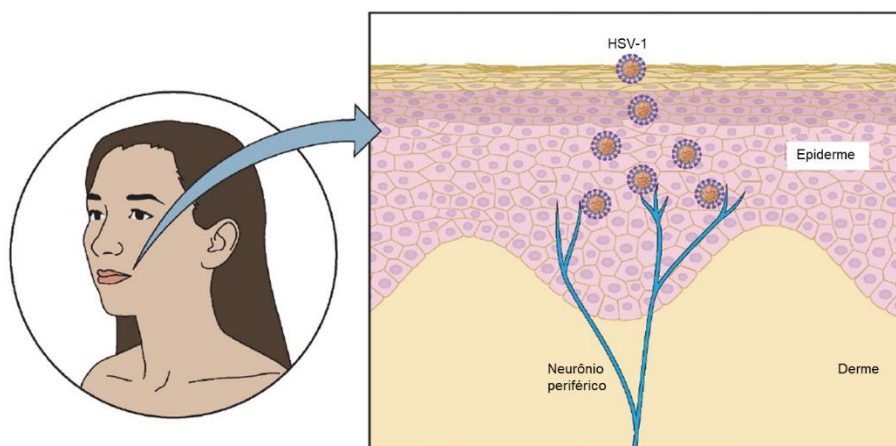


**Fonte:** adaptado de ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021.

Consecutivamente ao período de replicação nas células epiteliais, o HSV-1 entra nas terminações dos neurônios periféricos (Figura 1.3) e se transporta para o gânglio trigeminal, iniciando o processo de latência viral, não havendo expressão gênica limitada neste período e nenhuma produção de partículas virais

(HELD e DERFUSS, 2011; ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021).

**Figura 1.3** – Migração do vírus HSV-1 da pele/mucosa para sistema nervoso periférico.



**Fonte:** adaptado de ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021.

Esporadicamente, o vírus reativa, devido a fatores como estresse emocional, imunossupressão, cirurgia ou exposição à radiação UV, resultando em replicação e produção de partículas virais, que são transportadas para o local inicial de inoculação (BELLO-MORALES, ANDREU e LÓPEZ-GUERRERO, 2020; KOUJAH, SURYAWANSHI e SHUKLA, 2019; RAJČÁNI *et al.*, 2018).

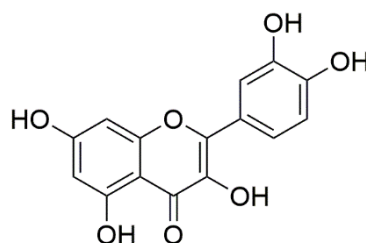
Para suprimir os sintomas da doença são utilizados fármacos que inibem alguma parte do ciclo de reprodução viral, como inibidores de glicoproteína viral, do receptor de entrada do hospedeiro, de fusão do envelope com a membrana plasmática, de replicação de DNA viral, da síntese de proteínas virais e de egresso viral (KOUJAH, SURYAWANSHI e SHUKLA, 2019). O fármaco mais utilizado no tratamento do herpes é o aciclovir, que atua inibindo a replicação de DNA viral (SADOWSKI *et al.*, 2021). No entanto, a utilização prolongada desse fármaco gerou cepas resistentes, dificultando o controle da doença (DEMIR *et al.*, 2020).

Compostos isolados de produtos naturais têm se mostrado promissores no tratamento dessa infecção (RUCHAWAPOL *et al.*, 2021; SAND *et al.*, 2021; SILVA-MARES, TORRES-LÓPEZ e RIVAS-GALINDO, 2016), como a quercetina, que pode ser utilizada no desenvolvimento de formulações seguras e de baixo custo.

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-2-fenilcromen-4-ona) é um

flavonoide, sem um açúcar anexado, encontrado em muitas frutas e vegetais (DI PETRILLO *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2016). Ela é caracterizada pela coloração amarela, por apresentar baixa solubilidade em água e ser solúvel em álcool e lipídeos e pela capacidade limitada de permeação da pele (HOSSEINI *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2016; SICURELLA *et al.*, 2022). Quimicamente (Figura 1.4) é composta por dois anéis benzênicos ligados por três carbonos que formam um anel pirano fechado. Esse composto possui ligações duplas, cinco grupos hidroxila e uma carbonila, que são comumente relacionados com suas propriedades farmacológicas (MAGAR e SOHNG, 2020; SHARMA *et al.*, 2018), como atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antiasmática, antiobesidade, anticarcinogênica, anti-hipercolesterolêmica, antiaterosclerótica e antiviral (DAVID, ARULMOLI e PARASURAMAN, 2016; WANG *et al.*, 2016). Na literatura os trabalhos relatam que a atividade antioxidante de compostos como a quercetina, frequentemente são acompanhadas de atividades antivirais e antimicrobianas, devido a presença das hidroxilas (MATERSKA, 2008).

**Figura 1.4** – Estrutura química da quercetina.



**Fonte:** Próprio autor.

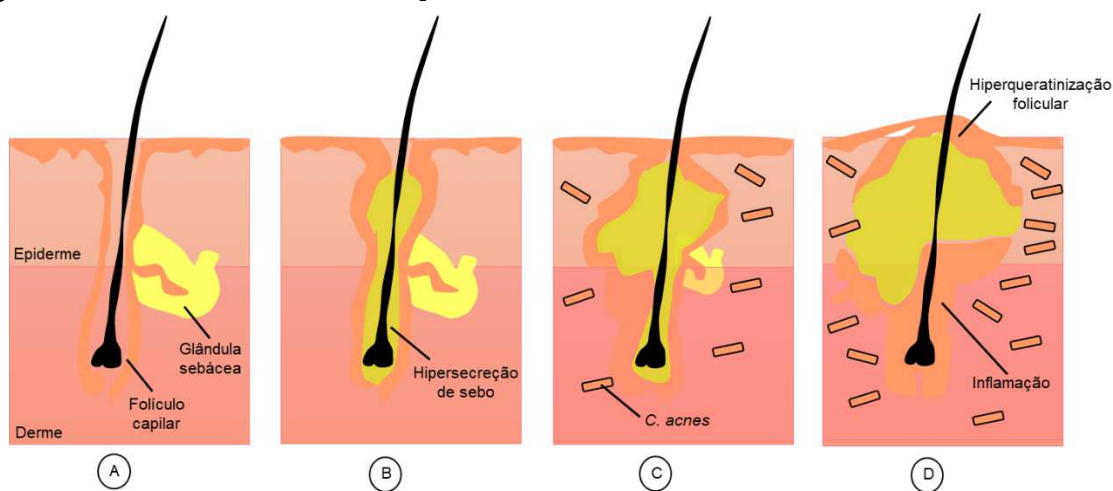
Como antiviral, a quercetina é eficaz na inibição de vários vírus como influenza A, B, dengue, hepatite C, rinovírus, Zika, Ebola, poliovírus tipo 1 e SARS-CoV-2 (BADSHAH *et al.*, 2021; ZAKARYAN *et al.*, 2017). No caso do HSV-1, esse composto atua na fase inicial da infecção como inibidor de entrada viral, inibindo a glicoproteína D, e como inibidor de replicação viral (DI PETRILLO *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2017; SAND *et al.*, 2021; SICURELLA *et al.*, 2022).

### 1.3.2 ACNE E RAMNOLIPÍDEOS

A acne é uma doença crônica que atinge 85% dos adolescentes e jovens adultos, comumente surge no folículo piloso e geralmente envolve inflamação na pele, além de ter impacto considerável na qualidade de vida dos pacientes (CASTILLO, NANDA e KERI, 2019; DESSINIOTI e DRENO, 2020; XU e LI, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). Existem condições que influenciam a incidência e persistência da acne, como fatores ambientais, hormônios, histórico familiar e estresse (DRÉNO *et al.*, 2018).

Existem quatro fatores que contribuem para a acne (Figura 1.5): 1) hipersecreção de sebo (Figura 1.5 B), 2) colonização bacteriana (Figura 1.5 C), 3) hiperqueratinização folicular (Figura 1.5 D) e 4) inflamação (Figura 1.5 D) (DRÉNO *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2022; XU e LI, 2019).

**Figura 1.5** – Processo de formação da acne.



Fonte: Próprio autor.

A *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*, anteriormente *Propionibacterium acnes*) é uma bactéria anaeróbia Gram-positiva aerotolerante, que faz parte da microbiota humana, sendo a espécie mais abundante na unidade pilosebácea onde surge a acne (CHUDZIK, MIGDAŁ e PAŚCIAK, 2022; DRÉNO *et al.*, 2018; XU e LI, 2019). Ela possui o papel de: I) hidrolisar triglicerídeos, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido propiônico, mantendo o pH da pele baixo; e II) inibir a

colonização de bactérias patogênicas (DRÉNO *et al.*, 2018; XU e LI, 2019).

A espécie *C. acnes* se divide em três tipos baseados na análise gênica e na atividade da lipase: I) *C. acnes* subsp. *acnes*, II) *C. acnes* subsp. *defendens* e III) *C. acnes* subsp. *elongatum*, e posteriormente em seis filotipos associados a diferentes condições clínicas, designados IA1, IA2, IB, IC, II e III (CHUDZIK, MIGDAŁ e PAŚCIAK, 2022; MCLAUGHLIN *et al.*, 2019). Por exemplo, os filotipos IA são encontrados em regiões afetadas por acne e os IB em infecções de tecidos moles (CHUDZIK, MIGDAŁ e PAŚCIAK, 2022).

Estudos recentes mostraram que a quantidade da bactéria *C. acnes* na pele humana é igual entre pessoas que possuem acne e pessoas saudáveis. No entanto, há perda na diversidade dos filotipos dessa bactéria e aumento considerável do filotipo IA nas pessoas que possuem acne (CHUDZIK, MIGDAŁ e PAŚCIAK, 2022; DRÉNO *et al.*, 2020; FOURNIÈRE *et al.*, 2020).

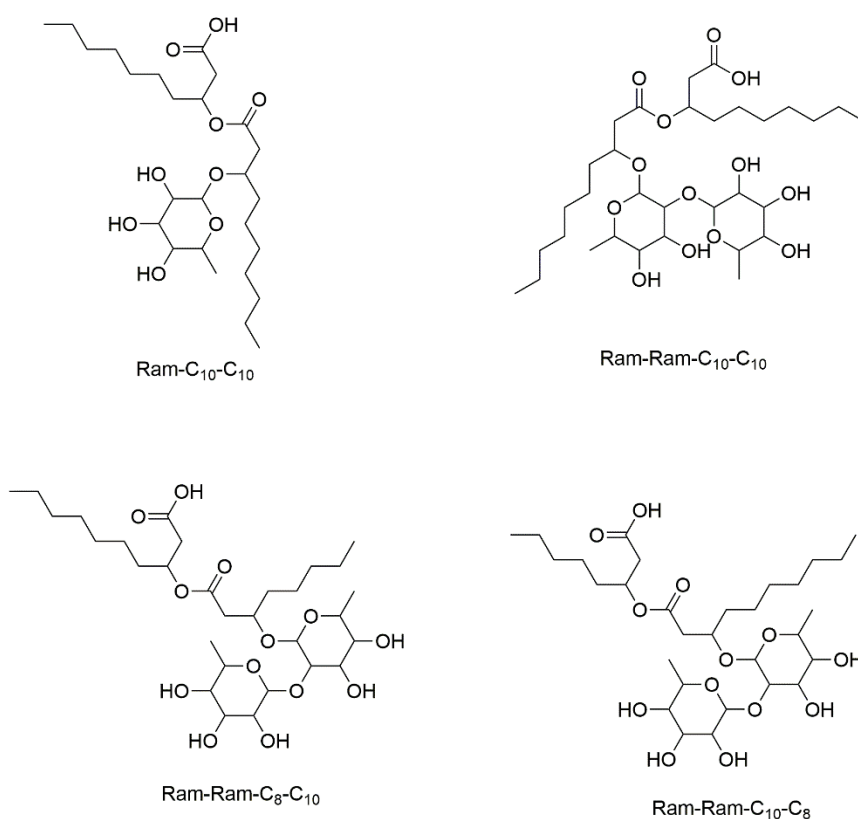
Os tratamentos convencionais da acne incluem retinóides tópicos, ácido azelaico, peróxido de benzoíla e antibióticos tópicos e orais. Todavia, atualmente, existe a preocupação com a seleção de cepas resistentes à antibióticos (DESSINIOTI e DRENO, 2020; KAYIRAN *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019), impulsionando o desenvolvimento de tratamentos novos, naturais e não convencionais (CASTILLO, NANDA e KERI, 2019), como o uso de biossurfactantes.

Os biossurfactantes são compostos anfífilos produzidos por microrganismos (leveduras, fungos ou bactérias) (AZIZ *et al.*, 2021). A parte hidrofílica é composta de açúcares, aminoácidos ou grupos funcionais polares, enquanto que a parte hidrofóbica é formada por uma cadeia de hidrocarbonetos alifáticos (ABDEL-MAWGOUD, LÉPINE e DÉZIEL, 2010). Eles são biodegradáveis, biocompatíveis com a pele e ambiente, apresentam baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e estabilidade em extremos de temperatura, pH e salinidade (ABDEL-MAWGOUD, LÉPINE e DÉZIEL, 2010; AZIZ *et al.*, 2021; LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009). Esses compostos são classificados de acordo com composição química em glicolipídios, lipopeptídeos, ácidos graxos, lipoproteínas, fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos (AZIZ *et al.*, 2021; INÈS e DHOUHA, 2015).

Os glicolipídios são compostos constituídos por porções de carboidratos ligadas a cadeias de ácidos graxos de comprimentos variados (ADU *et al.*, 2020; AZIZ *et al.*, 2021; VARJANI e UPASANI, 2017). Os ramnolipídeos são os biossurfactantes glicolipídicos mais amplamente estudados (SHAO *et al.*, 2017). Eles

são constituídos por uma (mono-ramnolipídeos) ou duas moléculas de ramnose (di-ramnolipídeos) que estão ligados (ligação glicosídica) a um ou dois ácidos graxos que contêm cadeias de 8 a 14 átomos de carbono (Figura 1.6) (AZIZ *et al.*, 2021; CHONG e LI, 2017).

**Figura 1.6** – Estrutura química de ramnolipídeos.



**Fonte:** Próprio autor.

Os ramnolipídeos são metabólitos secundários produzidos por bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa* (SHAO *et al.*, 2017), que sempre formam misturas de diferentes congêneres: mono- e di-ramnolipídeos (CHONG e LI, 2017; RIKALOVIĆ, VRVIĆ e KARADŽIĆ, 2015).

Em sua biossíntese estão envolvidos processos enzimáticos e genéticos, que ocorrem em três reações sequenciais. Na primeira etapa ocorre a produção dos precursores: o açúcar dTDP-L-ramnose, que pode ser sintetizado a partir da D-glicose; e a porção hidrofóbica, o ácido 3-(3-hidroxi)alcanoiloxi) alcanóico

(HAA), que pode ser obtido através da via de síntese de ácidos graxos. Na segunda etapa, a RhIB ramnosiltransferase catalisa a reação entre os percussores e produz os mono-ramnolipídeos. E na terceira etapa, ocorre a formação dos di-ramnolipídeos a partir da RhIC ramnosiltransferase e das moléculas de mono-ramnolipídeos e dTDP-L-ramnose (CHONG e LI, 2017; SHAO *et al.*, 2017; SOBERÓN-CHÁVEZ, LÉPINE e DÉZIEL, 2005; VARJANI e UPASANI, 2017).

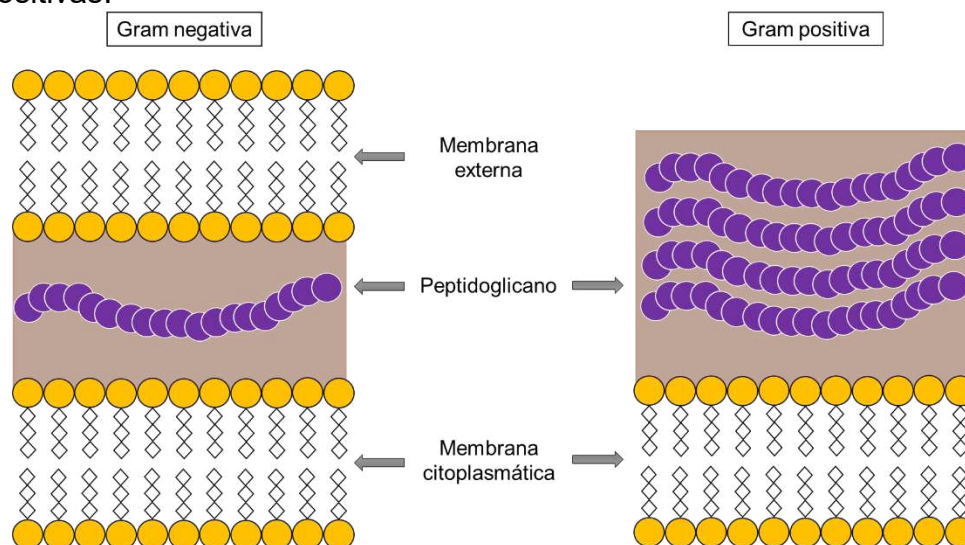
O rendimento da produção e a proporção de congêneres são afetados pelas condições ambientais e nutricionais para o crescimento microbiano, como a origem da cepa bacteriana, fonte de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, agitação, método de isolamento e purificação de ramnolipídeos (KASKATEPE e YILDIZ, 2016; RIKALOVIC, VRVIC e KARADZIC, 2015; VARJANI e UPASANI, 2017).

Estudos mostram que os ramnolipídeos podem ser utilizados como agentes antimicrobiano, antifúngico, anticancerígeno, antioxidante e imunomodulador (THAKUR, Priyanka *et al.*, 2021). A atividade antimicrobiana desses compostos é atribuída ao seu caráter anfifílico, que permite interação intermolecular com a membrana celular, causando alterações estruturais, como a formação de poros que levam a morte celular (BHARALI *et al.*, 2013; FERREIRA, VIEIRA e NITSCHKE, 2019).

As bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos ramnolipídeos do que as bactérias Gram negativas, devido à diferença na estrutura da parede celular entre esses tipos de bactérias (BHARALI *et al.*, 2013). As bactérias Gram positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano (Figura 1.7), apresentando coloração violeta no teste de Gram. Enquanto as Gram negativas, apresentam coloração vermelha nesse teste, por possuírem uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa protetora (Figura 1.7) que funciona como uma barreira de permeabilidade (RAJAGOPAL e WALKER, 2017).

Quando os ramnolipídeos foram testados como antimicrobianos na cepa *C. acnes* apresentaram um halo de inibição, mostrando que é um fármaco promissor para ser utilizado em produtos cosméticos (AZIZ *et al.*, 2021).

**Figura 1.7** – Diferença na estrutura da parede celular em bactérias Gram negativas e Gram positivas.



Fonte: Próprio autor.

### 1.3.3 FILMES POLIMÉRICOS

Os filmes poliméricos têm sido extensivamente utilizados como sistemas de liberação de fármacos (BOLLA *et al.*, 2018; RICCIO *et al.*, 2022; SAHA *et al.*, 2020; SIEPMANN; SIEPMANN, 2013a). Os materiais que compõem essa forma farmacêutica podem possuir propriedade de bioadesão, que é a capacidade de aderir ao tecido biológico (SAHA *et al.*, 2020). Devido a essa característica, os filmes poliméricos bioadesivos aumentam o tempo do fármaco no local de tratamento, criando um gradiente de concentração local (RICCIO *et al.*, 2022). Além de promover administração indolor, apresentar baixa toxicidade, baixa irritação do local administrado, baixa flutuação da dose no plasma sanguíneo, evitar sistema de digestão enzimático, aumenta a biodisponibilidade do fármaco e pode ser administrada nas vias oral, bucal, sublingual, oftálmica, vaginal, tópica e transdérmica (BOLLA *et al.*, 2018; RICCIO *et al.*, 2022).

Existem alguns mecanismos teóricos que explicam essa propriedade, como os processos de difusão-entrelaçamento, eletrostático, adsorção e molhabilidade (ANDREWS, LAVERTY e JONES, 2009; ASATI, JAIN e CHOUBEY, 2019; KUMAR *et al.*, 2014).

- Teoria da difusão-entrelaçamento de cadeias: a bioadesão ocorre devido a difusão dos polímeros líquidos nas microfissuras e irregularidades presentes na superfície do substrato.
- Teoria eletrônica: a transferência de elétrons entre os polímeros e a superfície do substrato causam a adesividade.
- Teoria da adsorção: interações intermoleculares entre os polímeros e a superfície do substrato, como ligação de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, são responsáveis pela adesão.
- Teoria de molhabilidade: a bioadesão ocorre devido a afinidade do líquido ou dispersão polimérica de baixa viscosidade com o substrato onde será espalhado. Nessa teoria os polímeros ancoram-se nas superfícies irregulares por meio do ângulo de contato.

Essa formulação pode ser constituída por um ou mais polímero(s) (blendas poliméricas) formador(es) de filme, plastificantes, surfactantes, conservantes e pigmentos (SKALSKY e PETEREIT, 2017). Os plastificantes atuam nas propriedades mecânicas, aumentando o alongamento e a tensão de ruptura, e na cinética de liberação do fármaco. Os surfactantes auxiliam na dispersão, molhabilidade e solubilização do filme, e os conservantes apresentam propriedades antimicrobianas, aumentando a estabilidade da formulação (RICCIO *et al.*, 2022; SKALSKY e PETEREIT, 2017).

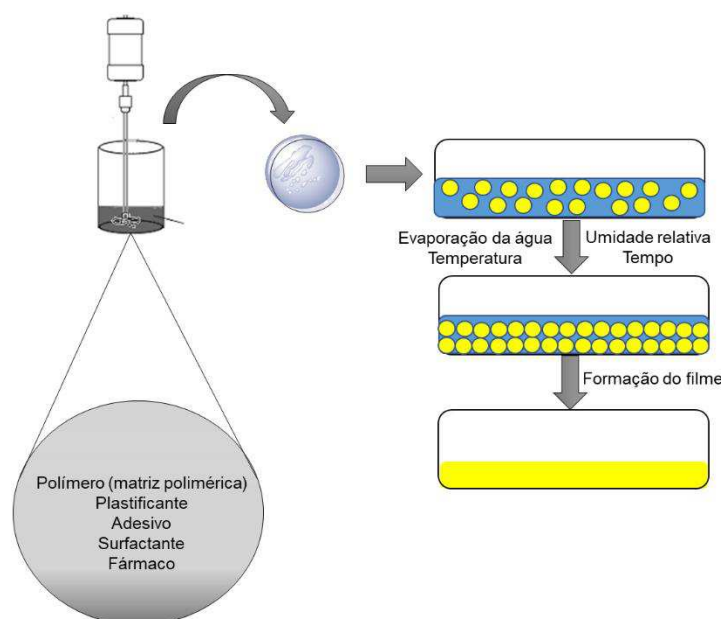
Os polímeros utilizados na obtenção dessas formas farmacêuticas devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, flexíveis, apresentar durabilidade, tenacidade, adesividade, parâmetros de tensão/deformação, baixo custo, e podem ser naturais ou sintéticos, sendo os mais comumente utilizados a celulose e derivados, quitosana, gelatina, goma de gelana, pectina, polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA) e polivinilpirrolidona (PVP) (BOLLA *et al.*, 2018; RICCIO *et al.*, 2022).

Existem alguns métodos utilizados para preparar filmes poliméricos. De forma breve, a técnica de eletrofiação produz nanofibras aplicando forças eletrostáticas em uma solução, os filmes formados por essa técnica são resistentes mecanicamente sem adição de plastificantes. No entanto, ela não é viável em larga escala (IBRAHIM e KLINGNER, 2020; RICCIO *et al.*, 2022). A técnica de *eletrospray*

forma filmes atomizando as partículas de polímero em um coletor metálico, essa metodologia somente utiliza soluções com baixa viscosidade (HUANG *et al.*, 2022; RICCIO *et al.*, 2022). A técnica de extrusão a quente é simples, não utiliza solventes e permite a obtenção de produtos de alta densidade. No entanto, ela utiliza calor, limitando a técnica a polímeros termoestáveis (RICCIO *et al.*, 2022; THAKKAR *et al.*, 2020). A bioimpressão tridimensional (3D) é uma técnica que imprime biopolímeros, ela possui elevado custo de aquisição e longo tempo de produção e o material utilizado deve possuir baixa viscosidade (RICCIO *et al.*, 2022). O método “casting” ou evaporação de solvente é um dos mais aplicados para a formação de filmes poliméricos, e foi o utilizado nesse trabalho, assim, descrito detalhadamente.

No método “casting” (Figura 1.8), os componentes (polímero, plastificante, adesivo, surfactante e fármaco) são dissolvidos em solvente apropriado (água, etanol), sob agitação constante, por um tempo determinado, normalmente durante algumas horas. Posteriormente, são transferidos para um molde, comumente uma placa de petri, e então o solvente é evaporado, em estufa, a baixa temperatura (aproximadamente 40-50 °C) ou em temperatura ambiente. Essa técnica apresenta alguns desafios, como garantir a distribuição homogênea do fármaco e dos componentes da formulação, a velocidade de agitação e o tempo de secagem devem ser otimizados (RICCIO *et al.*, 2022; SUHAG *et al.*, 2020).

**Figura 1.8** – Representação do método “casting”.



**Fonte:** Próprio autor.

Com o objetivo de garantir a qualidade dos filmes obtidos por qualquer um dos métodos descritos, algumas análises são necessárias, como as propriedades mecânicas (resistência à tração e à dobra, alongamento na ruptura e módulo de Young), força de bioadesão, análises térmicas, permeabilidade/transmissão de vapor de água, permeação de fármaco e cinética de liberação (KATHE e KATHPALIA, 2017; PORTER e FELTON, 2010).

A resistência à tração de um filme é definida como a resistência do material a uma força que tende a separá-lo e, normalmente, identificada como a tensão máxima na curva tensão-deformação e pode ser calculada de acordo com a Equação (1) (MORALES e MCCONVILLE, 2011).

$$\text{Resistência à tração} = \frac{\text{Força na falha}}{\text{Área transversal do filme}} \quad (1)$$

A resistência à dobra é uma medida da flexibilidade dos filmes poliméricos e é definida como o número de vezes que o filme pode ser dobrado em um ângulo de 180° até ele se quebrar (NAIR *et al.*, 2013).

O alongamento na ruptura é uma medida da deformação máxima que o filme pode sofrer antes de rasgar e é calculado usando a Equação (2) (MORALES e MCCONVILLE, 2011).

$$\text{Alongamento na ruptura} = \left( \frac{\text{Aumento do comprimento na ruptura}}{\text{Comprimento inicial do filme}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

O módulo de Young é uma avaliação da rigidez ou de como o filme se deforma na região elástica e é obtido a partir da razão da tensão aplicada e da tensão correspondente e pode ser calculada a partir da inclinação da curva tensão-deformação usando a Equação (3) (MORALES e MCCONVILLE, 2011).

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\text{Inclinação do estresse - curva de deformação}}{\text{Espessura do filme} \times \text{Velocidade transversal}} \quad (3)$$

A força de bioadesão é a medida da força máxima necessária para separar o filme polimérico aplicado do tecido biológico (NAIR *et al.*, 2013). As análises térmicas fornecem informações sobre a degradação térmica do filme e das interações intermoleculares do princípio ativo com os demais constituintes da formulação (NAIR

*et al.*, 2013). A permeabilidade de vapor de água é uma técnica que mensura a quantidade de vapor de água que penetra o filme, ela é importante para verificar se a formulação é oclusiva, o que pode afetar as funções fisiológicas da pele (SCIARRA e GIDWANI, 1972). A permeação de fármaco é uma análise importante para se ter conhecimento da taxa de absorção do agente ativo por essa via (YAMASHITA e HASHIDA, 2003). A cinética de liberação do fármaco é estudada para se determinar a velocidade de liberação da forma farmacêutica e o padrão da liberação do fármaco que pode ser imediata ou modificado (ADEPU e RAMAKRISHNA, 2021; VISAN, POPESCU-PELIN e SOCOL, 2021).

A incorporação da quercetina em filmes constituídos por diferentes polímeros vem sendo descrita na literatura. Yang *et al.* (2023) incorporaram quercetina pelo processo de sopro de extrusão em filme de poli(butileno adipato co-tereftalato)/amido termoplástico e observaram que a quercetina aumenta as capacidades antioxidante e anti-ultravioleta do filme, que é utilizado na proteção de alimentos.

Martins *et al.* (2022) obtiveram filme nanofibroso de poli(1-vinilpirrolidona)-co-(acetato de vinila) contendo quercetina em três concentrações diferentes (0, 5 e 15%, m/m) pela técnica de eletrofiação. Os filmes estudados apresentaram atividade antioxidante e possivelmente aumentam a biodisponibilidade da quercetina por aumentar a dissolução deste agente ativo.

Vinhal *et al.* (2021) incorporaram quercetina em filme de gelatina/PVA obtido pelo método “casting”, com o intuito de desenvolver uma embalagem antioxidante. Esses autores concluíram que o material analisado é promissor para ser aplicado em uma embalagem inteligente, que libera quercetina no alimento dependendo do pH e da polaridade do mesmo, evitando processos oxidativos.

Pandit, Omase e Mute (2020) obtiveram pelo método “casting” filmes de quitosana, glicerina e ácido acético contendo transferossomas carregados de quercetina para tratamento de osteoporose secundária. Esses autores concluíram que essa forma farmacêutica é promissora como alternativa ao tratamento oral, pois além de ser eficaz contra a doença é de fácil aplicabilidade, melhorando a adesão do paciente ao tratamento.

Sanchez-Rexach *et al.* (2019) obtiveram filmes poliméricos de poli(3-caprolactona) com quercetina por três métodos diferentes: “casting”, *spin coating* e eletrofiação e avaliaram a liberação da quercetina, que ocorreu nos três métodos.

Luzi *et al.* (2019) avaliaram filmes de PVA incorporados com ácido gálico e quercetina obtidos pelo método “casting” e concluíram que esses filmes podem ser utilizados como antioxidantes em embalagens de alimentos, além de melhorar as deformidades dos filmes em comparação a filmes de PVA sem nenhum agente ativo.

Morici, Arrigo e Dintcheva (2014) estudaram a fotoproteção exercida pela quercetina em filmes produzidos com três diferentes materiais: polímero à base de amido (Mater-Bi®), ácido polilático e poli(óxido de etileno) e observaram que esse flavonoide retarda a fotodegradação dos filmes de modo que esses podem ser utilizados em embalagens.

Quanto aos ramnolipídeos, existem poucos trabalhos na literatura que adsorvem o agente ativo em filmes poliméricos. Hajfarajollah *et al.* (2015) adsorveram 5 g/L de ramnolipídeos em filmes de polipropileno e avaliaram a atividade antimicrobiana desses filmes contra bactérias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e obtiveram resultados favoráveis frente as bactérias Gram positivas.

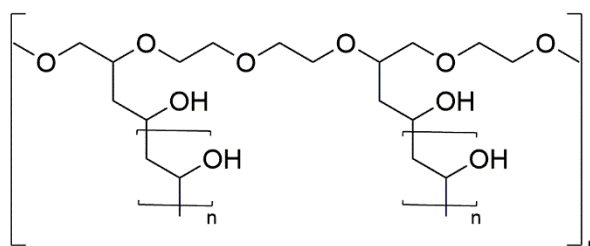
Costa *et al.* (2009) obtiveram filmes dos polímeros tereftalato de polietileno, poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(e-caprolactona) (PCL) e uma blenda polimérica de PVC/PCL pelo método “casting” e adsorveram ramnolipídeos na superfície para avaliar a capacidade de molhabilidade dos ramnolipídeos nas superfícies, e concluíram que esse surfactante apresenta propriedade umectante.

Neste trabalho foram utilizados o Kollicoat® IR como matriz polimérica, glicerol como plastificante, PVP como adesivo e poloxamer 407 (P407) como surfactante (em uma das formulações).

O Kollicoat® IR (aprox. 45.000 Da) é um copolímero solúvel em água constituído de 75% de PVA e 25% de PEG (Figura 1.9), apresenta flexibilidade, baixa viscosidade e rápida dissolução (BASF, 2015).

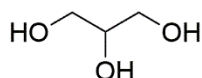
O glicerol, 1,2,3-propanotriol (Figura 1.10), é uma molécula pequena (92,09 g/mol) constituída por três grupamentos hidroxila, é usualmente aplicado como plastificante, aumentando a flexibilidade de outros polímeros (BEN, SAMSUDIN e YHAYA, 2022).

**Figura 1.9** – Estrutura química do Kollicoat® IR



**Fonte:** Próprio autor.

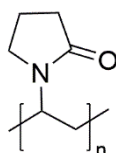
**Figura 1.10** – Estrutura química do glicerol



**Fonte:** Próprio autor.

A polivinilpirrolidona, 1-ethenylpyrrolidin-2-one (Figura 1.11), é um polímero sintético, atóxico, não iônico, inerte, resistente à temperatura, pH estável, e biocompatível, além de apresentar afinidade com compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (KURAKULA e RAO, 2020). Esse polímero apresenta excelente propriedade de adesão, devido ao grupamento da carbonila, que forma ligações de hidrogênio com o tecido biológico, sendo comumente utilizado em sistemas de liberação mucoadesivo e transdérmico (KURAKULA e RAO, 2020).

**Figura 1.11** – Estrutura química do PVP

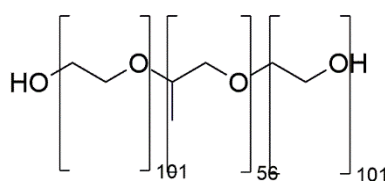


**Fonte:** Próprio autor.

Poloxamers são copolímeros e surfactantes não-iônicos, constituídos

por polioxietileno (poli[óxido de etileno], PEO) e polioxipropileno (poli[óxido de propileno], PPO), organizados em três blocos (PEO:PPO:PEO) (PERCIVAL *et al.*, 2018). O P407 é composto de 70% de PEO conforme Figura 1.12.

**Figura 1.12** – Estrutura química do P407



**Fonte:** Próprio autor.

Ambos os princípios ativos (quercetina e ramnolipídeos) foram incorporados na dispersão precursora do filme polimérico, sendo necessário microencapsular a quercetina para dispersá-la no filme polimérico.

#### 1.3.4 MICROCAPSULAS

As técnicas de microencapsulação consistem na obtenção de partículas heterogêneas, onde o material de parede (matriz polimérica), envolve o núcleo de interesse (LENGYEL *et al.*, 2019; MUHOZA *et al.*, 2020). Essas partículas variam de 1 a 1000  $\mu\text{m}$  e são amplamente utilizadas para estabilizar e proteger agentes ativos, mascarar sabores, aumentar biodisponibilidade de fármacos e converter agente ativos que são insolúveis em água em redispersíveis (DEVI *et al.*, 2017; LENGYEL *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2022).

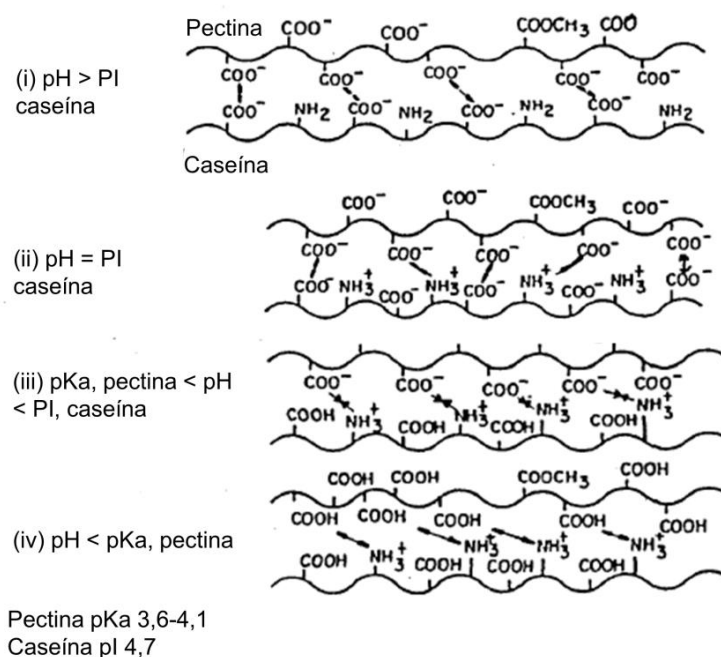
A coacervação é uma técnica muito utilizada para obtenção de microcápsulas devido à alta eficiência de encapsulação, baixo custo de produção e requerer equipamentos simples (YAN *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2020). Ela consiste na separação de fases líquidas em soluções coloidais devido a influências como: alteração de pH, de temperatura ou adição de um não solvente (LENGYEL *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2020). A formação dos coacervados também é afetada

pela velocidade de agitação, tipo de material de parede e do núcleo e a proporção entre esses materiais (DEVI *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2022). Essa técnica pode ser simples, sendo constituída por um único polímero ou complexa, sendo constituída por dois polímeros polieletrólitos com cargas opostas que interagem por interações eletrostáticas atraentes (LENGYEL *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2022).

Os coacervatos são feitos principalmente de proteínas e polissacarídeos (YAN *et al.*, 2022), sendo o pH a alteração comumente escolhida. As proteínas, que possuem grupamentos amina, tem carga elétrica positiva abaixo do ponto isoelétrico, e negativa acima do ponto isoelétrico (MUHOZA *et al.*, 2020). Os polissacarídeos, com exceção da quitosana, possuem carga elétrica negativa em pH superior ao pKa (MUHOZA *et al.*, 2020). Dessa forma, ajustando-se o pH de misturas de proteínas e polissacarídeos, favorece-se a atração eletrostática entre esses polímeros, e conseqüente formação de sistemas multiparticulados organizados, podendo ser denominados de microcápsulas (complexos poliméricos) (DEVI *et al.*, 2017; MUHOZA *et al.*, 2020).

Nesse trabalho, obteve-se microcápsulas de caseína (proteína) e pectina (polissacarídeo) para tornar a quercetina redispersível em solução aquosa. A caseína é uma proteína do leite, que possui grupamentos amina, com peso molecular médio de 19-25 KDa (MUHOZA *et al.*, 2020). A pectina é formada majoritariamente pelo ácido  $\alpha$ -1,4-D-poligalacturônico parcialmente metilado (YANG *et al.*, 2020). Em meios básicos (pH 8,0), ambos os polímeros apresentam carga negativa (Figura 1.13i) e interagem com repulsão de cargas. O pH sendo reduzido para 4,7 (ponto isoelétrico da caseína), ocorre a protonação da amina ( $-\text{NH}_3^+$ ) presente na caseína, o que promove atração e repulsão de cargas entre os polímeros (Figura 1.13ii). Quando o valor de pH se encontra entre o ponto isoelétrico da caseína e o pKa da pectina (3,6 a 4,7), ocorre atração de cargas entre os grupamentos amina da caseína (carga positiva) e os íons carboxilatos da pectina (carga negativa) (Figura 1.13iii). Se o valor de pH for menor que 3,6 o sistema volta a ser instável (Figura 1.13iv) (BARACAT, 2004; CAMILO, 2007).

**Figura 1.13** – Formação do conjugado caseína/pectina.



**Fonte:** Adaptado de Thakur *et al.* (1997).

### 1.3.5 MODELOS CINÉTICOS

A cinética de liberação do fármaco é estudada para se determinar a velocidade de liberação da forma farmacêutica e o padrão da liberação do fármaco que pode ser imediata ou modificada (ADEPU e RAMAKRISHNA, 2021; VISAN, POPESCU-PELIN e SOCOL, 2021). Para isso, utilizam-se modelos matemáticos, como os demonstrados abaixo.

#### 1.3.5.1 Ordem Zero

Nesse modelo, a liberação do fármaco é independente da concentração do mesmo e ocorre a uma taxa constante (COSTA e LOBO, 2001; RAMTEKE *et al.*, 2014). Esse modelo é representado pela Equação (4).

$$Q(t) = Q_0 + k_0 \cdot t \quad (4)$$

Sendo  $Q(t)$  a quantidade de fármaco liberada;  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco;  $k_0$  a constante de liberação de ordem zero; e  $t$  o tempo de liberação.

#### 1.3.5.2 Primeira Ordem

Nesse modelo, a liberação é um processo dependente da concentração de fármaco (COSTA e LOBO, 2001; RAMTEKE *et al.*, 2014). A Equação (5) explica a liberação por esse modelo.

$$\ln\left(\frac{Q_t}{Q_0}\right) = k_1 \cdot t \quad (5)$$

Sendo  $Q_t$  a quantidade de fármaco liberada;  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco;  $k_1$  a constante de liberação de primeira ordem; e  $t$  o tempo de liberação.

#### 1.3.5.3 Korsmeyer-Peppas

Esse é um modelo semi-empírico que descreve a liberação do fármaco em um sistema polimérico; porém, é aplicado apenas até 60% da quantidade de fármaco liberada (COSTA e LOBO, 2001; KORSMEYER *et al.*, 1983; RAMTEKE *et al.*, 2014). A Equação (6) é a de liberação de Korsmeyer-Peppas.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_{KP} \cdot t^n \quad (6)$$

Sendo  $Q_t/Q_\infty$  a fração de fármaco liberada;  $k_{KP}$  a constante de liberação de Korsmeyer-Peppas;  $t$  o tempo de liberação; e  $n$  o expoente que indica o mecanismo de liberação do fármaco (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1** – Expoente  $n$  da equação de Korsmeyer-Peppas e mecanismo de liberação do fármaco.

Expoente de liberação ( $n$ )			Mecanismo de liberação
Filme fino	Cilindro	Esfera	
$< 0,5$	$< 0,45$	$< 0,43$	Difusão <i>quasi</i> -Fickiana
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte Anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II
$n > 1,0$	$n > 0,89$	$n > 0,85$	Super caso II

**Fonte:** adaptado de Ritger e Peppas (1987).

O processo de difusão é modelado matematicamente pelas leis de Fick da difusão. A primeira lei de Fick afirma que a taxa de transferência de massa é proporcional ao gradiente de concentração (VESELY, 2008), sendo o coeficiente de difusão a constante de proporcionalidade (Equação 7).

$$J = -D \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (7)$$

Sendo  $J$  a transferência de massa;  $D$  o coeficiente de difusão;  $\Delta C$  a variação de concentração; e  $\Delta x$  a distância percorrida na transferência de massa.

Enquanto a primeira Lei de Fick assume que a fração liberada em determinado período de tempo é constante (estado estacionário), a segunda Lei de Fick prevê as mudanças no gradiente de concentração com o tempo (Equação 8) (COUTO *et al.*, 2014).

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \cdot \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (8)$$

Sendo  $\delta C/\delta t$  a transferência de massa;  $D$  o coeficiente de difusão;  $\delta^2 C$  a variação de concentração; e  $\delta x^2$  a distância percorrida na transferência de massa.

O mecanismo de difusão pode ser classificado de acordo com a taxa de difusão e de relaxamento da cadeia polimérica, que é o tempo necessário para a cadeia polimérica se movimentar molecularmente e entrar em equilíbrio com o solvente (BORRMANN, DANZER e SADOWSKI, 2021), em: difusão *quasi*-Fickiana, difusão Fickiana, transporte anômalo e transporte caso II (Tabela 1.1) (BORRMANN,

DANZER e SADOWSKI, 2021; FRISCH e STERN, 1983; KUMAR *et al.*, 2022).

- Difusão *quasi*-Fickiana: ocorre quando a taxa de difusão é muito menor do que a de relaxamento da cadeia polimérica.
- Difusão Fickiana: ocorre quando a taxa de difusão é menor do que a de relaxamento da cadeia polimérica.
- Transporte anômalo: ocorre quando a taxa de difusão é similar à de relaxamento da cadeia polimérica.
- Transporte caso II: ocorre quando a taxa de difusão é muito mais rápida do que a de relaxamento da cadeia polimérica.
- Super caso II: ocorre quando o solvente influencia o sistema de forma desproporcional ao coeficiente de difusão e ao relaxamento da cadeia polimérica, induzindo a plastificação do material polimérico.

#### 1.3.5.4 Hixon – Crowell

Esse modelo aborda o fato de que a superfície da formulação frequentemente muda com o tempo de dissolução/liberação (SIEPMANN e SIEPMANN, 2013b). A Equação (9) é a de liberação de Hixon – Crowell.

$$\sqrt[3]{Q_t} = \sqrt[3]{Q_0} - k \cdot t \quad (9)$$

Sendo  $Q(t)$  a quantidade de fármaco liberada;  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco;  $k$  a constante de liberação; e  $t$  o tempo de liberação.

#### 1.3.5.5 Higuchi

Esse modelo é baseado em diferentes hipóteses (RAMTEKE *et al.*, 2014; SIEPMANN e PEPPAS, 2011):

- a concentração inicial do fármaco na matriz é maior do que a

solubilidade do fármaco;

- a difusão do fármaco ocorre apenas em uma dimensão;
- as partículas do fármaco são menores que a espessura da matriz;
- o inchaço da matriz é desprezível;
- a difusividade do fármaco é constante;
- o meio de dissolução não satura.

A Equação (10) é a de liberação de Higuchi.

$$Q_t = k_H \sqrt[2]{t} \quad (10)$$

Sendo  $Q(t)$  a quantidade de fármaco liberada;  $k_H$  a constante de liberação; e  $t$  o tempo de liberação.

#### 1.3.5.6 Weibull

O modelo Weibull pode ser aplicado para a maioria dos tipos de curvas de dissolução/liberação (COSTA e LOBO, 2001; RAMTEKE *et al.*, 2014). A Equação (11) de Weibull é expressa por:

$$Q(t) = 1 - e^{-\frac{(t-T_i)^\beta}{\alpha}} \quad (11)$$

Sendo  $Q(t)$  a fração cumulativa de fármaco;  $t$  o tempo de liberação;  $T_i$  = é o tempo de atraso da dissolução do fármaco;  $\alpha$  = parâmetro de escala que define a escala de tempo do processo, que indica o intervalo de tempo no qual ocorrem 63,2% das falhas (ANIL KUMAR *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010);  $\beta$  = parâmetro de forma da curva de dissolução, sendo que  $\beta < 1$  indica uma curva parabólica,  $\beta = 1$  indica uma curva exponencial e  $\beta > 1$  indica uma curva em forma de S (COSTA e LOBO, 2001; ZHANG *et al.*, 2010).

### 1.3.5.7 Logistic

Esse modelo foi desenvolvido da forma mais simples possível para evitar parâmetros não identificáveis (POMMIER *et al.*, 2007). A Equação (12) de Logistic é expressa por (ZHANG *et al.*, 2010):

$$Q(t) = \frac{e^{\alpha+\beta \cdot \log(t)}}{1+e^{\alpha+\beta \cdot \log(t)}} \quad (12)$$

Sendo Q(t) a fração cumulativa de fármaco; t o tempo de liberação;  $\alpha$  = parâmetro de escala que define a escala de tempo do processo, que indica o intervalo de tempo no qual ocorrem 63,2% das falhas (ZHANG *et al.*, 2010);  $\beta$  = parâmetro de forma da curva de dissolução, sendo que  $\beta < 1$  indica uma curva parabólica,  $\beta = 1$  indica uma curva exponencial e  $\beta > 1$  indica uma curva em forma de S (ZHANG *et al.*, 2010).

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, 2010.
- ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. **Molecules**, v. 26, p. 1–45, 2021.
- ADU, S. A. *et al.* Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1–21, 2020.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505–518, 2009.
- ANIL KUMAR, C. R. *et al.* Investigation into the failure of XLPE cables due to electrical treeing: a physico chemical approach. **Polymer Testing**, v. 22, p. 313–318, 2003.
- ASATI, S.; JAIN, S.; CHOUBEY, A. Bioadhesive or Mucoadhesive Drug Delivery System: A Potential Alternative to Conventional Therapy. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4- A, p. 858–867, 2019.

AZIZ, Z. A. A. *et al.* The Potential Use of Biosurfactants in Cosmetics and Dermatological Products. **Biosurfactants for a Sustainable Future: Production and Applications in the Environment and Biomedicine**, p. 397–421, 2021.

BADSHAH, S. L. *et al.* Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 1–29, 2021.

BARACAT, M. M. **Preparação e avaliação de microcápsulas à base de pectina**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2004.

BASF. **Kollicoat® IR**. [s.l.: s.n.].

BELLO-MORALES, R.; ANDREU, S.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A. The role of herpes simplex virus type 1 infection in demyelination of the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–19, 2020.

BEN, Z. Y.; SAMSUDIN, H.; YHAYA, M. F. Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch based films. **European Polymer Journal**, v. 175, 2022.

BHARALI, P. *et al.* Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: A novel chemotaxis and antibacterial agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 502–509, 2013.

BOLLA, P. K. *et al.* A review on pH and temperature responsive gels and other less explored drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 416–435, 2018.

BORRMANN, D.; DANZER, A.; SADOWSKI, G. Generalized Diffusion-Relaxation Model for Solvent Sorption in Polymers. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 60, p. 15766–15781, 2021.

CAMILO, K. F. B. **Complexo pectina / caseína: aspectos básicos e aplicados**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

CASTILLO, D. E.; NANDA, S.; KERI, J. E. *Propionibacterium (Cutibacterium) acnes* Bacteriophage Therapy in Acne: Current Evidence and Future Perspectives. **Dermatology and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 19–31, 2019.

CHONG, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 137, p. 1–12, 2017.

CHUDZIK, A.; MIGDAŁ, P.; PAŚCIAK, M. Different *Cutibacterium acnes* Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1–13, 2022.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

COSTA, S. G. V. A. O. *et al.* Wettability of aqueous rhamnolipids solutions produced

by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 12, p. 125–130, 2009.

COUTO, A. et al. Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, v. 177, n. 1, p. 74–83, 2014.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84–89, 2016.

DEMIR, S. et al. Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV. **Antiviral Therapy**, v. 25, n. 7, p. 353–363, 2020.

DESSINIOTI, C.; DRENO, B. Acne treatments: future trajectories. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 45, n. 8, p. 955–961, 2020.

DEVI, N. et al. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.

DI PETRILLO, A. et al. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 266–278, 2021.

DRÉNO, B. et al. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, p. 5–14, 2018.

DRÉNO, B. et al. The Skin Microbiome: A New Actor in Inflammatory Acne. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 21, p. 18–24, 2020.

DUARTE, L. F. et al. Crosstalk Between Epithelial Cells, Neurons and Immune Mediators in HSV-1 Skin Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–16, 2021.

FERREIRA, J. DE F.; VIEIRA, E. A.; NITSCHKE, M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. **Food Research International**, v. 116, p. 737–744, 2019.

FOURNIÈRE, M. et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–31, 2020.

FRISCH, H. L.; STERN, S. A. Diffusion of small molecules in polymers. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 11, n. 1, p. 123–187, 1983.

GARCÍA, M. C. et al. Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 75–86, 2017.

GUO, R. et al. Bioadhesive film formed from a novel organic-inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and**

**Biopharmaceutics**, v. 79, n. 3, p. 574–583, 2011.

GUPTA, A. *et al.* Formulation and evaluation of a topical niosomal gel containing a combination of benzoyl peroxide and tretinoin for antiacne activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 171–182, 2015.

HAAS, J.; LEHR, C. M. Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 2, n. 3, p. 287–298, 2002.

HAJFARAJOLLAH, H. *et al.* Rhamnolipid biosurfactant adsorption on a plasma-treated polypropylene surface to induce antimicrobial and antiadhesive properties. **RSC Advances**, v. 5, p. 33089–33097, 2015.

HELD, K.; DERFUSS, T. Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia-current overview. **Journal of neurovirology**, v. 17, n. 6, p. 518–527, 2011.

HOSSEINI, A. *et al.* Quercetin and metabolic syndrome: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 10, p. 5352–5364, 2021.

HUANG, S. *et al.* A comprehensive review of electrospray technique for membrane development: Current status, challenges, and opportunities. **Journal of Membrane Science**, v. 646, p. 120248, 2022.

IBRAHIM, H. M.; KLINGNER, A. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. **Polymer Testing**, v. 90, p. 106647, 2020.

INÈS, M.; DHOUHA, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 59–69, 2015.

JADHAV, J. *et al.* Fermentative production of rhamnolipid and purification by adsorption chromatography. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 234–241, 2018.

KASKATEPE, B.; YILDIZ, S. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas species*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1–16, 2016.

KATHE, K.; KATHPALIA, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 487–497, 2017.

KAYIRAN, M. A. *et al.* Antibiotic Resistance in Acne: Mechanisms, Complications and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 813–819, 2020.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

KOUJAH, L.; SURYAWANSHI, R. K.; SHUKLA, D. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 405–419, 2019.

KUMAR, G. *et al.* Antibacterial Screening of Selected Indian Medicinal Plants Against Acne Inducing Bacteria. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 34–47, 2007.

KUMAR, K. *et al.* Bioadhesive polymers: Novel tool for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 274–283, 2014.

KUMAR, N. *et al.* Transport mechanism and diffusion kinetics of kerosene through polynorborene rubber/natural rubber blends. **Polymer Bulletin**, v. 79, n. 7, p. 5305–5325, 2022.

KURAKULA, M.; RAO, G. S. N. K. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, p. 102046, 2020.

LEE, S. *et al.* The anti-HSV-1 effect of quercetin is dependent on the suppression of TLR-3 in Raw 264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 40, n. 5, p. 623–630, 2017.

LENGYEL, M. *et al.* Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 20, p. 1–31, 2019.

LI, Y. *et al.* Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2016.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: Glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 4, p. 255–261, 2009.

LUZI, F. *et al.* Gallic acid and quercetin as intelligent and active ingredients in poly(vinyl alcohol) films for food packaging. **Polymers**, v. 11, p. 1–20, 2019.

MAGAR, R. T.; SOHNG, J. K. A Review on Structure, Modifications and Structure-Activity Relation of Quercetin and Its Derivatives. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 11–20, 2020.

MARTINS, L. M. *et al.* Poly(1-vinylpyrrolidone-co-vinyl-acetate)-based electrospun dissolvable nanofibrous film for quercetin administration. **Process Biochemistry**, v. 122, p. 8–15, 2022.

MATERSKA, M. Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, n. 4, p. 407–413, 2008.

MCLAUGHLIN, J. *et al.* *Propionibacterium acnes* and *Acne vulgaris*: New insights from the integration of population genetic, multi-omic, biochemical and host-microbe studies. **Microorganisms**, v. 7, p. 1–29, 2019.

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and**

**Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.

MORICI, E.; ARRIGO, R.; DINTCHEVA, N. T. Quercetin as natural stabilizing agent for bio-polymer. **AIP Conference Proceedings**, v. 1599, p. 314–317, 2014.

MUHOZA, B. *et al.* Microencapsulation of essential oils by complex coacervation method: preparation, thermal stability, release properties and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 1363–1382, 2020.

NAIR, A. B. *et al.* *In vitro* techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, p. 10–21, 2013.

OSHIRO JUNIOR, J. A. *et al.* Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

PANDIT, A. P.; OMASE, S. B.; MUTE, V. M. A chitosan film containing quercetin-loaded transfersomes for treatment of secondary osteoporosis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, p. 1495–1506, 2020.

PERCIVAL, S. L. *et al.* Mode of action of poloxamer-based surfactants in wound care and efficacy on biofilms. **International Wound Journal**, v. 15, n. 5, p. 749–755, 2018.

PEREIRA, G. G. *et al.* Polymeric films loaded with vitamin e and *Aloe vera* for topical application in the treatment of burn wounds. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

POMMIER, S. *et al.* A Logistic Model for the Prediction of the Influence of Water on the Solid Waste Methanization in Landfill. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 3, p. 473–482, 2007.

PORTER, S. C.; FELTON, L. A. Techniques to assess film coatings and evaluate film-coated products. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 2, p. 128–142, 2010.

RAJAGOPAL, M.; WALKER, S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. In: BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R. (Eds.). **Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-Positive Bacteria**. Gewerbestrasse, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. v. 404p. 1–44.

RAJČÁNI, J. *et al.* The potential of currently unavailable herpes virus vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 3, p. 239–248, 2018.

RAMTEKE, K. H. *et al.* Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 388–396, 2014.

RICCIO, B. V. F. *et al.* Exploiting Polymeric Films as a Multipurpose Drug Delivery System: a Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 7, p. 1–23, 2022.

- RIKALOVIĆ, M. G.; VRVIĆ, M. M.; KARADŽIĆ, I. M. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* – from discovery to application in contemporary technology. **Journal of Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 3, p. 279–304, 2015.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37–42, 1987.
- RUCHAWAPOL, C. *et al.* Natural products and their derivatives against human herpesvirus infection. **Molecules**, v. 26, p. 1–36, 2021.
- SADOWSKI, L. A. *et al.* Current drugs to treat infections with herpes simplex viruses-1 and -2. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2021.
- SAHA, N. *et al.* Polymer based bioadhesive biomaterials for medical application—a perspective of redefining healthcare system management. **Polymers**, v. 12, p. 1–19, 2020.
- SANCHEZ-REXACH, E. *et al.* Novel biodegradable and non-fouling systems for controlled-release based on poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Quercetin blends and biomimetic bacterial S-layer coatings. **RSC Advances**, v. 9, p. 24154–24163, 2019.
- SAND, L. VAN DE *et al.* Antiviral active compounds derived from natural sources against herpes simplex viruses. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1–18, 2021.
- SCIARRA, J. J.; GIDWANI, R. N. Evaluation of Selected Physical Constants of Polymeric Films and Proposed Kinetics of Drug Release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 754–761, 1972.
- SHAO, B. *et al.* Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. **Microbiological Research**, v. 200, p. 33–44, 2017.
- SHARMA, A. *et al.* Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. **Pharmaceutical patent analyst**, v. 7, n. 1, p. 15–32, 2018.
- SHARMA, S. *et al.* Novel Strategies in the Treatment of Acne: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 12, n. 2, p. 123–128, 2022.
- SICURELLA, M. *et al.* Natural Polyphenol-Containing Gels against HSV-1 Infection: A Comparative Study. **Nanomaterials**, v. 12, n. 2, 2022.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6–12, 2011.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Stability of aqueous polymeric controlled release film coatings. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 2, p. 437–445, 2013a.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution.

**International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 12–24, 2013b.

SILVA-MARES, D.; TORRES-LÓPEZ, E.; RIVAS-GALINDO, V. M. Antiherpetic plants: A review of active extracts, isolated compounds, and bioassays. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 4, p. 557–566, 2016.

SKALSKY, B.; PETEREIT, H.-U. Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms. In: FELTON, L. A. (Ed.). **Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms**. Fourth ed. Albuquerque, NM, USA: CRC Press, 2017. p. 207–245.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718–725, 2005.

SUHAG, R. *et al.* Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. **Food Research International**, v. 136, p. 109582, 2020.

SZCZUBIAŁKA, K.; PYRC, K.; NOWAKOWSKA, M. In search for effective and definitive treatment of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infections. **RSC Advances**, v. 6, p. 1058–1075, 2016.

THAKKAR, R. *et al.* Systematic screening of pharmaceutical polymers for hot melt extrusion processing: a comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 576, p. 1–18, 2020.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and Uses of Pectin - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47–73, 1997.

THAKUR, P. *et al.* Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2021.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389–397, 2017.

VESELY, D. Diffusion of liquids in polymers. **International Materials Reviews**, v. 53, n. 5, p. 299–315, 2008.

VINHAL, G. L. R. R. DE B. *et al.* Gelatine/PVA copolymer film incorporated with quercetin as a prototype to active antioxidant packaging. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 10, p. 3924–3932, 2021.

VISAN, A. I.; POPESCU-PELIN, G.; SOCOL, G. Degradation behavior of polymers used as coating materials for drug delivery—a basic review. **Polymers**, v. 13, p. 1–36, 2021.

WANG, W. *et al.* The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery

systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 21–38, 2016.

XU, H.; LI, H. Acne, the Skin Microbiome, and Antibiotic Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 20, n. 3, p. 335–344, 2019.

YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 9, p. 1185–1199, 2003.

YAN, C. *et al.* Microencapsulation for Food Applications: A Review. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, p. 5497–5512, 2022.

YANG, F. *et al.* Effects of Quercetin and Organically Modified Montmorillonite on the Properties of Poly(butylene adipate-co-terephthalate)/Thermoplastic Starch Active Packaging Films. **ACS Omega**, v. 8, p. 663–672, 2023.

YANG, M. *et al.* Microencapsulation Delivery System in Food Industry - Challenge and the Way Forward. **Advances in Polymer Technology**, v. 2020, p. 1–14, 2020.

ZAKARYAN, H. *et al.* Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of Virology**, v. 162, n. 9, p. 2539–2551, 2017.

ZHANG, N. *et al.* Antimicrobial Susceptibility, Biotypes and Phylotypes of Clinical *Cutibacterium (Formerly Propionibacterium) acnes* Strains Isolated from Acne Patients: An Observational Study. **Dermatology and Therapy**, v. 9, n. 4, p. 735–746, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

ZHU, S.; VIEJO-BORBOLLA, A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2670–2702, 2021.

## Capítulo 2

---

### **DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS CONTENDO QUERCETINA PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TÓPICA ANTI-HERPÉTICA**

---

## RESUMO

O herpes é uma doença sem cura, que atinge uma grande parcela da população mundial, e pode causar feridas, dor, queimação, coceira, febre e dor de cabeça nas pessoas infectadas. Não existem vacinas eficazes contra essa infecção e os tratamentos convencionais utilizados, como o fármaco aciclovir, selecionaram cepas resistentes, dificultando o tratamento da doença. Compostos isolados de produtos naturais, tem demonstrado atividade antiviral, como a quercetina, que tem grande potencial para inibir o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Um desafio desse composto é a sua baixa biodisponibilidade, que pode ser aumentada com a utilização da tecnologia de microencapsulação e posterior incorporação na dispersão precursora do filme bioadesivo, que tem como vantagens a facilidade de utilização, flexibilidade de dosagem, menor potencial de irritação e se mantém aderido ao local de ação, diminuindo a frequência de reaplicação do medicamento em comparação a outras formas farmacêuticas. Os objetivos do trabalho foram desenvolver filmes poliméricos bioadesivos contendo quercetina para serem utilizados como produtos anti-herpéticos e avaliar a qualidade, eficácia e segurança da forma farmacêutica. A quercetina tem grande potencial para obtenção de um bioproduto atóxico ( $CC_{50}$  28,90  $\mu\text{g/mL}$ ) com atividade anti-herpética ( $IC_{50}$  1,80  $\mu\text{g/mL}$  para HSV-1-KOS e 1,08  $\mu\text{g/mL}$  para HSV-1-AR). Foram desenvolvidas 15 formulações e com base nas propriedades mecânicas (força de bioadesão e resistência à dobra), liberação do agente ativo, variação de massa e dosagem da quercetina, a formulação n° 8 foi escolhida e caracterizada por MEV, DSC, FTIR e pelas propriedades físico-químicas, e realizado o estudo de estabilidade. Essas formulações apresentaram aspecto homogêneo; propriedades mecânicas elásticas, pH semelhante ao da pele humana, bioadesividade, liberaram o agente ativo e demonstraram serem estáveis físico-quimicamente. Realizou-se os estudos de citotoxicidade e atividade antiviral *in vivo*, que mostraram que o filme polimérico contendo quercetina é seguro no tratamento dos processos inflamatórios causados pelo vírus HSV-1.

**Palavras-chave:** flavonoide, planejamento fatorial, propriedades mecânicas, vírus.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 3,7 bilhões de pessoas com menos de 50 anos, o equivalente a 67% da população mundial, tenham se infectado pelo vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), em 2016 (OMS, 2020).

O HSV-1 tem um ciclo replicativo curto (horas) e contém grande genoma de DNA de fita dupla linear protegido por um capsídeo icosaédrico cercado por uma camada proteica denominada tegumento e envolto em um envelope contendo glicoproteínas virais (WHITLEY, 1996; ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021). Esse vírus possui capacidade de replicação em uma ampla variedade de tecidos hospedeiros (WHITLEY, 1996).

O HSV infecta as células epiteliais da mucosa ou da pele e sua disseminação ocorre de célula a célula, causando infecção no local de contaminação, inflamação e dano tecidual (ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021). A infecção por HSV-1 é caracterizada pela formação de vesículas na pele ou mucosa e sua transmissão ocorre devido ao contato direto no local da lesão, as pessoas infectadas podem ser assintomáticas ou apresentar, além das feridas, dor, queimação, coceira, febre e dor de cabeça (DEMIR *et al.*, 2020).

Este vírus estabelece latência nas células neurais, principalmente do sistema nervoso periférico e é frequentemente reativado com ou sem manifestações clínicas (BUXBAUM *et al.*, 2003; ZHU e VIEJO-BORBOLLA, 2021). Na sua forma latente, o HSV-1 não pode ser detectado rotineiramente, a menos que sejam utilizadas sondas moleculares específicas (WHITLEY, 1996).

Quando o HSV latente é reativado, o vírus percorre o nervo e eventualmente se localiza na pele, onde causa lise das células epidérmicas levando a lesões na pele ou excreção de vírus na ausência de lesões (MILLER *et al.*, 2002).

A infecção herpética não tem cura, nem vacinas, sendo o aciclovir o fármaco de referência para tratamento (RECHENCHOSKI *et al.*, 2017). Atualmente, existem cepas resistentes a este ativo, dificultando o controle da doença (DEMIR *et al.*, 2020).

Uma alternativa aos tratamentos convencionais é a utilização de produtos naturais que possuem compostos com atividade antiviral, como a quercetina,

a qual pode ser utilizada no desenvolvimento de formulações eficazes, seguras e de baixo custo.

A quercetina é um flavonoide presente em nossa alimentação diária que possui diversas atividades biológicas, sendo extensivamente estudada como um antiviral (ZAKARYAN *et al.*, 2017). Este composto é eficaz na inibição de vários vírus como influenza A, B, dengue, hepatite C, rinovírus, Zika, Ebola, poliovírus tipo 1 e SARS-CoV-2 (BADSHAH *et al.*, 2021; ZAKARYAN *et al.*, 2017). A ação anti-HSV-1 já foi demonstrada *in vitro*, sugerindo inibição na expressão viral nas etapas iniciais como adsorção e penetração (HUNG *et al.*, 2015), sendo um produto promissor no tratamento herpético.

No entanto, a quercetina possui baixa solubilidade em água, o que reduz sua absorção percutânea no corpo, sendo necessário buscar alternativas para aumentar sua biodisponibilidade. Em um trabalho anterior, nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a microencapsulação da quercetina por coacervação complexa, utilizando o conjugado polimérico de caseína/pectina, melhorou a retenção cutânea da quercetina, aumentando o efeito antioxidante e anti-inflamatório (VALE *et al.*, 2021).

Produtos de uso tópico costumam ser líquidos ou semissólidos. No entanto, nos últimos anos, observou-se o desenvolvimento de filmes poliméricos bioadesivos para a administração de fármacos (KATHE e KATHPALIA, 2017). Esses filmes devem ser baseados em polímero atóxico e biocompatível com o fármaco que será incorporado, também devem ser flexíveis, elásticos e resistentes a quebras devido ao estresse no local da aplicação (GARCÍA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2013).

Eles apresentam como vantagens grande área de aplicação, absorção de exsudatos, maior flexibilidade de dosagem e facilidade de uso, menor potencial de irritação, melhor aparência cosmética, permitem a interrupção imediata do tratamento por algum efeito colateral, maior simplicidade de fabricação e não precisam ser reaplicados como cremes, pomadas, loções e sprays (GARCÍA *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2011; KATHE e KATHPALIA, 2017; OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014). A menor necessidade de reaplicação ocorre devido a bioadesão, que é a capacidade do material em aderir ao tecido biológico (SAHA *et al.*, 2020) promovendo a liberação do fármaco no local de tratamento.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivos desenvolver filmes poliméricos bioadesivos contendo quercetina para serem utilizados como

produto anti-herpético e avaliar a qualidade, eficácia e segurança da forma farmacêutica.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 MATERIAIS

#### 2.2.1.1 Reagentes

A quercetina (95% de pureza) foi obtida da Sanrisil (Itaquaquecetuba, São Paulo, Brasil); dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio, glicerol e cloreto de sódio, Anidrol (Diadema, São Paulo, Brasil); Kollicoat® IR, polivinilpirrolidona (PVP) e poloxamer 407 (P407), BASF® (São Paulo, São Paulo, Brasil); etanol absoluto, Tween 20, cloreto de cálcio anidro, Synth (Diadema, São Paulo, Brasil); ácido cítrico e nitrato de magnésio hexahidratado, Dinamica (Indaiatuba, São Paulo, Brasil); cloreto de alumínio, BIOTEC® (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil); Aciclovir 50 mg/g, CIMED (São Paulo, São Paulo, Brasil); *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), brometo de dimetil tiazol-difeniltetrazólio (MTT), Hematoxilina e Eosina, Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA); papel indicador de pH, Merck (Darmstadt, Alemanha); Caseína, Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro); Pectina, CP Kelco (Limeira, São Paulo, Brasil); ketamina 100 mg/mL, Dechra (Londrina, Paraná, Brasil).

#### 2.2.1.2 Equipamentos

Espectrofotômetro de microplacas ELx800, Biotek (Winooski, Vermont, EUA); espectrofotômetro Evolution 60, Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA); centrífuga Baby® I 206-BL, Fanem (Guarulhos - São Paulo -

Brasil); pHmetro DM-22, Digimed (São Paulo, São Paulo, Brasil); agitador mecânico 713D, Fisatom (São Paulo, São Paulo, Brasil); Ultra turrax T18 Basic, IKA (Staufen, Alemanha); ultrassom Q3.8/40, Ultronique (Indaiatuba, São Paulo, Brasil); estufa 171, Fabbe-primar (São Paulo, São Paulo, Brasil); estufa FD023UL, Binder World (Tuttlingen, Alemanha); estufa TE-393/2, Tecnal (Piracicaba, São Paulo, Brasil); estufa Incubadora de CO<sub>2</sub> MCO-17 AC, Sanyo (Osaka, Osaka, Japão); analisador de textura TA-XT2plus, Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra); balança analítica AG204, Mettler Toledo (Barueri, São Paulo, Brasil); balança semi-analítica AD330, Marte (São Paulo, São Paulo, Brasil); agitador magnético de 15 pontos MAG-MULTI, Marte (São Paulo, São Paulo, Brasil); colorímetro CR-400, Konica Minolta (Chiyoda, Tóquio, Japão); Paquímetro Universal SOMET TCHECO; Sputter Coater SDC 050, BAL-TEC (Balzers, Liechtenstein); Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200, FEI-PHILIPS (Hillsboro, Oregon, United States); Calorímetro de Varredura Diferencial DSC-60, SHIMADZU (Kyoto, Kyoto, Japan); espectrômetro FT-IR Vertex 70, Bruker (Atibaia, São Paulo, Brasil); e micrótopo semiautomático CUT 6062, SLEE® (Nieder-Olm, Alemanha).

## 2.2.2 ANÁLISE ANTI-HERPÉTICA E CITOTÓXICA DO COMPOSTO

A quercetina foi diluída em 2% de DMSO e 98% de meio de cultura celular DMEM para obtenção da solução estoque. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 2.2.2.1 Células e Vírus

Para os ensaios antivirais foram utilizadas células Vero (epitélio de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops* - ATCC CCL-81) cultivadas com meio DMEM 1x e 10% de Soro Fetal Bovino e tratadas com 2% de fungizona, penicilina/estreptomicina e glutamina. Foi utilizado o Herpes Simplex Virus sorotipo 1

cepa KOS (HSV-1-KOS), sensível ao aciclovir, e cepa AR (HSV-1-AR), resistente ao aciclovir, pertencentes ao Laboratório de Virologia da UEL. O estoque viral foi obtido por meio da inoculação dos vírus em culturas de células Vero e mantidos em ambiente de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até a observação de efeito citopático. Após isso, foram distribuídos em alíquotas e congeladas a -20 °C.

#### 2.2.2.2 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade, aplicado para verificar quais as concentrações da quercetina são seguras para uso nas células sem causar danos, foi realizado pelo método de MTT (brometo de dimetil tiazol-difeniltetrazólio). Primeiramente, células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços até obter 80 a 100% de confluência. Após isso, diferentes concentrações do composto (2000 a 15,63 µg/mL) foram adicionadas às células e incubadas em ambiente de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm em espectrofotômetro de microplacas; foi realizado a leitura em 570 nm (comprimento de onda que o corante absorve radiação) e em 690 nm (absorvância de fundo, ela é realizada para reduzir erros analíticos). Posteriormente, com o uso de regressão linear, foi calculada a concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) do composto.

#### 2.2.2.3 Titulação Viral

A titulação viral, na qual descobre-se o menor título no qual o vírus causa efeito citopático na célula, foi realizada pelo método de MTT. Inicialmente, foi realizado o cultivo de células Vero em microplacas de 96 poços até atingir 80 a 100% de confluência. Após, foram inoculados diversos títulos ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  µg/mL) de HSV-1-KOS ou AR às células, as quais, posteriormente, foram incubadas em ambiente de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690

nm em espectrofotômetro de microplacas.

#### 2.2.2.4 Ensaios Antivirais

##### 2.2.2.4.1 Ensaio simultâneo

Os ensaios antivirais foram realizados pelo método de MTT e as células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços até atingir 80 a 100% de confluência, sob ambiente de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Posteriormente, diluições da quercetina (100 a 0,0488 µg/mL) foram inoculadas simultaneamente ao vírus (HSV-1-KOS e HSV-1-AR, nas diluições de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-3</sup> µg/mL, respectivamente) e às células Vero, e a microplaca foi incubada em estufa de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm em espectrofotômetro de microplacas. Por meio de regressão linear foi calculado a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) e o índice de seletividade (IS) da quercetina.

##### 2.2.2.4.2 Testes de identificação do mecanismo de ação

- Inibição da Adsorção: Após as células Vero atingirem 80 a 100% de confluência na microplaca, foram colocadas em ambiente de 4 °C por 1 h. Posteriormente, diluições da quercetina (25 a 1,5 µg/mL) simultaneamente com os vírus (HSV-1-KOS e HSV-1-AR, nas diluições de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-3</sup> µg/mL, respectivamente) foram inoculados às células e recolocadas nas mesmas condições citadas. Após o período de 1 h, foi feita uma lavagem e adicionado 100 µL de meio DMEM e colocadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 96 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura

colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm em espectrofotômetro de microplacas.

- Virucida: Diluições da quercetina (25 a 1,5 µg/mL) simultaneamente com os vírus (HSV-1-KOS e HSV-1-AR, nas diluições de  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  µg/mL, respectivamente) foram colocados em banho maria, numa temperatura de 37 °C, por 1 h. Após esse período, foram diluídos (1:10) e inoculados às células, as quais foram posteriormente incubadas em estufa de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 96 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm em espectrofotômetro de microplacas.

### 2.2.3 OBTENÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

As microcápsulas foram obtidas pelo método de coacervação complexa. Para isso, adicionou-se 100 mL de água ultrapura à 12,5 g de caseína e 150 mL de água ultrapura à 12,5 g de pectina; posteriormente, elevou-se o pH de ambas as dispersões aquosas para  $8,0 \pm 0,1$ , gotejando-se uma solução de hidróxido de sódio 4 mol/L, sob agitação constante (50 rpm) utilizando-se um agitador mecânico. Em paralelo, dispersão aquosa (50 mL) de quercetina (5 g) foi preparada com auxílio do ultra turrax (1 min), seguido de ultrassom por 3 min. Em seguida, as três dispersões foram misturadas a 50 rpm e o pH foi reduzido de forma lenta e gradual para  $3,7 \pm 0,1$  pela adição de ácido cítrico 1,0 mol/L (BARACAT *et al.*, 2012).

Para confirmar a encapsulação foi realizado a análise de eficiência de encapsulação (EE). Para isso, determinada quantidade de microcápsulas que continham quercetina foram adicionadas a 10 mL de etanol absoluto, agitadas manualmente e centrifugadas à 2400 rpm por 10 minutos. Foram realizadas 3 extrações sequenciais e o teor de quercetina no sobrenadante foi quantificado pela técnica de complexação com cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 2% em uma reação 1:1 (amostra:AlCl<sub>3</sub>) incubada durante 1 h a temperatura ambiente. O complexo foi analisado em comprimento de onda de 420 nm com espectrômetro UV-vis. O branco foi constituído de etanol absoluto e AlCl<sub>3</sub> 2%, e as análises foram realizadas em

triplicata (JEMLI *et al.*, 2016). A EE foi calculada pela Equação (1).

$$EE = \frac{\text{teor de quercetina na formulação} - \text{teor de quercetina no sobrenadante}}{\text{teor de quercetina na formulação}} \times 100 \quad (1)$$

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) do Centro de Pesquisa e Pós-graduação (CEPPOS) localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UEL.

#### 2.2.4 OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS

As dispersões poliméricas foram obtidas à temperatura ambiente. Para isso, realizou-se um planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken com três pontos centrais (MYERS, MONTGOMERY e ANDERSON-COOK, 2009), totalizando 15 experimentos (dispersões), que foram executados aleatoriamente. Utilizou-se Kollicoat® IR (3%, m/V) como matriz polimérica, glicerol (G) como plastificante, polivinilpirrolidona (PVP) (6%, m/m) como adesivo, poloxamer 407 (P407) como surfactante e microcápsulas de caseína/pectina contendo quercetina (QC) que auxiliam na dispersão do princípio ativo na formulação.

As variáveis independentes foram as concentrações de G, P407 e QC, que tiveram concentrações variadas (Tabela 2.1), e as variáveis dependentes (respostas do planejamento) foram as medidas de resistência à dobra (RD), força de bioadesão (FB), variação de massa (VM), teor de quercetina (TQ) e teste de liberação (L).

As dispersões aquosas iniciaram-se com adição do glicerol e do PVP à água ultrapura, sob agitação constante (500 rpm) em agitador mecânico por 30 min. Em seguida, o Kollicoat® IR foi adicionado lentamente e a agitação de 500 rpm foi mantida por 30 min. Posteriormente, o P407 e as microcápsulas contendo QC foram adicionadas à dispersão, e a agitação (500 rpm) foi mantida por 6 h.

**Tabela 2.1** – Matriz do planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken com fatores codificados e seus níveis para a obtenção das 15 dispersões poliméricas (F1 a F15).

Exp.	QC (%, m/m)	G (%, m/m)	P407 (%, m/m)
F1	-1(0,21)	-1(1,0)	0(1,5)
F2	+1(0,41)	-1(1,0)	0(1,5)
F3	-1(0,21)	+1(2,0)	0(1,5)
F4	+1(0,41)	+1(2,0)	0(1,5)
F5	-1(0,21)	0(1,5)	-1(0,5)
F6	+1(0,41)	0(1,5)	-1(0,5)
F7	-1(0,21)	0(1,5)	+1(2,5)
F8	+1(0,41)	0(1,5)	+1(2,5)
F9	0(0,31)	-1(1,0)	-1(0,5)
F10	0(0,31)	+1(2,0)	-1(0,5)
F11	0(0,31)	-1(1,0)	+1(2,5)
F12	0(0,31)	+1(2,0)	+1(2,5)
F13	0(0,31)	0(1,5)	0(1,5)
F14	0(0,31)	0(1,5)	0(1,5)
F15	0(0,31)	0(1,5)	0(1,5)

Exp. = experimento; QC = quercetina; G = glicerol; P407 = poloxamer 407.

Fonte: o próprio autor.

Após esse período, as dispersões foram espalhadas em placas de policarbonato com área total de 28,27 cm<sup>2</sup> (60 mm de diâmetro), deixadas em repouso durante 1 h, a temperatura ambiente, para remoção de bolhas. Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar (171, Fabbe-primar), mantidas a temperatura de 43 ± 2 °C e umidade relativa de 40 ± 2% por 24 h. Após avaliação visual, os filmes livres foram cortados em fragmentos circulares de 16 mm de diâmetro (2,01 cm<sup>2</sup>) com o auxílio de vazador de aço inoxidável, e mantidos, até o momento do uso, em dessecador a temperatura ambiente, e umidade relativa de 53 ± 2% obtida com solução saturada de nitrato de magnésio hexahidratado (adaptado de COUTO *et al.*, 2017).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 2.2.5 ASPECTO VISUAL

Analisou-se as características macroscópicas das formulações a olho nu e os filmes selecionados foram aqueles que apresentaram aspecto homogêneo, cor uniforme e que não apresentaram partículas insolúveis, sinais de bolhas e quebras ou áreas frágeis. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 2.2.6 RESISTÊNCIA À DOBRA

Cinco filmes de cada lote foram repetidamente dobrados manualmente no mesmo local até 300 vezes ou até se quebrar, sendo o número de vezes em que o filme pode ser dobrado no mesmo local sem se quebrar, o valor da resistência à dobra (LI *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 2.2.7 AVALIAÇÃO, *EX VIVO*, DA FORÇA BIOADESIVA

#### 2.2.7.1 Preparação da Pele de Suíno

As peles para o teste foram obtidas por dissecação de orelhas de suínos, albinos e jovens, sendo esses recém abatidos. As peles foram lavadas com água, os pelos cortados e, posteriormente, essas foram dissecadas a fim de extrair a epiderme e a derme. Foram cortadas em tamanhos padronizados e adequados ao teste, sendo acondicionadas em filme plástico e papel alumínio e mantidas em congelador. No momento do uso, foram descongeladas à temperatura ambiente (LUNTER, ROTTKE e DANIELS, 2014). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos

(LABSLiF) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 2.2.7.2 Análise

Utilizando um analisador de textura TA-XT2plus no modo de tensão, a força bioadesiva dos filmes (16 mm de diâmetro) foi avaliada *ex vivo*, por meio da força necessária para remover a pele (de suíno) a partir da formulação. A pele foi presa em um *vial* e esse foi fixado na *probe*. Na temperatura ambiente, uma amostra da formulação, previamente acondicionada, foi colocada sobre uma placa de petri, a qual foi abaixada até que a pele entre em contato com a superfície da amostra. Instantaneamente, uma força para baixo de 0,03 N foi aplicada por um tempo definido de 30 s, para assegurar o contato íntimo entre a pele e a amostra. A *probe* foi levantada com velocidade constante de 10,0 mm/s e a força necessária para remover a pele da superfície da formulação foi determinada como o valor resultante da curva força pelo tempo. Para todas as formulações, as medidas foram realizadas em triplicata (BRUSCHI *et al.*, 2007). Os experimentos foram realizados no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM.

#### 2.2.8 VARIAÇÃO DE MASSA

Oito amostras de filmes (16 mm de diâmetro) foram pesadas separadamente em balança analítica (AG204, Mettler Toledo), sendo determinadas as médias e o desvio padrão das massas obtidas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE QUERCETINA

A análise do teor de quercetina foi realizada extraíndo-se o fármaco

de oito filmes (16 mm de diâmetro) com 10 mL de etanol 80%, durante 5 min, sob ultrassom, e 10 min de centrifugação (2400 rpm), sendo o processo repetido até remoção completa do fármaco. O conteúdo do fármaco foi determinado por espectrofotômetro UV-visível, por complexação com  $\text{AlCl}_3$  a 2% em reação 1:1 (amostra: $\text{AlCl}_3$ ) incubada durante 1 h, a temperatura ambiente. O complexo foi analisado em comprimento de onda de 420 nm. O branco foi constituído de etanol 80% e  $\text{AlCl}_3$  2%, e as análises foram realizadas em triplicata (JEMLI *et al.*, 2016). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 2.2.10 TESTE DE LIBERAÇÃO

#### 2.2.10.1 Solubilidade da Quercetina

Foram preparados 10 mL de soluções saturadas de quercetina em tampão fosfato (pH 7,4) com diferentes concentrações de Tween 20 (0,0; 0,5; 1,0, 1,5; 2,0 e 2,5%) para a escolha do meio de dissolução presente no compartimento receptor das células de difusão do tipo Franz. O conteúdo do fármaco foi determinado por espectrofotômetro UV-visível, por complexação com  $\text{AlCl}_3$  a 2% em reação 1:1 (amostra: $\text{AlCl}_3$ ) incubada durante 1 h, a temperatura ambiente. O complexo foi analisado em comprimento de onda de 420 nm. O branco foi constituído da solução de tampão com Tween 20 e  $\text{AlCl}_3$  2%, e as análises foram realizadas em triplicata (JEMLI *et al.*, 2016). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.10.2 Estudo de Liberação

O compartimento receptor das células de difusão do tipo Franz, foi preenchido com 10 mL de tampão fosfato (pH 7,4) com 2% de Tween 20 e mantido

sob agitação magnética (50 rpm). Foi utilizada uma membrana de Nylon (0,45 µm) entre os compartimentos. O filme (16 mm de diâmetro) foi depositado sobre a membrana, no compartimento do doador. A água que circula nas células foi mantida em 32 °C (temperatura da superfície da pele) (KROMBHOLZ, LIU e LUNTER, 2021). O experimento foi conduzido por 12 h, e em intervalo de tempo predeterminado (30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 540 e 720 min), e após, 2 mL de solução foram retirados do compartimento do receptor e substituídos imediatamente pela solução do meio receptor. O conteúdo do fármaco foi determinado por espectrofotômetro UV-visível, por complexação com AlCl<sub>3</sub> a 2% em reação 1:1 (amostra:AlCl<sub>3</sub>) incubada durante 1 h, a temperatura ambiente. O complexo foi analisado em comprimento de onda de 420 nm. O branco foi constituído de tampão fosfato com 2% de Tween 20 e AlCl<sub>3</sub> 2%, e as análises foram realizadas em triplicata (JEMLI *et al.*, 2016). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

A quantidade de quercetina liberada acumulada (%) foi calculada pela Equação (2).

$$\% \text{ de quercetina liberada acumulativa} = \frac{V_1 C_i + V_2 \sum C_{(i-1)}}{m} \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo V<sub>1</sub> o primeiro volume retirado; C<sub>i</sub> a concentração inicial; V<sub>2</sub> o volume retirado; ΣC<sub>i-1</sub> somatório das concentrações subsequentes; e m a massa de quercetina na formulação.

Os dados de liberação do princípio ativo foram analisados pelo programa DDSolver, que é um suplemento gratuito do Excel que facilita a modelagem de dados usando métodos não lineares, sendo equipado com uma biblioteca que contém 40 modelos de dissolução integrados. Esse programa também permite comparar perfis de dissolução e reduz o tempo e os erros de cálculos (ZHANG *et al.*, 2010; ZUO *et al.*, 2014).

### 2.2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL

As análises estatísticas dos dados experimentais de resistência à

dobra, força de bioadesão, variação de massa, teor de quercetina e teste de liberação foram realizadas por ANOVA e regressão linear usando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), empregando o módulo *Visual General Linear Model (VGLM)* do *software Statistica 7* (Statsoft Inc., Tulsa, EUA), sendo aplicada a equação polinomial quadrática, dada pela Equação (3), como função de resposta. Apenas os fatores com significância maior ou igual a 5% ( $p \leq 0,05$ ) foram considerados.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad (3)$$

Sendo Y a variável dependente;  $\beta_0$  a constante do modelo;  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  as variáveis independentes;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  os coeficientes lineares;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  os coeficientes quadráticos; e  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  os coeficientes de interação.

#### 2.2.12 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE FILME POLIMÉRICO

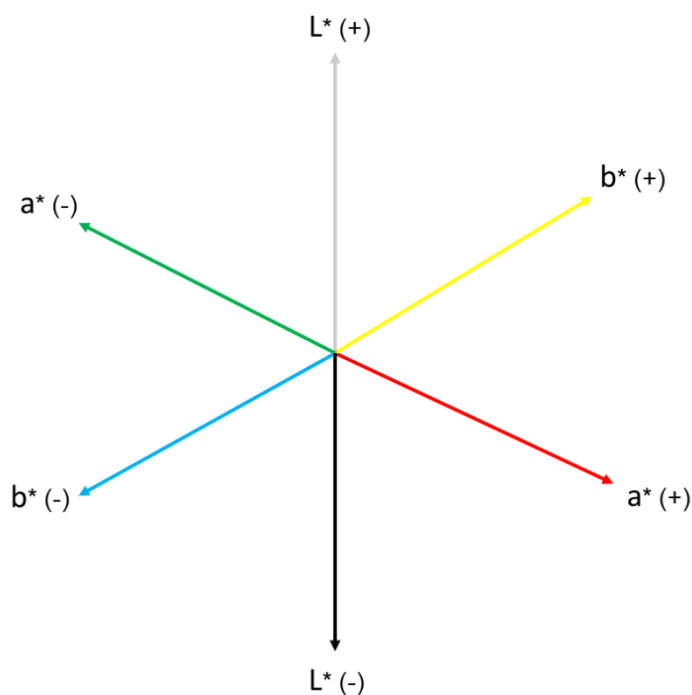
Após a escolha da formulação que se adequou as propriedades de resistência à dobra, força de bioadesão, variação de massa, teor de quercetina e teste de liberação, com base no planejamento fatorial, foram realizados os testes para a caracterização da mesma.

##### 2.2.12.1 Cor

O sistema de cor CIELab atribui números a cores utilizando o plano cartesiano (XYZ), como pode ser observado na Figura 2.1. A luminosidade ( $L^*$ , eixo Z) varia de zero (preto) a 100 (branco), a coordenada vermelho/verde ( $a^*$ , eixo X) varia de -120 (verde) a +120 (vermelho), e a coordenada amarelo/azul ( $b^*$ , eixo Y) varia de -120 (azul) a +120 (amarelo) (DIMITROVA *et al.*, 2022; LILLOTTE *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2019). A cor de cinco filmes (60 mm de diâmetro) foi medida, em triplicata, pelos parâmetros de cor CIELab com o auxílio de um colorímetro. As análises foram realizadas no Laboratório de tecnologia do Departamento de Ciência e Tecnologia em

Alimentos da UEL.

**Figura 2.1** – Sistema de cor CIELab.



**Fonte:** o próprio autor.

#### 2.2.12.2 Espessura

Foram realizadas 10 medições aleatórias, em cinco filmes poliméricos (60 mm de diâmetro) com o auxílio de paquímetro, em diferentes partes dos filmes, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (adaptado de COUTO *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.12.3 Densidade

Após a secagem e medição da espessura, foi determinado a

densidade de cinco filmes (60 mm de diâmetro) utilizando-se a Equação (4) (adaptado de GUIDI *et al.*, 2020).

$$p = \frac{m}{A \times h} \quad (4)$$

Sendo  $p$  é a densidade (g/mL);  $m$  é a massa (g);  $A$  é a área da superfície (cm<sup>2</sup>);  $h$  é a espessura (cm) do filme.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.12.4 pH da Superfície

Três filmes (16 mm de diâmetro) foram intumescidos com água e o pH da superfície foi medido imediatamente após o gotejamento de água, com o uso de papel indicador de pH colocado sobre a superfície do filme intumescido (adaptado de LI *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.12.5 Solubilidade em Água

Três filmes (16 mm de diâmetro) foram colocados na estufa (TE-393/2, Tecnal) a 100 °C, durante 24 h, para determinação da porcentagem inicial de matéria seca. Após pesagem, as amostras foram imersas em água ultrapura e agitadas por 24 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram filtradas e secas novamente em estufa, 100 °C, durante 24 h, para determinar a massa da matéria seca que não dissolveu em água (adaptado de LUCENA *et al.*, 2017). A solubilidade foi determinada pela equação (5).

$$S = \frac{Massa\ inicial - Massa\ final}{Massa\ inicial} \times 100 \quad (5)$$

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.12.6 Transmissão de Vapor de Água (TVA)

A TVA foi determinada gravimetricamente, de acordo com as normas da ASTM E96-00 (ASTM, 2000). Três filmes (60 mm de diâmetro) foram colocados em células de permeação com uma abertura circular de 40 mm e selados de modo a garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme.

O conjunto foi colocado em dessecador a 25 °C contendo solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) que propiciou ambiente com 75% de UR, a célula de permeabilidade foi parcialmente preenchida com cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>, 0% UR) no seu interior. As células foram pesadas em balança semi-analítica (AD330, Marte) até a obtenção da taxa constante de ganho de massa. As análises foram realizadas em triplicata.

O coeficiente angular de cada reta foi calculado pela regressão linear no regime constante ( $R^2 > 0,99$ ) e a TVA foi calculada de acordo com a Equação (6).

$$TVA = \frac{m}{t} \cdot \frac{e}{A \cdot \Delta p} \quad (6)$$

Sendo TVA a transmissão de vapor de água do filme; m/t o coeficiente angular da reta (g/s); e a espessura do filme (m); A a área do filme (m<sup>2</sup>);  $\Delta p$  a diferença de pressão entre o ambiente contendo CaCl<sub>2</sub> e o ambiente saturado com NaCl (2375,4 Pa).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.12.7 Propriedades Mecânicas

Cinco filmes foram cortados de modo a apresentarem 50 mm de comprimento e 20 mm de largura. Posteriormente, utilizando um analisador de textura TA-XT2plus com cela de carga de 5 kgf. Os filmes foram fixados com garras pneumáticas distanciadas inicialmente a 30,0 mm uma da outra e os parâmetros de resistência à tração, alongamento na ruptura e módulo de Young foram registrados durante a extensão do material a uma taxa de 0,80 mm/s. As análises foram realizadas no Laboratório de tecnologia do Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos da UEL.

#### 2.2.12.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dos filmes poliméricos, microcápsulas e quercetina

Os filmes (com quercetina e branco), microcápsulas (com quercetina e branco) e quercetina foram colocados em *stubs* e recobertos com uma camada de aproximadamente 15 nm de ouro utilizando um *Sputter Coater*. Posteriormente, a superfície das amostras foi analisada por microscópio eletrônico de varredura, no aumento de 5000x, operando com um feixe de elétrons de 25 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da UEL.

#### 2.2.12.9 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Para observar o perfil de degradação térmica dos filmes poliméricos, foram aquecidas 5 mg dos filmes branco e com quercetina em cadinho de alumínio com tampa perfurada, no intervalo de -60 a 50 °C e de 20 a 450 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em fluxo de gás de nitrogênio, com vazão média de 25 mL/min, utilizando o equipamento SHIMADZU DSC-60. As análises foram realizadas

no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da UEL.

#### 2.2.12.10 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o intuito de verificar como os componentes dos filmes podem afetar os grupos funcionais observados da amostra foram obtidos espectros de FTIR, por meio de ATR, dos filmes (com e sem quercetina) e seus constituintes (Kollicoat® IR, PVP e P407), na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se um espectrômetro FT-IR Vertex 70 da Bruker. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Prebiótica do Departamento de Química da UEL.

#### 2.2.13 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES POLIMÉRICOS

Filme contendo quercetina e filme sem insumo ativo (60 mm de diâmetro) foram armazenados em placas de Petri (permeáveis à gases e a umidade), seladas com parafilme, nas temperaturas: 4 °C, ambiente (25 °C) e à 40 °C (75% UR) por 6 meses (180 dias). Em intervalos de tempo pré-determinados (0, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias) as amostras foram analisadas por determinação do teor de quercetina e resistência à dobra para realização do estudo de estabilidade físico-química. O efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da temperatura e do tempo na estabilidade foram avaliadas pelo teste de ANOVA de duas vias (*two-way*), seguido do teste de Tukey para comparação múltipla. As análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (version 7.0, *GraphPad Software, Inc.*, San Diego, USA) e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

A cinética da taxa de degradação da quercetina foi determinada plotando logaritmo da concentração de quercetina restante *versus* tempo (processo de primeira ordem). Os parâmetros cinéticos, como constante de taxa de degradação de ordem aparente ( $k$ ), meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e  $t_{90}$  (tempo em que 90% da concentração original da quercetina permanece inalterada) foram obtidos a partir das inclinações das linhas retas em cada temperatura. Cada experimento foi realizado em triplicata e

os valores médios foram tomados para a análise.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 2.2.14 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXIDADE DO FILME

Para averiguar a citotoxicidade da formulação escolhida, o filme de 16 mm de diâmetro, foi dissolvido em 1 mL de DMEM, obtendo-se uma solução de 143,12 µg/mL de quercetina. O ensaio foi realizado pelo método de MTT e as células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços até obter 80 a 100% de confluência. Após isso, o filme dissolvido foi adicionado às células e incubado em ambiente de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm em espectrofotômetro de microplacas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da UEL.

#### 2.2.15 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

O filme (16 mm de diâmetro), foi dissolvido em 1 mL de DMEM, obtendo-se uma solução de 143,12 µg/mL de quercetina. O ensaio foi realizado pelo método de MTT e as células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços até obter 80 a 100% de confluência. Após isso, o filme dissolvido foi inoculado simultaneamente ao vírus (HSV-1-KOS e HSV-1-AR, nas diluições de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-3</sup> µg/mL, respectivamente) e às células, as quais foram incubadas em estufa de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, foi adicionado MTT para corar as células viáveis. Após 2 h, foi realizada leitura colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm em espectrofotômetro de microplacas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da UEL.

### 2.2.16 ENSAIOS *IN VIVO*

Camundongos BALB/c, com peso variando de 22-27 g, passaram dois dias para ambientalização no biotério após o transporte, mantendo-se um ciclo claro-escuro de 12 h e  $22 \pm 2$  °C. Em relação à dieta foi mantida ração Nuvilab – CR1 (fabricante Nuvital) e água *ad libitum*. Posteriormente, os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) via intraperitoneal e após a verificação da anestesia, os pelos da região lombar dos animais foram retirados manualmente. Os experimentos, *in vivo*, foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (015.2022 e 068.2022).

#### 2.2.16.1 Determinação da Toxicidade do Composto

Foi realizado o ensaio de irritação dérmica de acordo com a norma descrita no guia OECD nº 404 (OECD, 2002), para isso foram formados dois grupos com 6 (seis) animais cada. No grupo controle, nenhuma formulação foi aplicada e no grupo da irritação dérmica, foram aplicados filmes umidificados contendo quercetina (16 mm de diâmetro), três vezes ao dia, durante oito dias (tratamento aplicado no ensaio antiviral). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da UEL.

#### 2.2.16.2 Ensaio Antiviral

Após a remoção dos pelos dos animais ocorreu a inoculação com HSV-1 por escarificação (CARDOZO *et al.*, 2013; GONSHO *et al.*, 1990), com o auxílio de uma agulha de calibre 27 em vinte e quatro animais. Nesta região aconteceu a inoculação de 70 µL de vírus HSV-1-KOS.

Após a inoculação viral, os animais foram divididos em quatro grupos com seis camundongos cada e receberam diferentes tratamentos, três vezes ao dia,

durante oito dias. Os grupos analisados foram: 1) sem tratamento (controle viral); 2) tratamento com aciclovir (controle positivo); 3) filme sem quercetina (umidificado, 16 mm de diâmetro) e 4) filme contendo quercetina (umidificado, 16 mm de diâmetro).

As alterações foram observadas diariamente de acordo com o desenvolvimento das lesões na pele, sendo classificadas conforme Cardozo *et al.* (2013): 0 - sem lesões visíveis; 1 – presença de vesículas; 2 - erosão ou ulceração da vesícula; 3 - lesões zosteriformes leves; 4 - lesões zosteriformes moderadas; 5 - lesões zosteriformes severas. Ao final, os camundongos de cada grupo foram pesados e eutanasiados, por meio de injeção de ketamina (229 mg/Kg), via intraperitoneal.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da UEL.

#### 2.2.16.3 Análise Histológica

Ao término do experimento, todos os animais utilizados nos ensaios de irritação dérmica e ensaio antiviral foram eutanasiados por meio de Ketamina (229 mg/Kg) – via intraperitoneal, com posterior remoção da área lesionada de pele para avaliação histológica descritiva. Os fragmentos de tecidos cutâneos coletados foram fixados em formalina 10% tamponada neutra pH 7,2, por 24 h. Posteriormente, foram transferidos para solução hidroalcolica 70% e subsequentemente foram desidratados e embebidos em parafina. O material parafinado foi cortado em micrótomo semiautomático e as lâminas produzidas com espessura de 5 µm, que foram processadas e coradas em Hematoxilina e Eosina, para avaliação das alterações histológicas. Desta forma, as lâminas foram lidas em microscópio óptico e foi definido um *score* lesional a partir de todas as alterações encontradas na pele dos camundongos: 1) gravidade leve: hiperqueratinização, hiperplasia epidérmica e esponginose; 2) gravidade moderada: inflamação da epiderme, inflamação da derme e de inflamação da hipoderme; e 3) gravidade severa: necrose da epiderme e necrose da derme.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL.

### 2.2.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) foram avaliadas pelo teste de teste *t-Student*, ou ANOVA de uma via (*one-way*), seguido do teste de Tukey para comparação múltipla utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 7.0, *GraphPad Software*, Inc., San Diego, USA) e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E DO ENSAIO ANTIVIRAL DA QUERCETINA

A Quercetina apresentou concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) de 28,90  $\mu\text{g/mL}$  e os resultados de titulação viral mostraram que as diluições de  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  foram as que causaram efeito citopático em mais de 50% das células para os vírus HSV-1-KOS e HSV-1-AR, respectivamente.

No ensaio simultâneo, esse flavonoide apresentou atividade antiviral em baixa concentração (6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) para ambas as cepas de HSV-1, a porcentagem de inibição viral, na referida concentração foi de 100% para HSV-1-KOS e 97,9% para HSV-1-AR. Para o HSV-1-KOS, a quercetina apresentou concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) de 1,80  $\mu\text{g/mL}$  e Índice de Seletividade (IS) de 16,05. E para o HSV-1-AR, seu  $IC_{50}$  foi de 1,08  $\mu\text{g/mL}$  e o IS de 26,76. O IS é o valor que estima a segurança do fármaco, ele é calculado pela razão  $CC_{50}/IC_{50}$  e quanto maior é seu valor, maior é a segurança do fármaco nas células analisadas (DEZENGRINI *et al.*, 2010).

Na literatura observa-se valores variados para a quercetina, Bidone *et al.* (2015) encontrou resultados próximos ao deste trabalho ( $CC_{50} = 25,34 \mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{50} = 7,93 \mu\text{g/mL}$ , IS = 3,00), enquanto Chiang *et al.* (2003) encontrou valores mais altos ( $CC_{50} = 496,90 \mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{50} = 22,60 \mu\text{g/mL}$ , IS = 22,00).

O teste de inibição da adsorção mostrou que a quercetina nas concentrações de 1,5 a 25 µg/mL inibiu de 84 a 100% o vírus HSV-1-KOS e de 68 a 100% o vírus HSV-1-AR. No teste virucida, as mesmas concentrações de quercetina, mostraram inibição de 87,5 a 100% para o vírus HSV-1-KOS e de 6 a 21% para o vírus HSV-1-AR. Estes resultados corroboram com a literatura, que sugere que a quercetina atua no estágio de adsorção do vírus na célula, possivelmente inibindo a glicoproteína D (nas duas cepas) e a replicação viral (HSV-1-KOS) (DI PETRILLO *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2017; SAND *et al.*, 2021; SICURELLA *et al.*, 2022).

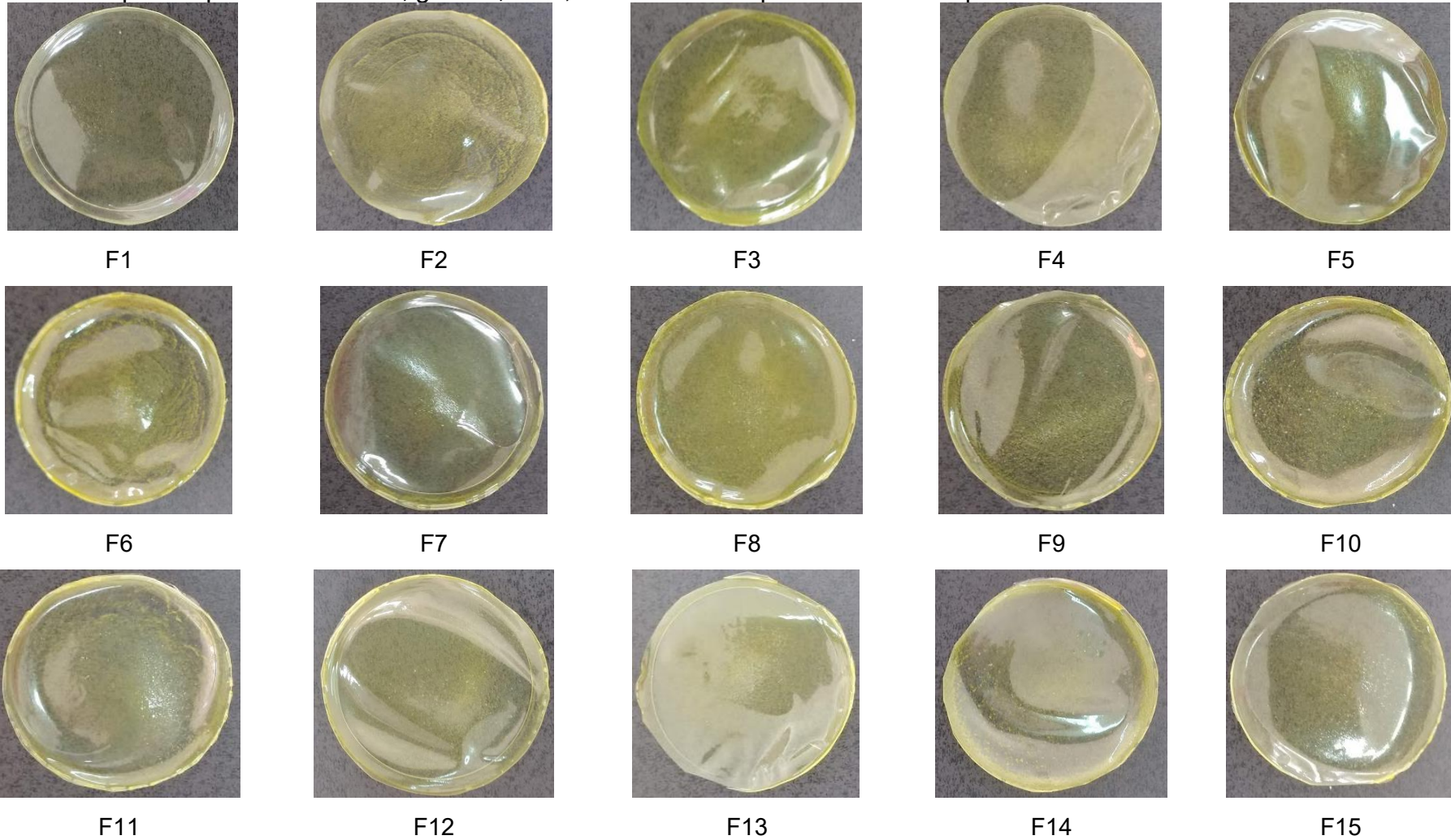
### 2.3.2 OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS

As características macroscópicas das quinze formulações (F1 a F15) obtidas com o planejamento fatorial podem ser visualizadas na Figura 2.2. Observa-se que os filmes poliméricos obtidos foram semelhantes visualmente, sem marcas de bolhas e quebras, e com coloração uniforme.

A matriz do planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken e os resultados das variáveis dependentes: resistência à dobra (RD), força de bioadesão (FB), variação de massa (VM), dosagem dos teores de quercetina (TQ) e teste de liberação (L), são mostrados na Tabela 2.2.

A resistência à dobra e a bioadesão são propriedades mecânicas importantes de filmes poliméricos. Para desempenhar seu papel eles precisam aderir ao tecido biológico, sem quebrar no momento de aplicação e ao longo do tempo de uso. O menor valor de dobra foi obtido para a formulação 12 (228) e à dobra máxima analisada (300) foi obtida para as formulações 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 14 e 15. Para a bioadesão observou-se que a formulação que precisa de mais força para se desgrudar da pele é a 5 (0,1212 N) e a que precisa de menor força é a 1 (0,0699 N). As análises estatísticas mostraram que nenhuma das variáveis independentes estudadas apresentaram efeito significativo na resistência à dobra e na bioadesão, e dessa forma essas variáveis não podem explicar o porquê dos valores diferentes entre as formulações.

**Figura 2.2** – Características macroscópicas dos 15 filmes poliméricos (F1 a F15) obtidos utilizando o planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken compostos por Kollicoat® IR, glicerol, PVP, P407 e microcápsulas contendo quercetina.



Fonte: Próprio autor.

**Tabela 2.2** – Matriz do planejamento fatorial 3<sup>3</sup> Box-Behnken com fatores codificados e seus níveis resultando em 15 formulações (F1 a F15) e os resultados das variáveis dependentes: resistência à dobra (RD), força de bioadesão (FB), variação de massa (VM), dosagem dos teores de quercetina (TQ) e teste de liberação (L).

Exp.	Variáveis independentes			Variáveis dependentes				
	QC (%)	G (%)	P407 (%)	RD	FB (N)	VM (mg)	TQ (µg)	L* (%)
F1	-1(0,21)	-1(1,0)	0(1,5)	285 ± 34	0,0699 ± 0,0029	27,6 ± 10,6	58,59 ± 8,35	13,80 ± 1,96
F2	+1(0,41)	-1(1,0)	0(1,5)	300 ± 0	0,0870 ± 0,0027	32,5 ± 6,7	163,50 ± 19,45	14,56 ± 4,45
F3	-1(0,21)	+1(2,0)	0(1,5)	300 ± 0	0,0906 ± 0,0033	27,7 ± 9,5	56,71 ± 5,99	25,63 ± 8,15
F4	+1(0,41)	+1(2,0)	0(1,5)	299 ± 3	0,0768 ± 0,0051	30,6 ± 7,9	149,11 ± 18,13	17,22 ± 2,69
F5	-1(0,21)	0(1,5)	-1(0,5)	292 ± 18	0,1212 ± 0,0076	29,3 ± 9,9	51,52 ± 8,80	21,20 ± 7,52
F6	+1(0,41)	0(1,5)	-1(0,5)	300 ± 0	0,1085 ± 0,0076	30,8 ± 7,7	141,08 ± 12,95	30,28 ± 17,04
F7	-1(0,21)	0(1,5)	+1(2,5)	300 ± 0	0,0837 ± 0,0098	30,4 ± 9,9	58,68 ± 8,19	25,69 ± 13,17
F8	+1(0,41)	0(1,5)	+1(2,5)	293 ± 16	0,0757 ± 0,0070	29,9 ± 10,8	143,12 ± 9,39	32,52 ± 10,61
F9	0(0,31)	-1(1,0)	-1(0,5)	300 ± 0	0,0797 ± 0,0011	29,4 ± 6,8	92,19 ± 13,63	29,67 ± 8,09
F10	0(0,31)	+1(2,0)	-1(0,5)	300 ± 0	0,0834 ± 0,0013	32,2 ± 10,5	91,45 ± 11,00	15,17 ± 1,03
F11	0(0,31)	-1(1,0)	+1(2,5)	300 ± 0	0,0852 ± 0,0033	33,8 ± 8,3	96,22 ± 12,14	21,59 ± 8,00
F12	0(0,31)	+1(2,0)	+1(2,5)	228 ± 100	0,0783 ± 0,0070	25,8 ± 11,9	98,15 ± 11,02	29,20 ± 5,67
F13	0(0,31)	0(1,5)	0(1,5)	269 ± 69	0,0764 ± 0,0033	29,0 ± 5,9	82,42 ± 8,23	20,14 ± 4,25
F14	0(0,31)	0(1,5)	0(1,5)	300 ± 0	0,0859 ± 0,0054	30,4 ± 2,9	74,03 ± 8,89	16,93 ± 3,77
F15	0(0,31)	0(1,5)	0(1,5)	300 ± 0	0,1048 ± 0,0022	31,2 ± 5,7	91,79 ± 8,85	18,01 ± 7,68

QC = quercetina; G = glicerol; P407 = poloxamer 407.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de triplicatas reais.

\*Maior % de quercetina liberada acumulada em 12 h de experimento.

**Fonte:** o próprio autor.

O Kollicoat® IR é um copolímero que forma filmes flexíveis devido ao fato de não haver migração do plastificante em sua estrutura química (SALEHI e BODDOHI, 2019), no entanto o uso de plastificantes como o glicerol pode aumentar a resistência à dobra de filmes que contenham Kollicoat® IR, como demonstrado por Mali, Patil e Chellampillai (2022).

Os compostos utilizados na preparação dos filmes são constituídos por grupamentos hidroxila e carbonila que formam interações interatômicas com a pele, gerando a bioadesão. Vecchi *et al.* (2020) obtiveram filmes mucoadesivos compostos por PVA, PVP e P407 e analisaram a força de bioadesão em disco de mucina; esses autores encontraram valores mais elevados do que os deste trabalho, no entanto, eles utilizaram concentrações maiores dos polímeros e testaram em tecido biológico mais úmido do que a pele.

A variação de massa apresentou valores de 25,8 mg (formulação 12) a 33,8 mg (formulação 11). Os resultados da ANOVA (dados não mostrados) demonstraram que somente a interação entre glicerol e P407 apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) e negativo na variação de massa. As interações entre variáveis independentes podem ser sinérgicas, apresentando efeito positivo significativo na variável dependente, ou antagonistas, apresentando efeito significativo negativo (PERECIN e CARGNELUTTI FILHO, 2008).

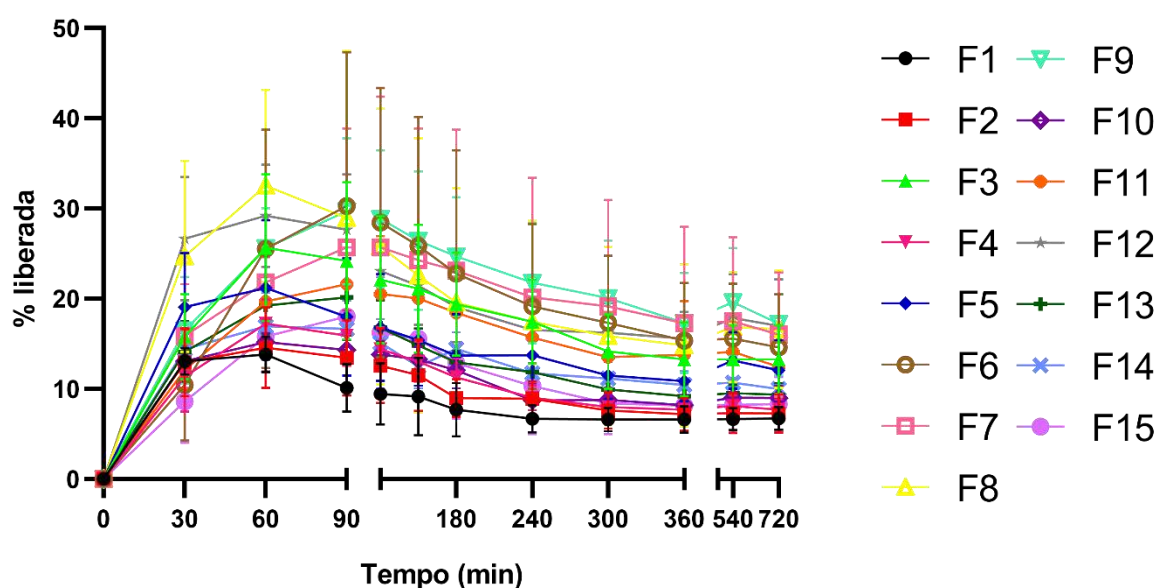
Para a dosagem dos teores de quercetina, observou-se que a dispersão dos componentes da formulação não foi uniforme em todos os filmes poliméricos, sendo que as formulações do nível -1 apresentaram valores mais próximos entre si, do que os outros dois níveis. Os resultados de ANOVA (dados não mostrados) demonstraram que a concentração de quercetina teve efeito linear positivo, indicando que quanto maior a concentração de quercetina adicionada no filme, maior é a dosagem encontrada, e efeito quadrático negativo; e que a concentração de glicerol também teve efeito quadrático negativo, que pode indicar mudança na difusividade do filme (SKALSKY e PETEREIT, 2017).

Antes de realizar o teste de liberação foi necessário analisar a solubilidade da quercetina no líquido presente no compartimento receptor das células de difusão do tipo Franz. Em 10 mL das soluções contendo 0,0; 0,5; 1,0, 1,5; 2,0 e 2,5% de Tween 20, solubilizou 6,83; 123,25; 227,49; 326,81; 444,66; 505,59  $\mu\text{g}$  de quercetina, respectivamente. Optou-se pela solução contendo 2,0% de Tween 20 para garantir que o meio de dissolução não saturasse (*sink conditions*), reduzindo os erros

da análise (LIU *et al.*, 2013).

Observa-se na Figura 2.3, que o perfil de liberação apresenta duas cinéticas. Primeiramente, ocorreu liberação rápida com o máximo de liberação acumulada (Tabela 2.2) em 60 min para os filmes 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12 e 14, e em 90 min para os filmes 6, 7, 9, 11, 13 e 15. Posteriormente, ocorre o decaimento da dose liberada até 6 h de liberação e, em seguida, o teor permanece constante até 12 h. Essa liberação rápida, também chamada de dose de ataque, é importante para o agente ativo iniciar o efeito terapêutico, por atingir rapidamente a concentração-alvo do fármaco. Posteriormente, observa-se o efeito da dose de manutenção, que garante que o princípio ativo, mantenha sua função (LÊ *et al.*, 2020).

**Figura 2.3** – Resultados dos perfis de liberação dos quinze filmes analisados (F1 a F15).



Fonte: Próprio autor.

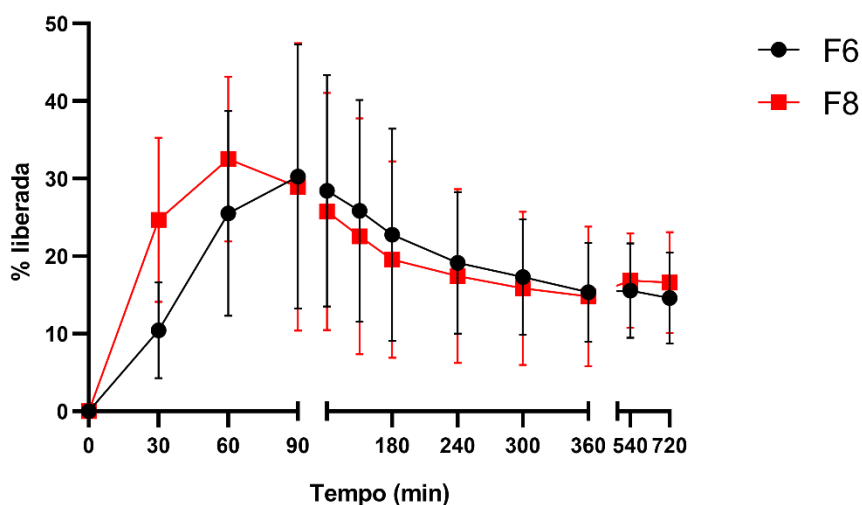
Utilizando-se o programa DDSolver foi possível modelar esses dados. Até o tempo de 90 min, os dados de liberação foram modelados por Korsmeyer-Peppas, que mostrou que a maioria das formulações apresenta liberação *quasi*-Fickiana ( $n < 0,5$ ), a formulação 11 apresentou liberação de difusão Fickiana ( $n = 0,5$ ) e as formulações 6, 9 e 15 tiveram liberação não-Fickiana (transporte anômalo,  $0,5 < n < 1,0$ ) (KORSMEYER *et al.*, 1983; MARANI, BLOISI e PETRI, 2015; RITGER e

PEPPAS, 1987). De 90 a 720 min, observou-se que as formulações 4, 8 e 13 foram modeladas pelo modelo Weibull e as demais pelo modelo Logistic. Não foi possível relacionar as diferentes cinéticas com os parâmetros avaliados (G, QC e P407).

Os resultados do teste de liberação mostraram que somente os filmes 6 (2,06 µg/mL) e 8 (2,38 µg/mL) liberaram uma dose acima do IC<sub>50</sub> da atividade antiviral do vírus HSV-1-KOS (1,80 µg/mL) ao longo das 12 h de experimento. A análise de comparação de semelhança (F2) entre esses dois perfis deu negativa (F2 = 40,94), o que era esperado pela comparação visual das curvas (Figura 2.4) e pelas diferentes cinéticas observadas entre eles (Tabela 2.3). Até 90 min, o filme 6 libera a quercetina por difusão não-Fickiana ( $0,5 < n < 1,0$ ), enquanto que o filme 8 libera pela difusão *quasi*-Fickiana ( $n < 0,5$ ), observa-se também que o filme 8 possui uma taxa de liberação (k) mais rápida que filme 6; e possui tempo de liberação de 50% (T<sub>50</sub>) do princípio ativo maior. De 90 a 720 min, os dois filmes também possuem cinéticas diferentes, o filme 6 foi modelado por Logistic (R<sup>2</sup> = 0,73) e o filme 8 foi modelado por Weibull (R<sup>2</sup> = 0,85). Esses modelos apresentam os fatores  $\alpha$  e  $\beta$ . O fator  $\alpha$  é o parâmetro de escala, que indica o intervalo de tempo no qual ocorrem 63,2% das falhas (ANIL KUMAR *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010), em ambos os filmes se observou intervalos de tempo curtos, sendo  $\alpha = 1,02$  para filme 6 e  $\alpha = 0,91$  para filme 8. O fator  $\beta$  é o parâmetro de formato da curva de dissolução, sendo que  $\beta < 1$  indica uma curva parabólica,  $\beta = 1$  indica uma curva exponencial e  $\beta > 1$  indica uma curva em forma de S (COSTA e LOBO, 2001; ZHANG *et al.*, 2010); para ambos os filmes se observou formato de curva parabólica. Outro parâmetro obtido foi o tempo de liberação de 50% (T<sub>50</sub>) do princípio ativo, que foi maior para o filme 8.

Os resultados de ANOVA (dados não mostrados) demonstraram que o P407 teve um efeito quadrático negativo em todos os tempos de liberação. No tempo de 30 minutos, observou-se outros efeitos significativos: as interações G\*P407 e QC\*P407 e o P407 tiveram um efeito positivo, este último indicando que quanto maior a concentração do tensoativo, maior foi a liberação nesse tempo. No tempo de 12 h, a interação G\*P407 também teve um efeito positivo na resposta analisada.

**Figura 2.4** – Comparação do perfil de liberação dos filmes F6 (●) e F8 (■).



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 2.3** – Parâmetros cinéticos da liberação da quercetina das formulações 6 e 8.

Modelo	Parâmetros	Filme 6	Filme 8
Korsmeyer-Peppas	R <sup>2</sup>	0,93	0,96
	K (min <sup>-n</sup> )	0,79	14,27
	N	<b>0,97</b>	<b>0,17</b>
	T <sub>50</sub> (min)	608,43	1389,18
Weibull	R <sup>2</sup>	0,71	<b>0,85</b>
	α (min)	2,22	<b>0,91</b>
	B	-0,33	<b>-0,33</b>
	Ti (min)	42,00	<b>45,00</b>
	T <sub>50</sub> (min)	61,83	<b>68,17</b>
Logistic	R <sup>2</sup>	<b>0,73</b>	0,82
	α (min)	<b>1,02</b>	1,28
	B	<b>-1,04</b>	-1,06
	T <sub>50</sub> (min)	<b>30,25</b>	34,80

R<sup>2</sup> = coeficiente de correlação k = constante de taxa de liberação do princípio ativo; n = expoente de difusão; α = parâmetro de escala que define a escala de tempo do processo; β = parâmetro de forma da curva de dissolução (exponencial (β = 1), em forma de S (β >1) ou parabólica (β < 1)); Ti = é o tempo de atraso da dissolução do fármaco; T<sub>50</sub> = tempo de liberação de 50% do princípio ativo.

Fonte: o próprio autor.

A matriz de correlação entre as variáveis dependentes (dados não mostrados) indicou correlação positiva entre a resistência à dobra e a variação de massa (R<sup>2</sup> = 0,69), esse resultado sugere que os fatores que afetam o parâmetro de variação de massa como quantidade de aditivos e presença ou ausência de partículas

insolúveis interferem diretamente nas propriedades mecânicas do material, como a resistência à dobra (TAKEUCHI *et al.*, 2020). Observou-se também correlação negativa entre a resistência à dobra e a liberação do princípio ativo no tempo de 30 minutos ( $R^2 = -0,70$ ), sugerindo que quanto mais o filme polimérico é resistente à dobra, menor é a liberação inicial da formulação; os dados de ANOVA mostraram que quanto menos P407 tem na formulação, menor é a liberação da quercetina em 30 minutos. A menor concentração de surfactante, diminui as atrações intermoleculares entre cadeias poliméricas adjacentes, o que aumenta a flexibilidade do filme, tornando mais resistente à dobra (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2019). As demais correções com  $R^2 > 0,6$  ocorreram entre os tempos de liberação estudados.

Como as formulações 6 e 8 foram as que liberaram acima do  $IC_{50}$ , optou-se por uma delas. Essas formulações foram muito semelhantes em relação as respostas avaliadas, apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) apenas para a força de bioadesão. Apesar do filme 8 apresentar valor de força de bioadesão menor do que o 6, ele adere bem a pele e teve aparência visual melhor que o filme 6 como observa-se na Figura 2.2, o que agrega valor quando esta formulação é avaliada como um produto a ser comercializado. Desta forma, a formulação escolhida para prosseguir com os testes foi a número 8.

### 2.3.3 CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO SELECIONADO (Nº 8)

Os resultados da caracterização do filme polimérico nº 8 estão demonstrados na Tabela 2.4.

Os resultados referentes ao sistema de cor CIELab apresentaram diferença estatística entre os filmes com e sem quercetina. Ambos os filmes apresentaram elevados valores de luminosidade, esse resultado já era esperado devido ao fato de os filmes apresentam transparência (Figura 2.2) e serem analisados sobre uma superfície branca. Os resultados da coordenada  $a^*$  foram negativos, indicando que por essa coordenada ambos os filmes apresentam leve tom de verde; enquanto que os resultados da coordenada  $b^*$  foram positivos (amarelo) para os filmes de quercetina e negativos (azul), próximos a zero para o filme branco.

**Tabela 2.4** – Resultados da caracterização do filme polimérico n° 8 obtidos nas análises de cor (luminosidade, coordenada vermelho/verde e coordenada amarelo/azul), espessura, densidade, pH, solubilidade, permeação de vapor de água e propriedades mecânicas (módulo de Young, resistência a tração e alongamento na ruptura).

Característica	FQ	FB
Luminosidade	93,28 ± 0,55 <sup>a</sup>	94,88 ± 0,49 <sup>b</sup>
Coordenada vermelho/verde	-9,25 ± 0,90 <sup>a</sup>	-2,00 ± 0,76 <sup>b</sup>
Coordenada amarelo/azul	19,25 ± 2,07 <sup>a</sup>	-0,26 ± 0,24 <sup>b</sup>
Espessura (mm)	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>
Densidade (g/mL)	0,81 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,03 <sup>a</sup>
pH	6 ± 0 <sup>a</sup>	6 ± 0 <sup>a</sup>
Solubilidade (%)	99,53 ± 0,44 <sup>a</sup>	97,47 ± 0,92 <sup>b</sup>
TVA (10 <sup>-10</sup> g/msPa)	2,36 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,00 <sup>a</sup>
Módulo de Young (Mpa)	33,74 ± 2,20 <sup>a</sup>	33,36 ± 6,22 <sup>a</sup>
Resistência a Tração (N/mm <sup>2</sup> )	3,08 ± 0,38 <sup>a</sup>	2,74 ± 0,44 <sup>a</sup>
Alongamento na ruptura (%)	17,83 ± 2,95 <sup>a</sup>	16,24 ± 3,11 <sup>a</sup>

FQ = filme com quercetina e FB = filme branco.

As letras diferentes representam diferença estatística  $p < 0,05$ , e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de triplicatas reais.

**Fonte:** o próprio autor.

A presença da quercetina não alterou os valores de espessura, densidade e pH entre os filmes. Siddiqui *et al.* (2022) avaliou filmes formados por Kollicoat® IR e concluíram que a espessura varia de acordo com a quantidade de polímero presente no filme. Os mesmos autores avaliaram o pH dos filmes e encontraram valores entre 5 e 6, corroborando com este trabalho. A densidade dos filmes é justificada pelas variáveis massa, espessura e área de cada filme, que foram semelhantes entre filmes com e sem quercetina.

Ambos os filmes analisados são altamente solúveis em água, assim como os compostos que os constituem em maior proporção: Kollicoat® IR, glicerol, PVP e P407, respaldando os resultados obtidos.

Os filmes obtidos apresentaram baixos valores de transmissão de vapor de água, menores inclusive que filmes de PVA puro (6,97.10<sup>-7</sup> g/msPa) (SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2021). Essa análise mensura a capacidade das moléculas de água de penetrarem o filme, e essa capacidade depende de fatores como a afinidade hidrofílica do material e da interação intermolecular entre os polímeros presentes no filme (CAZÓN, VÁZQUEZ e VELAZQUEZ, 2018).

Os resultados relacionados ao módulo de Young, resistência a tração

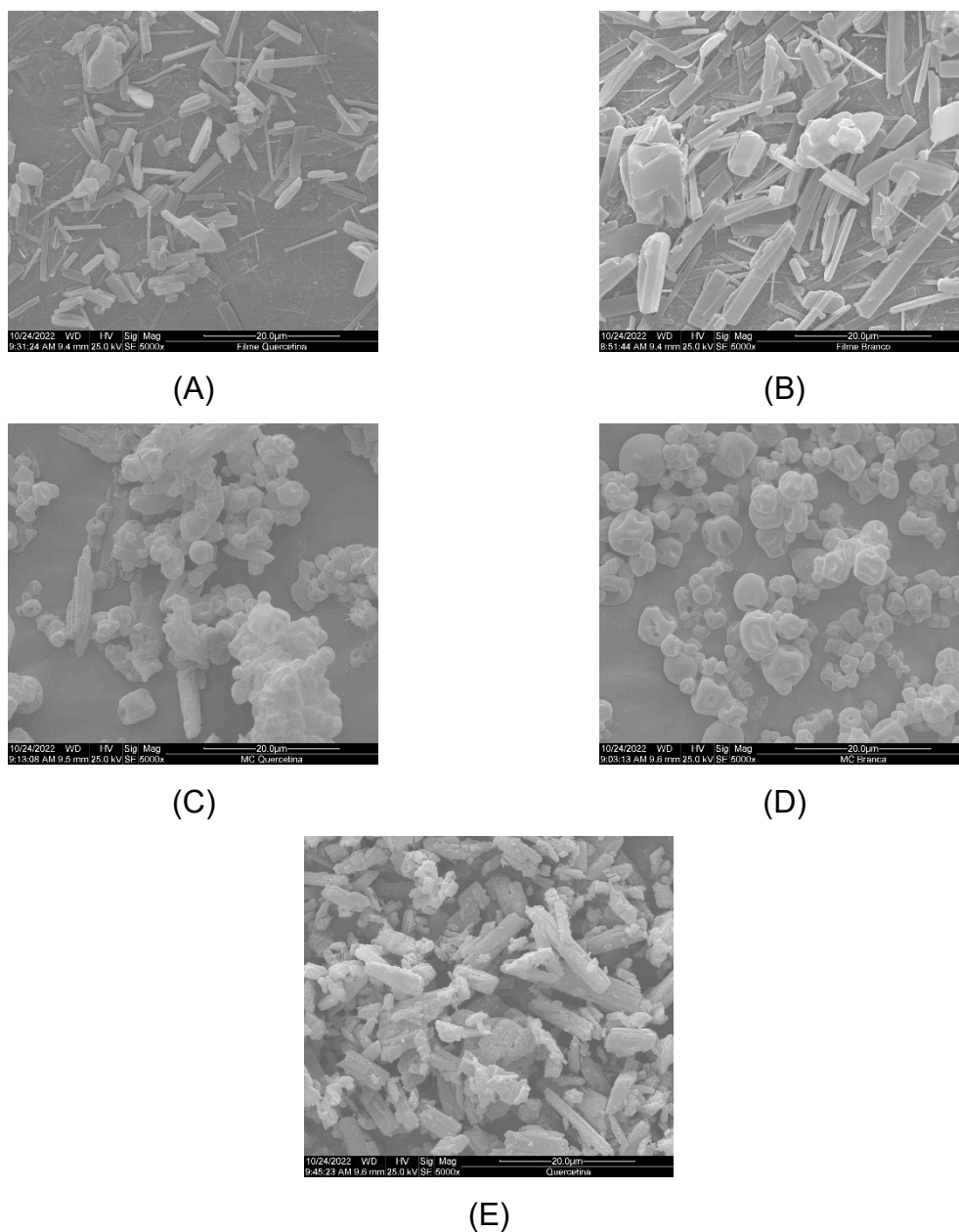
e alongamento na ruptura fornecem informações sobre a resistência e deformação elástica do material, sendo que os resultados obtidos para as amostras mostram que os filmes preparados neste trabalho possuem elasticidade. Os atributos de tração ideais para filmes poliméricos orodispersíveis são módulo de Young  $< 550$  Mpa, resistência a tração  $> 2$  N/mm<sup>2</sup> e alongamento na ruptura  $> 10\%$  (GUPTA *et al.*, 2021). Łyszczarza *et al.* (2020) produziram filmes de Kollicoat® IR com glicerol em maior proporção ao utilizado nesse trabalho e encontraram valores semelhantes de alongamento na ruptura e valores mais altos de módulo de Young e resistência a tração, indicando que o aumento desses polímeros torna o material mais rígido.

#### 2.3.3.1 MEV da superfície dos filmes poliméricos, microcápsulas e quercetina

As micrografias da superfície das amostras analisadas são mostradas na Figura 2.5. Observa-se que os filmes (Figuras 2.5 A e B) apresentam as mesmas estruturas cristalinas que são o P407 (ALVES *et al.*, 2018), o que indica que esse polímero não interage em nível molecular com os demais polímeros. Vecchi *et al.* (2020), obtiveram filmes constituídos por PVA, PVP e P407 e as micrografias da superfície dos filmes, apresentaram áreas lisas com poucas partículas.

A Figura 2.5 C mostra que alguns cristais de quercetina não foram microencapsulados (a eficiência de encapsulação foi de  $73,98 \pm 5,77\%$ ) e que o polímero coalesce em comparação com as microcápsulas sem o fármaco (Figura 2.5 D). Na Figura 2.5 E verifica-se que os cristais de quercetina apresentam formato de agulha como reportado na literatura (SETYAWAN *et al.*, 2018).

**Figura 2.5** – MEV do (A) filme com quercetina microencapsulada, do (B) filme branco, da (C) microcápsula com quercetina, da (D) microcápsula branca e da (E) quercetina.



**Fonte:** o próprio autor.

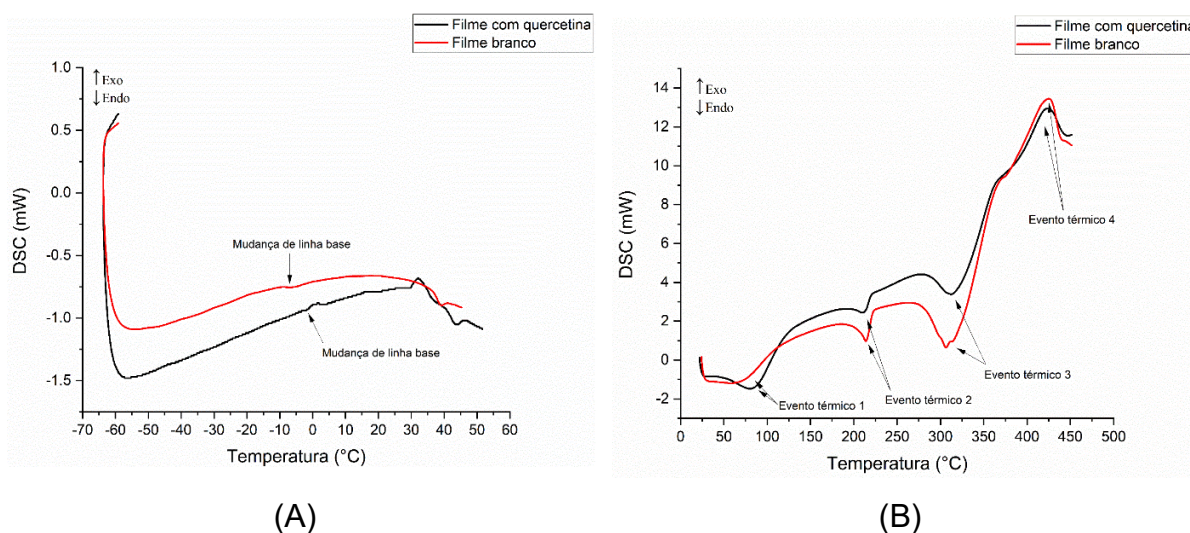
### 2.3.3.2 DSC

Na Figura 2.6 observa-se o perfil de degradação térmica dos filmes analisados. As curvas de DSC de -60 a 50 °C (Figura 2.6 A) mostram mudança da linha de base em aproximadamente -6 °C que indicam a temperatura de transição

vítrea ( $T_g$ ) da formulação. A presença de plastificantes pode reduzir a  $T_g$  dos polímeros, o PVA puro tem  $T_g$  de 92 °C. No entanto, quando misturado com o PEG formando o Kollicoat® IR, a  $T_g$  é reduzida para 45 °C (FOUAD *et al.*, 2011). Nos filmes foram adicionados glicerina, podendo reduzir a  $T_g$  para -6 °C.

As curvas de DSC de 20 a 450 °C (Figura 2.6 B) apresentaram quatro eventos térmicos. O primeiro, representado pelo pico endotérmico em aproximadamente 70 °C, pode ser caracterizado por desidratação. O segundo evento térmico, em aproximadamente 200 °C, é referente ao ponto de fusão do álcool polivinílico presente no Kollicoat® IR (MALI, PATIL e CHELLAMPILLAI, 2022). Os demais eventos, processo endotérmico em aproximadamente 300 °C e exotérmico em aproximadamente 420 °C, indicam perdas de componentes e degradação dos polímeros. Observa-se também que os eventos do filme com quercetina estão levemente deslocados para a direita em comparação com o filme branco, isso sugere a presença de interações intermoleculares da quercetina com os polímeros, aumentando ligeiramente a estabilidade térmica da formulação.

**Figura 2.6** – Perfil de degradação térmica obtido por DSC do (-) filme com quercetina e do (-) filme branco nos intervalos de temperatura de (A) -60 a 50 °C e (B) 20 a 450 °C.



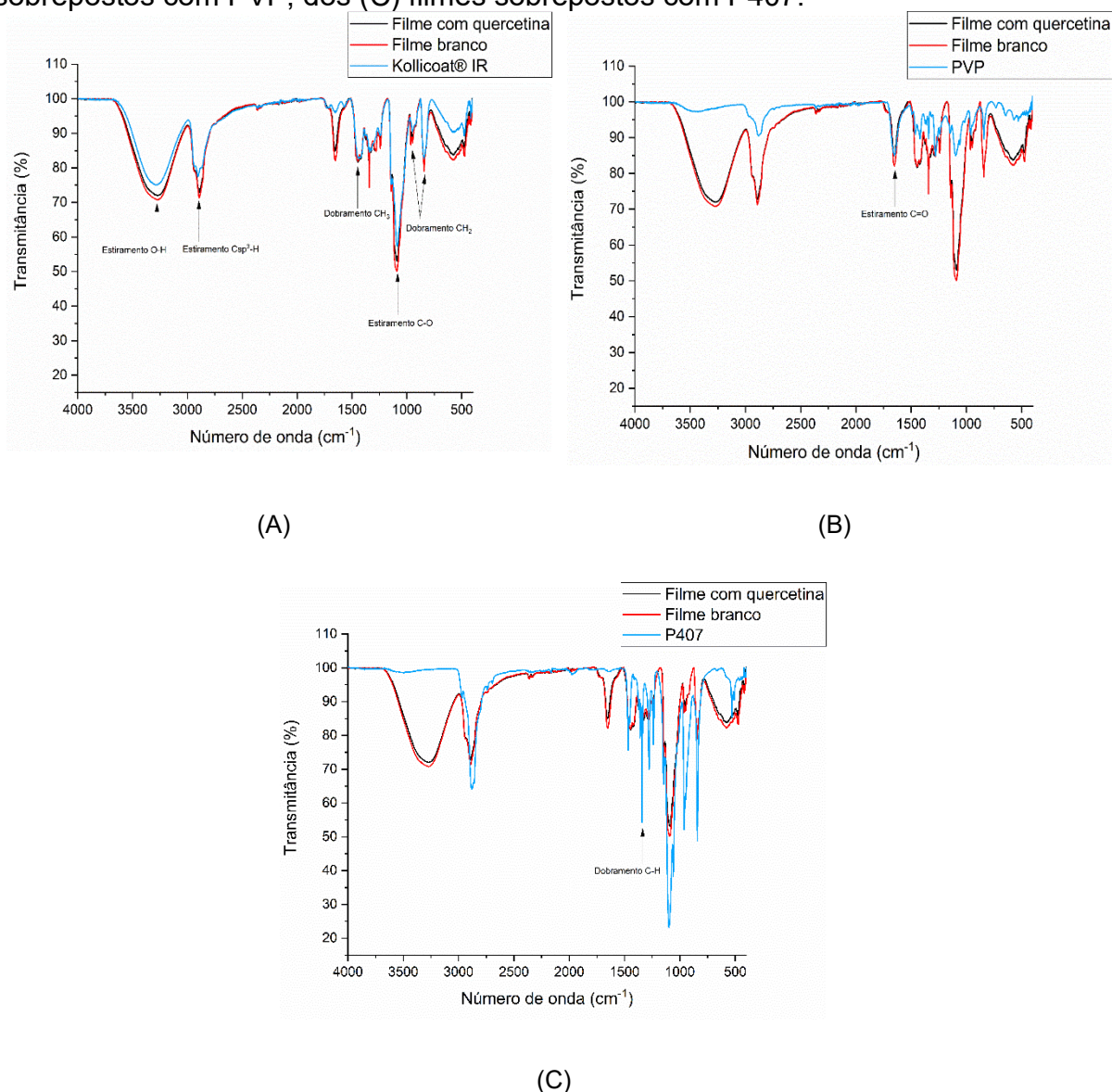
Fonte: o próprio autor.

### 2.3.3.3 FTIR

Os espectros de FTIR (Figura 2.7) obtidos para verificar como os componentes dos filmes podem afetar os grupos funcionais observados na amostra, mostraram que as bandas dos filmes (com e sem quercetina) não apresentam diferenças de bandas e/ou intensidades, e são predominantemente as mesmas do Kollicoat® IR, que é o polímero mais abundante.

Na Figura 2.7 observa-se bandas largas e intensas centradas em  $3650-3000\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento O-H de álcoois. Uma banda em  $2890\text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento  $\text{Csp}^3\text{-H}$ ; uma banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento C=O da carbonila do grupo funcional amida do polímero PVP; uma banda em  $1450\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao dobramento  $\text{CH}_3$ ; o sinal em  $1340\text{ cm}^{-1}$ , decorrente do dobramento C-H; o sinal intenso em  $1100\text{ cm}^{-1}$  é atribuído a vibração de estiramento C-O; e as bandas em  $960$  e  $840\text{ cm}^{-1}$ , são referentes ao dobramento  $\text{CH}_2$  (ABDELGHANY *et al.*, 2015; FOUAD *et al.*, 2011; MASOOD, ANSARI e AFZAL, 2021; PAVIA *et al.*, 2010).

**Figura 2.7** – FTIR dos (A) filmes sobrepostos com Kollicoat® IR, dos (B) filmes sobrepostos com PVP, dos (C) filmes sobrepostos com P407.

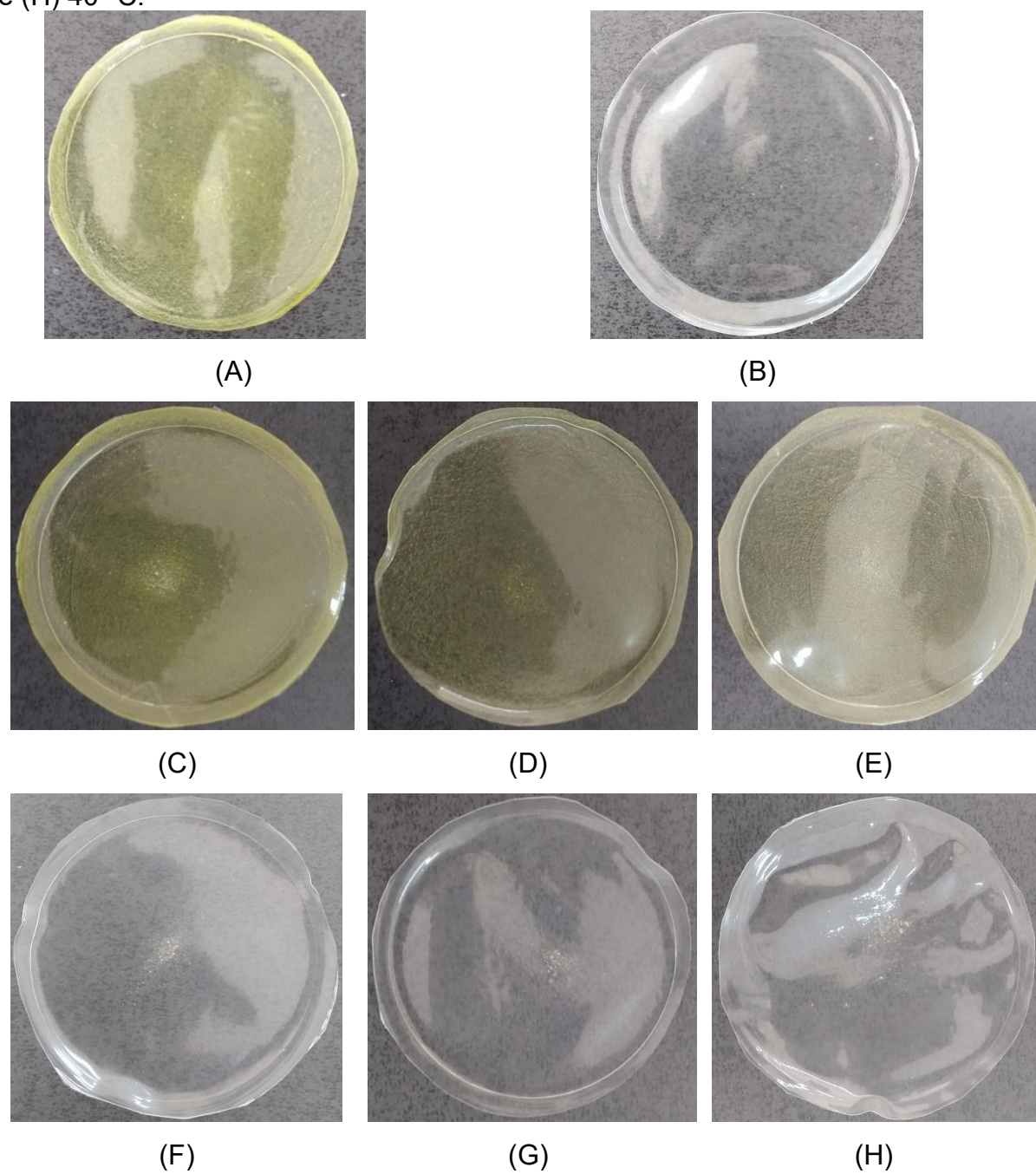


**Fonte:** o próprio autor.

### 2.3.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES POLIMÉRICOS

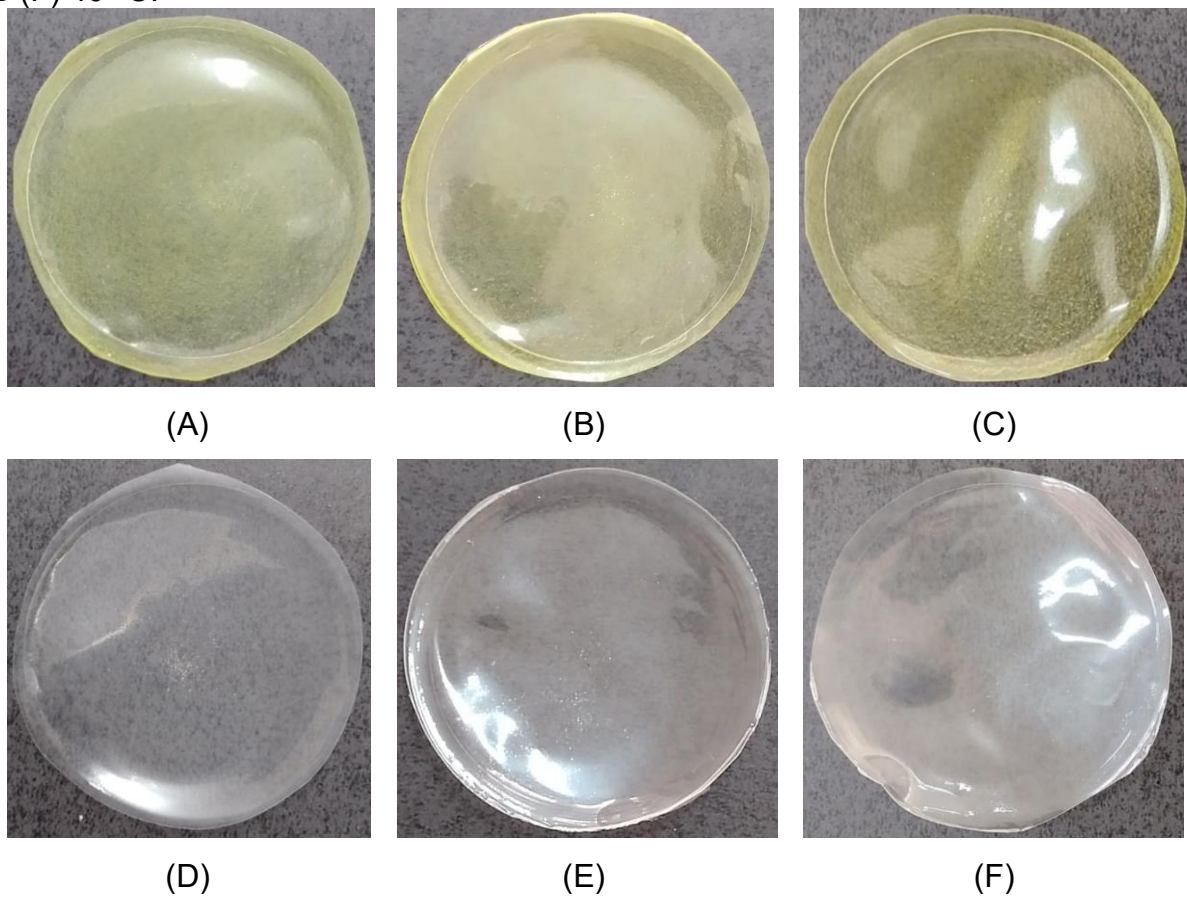
Os filmes estudados nas temperaturas de 4 e 25 °C não mudaram a aparência visual no período analisado (Figuras 2.8 a 2.13), os filmes armazenados em 40 °C apresentaram visualmente tom de amarelo mais escuro a partir de 14 dias e no tempo de 90 dias começaram a surgir manchas escuras, características de degradação.

**Figura 2.8** – Filmes (A) com quercetina e (B) branco (sem fármaco) no tempo zero da estabilidade; e filmes armazenados durante sete dias: com quercetina nas temperaturas de (C) 4, (D) 25 e (E) 40 °C e branco nas temperaturas de (F) 4, (G) 25 e (H) 40 °C.



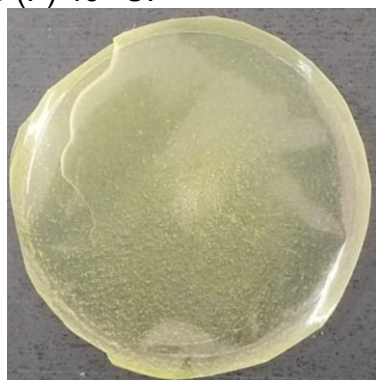
**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 2.9** – Filmes armazenados durante 14 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco (sem fármaco) nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.



Fonte: o próprio autor.

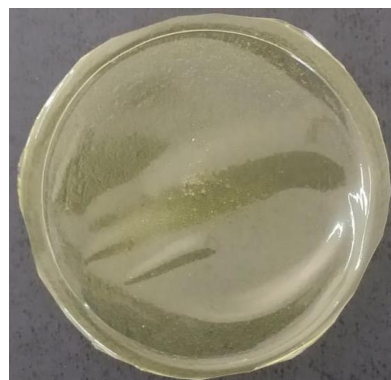
**Figura 2.10** – Filmes armazenados durante 30 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco (sem fármaco) nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.



(A)



(B)



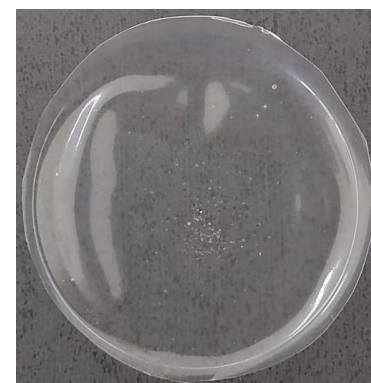
(C)



(D)



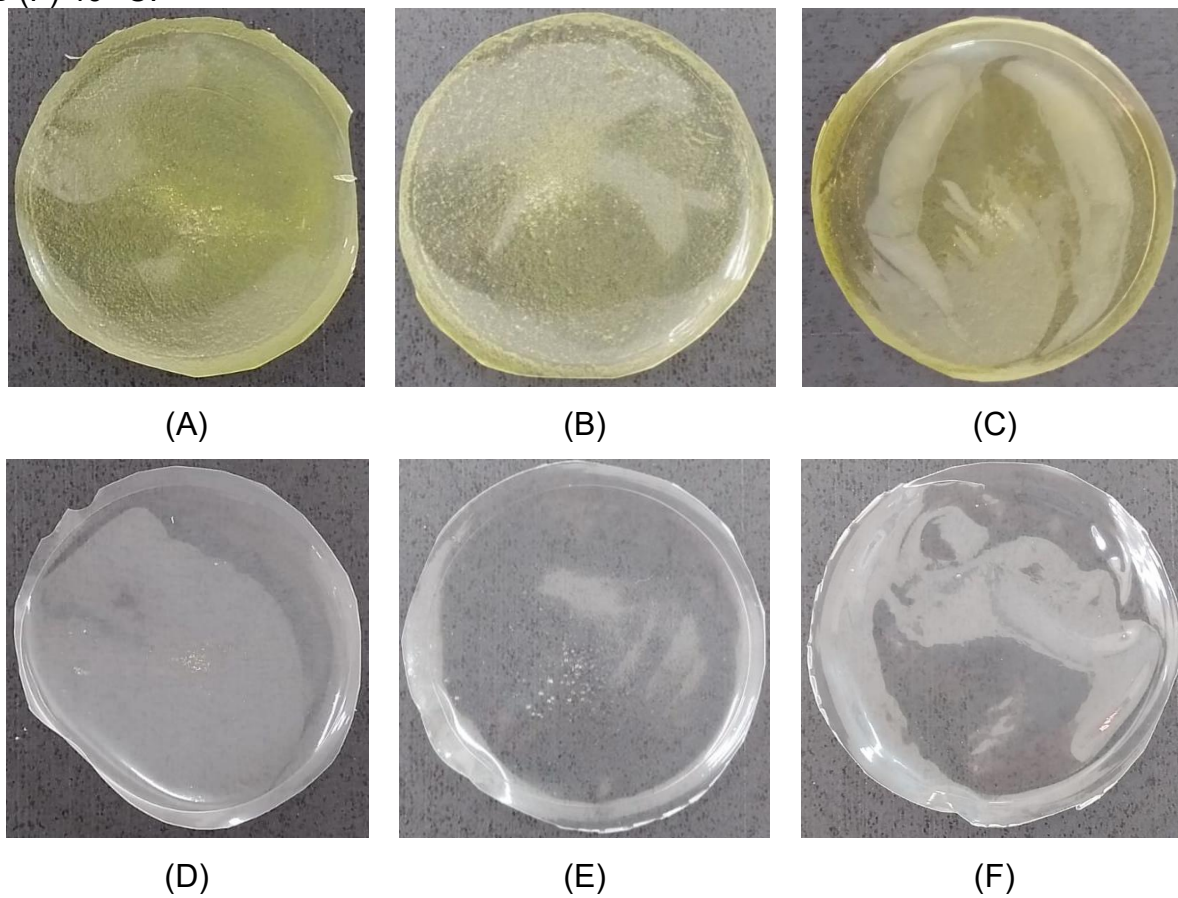
(E)



(F)

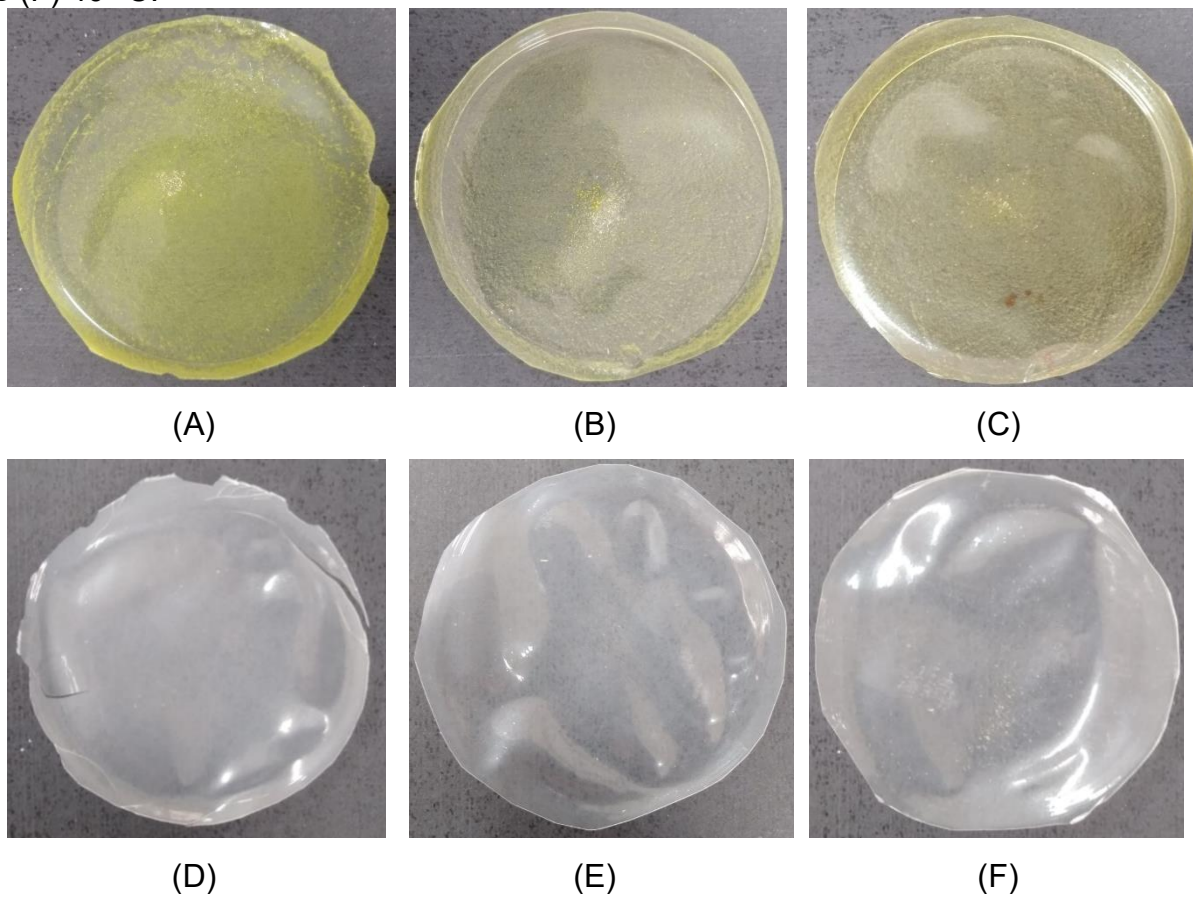
Fonte: o próprio autor.

**Figura 2.11** – Filmes armazenados durante 60 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco (sem fármaco) nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.



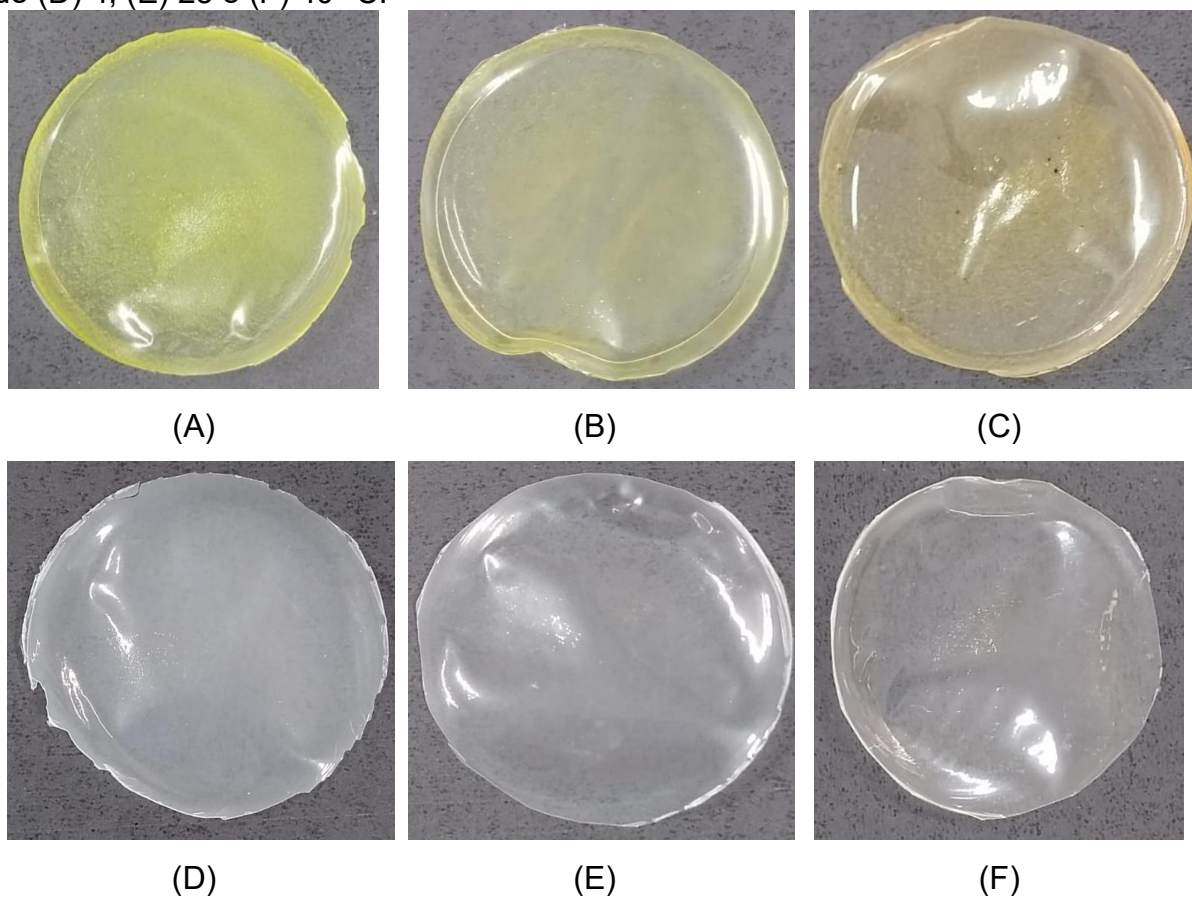
**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 2.12** – Filmes armazenados durante 90 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco (sem fármaco) nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.



**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 2.13** – Filmes armazenados durante 180 dias: com quercetina nas temperaturas de (A) 4, (B) 25 e (C) 40 °C e branco (sem fármaco) nas temperaturas de (D) 4, (E) 25 e (F) 40 °C.



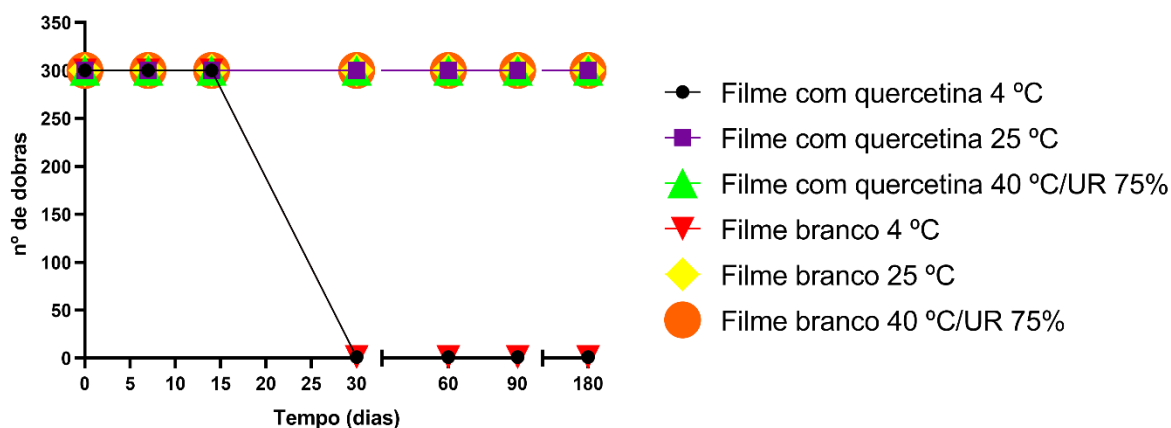
**Fonte:** o próprio autor.

Na Figura 2.14 A, observa-se que os filmes (com e sem quercetina) armazenados a 4 °C quebraram após 30 dias, enquanto os filmes armazenados em 25 °C e 40 °C/UR 75%, se mantêm resistentes a dobra. Os resultados de DSC (Figura 2.6) mostraram a Tg do material em -6 °C, o que justifica a quebra do filme polimérico armazenado em 4 °C.

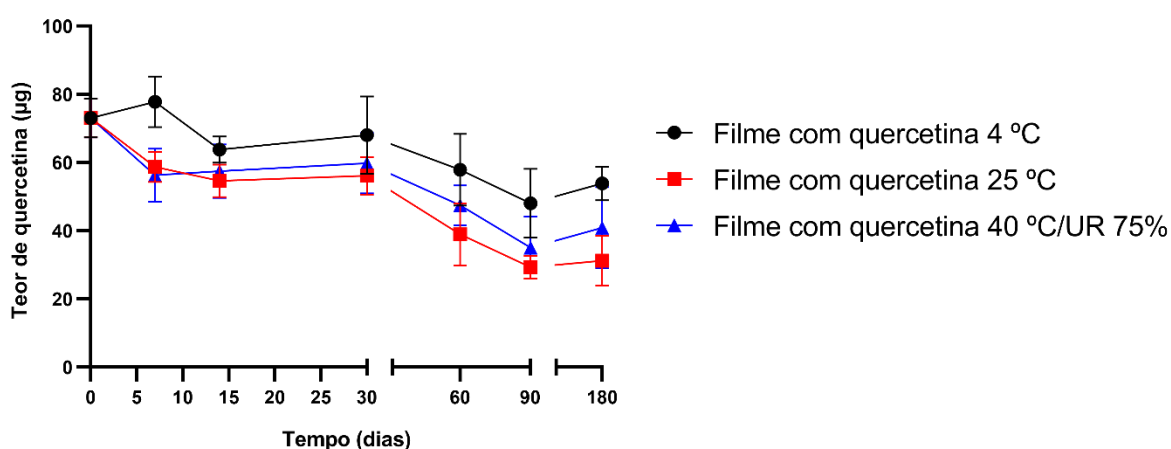
Na Figura 2.14 B observa-se que a concentração de quercetina permaneceu constante em trinta dias de armazenamento e no tempo de 180 dias apresentou degradação de 46,10; 68,82 e 59,16%. Casagrande *et al.* (2009) avaliaram quercetina pura e em duas formulações (creme) durante 365 dias, e constataram que a quercetina pura não degradou e que as formulações apresentaram baixa degradação de quercetina (menor que 50%) no período avaliado. Outros estudos apresentados na revisão de Wang *et al.* (2016) mostraram que a estabilidade da quercetina é afetada pelo pH, temperatura e tempo de armazenamento, corroborando

com a análise estatística que mostrou que o tempo de armazenamento e a temperatura afetam significativamente o teor de quercetina deste trabalho.

**Figura 2.14** – Panorama geral da estabilidade físico-química dos filmes poliméricos em relação a (A) resistência à dobra e (B) teor de quercetina.



(A)



(B)

**Fonte:** o próprio autor.

Os parâmetros da cinética de degradação de primeira ordem sob as condições de armazenamento em 4, 25 e 40 °C são apresentados na Tabela 2.5. Observa-se que a taxa de degradação ( $k$ ) foi menor para a formulação armazenada a 4 °C, seguido das amostras armazenadas em 40 e 25 °C. Esse resultado mostra que a temperatura interfere na degradação e sugere a interferência da umidade relativa (UR). O ambiente de 4 °C apresenta baixa UR, o de 40 °C possui elevada UR (75%) e o de 25 °C apresenta UR variada de acordo com as condições climáticas. Os

resultados de  $k$ ,  $t_{1/2}$  e  $t_{90}$  mostraram que é necessário a utilização de embalagem impermeável e com isolamento térmico adequado para garantir a estabilidade da formulação obtida.

**Tabela 2.5** – Parâmetros cinéticos de degradação do F8 sob as condições de armazenamento em 4, 25 e 40 °C.

	$k$ (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	$t_{90}$ (dias)	$R^2$
4 °C	0,0021	330,0	50,2	0,58
25 °C	0,0047	147,4	22,4	0,74
40 °C	0,0030	231,0	35,1	0,61

$k$  = constante de taxa de degradação da quercetina;  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $t_{90}$  = tempo em que 90% da concentração original da quercetina permanece inalterada;  $R^2$  = coeficiente de correlação.

**Fonte:** o próprio autor.

### 2.3.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FILME COM QUERCETINA

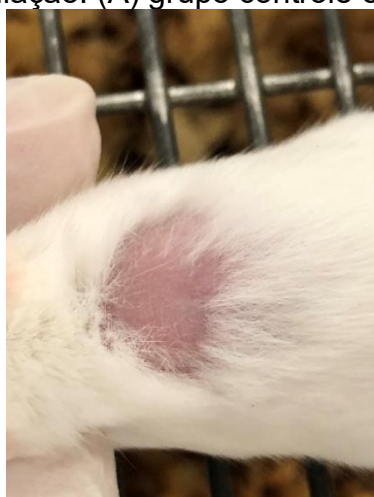
O filme escolhido no planejamento fatorial ( $n^{\circ}$  8), continha a concentração de 143,12  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina após solubilização com DMEM. Nessa concentração, observou-se viabilidade celular de 62,32% das células Vero. A concentração utilizada é superior ao  $CC_{50}$  (28,90  $\mu\text{g/mL}$ ) da quercetina em sua forma livre, isso possivelmente acontece devido as interações intermoleculares da quercetina com os polímeros, observadas nos resultados de DSC; essas interações reduzem a disponibilidade da quercetina, sendo necessárias concentrações maiores para os efeitos de citotoxicidade e atividade viral. O filme branco também foi testado e não apresentou citotoxicidade.

Os ensaios antivirais realizados com os vírus HSV-1-KOS e HSV-1-AR mostraram que o filme branco não apresenta atividade antiviral e que nessa concentração (143,12  $\mu\text{g/mL}$ ) o filme com quercetina inibiu 100% do vírus HSV-1-KOS e 8,12% do vírus HSV-1-AR. Desta forma, optou-se por realizar o experimento *in vivo* somente com o vírus HSV-1-KOS.

### 2.3.6 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FILME COM QUERCETINA

O filme com quercetina não apresentou irritação na pele dos camundongos (Figura 2.15), este resultado era esperado devido a viabilidade celular de 62,32% encontrada nos resultados da citotoxicidade *in vitro*.

**Figura 2.15** – Resultados da irritação dérmica após oito dias de aplicação da formulação: (A) grupo controle e (B) grupo teste.



(A)

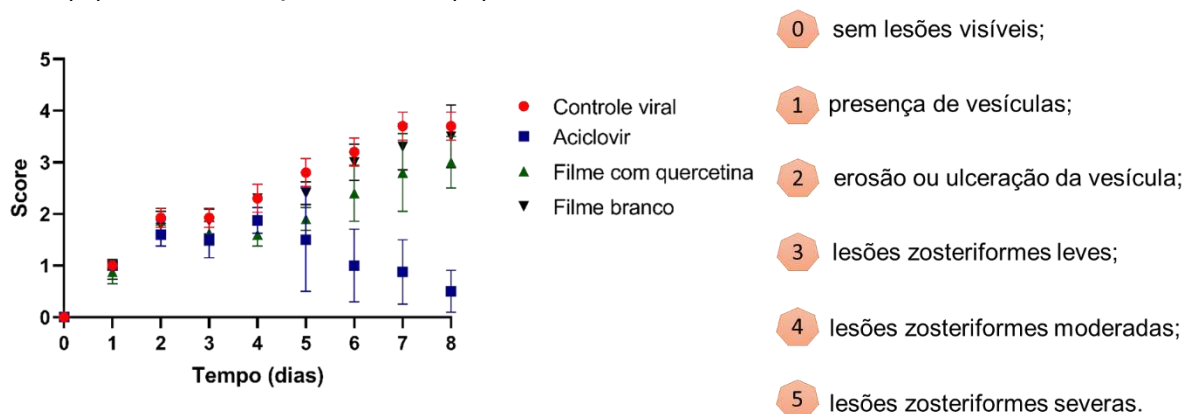


(B)

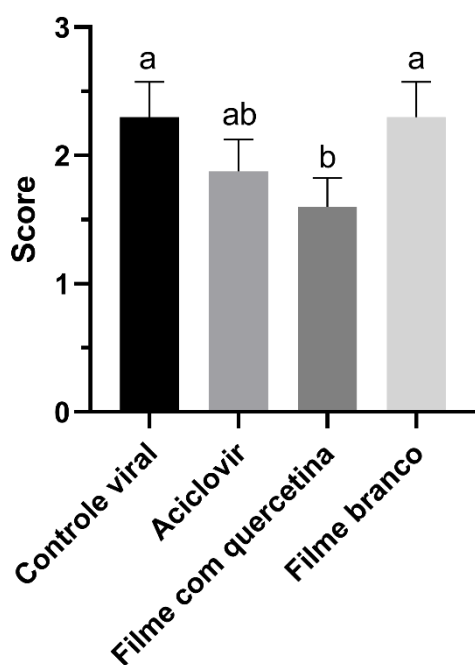
**Fonte:** o próprio autor.

Os ensaios antivirais *in vivo* também corroboram com os ensaios *in vitro*, sugerindo que a quercetina atua nos processos iniciais da replicação viral, como no estágio de adsorção do vírus na célula. Nas Figuras 2.16 a 2.20, observa-se que até o quarto dia de tratamento a quercetina apresenta resultados melhores que o aciclovir, que é o fármaco de primeira escolha para o tratamento das feridas de herpes.

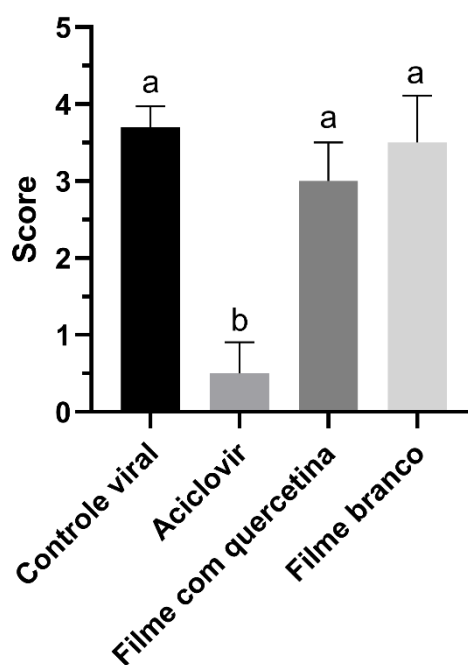
**Figura 2.16** – Resultados da atividade antiviral do filme com quercetina: (A) panorama geral, (B) análise do quarto dia e (C) análise do oitavo dia.



(A)



(B)

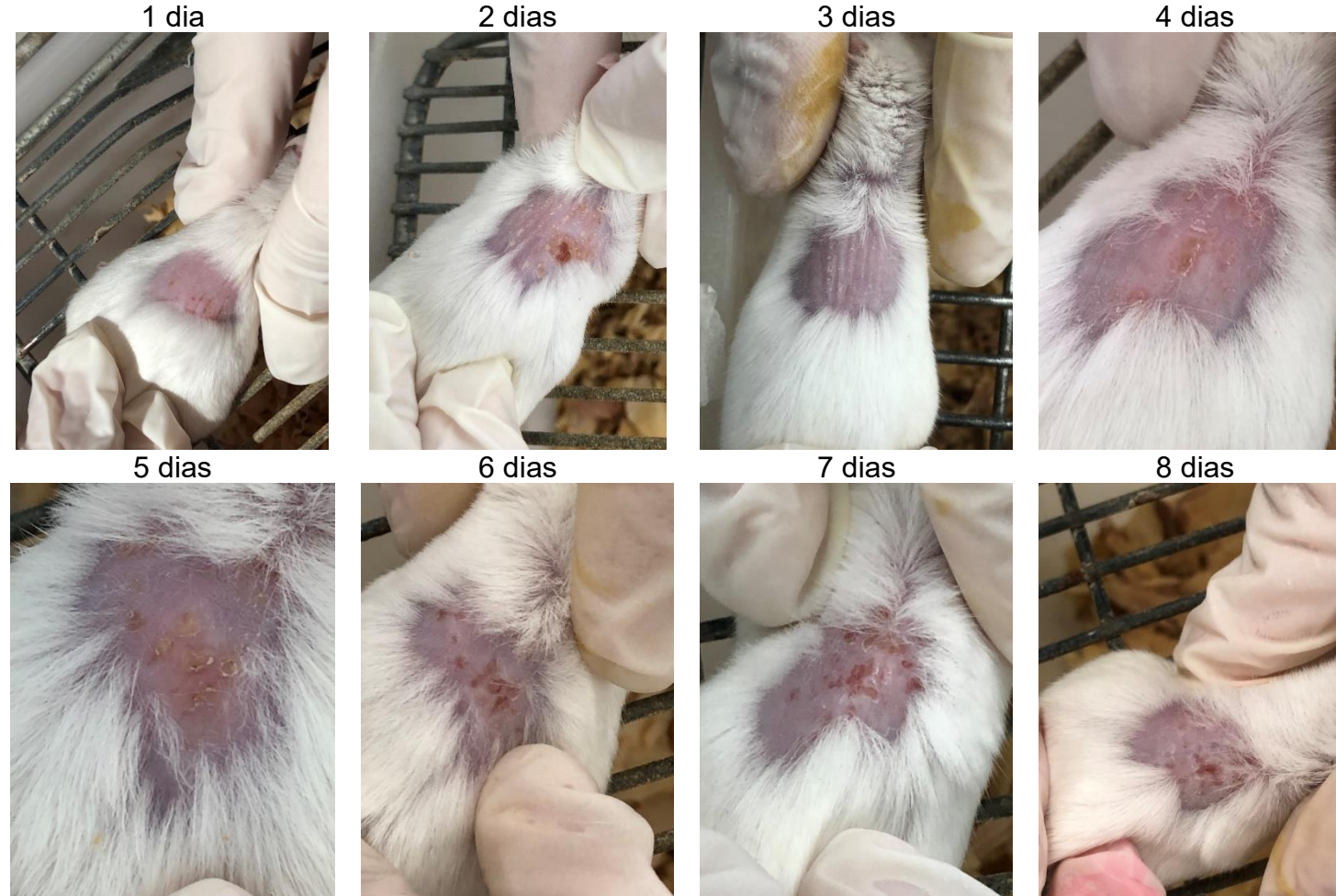


(C)

As letras diferentes representam diferença estatística  $p < 0,05$ , e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas reais.

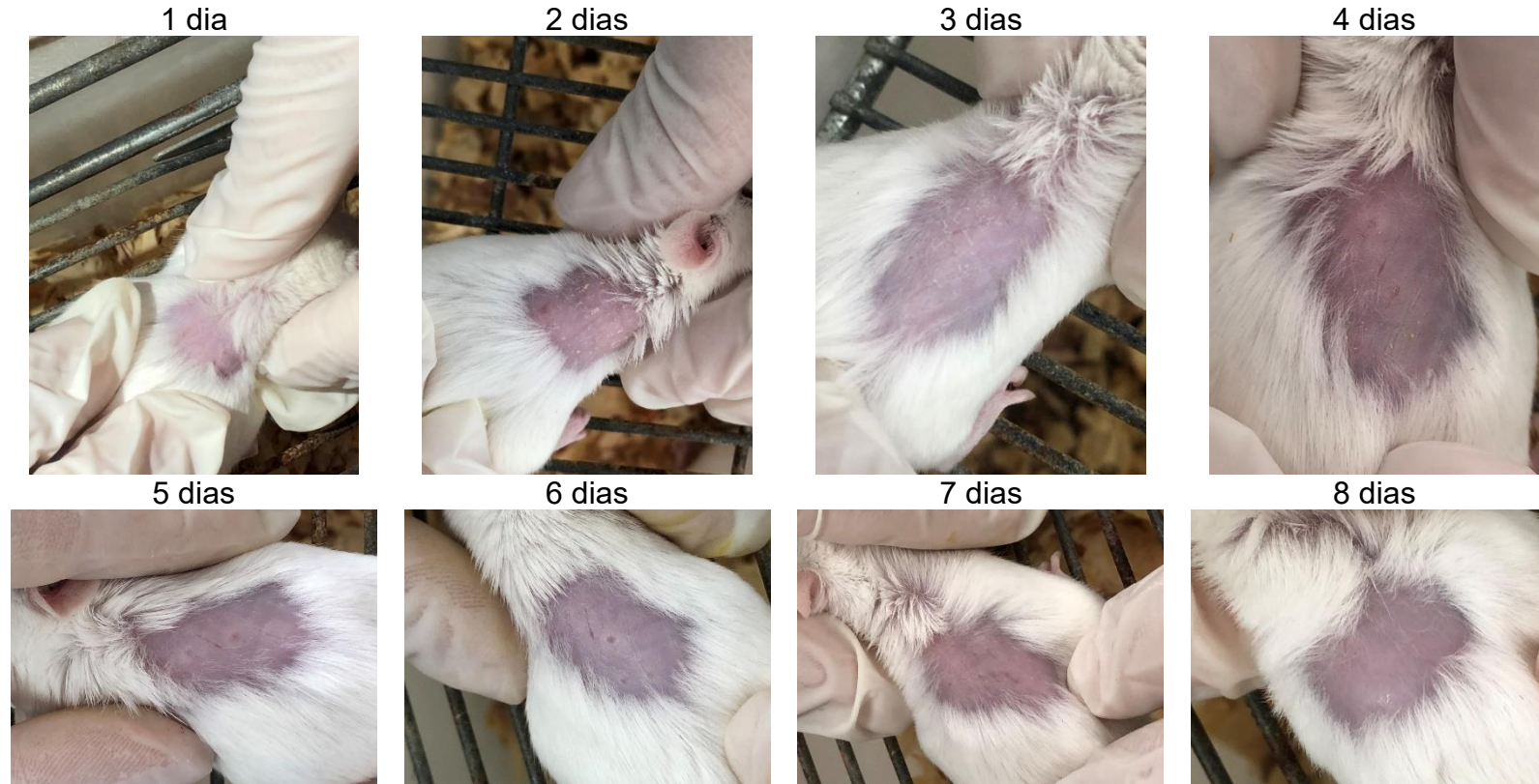
**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 2.17** – Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo controle viral ao longo dos oito dias de tratamento.



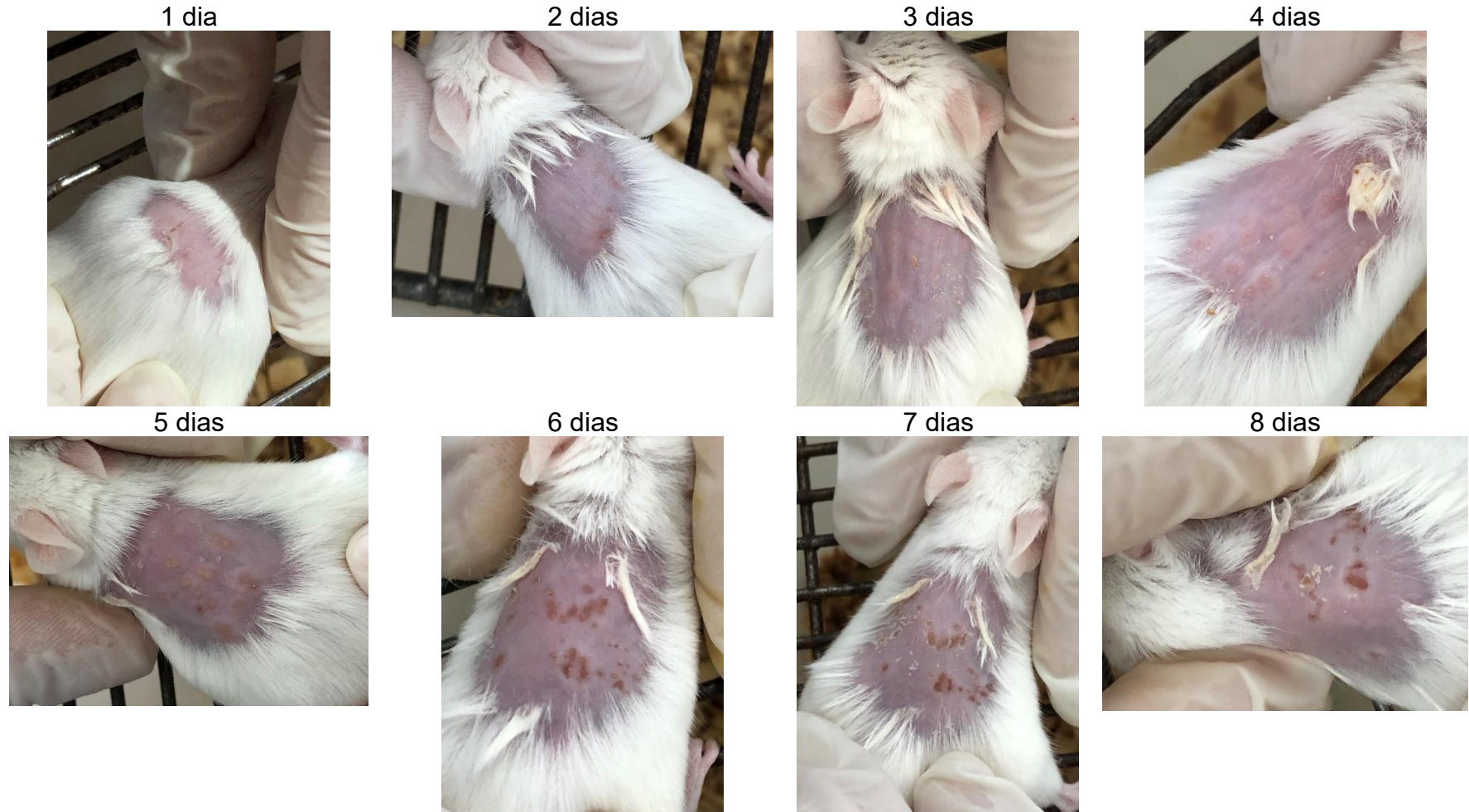
Fonte: o próprio autor.

**Figura 2.18** – Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo tratado com aciclovir (controle positivo) ao longo dos oito dias de tratamento.



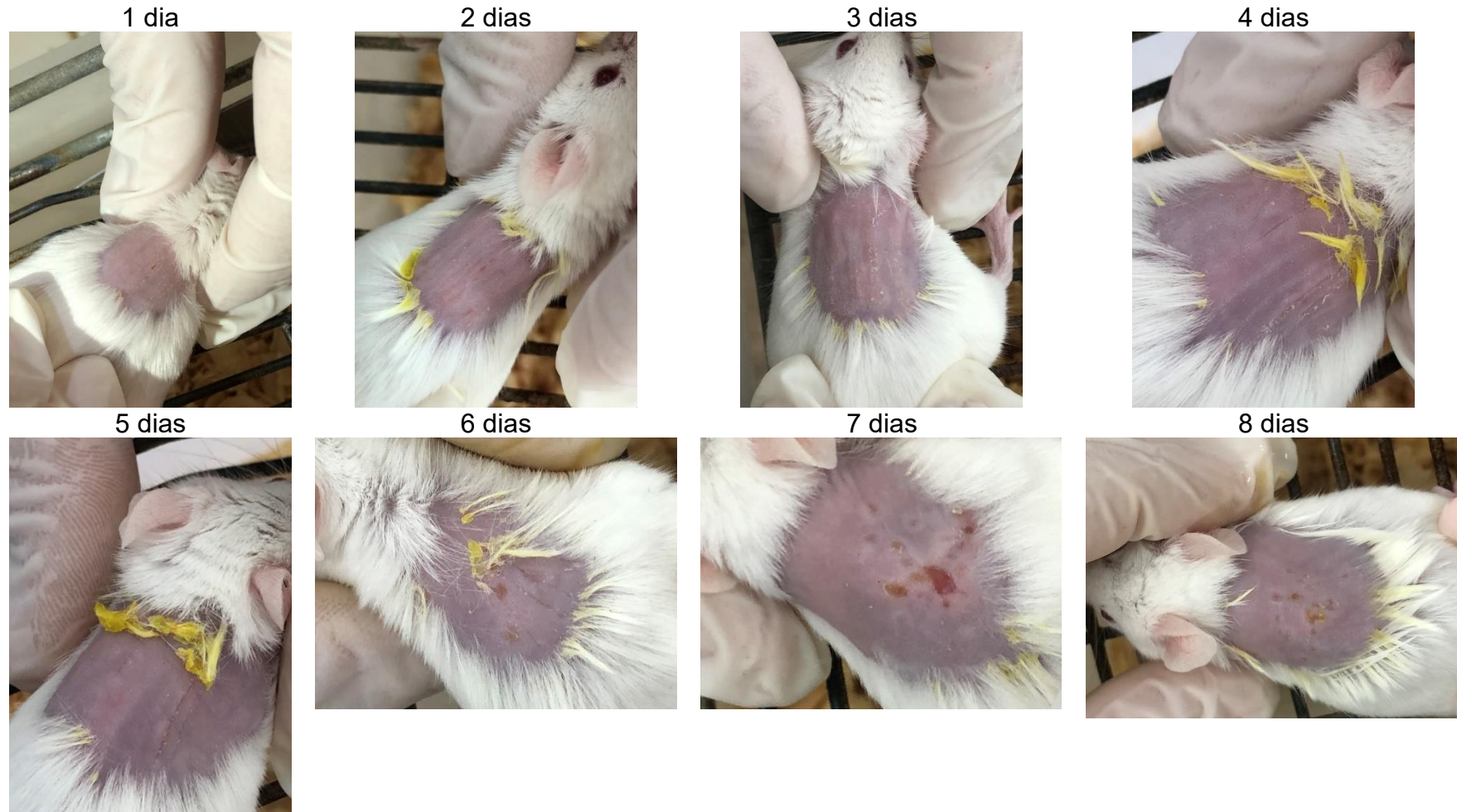
Fonte: o próprio autor.

**Figura 2.19** – Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo tratado com filme branco ao longo dos oito dias de tratamento.



**Fonte:** o próprio autor.

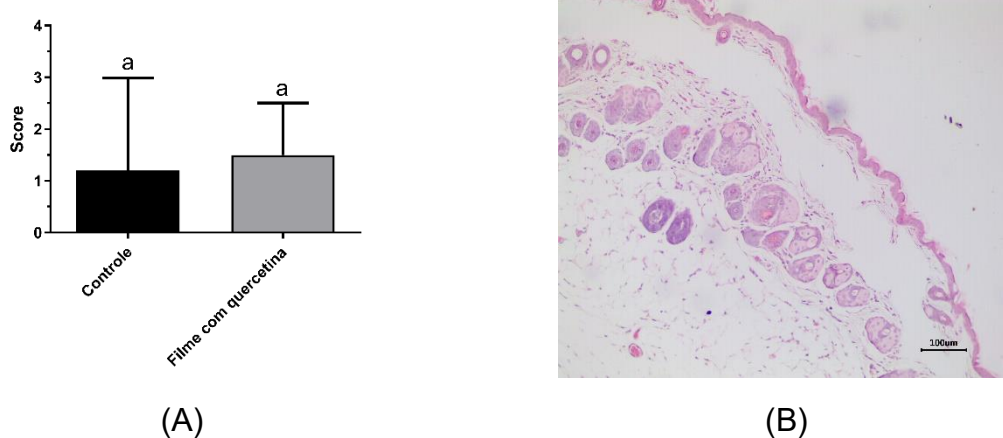
**Figura 2.20** – Acompanhamento da análise visual dos animais do grupo tratado com filme com quercetina ao longo dos oito dias de tratamento.



Fonte: o próprio autor.

Os resultados da irritação dérmica na análise histológica realizado no oitavo dia, comprovaram que a quercetina não causou alterações na pele dos camundongos (Figura 2.21).

**Figura 2.21** – Resultados da irritação dérmica: (A) score de irritação dérmica e (B) imagem representativa da análise histológica da pele dos animais tratados com filme com quercetina corada em Hematoxilina e Eosina (grupo teste).



As letras diferentes representam diferença estatística  $p < 0,05$ , e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas reais.

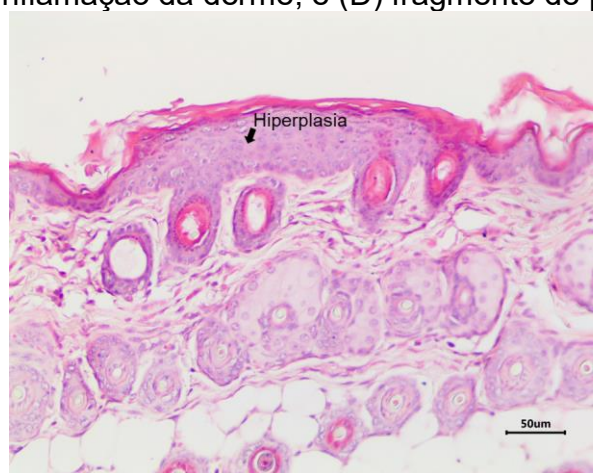
**Fonte:** o próprio autor.

No oitavo dia da análise antiviral, foram coletadas as peles dos camundongos para realizar a análise histológica e foram observadas alterações leves (hiperqueratinização e hiperplasia epidérmica), moderadas (inflamação da epiderme, inflamação da derme e de inflamação da hipoderme); e em poucos animais, alterações severas (necrose da epiderme e necrose da derme)). Destas, as que apareceram com mais ocorrência (maior número de animais) foram hiperplasia epidérmica, inflamação da epiderme e inflamação da derme, que estão ilustradas na Figura 2.22. Observa-se o espessamento da epiderme (hiperplasia) na Figura 2.22 A; nota-se na inflamação da epiderme (Figura 2.22 B) fenda em junção derme-epiderme (*cleft*) e linfócitos; e na inflamação da derme verifica-se a presença de edema e infiltrado inflamatório (Figura 2.22 C). Essas três alterações são comuns em casos de infecção de herpes e podem ser induzidas pela síntese de marcadores de inflamação produzidos pelo organismo (NOVAK *et al.*, 2021; SASSO *et al.*, 2020).

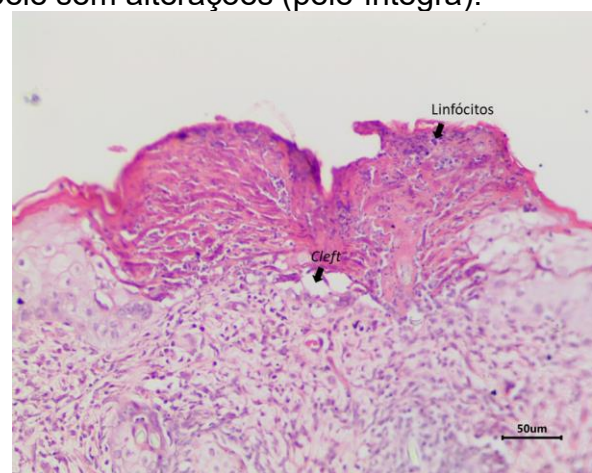
Os resultados das análises histológicas foram semelhantes aos

resultados observados no score macrocópico (Figura 2.16), no entanto, eles são mais otimistas em relação a quercetina (Figura 2.23), mostrando que apesar da quercetina não ser tão eficiente quanto o aciclovir, ela ameniza os processos inflamatórios causados pela infecção do vírus HSV-1.

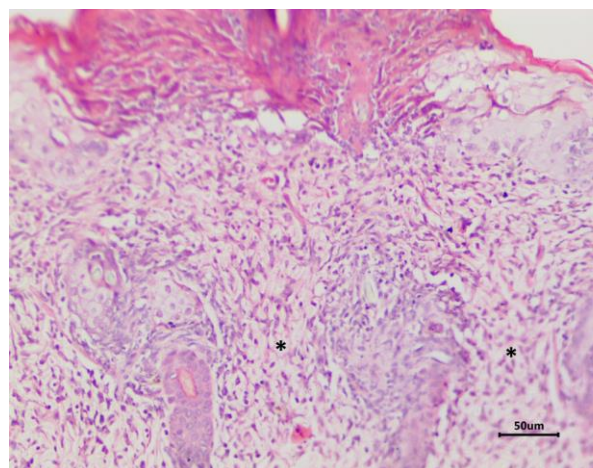
**Figura 2.22** – Alterações recorrentes observadas na pele de camundongos infectados com o vírus HSV-1: (A) hiperplasia epidérmica, (B) inflamação da epiderme e (C) inflamação da derme; e (D) fragmento de pele sem alterações (pele íntegra).



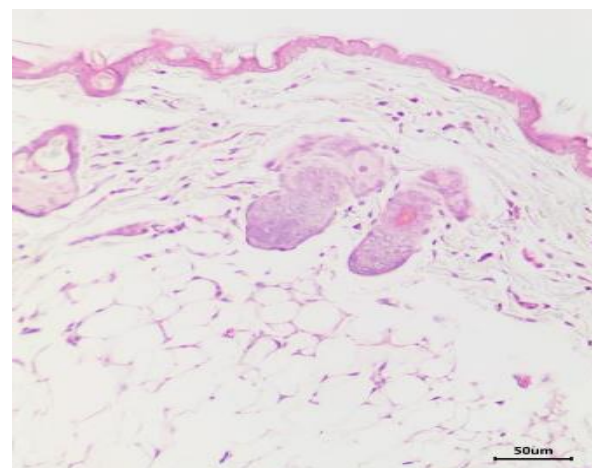
(A)



(B)



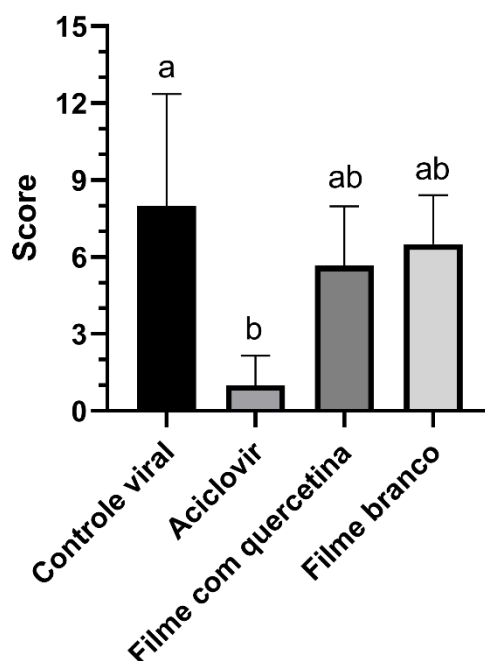
(C)



(D)

\*Edema e infiltrado inflamatório (Figura 2.20C).  
**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 2.23** – Resultados quantitativos da análise histológica da atividade antiviral realizados no oitavo dia.



Fonte: o próprio autor.

## 2.4 CONCLUSÃO

A quercetina apresentou baixa citotoxicidade ( $CC_{50}$  28,90  $\mu\text{g/mL}$ ) e atividade frente ao herpes simplex tipo 1 em baixas concentrações ( $IC_{50}$  1,80  $\mu\text{g/mL}$  para HSV-1-KOS e 1,08  $\mu\text{g/mL}$  para HSV-1-AR), se tornando um agente ativo promissor no tratamento dos processos inflamatórios causados por esse vírus.

Os filmes poliméricos obtidos são seguros (atóxicos) e foram eficazes frente ao HSV-1-KOS nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, principalmente no início do processo infeccioso, como foi evidenciado até o quarto dia de tratamento. Além disso, essas formulações apresentaram aspecto homogêneo; propriedades elásticas; pH semelhante ao da pele humana, o que ajuda a reduzir o risco de possíveis irritações dérmicas; são estáveis físico-quimicamente; liberaram o agente ativo e apresentaram bioadesividade, característica essa que contribui com o aumento da adesão de pacientes ao tratamento pela facilidade de uso e por não precisar reaplicar a formulação várias vezes ao longo do dia.

Dessa forma, esse trabalho trouxe inovação com a apresentação de

nova formulação para o tratamento do herpes simplex tipo 1 utilizando um princípio ativo de fácil obtenção.

Uma proposta para trabalhos futuros, é o estudo de possível sinergismo entre a quercetina e o aciclovir, melhorando a resposta de ambos os agentes ativos no tratamento dessa doença. Assim como testar a forma farmacêutica em outros vírus da família *Herpesviridae*, como o herpes zóster.

## REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, A. M. *et al.* Combined DFT/FTIR structural studies of monodispersed PVP/Gold and silver nano particles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 646, p. 326–332, 2015.

ALVES, T. F. R. *et al.* Crystalline Ethylene Oxide and Propylene Oxide Triblock Copolymer Solid Dispersion Enhance Solubility, Stability and Promoting Time-Controllable Release of Curcumin. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 12, p. 65–74, 2018.

ANIL KUMAR, C. R. *et al.* Investigation into the failure of XLPE cables due to electrical treeing: a physico chemical approach. **Polymer Testing**, v. 22, p. 313–318, 2003.

ASTM. **ASTM E96: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. [s.l: s.n.].

BADSHAH, S. L. *et al.* Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 1–29, 2021.

BARACAT, M. M. *et al.* Preparation and characterization of microcapsules based on biodegradable polymers: Pectin/casein complex for controlled drug release systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 2, p. 364–372, 2012.

BIDONE, J. *et al.* Antiherpes Activity and Skin/Mucosa Distribution of Flavonoids from *Achyrocline satureioides* Extract Incorporated into Topical Nanoemulsions. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

BRUSCHI, M. L. *et al.* Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: *In Vitro* Release Kinetics , Syringeability , Rheological , Textural , and Mucoadhesive Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074–2089, 2007.

BUXBAUM, S. *et al.* Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: What has changed? **Medical Microbiology and Immunology**, v. 192, n. 3, p. 177–

181, 2003.

CARDOZO, F. T. G. S. *et al.* *In vivo* anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of agaricus brasiliensis mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2541–2549, 2013.

CASAGRANDE, R. *et al.* Method validation and stability study of quercetin in topical emulsions. **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1939–1942, 2009.

CAZÓN, P.; VÁZQUEZ, M.; VELAZQUEZ, G. Novel composite films based on cellulose reinforced with chitosan and polyvinyl alcohol: Effect on mechanical properties and water vapour permeability. **Polymer Testing**, v. 69, p. 536–544, 2018.

CHIANG, L. C. *et al.* *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 194–198, 2003.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

COUTO, R. O. DO *et al.* Combining amino amide salts in mucoadhesive films enhances needle-free buccal anesthesia in adults. **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 205–215, 2017.

DEMIR, S. *et al.* Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV. **Antiviral Therapy**, v. 25, n. 7, p. 353–363, 2020.

DEZENGRINI, R. *et al.* Atividade de três drogas antivirais sobre os herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 em cultivo celular. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 10, p. 855–860, 2010.

DI PETRILLO, A. *et al.* Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 266–278, 2021.

DIMITROVA, M. *et al.* Color Stability Determination of CAD/CAM Milled and 3D Printed Acrylic Resins for Denture Bases: A Narrative Review. **Journal of Composites Science**, v. 6, p. 1–12, 2022.

FOUAD, E. A. *et al.* Technology evaluation: Kollicoat IR. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 5, p. 693–703, 2011.

GARCÍA, M. C. *et al.* Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 75–86, 2017.

GONSHO, A. *et al.* Controlled (trans) dermal delivery of an antiviral agent (acyclovir). I: An *in vivo* animal model for efficacy evaluation in cutaneous HSV-1 infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 183–194, 1990.

GUIDI, A. C. *et al.* Stem bark extract of *Poincianella pluviosa* incorporated in polymer film: Evaluation of wound healing and anti-staphylococcal activities. **Injury**, v. 51, n. 4, p. 840–849, 2020.

GUO, R. *et al.* Bioadhesive film formed from a novel organic-inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 3, p. 574–583, 2011.

GUPTA, M. S. *et al.* Orodispersible films: Conception to quality by design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 178, p. 113983, 2021.

HUNG, P. Y. *et al.* *Houttuynia cordata* targets the beginning stage of herpes simplex virus infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2015.

JEMLI, M. EL *et al.* Radical-Scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

KATHE, K.; KATHPALIA, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 487–497, 2017.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

KROMBOLZ, R.; LIU, Y.; LUNTER, D. J. In-line and off-line monitoring of skin penetration profiles using confocal raman spectroscopy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2021.

LÊ, M. P. *et al.* Rationale of a loading dose initiation for hydroxychloroquine treatment in COVID-19 infection in the DisCoVeRy trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 9, p. 2376–2380, 2020.

LEE, S. *et al.* The anti-HSV-1 effect of quercetin is dependent on the suppression of TLR-3 in Raw 264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 40, n. 5, p. 623–630, 2017.

LI, X.-Q. *et al.* Mucoadhesive buccal films of tramadol for effective pain management. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 67, n. 3, p. 231–237, 2017.

LILLOTTE, T. D. *et al.* UV–VIS spectra as potential process analytical technology (PAT) for measuring the density of compressed materials: Evaluation of the CIELAB color space. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 603, p. 120668, 2021.

LIN, C. J. *et al.* Optimization of color design for military camouflage in CIELAB color space. **Color Research and Application**, v. 44, n. 3, p. 367–380, 2019.

LIU, P. *et al.* Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 748–756, 2013.

LUCENA, C. A. A. DE *et al.* Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. v. 27, p. 35–41, 2017.

LUNTER, D. J.; ROTTKE, M.; DANIELS, R. Oil-in-oil-emulsions with enhanced substantivity for the treatment of chronic skin diseases. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1515–1519, 2014.

ŁYSZCZARZA, E. *et al.* Orodispersible films containing ball milled aripiprazole-poloxamer®407 solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 575, p. 1–9, 2020.

MALI, A. J.; PATIL, S.; CHELLAMPILLAI, B. Investigation of polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer as an advanced functional polymer in the development of perampanel orodispersible film. **Journal of Polymer Research**, v. 29, p. 1–11, 2022.

MARANI, P. L.; BLOISI, G. D.; PETRI, D. F. S. Hydroxypropylmethyl cellulose films crosslinked with citric acid for control release of nicotine. **Cellulose**, v. 22, n. 6, p. 3907–3918, 2015.

MASOOD, Z.; ANSARI, M. T.; AFZAL, S. Combination of eudragit EPO with poloxamers for improved solubility and dissolution of Zafirlukast: An evaluation of solid dispersion formulations. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 5, p. 1923–1928, 2021.

MILLER, R. L. *et al.* Immunomodulation as a treatment strategy for genital herpes: Review of the evidence. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 443–451, 2002.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

NOVAK, N. *et al.* Herpes simplex virus 1 proteins can induce skin inflammation in an atopic dermatitis-like mouse model. **Experimental Dermatology**, p. 1–6, 2021.

OECD. Initial test (*in vivo* dermal irritation/corrosion test using one animal). **Guideline for the Testing of Chemicals**, v. 1, n. 404, p. 1–13, 2002.

OMS. **Herpes simplex virus**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>>.

OSHIRO JUNIOR, J. A. *et al.* Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 4th. ed. Bellingham: Cengage Learning, 2010.

PERECIN, D.; CARGNELUTTI FILHO, A. Efeitos por comparações e por

experimento em interações de experimentos fatoriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 68–72, 2008.

PEREIRA, G. G. *et al.* Polymeric films loaded with vitamin e and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

RECHENCHOSKI, D. Z. *et al.* Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

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

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

SAHA, N. *et al.* Polymer based bioadhesive biomaterials for medical application—a perspective of redefining healthcare system management. **Polymers**, v. 12, p. 1–19, 2020.

SALEHI, S.; BODDOHI, S. Design and optimization of kollicoat® IR based mucoadhesive buccal film for co-delivery of rizatriptan benzoate and propranolol hydrochloride. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 230–244, 2019.

SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M. *et al.* Cellulose nanofibers from olive tree pruning as food packaging additive of a biodegradable film. **Foods**, v. 10, p. 1–15, 2021.

SAND, L. VAN DE *et al.* Antiviral active compounds derived from natural sources against herpes simplex viruses. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1–18, 2021.

SASSO, B. M. *et al.* Herpes simplex virus mucocutaneous tumoural lesions – Systematic review. **Journal of Clinical Virology**, v. 123, p. 1–7, 2020.

SETYAWAN, D. *et al.* Co-crystallization of quercetin and malonic acid using solvent-drop grinding method. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 6, p. 997–1002, 2018.

SICURELLA, M. *et al.* Natural Polyphenol-Containing Gels against HSV-1 Infection: A Comparative Study. **Nanomaterials**, v. 12, n. 2, 2022.

SIDDIQUI, M. H. BIN *et al.* Preparation and evaluation of sublingual film of ketorolac tromethamine. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1–8, 2022.

SKALSKY, B.; PETEREIT, H.-U. Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms. In: FELTON, L. A. (Ed.). **Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms**. Fourth ed. Albuquerque, NM, USA: CRC Press, 2017. p. 207–245.

SOUZA, L. K. *et al.* Ureasil-polyether hybrid film-forming materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 156–161, 2013.

TAKEUCHI, Y. *et al.* Mechanical characteristics of orally disintegrating films: Comparison of folding endurance and tensile properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, p. 1–10, 2020.

VALE, D. L. *et al.* A topical formulation containing quercetin-loaded microcapsules protects against oxidative and inflammatory skin alterations triggered by UVB irradiation: enhancement of activity by microencapsulation. **Journal of Drug Targeting**, v. 29, n. 9, p. 983–997, 2021.

VECCHI, C. F. *et al.* Mucoadhesive polymeric films comprising polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, and poloxamer 407 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 26, n. 2, p. 138–149, 2020.

WANG, W. *et al.* The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 21–38, 2016.

WANG, Y. *et al.* Formulation development and visualized investigation of temperature-resistant and salt-tolerant surfactant-polymer flooding to enhance oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 174, p. 584–598, 2019.

WHITLEY, R. J. Herpesviruses. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th. ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

ZAKARYAN, H. *et al.* Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of Virology**, v. 162, n. 9, p. 2539–2551, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

ZHU, S.; VIEJO-BORBOLLA, A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2670–2702, 2021.

ZUO, J. *et al.* Evaluation of the DDSolver software applications. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

### Capítulo 3

---

## DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS CONTENDO RAMNOLIPÍDEOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TÓPICA ANTIACNE

---

## RESUMO

A acne é uma doença que atinge a maior parte da população mundial, principalmente adolescentes e jovens adultos. Uma de suas causas é a presença de bactérias como a *Cutibacterium acnes* que fazem parte da microbiota natural da pele. Os tratamentos tópicos consistem na utilização de redutores de comedões, anti-inflamatórios e antibióticos, todavia, este seleciona cepas resistentes. Alternativas aos antibióticos utilizados são os biocompostos que possuem atividade antimicrobiana como os biossurfactantes que são produzidos por bactérias. Uma forma inovadora de aplicação desses compostos são os filmes poliméricos bioadesivos que aderem a pele e liberam, por via tópica, o princípio ativo. O objetivo do trabalho foi desenvolver filmes poliméricos bioadesivos contendo ramnolipídeos como produtos antiacne e avaliar a qualidade, eficácia e segurança da forma farmacêutica. Os ramnolipídeos possuem grande potencial para serem utilizados no tratamento da acne por apresentarem atividade antimicrobiana contra o *C. acnes* em concentrações baixas e seguras (CIM de 15,63 µg/mL, CBM de 31,25 µg/mL e CC<sub>50</sub> de 181,93 µg/mL). Foram obtidos quatro filmes com diferentes concentrações de ramnolipídeos (0,0; 0,1; 0,2; e 0,3%, m/m) que foram avaliados quanto ao aspecto visual, variação de massa, espessura, densidade, solubilidade, pH, transmissão de vapor de água, propriedades mecânicas (resistência à dobra, força de bioadesão, módulo de Young, resistência à tração e alongamento na ruptura), microscopia eletrônica de varredura e infravermelho. Os resultados mostraram que essas formulações apresentaram aspecto homogêneo; propriedades mecânicas elásticas; pH semelhante ao da pele humana e bioadesividade. Os filmes poliméricos contendo ramnolipídeos foram eficazes frente ao *C. acnes*, no ensaio *in vitro*, nas três concentrações testadas, sendo o filme de maior concentração (0,3%, m/m), o mais promissor por apresentar maior atividade antimicrobiana. Dessa forma, o filme polimérico contendo ramnolipídeos possui potencial para ser utilizado no tratamento da acne.

**Palavras-chave:** biossurfactante, *C. acnes*, formulação, propriedades mecânicas.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A acne é uma doença inflamatória da unidade pilosebácea com causas multifatoriais (hiperqueratinização folicular, aumento da produção de sebo, desequilíbrio hormonal e infecção bacteriana externa) que atinge a maioria da população mundial, principalmente adolescentes e jovens adultos (BATUBARA, MITSUNAGA e OHASHI, 2009; RANJAN *et al.*, 2019; SHAHTALEBI *et al.*, 2018; VORA, SRIVASTAVA e MODI, 2018; XU *et al.*, 2018). Ela se apresenta na forma de espinhas, cravos, pápulas, pústulas ou nódulos, que se apresentam principalmente na face, tórax e costas (GUPTA *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2007). A bactéria relacionada com essa doença é Gram-positiva, anaeróbia e constitui a microbiota natural da pele: *Cutibacterium acnes* (anteriormente *Propionibacterium acnes*). Esta bactéria hidrolisa sebo e libera lipases, proteases, hialuronidases e fatores quimiotáticos que formam ácidos graxos insaturados capazes de induzir hiperqueratinização do epitélio folicular (BATUBARA, MITSUNAGA e OHASHI, 2009; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; SHAHTALEBI *et al.*, 2018).

Os compostos com atividade antiacne devem ser capazes de inibir o crescimento de *C. acnes*, inibir a atividade da lipase de *C. acnes* e inibir o estresse oxidativo (BATUBARA, MITSUNAGA e OHASHI, 2009). Comumente são utilizados antibióticos (eritromicina e clindamicina), retinóides (tretinoína, adapaleno e tazaroteno), peróxido de benzoíla e ácido azeláico, no tratamento tópico desta patogênese, no entanto, o uso destes medicamentos podem causar efeitos colaterais como irritação da pele (retinóides, peróxido de benzoíla e ácido azeláico), fotossensibilização (retinóides e ácido azeláico), dermatite alérgica (peróxido de benzoíla), e no caso dos antibióticos, aumento de cepas bacterianas resistentes (CHORACHOO, AMNUAIKIT e VORAVUTHIKUNCHAI, 2013; FOX *et al.*, 2016; MAHTO, 2017; PRASAD, 2016; WANG *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018).

Uma alternativa aos tratamentos convencionais é a utilização de produtos naturais que possuem compostos com atividade antimicrobiana, como os biossurfactantes, por exemplo, os ramnolipídeos, que podem ser utilizados no desenvolvimento de medicamentos antiacne eficazes, seguros e de baixo custo (VORA, SRIVASTAVA e MODI, 2018).

Biossurfactantes são surfactantes de origem biológica, produzidos

principalmente por microrganismos a partir de fontes renováveis, possuem boa biodegradabilidade, baixa toxicidade, alta aceitabilidade ecológica, eficácia em uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade (JADHAV *et al.*, 2018; LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009). Eles são classificados, de acordo com suas estruturas químicas, em glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e compostos poliméricos (LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009). Entre os glicolipídios, os ramnolipídeos são os biossurfactantes mais estudados, produzidos predominantemente por *Pseudomonas aeruginosa* (JADHAV *et al.*, 2018). Os ramnolipídeos são compostos de uma ou duas moléculas de ramnose e estão ligados a frações do ácido 3-hidroxicaprílico (LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009; VECINO *et al.*, 2017). Os ramnolipídeos têm impacto direto na superfície celular das bactérias, apresentando excelente atividade antimicrobiana (JADHAV *et al.*, 2018; LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009).

Uma forma de utilizar esse agente ativo é incorporá-lo em filmes poliméricos bioadesivos, atóxicos e biocompatíveis. Essas formulações são compostas de macromoléculas que apresentam a propriedade de aderir ao tecido biológico por meio de forças atrativas intermoleculares (AMMAR *et al.*, 2009; OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2015; REPKA e MCGINITY, 2000). Eles não precisam ser reaplicados com a mesma frequência de outras formas farmacêuticas utilizadas para via tópica, devido a propriedade de bioadesão desses materiais, são de fácil uso e possuem menor risco de irritação, além de permitirem a interrupção imediata do tratamento por algum efeito colateral (GARCÍA *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2011; KATHE e KATHPALIA, 2017; OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014).

Neste contexto, a presente tese tem como objetivo desenvolver filmes poliméricos bioadesivos contendo ramnolipídeos para serem utilizados como produtos antiacne.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 MATERIAIS

#### 3.2.1.1 Microrganismos

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ATCC® 15692™, pertencentes ao Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia Microbiana (LBBM) do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina (UEL). *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* ATCC® 11827™, pertencentes ao Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da UEL.

#### 3.2.1.2 Reagentes

Kollicoat® IR e polivinilpirrolidona (PVP), BASF® (São Paulo, São Paulo, Brasil); Glicerol, hidróxido de sódio e cloreto de sódio, Anidrol (Diadema, São Paulo, Brasil); cloreto de cálcio anidro, clorofórmio, metanol, triton X-10, Synth (Diadema, São Paulo, Brasil); ácido clorídrico, Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro); nitrato de magnésio hexahidratado, Dinamica (Indaiatuba, São Paulo, Brasil); meio de cultura RCM (*Reinforced Clostridial Medium*), papel indicador de pH, Merck (Darmstadt, Alemanha); meio de cultura LB (Luria-Bertani), Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA).

#### 3.2.1.3 Equipamentos

Espectrofotômetro de microplacas LMR-961, Loccus (Cotia, São

Paulo, Brasil); espectrofotômetro Evolution 60, Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA); centrífuga Universal 320 R, Hettich (Tuttlingen, Alemanha); agitador mecânico 713D, Fisatom (São Paulo, São Paulo, Brasil); estufa TE-393/2, Tecnal (Piracicaba, São Paulo, Brasil); incubadora B.O.D., SS Scientific (Londrina, Paraná, Brasil); analisador de textura TA-XT2plus, Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra); balança analítica AG204, Mettler Toledo (Barueri, São Paulo, Brasil); balança semi-analítica AD330, Marte (São Paulo, São Paulo, Brasil); Paquímetro Universal SOMET TCHECO; Sputter Coater SDC 050, BAL-TEC (Balzers, Liechtenstein); rotaevaporador (RE-301-AW RE301, Yamato, Santa Clara, California, USA); microscópio eletrônico de varredura Quanta 200, FEI-PHILIPS (Hillsboro, Oregon, United States); e espectrômetro FT-IR Vertex 70, Bruker (Atibaia, São Paulo, Brasil).

### 3.2.2 OBTENÇÃO DOS RAMNOLIPÍDEOS

O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL do meio LB (Luria-Bertani), inoculados com 3 a 5 colônias bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) e incubados a 37 °C por 12 h sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano durante o preparo do pré-inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (D.O.600 nm), e utilizado como inóculo quando a D.O.600 nm encontrar-se entre 0,6 e 0,8 (CONCEIÇÃO et al., 2020).

A produção dos ramnolipídeos foi realizada por cultivos submersos em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 100 mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) acrescentado de glicerol (3%, v/v). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121 °C/1 ATM, resfriados e inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2% (V/V). Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital a 37 °C/200 rpm. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação 2500 g por 25 min após nove dias de cultivo. Os sobrenadantes livres de células foram aquecidos à 80 °C por 45 minutos seguido de centrifugação (2500 g por 25 min) a fim de retirar proteínas. O sobrenadante resultante

foi acidificado adicionando-se ácido clorídrico até atingir pH 2 e, em seguida, armazenado em câmara fria por 5 dias. Após a incubação, o material foi centrifugado durante 25 minutos, 2.500 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os ramnolipídeos retidos no tubo foram submetidos a processo de extração com clorofórmio:metanol (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH) em proporção de 9:1, seguido de evaporação do solvente aquecimento a 60 °C e pressão negativa. O extrato contendo ramnolipídeos foi solubilizado em água e o pH acertado para 7 com adição de NaOH, congelado e liofilizado (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2020).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia Microbiana (LBBM) do Departamento de Bioquímica da UEL.

### 3.2.3 ANÁLISE *IN VITRO* ANTIMICROBIANA

Para este experimento foi utilizada a cultura de bactéria *Cutibacterium acnes* ATCC® 11827™, filotipo IA (AUBIN *et al.*, 2017). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi avaliada pelo método de microdiluição seriada em caldo, conforme o protocolo descrito pelo CLSI (CLSI, 2012). O ensaio de CIM foi realizado duas vezes na mesma placa para garantir reprodutibilidade dos testes. A placa foi incubada a 37 °C por 42 h em anaerobiose. O meio de cultura RCM em que o ensaio foi realizado foi o controle negativo do experimento, e o controle positivo representa o cultivo de *C. acnes*. O composto também foi testado como controle negativo no meio de cultura, a fim de visualizar se havia contaminação, após esterilização em luz ultravioleta, por 40 minutos. As concentrações testadas do composto foram de 250 a 1,95 µg/mL.

A fim de investigar a concentração bactericida mínima (CBM), houve gotejamento das amostras da placa de 96 poços em ágar RCM nas duas concentrações mais baixas em que não houve crescimento no teste CIM e a placa foi incubada a 37 °C por 42 h, em anaerobiose.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da UEL.

### 3.2.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXIDADE

A citotoxicidade do composto foi avaliada pela atividade hemolítica (IZUMI *et al.*, 2012). A amostra de ramnolípídeos foi esterilizada com lâmpada ultravioleta durante 40 minutos e o sangue foi obtido de doadores humanos saudáveis com consentimento voluntário, o qual foi aprovado pelo comitê de ética em humanos (CAAE 47661115.0.0000.5231, nº 1.268.019 – UEL). Posteriormente, os eritrócitos foram separados por centrifugação (5000 rpm, 4°C, 5 min) e inoculados a 3% (V/V) em placas de 96 poços contendo PBS (0,1 mol/L, pH 7,2) com as mesmas concentrações testadas no ensaio antimicrobiano (250 a 1,95 µg/mL). Utilizou-se Triton X-100 a 1% (V/V) como controle positivo e PBS como controle negativo. Após 3 h de incubação a 37 °C, os sobrenadantes foram lidos a 550 nm para avaliar a liberação de hemoglobina. Em seguida, com o uso de regressão linear, foi calculada a concentração do composto necessária para causar 50% de hemólise (CC<sub>50</sub>).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da UEL.

### 3.2.5 OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS

Utilizou-se Kollicoat® IR (3%, m/V) como matriz polimérica, glicerol (1,5%, m/m) como plastificante, polivinilpirrolidona (PVP) (6%, m/m) como adesivo e ramnolípídeos em diferentes concentrações (0,0; 0,1; 0,2; 0,3%, m/m) como agente ativo e surfactante. As concentrações dos polímeros foram definidas com base no planejamento fatorial do capítulo 2.

As dispersões aquosas iniciaram-se com adição do glicerol e do PVP à água ultrapura, sob agitação constante (500 rpm) em agitador mecânico por 30 min. Em seguida, o Kollicoat® IR foi adicionado lentamente e a agitação de 500 rpm foi mantida por 30 min. Posteriormente, os ramnolípídeos foram adicionadas à dispersão, e a agitação (500 rpm) foi mantida por 6 h.

As dispersões obtidas foram espalhadas em placas de policarbonato com área total de 28,27 cm<sup>2</sup> (60 mm de diâmetro), deixados em repouso durante 1 h

a temperatura ambiente para remoção de bolhas. Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa com circulação de ar (TE-393/2, Tecnal) mantida a temperatura de  $40 \pm 1$  °C e umidade relativa de  $40 \pm 2\%$  por 24 h. Após avaliação visual os filmes livres foram mantidos, até o momento do uso, em dessecador a temperatura ambiente, e umidade relativa de  $53 \pm 2, \%$  obtida com solução saturada de nitrato de magnésio hexahidratado (adaptado de COUTO *et al.*, 2017).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) do Centro de Pesquisa e Pós-graduação (CEPPOS) localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UEL.

### 3.2.6 ASPECTO VISUAL

Analisou-se as características macroscópicas das formulações a olho nu, e os filmes selecionados foram aqueles que apresentaram aspecto homogêneo e que não apresentaram partículas insolúveis, sinais de bolhas e quebras ou áreas frágeis. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.7 VARIAÇÃO DE MASSA

Oito amostras de filmes (16 mm de diâmetro) foram pesadas separadamente em balança analítica (AG204, Mettler Toledo), sendo determinadas as médias e o desvio padrão das massas obtidas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.8 ESPESSURA

Foram realizadas 10 medições aleatórias, em cinco filmes poliméricos (60 mm de diâmetro) com o auxílio de paquímetro, em diferentes partes dos filmes, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (adaptado de COUTO *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.9 DENSIDADE

Após a secagem e medição da espessura, foi determinada a densidade de cinco filmes (60 mm de diâmetro) utilizando-se a Equação (1) (adaptado de GUIDI *et al.*, 2020).

$$p = \frac{m}{A \times h} \quad (1)$$

Sendo  $p$  a densidade (g/mL);  $m$  a massa (g);  $A$  a área da superfície (cm<sup>2</sup>);  $h$  a espessura (cm) do filme.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

#### 3.2.10 pH DA SUPERFÍCIE

Três filmes (16 mm de diâmetro) foram intumescidos com água e o pH da superfície foi medido imediatamente após o gotejamento de água, com o uso de papel indicador de pH colocado sobre a superfície do filme intumescido (adaptado de LI *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.11 SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Três filmes (16 mm de diâmetro) foram colocados na estufa (TE-393/2, Tecnal) a 100 °C, durante 24 h, para determinação da porcentagem inicial de matéria seca. Após pesagem, as amostras foram imersas em água ultrapura e agitadas por 24 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram filtradas e secas novamente em estufa, 100 °C, durante 24 h, para determinar a massa da matéria seca que não dissolveu em água (adaptado de LUCENA *et al.*, 2017). A solubilidade foi determinada pela equação (2).

$$S = \frac{\text{Massa inicial} - \text{Massa final}}{\text{Massa inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.12 TRANSMISSÃO DE VAPOR DE ÁGUA (TVA)

A TVA foi determinada gravimetricamente, de acordo com as normas da ASTM E96-00 (ASTM, 2000). Três filmes (60 mm de diâmetro) foram colocados em células de permeação com uma abertura circular de 40 mm e selados de modo a garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme.

O conjunto foi colocado em dessecador a 25 °C contendo solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) que propiciou ambiente com 75% de UR, a célula de permeabilidade foi parcialmente preenchida com cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>, 0% UR) no seu interior. As células foram pesadas em balança semi-analítica (AD330, Marte) até a obtenção da taxa constante de ganho de massa. As análises foram realizadas em triplicata.

O coeficiente angular de cada reta foi calculado pela regressão linear no regime constante ( $R^2 > 0,99$ ) e a TVA foi calculada de acordo com a equação (3).

$$TVA = \frac{m}{t} \cdot \frac{e}{A \cdot \Delta p} \quad (3)$$

Sendo TVA a transmissão de vapor de água do filme; m/t o coeficiente angular da reta (g/s); e a espessura do filme (m); A a área do filme (m<sup>2</sup>); Δp a diferença de pressão entre o ambiente contendo CaCl<sub>2</sub> e o ambiente saturado com NaCl (2375,4 Pa).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.13 RESISTÊNCIA À DOBRA

Cinco filmes de cada lote foram repetidamente dobrados manualmente no mesmo local até 300 vezes ou até se quebrar, sendo, o número de vezes em que o filme pode ser dobrado, no mesmo local, sem se quebrar, o valor da resistência à dobra (LI *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do PPGCS do CEPPOS localizado no CCS da UEL.

### 3.2.14 AVALIAÇÃO, *EX VIVO*, DA FORÇA BIOADESIVA

#### 3.2.14.1 Preparação da Pele de Suíno

As peles para o teste foram obtidas por dissecação de orelhas de suínos, albinos e jovens, sendo esses recém abatidos. As peles foram lavadas com água, os pelos cortados e, posteriormente, essas foram dissecadas a fim de extrair a epiderme e a derme. Foram cortadas em tamanhos padronizados e adequados ao teste, sendo acondicionadas em filme plástico e papel alumínio e mantidas em congelador. No momento do uso, foram descongeladas à temperatura ambiente (LUNTER, ROTTKE e DANIELS, 2014). Os experimentos foram realizados no

Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos (LABSLiF) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 3.2.14.2 Análise

Utilizando o analisador de textura TA-XT2plus no modo de tensão, a força bioadesiva dos filmes (16 mm de diâmetro) foi avaliada *ex vivo*, por meio da força necessária para remover a pele (de suíno) a partir da formulação. A pele foi presa em um *vial* e esse foi fixado na *probe*. Na temperatura ambiente, uma amostra da formulação, previamente acondicionada, foi colocada sobre uma placa de petri, a qual foi abaixada até que a pele entre em contato com a superfície da amostra. Instantaneamente, uma força para baixo de 0,03 N foi aplicada por tempo definido de 30 s, para assegurar o contato íntimo entre a pele e a amostra. A *probe* foi levantada com velocidade constante de 10,0 mm/s e a força necessária para remover a pele da superfície da formulação foi determinada como o valor resultante da curva força pelo tempo. Para todas as formulações, as medidas foram realizadas em triplicata (BRUSCHI *et al.*, 2007). Os experimentos foram realizados no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM.

#### 3.2.15 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Cinco filmes foram cortados de modo a apresentarem 50 mm de comprimento e 20 mm de largura. Posteriormente, utilizando o analisador de textura TA-XT2plus com cela de carga de 5 kgf. Os filmes foram fixados com garras pneumáticas distanciadas inicialmente a 30,0 mm uma da outra e os parâmetros de resistência à tração, alongamento na ruptura e módulo de Young foram registrados durante a extensão do material a uma taxa de 0,80 mm/s. As análises foram realizadas no Laboratório de tecnologia do Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos da UEL.

### 3.2.16 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os filmes obtidos foram colocados em *stubs* e recobertos com uma camada de aproximadamente 15 nm de ouro utilizando um *Sputter Coater* (BAL-TEC, SDC 050). Posteriormente, a superfície das amostras foi analisada por Microscópio Eletrônico de Varredura, no aumento de 600x, operando com um feixe de elétrons de 25 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da UEL.

### 3.2.17 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Com o intuito de verificar como os componentes dos filmes podem afetar os grupos funcionais observados da amostra foram obtidos espectros de FTIR, por meio de ATR, na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se um espectrômetro FT-IR Vertex 70 da Bruker. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Prebiótica do Departamento de Química da UEL.

### 3.2.18 TESTE ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DOS FILMES

Os filmes contendo ramnolipídeos em diferentes concentrações (0,0%; 0,1%; 0,2% e 0,3%, m/m) foram esterilizados com lâmpada ultravioleta, 20 minutos de cada lado do filme polimérico. Posteriormente, os filmes foram colocados sobre ágar RCM inoculado com *C. acnes*. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C, por 42 h, em anaerobiose, e avaliou-se a existência ou ausência de halo de inibição, a fim de investigar a difusão deste ativo e sua atividade antibacteriana.

Analizou-se também a difusão em caldo RCM dessas formulações a fim de garantir que o filme sem ramnolipídeos (0,0%) não teve ação antibacteriana. Os filmes contendo ramnolipídeos em diferentes concentrações (0,0%; 0,1%; 0,2% e 0,3%, m/m) foram esterilizados com lâmpada ultravioleta, 20 minutos de cada lado do

filme polimérico. Posteriormente, os filmes foram colocados em microtubos contendo caldo RCM inoculado com *C. acnes*. Em seguida, os microtubos foram incubados a 37 °C, por 42 h, em anaerobiose, e avaliou-se a existência ou ausência de turbidez.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da UEL.

### 3.2.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) foram avaliadas pelo teste de teste *t-Student*, ou ANOVA de uma via (*one-way*), seguido do teste de Tukey para comparação múltipla utilizando o *software GraphPad Prism* (versão 7.0, *GraphPad Software*, Inc., San Diego, USA) e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ENSAIO ANTIMICROBIANO E DA CITOTOXICIDADE

Os resultados de CIM mostraram que não houve crescimento bacteriano visível entre as concentrações de 15,63 e 7,81  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 3.1), dessa forma, a concentração inibitória foi de 15,63  $\mu\text{g/mL}$ . Avaliou-se também a CBM nas menores concentrações que não houve crescimento bacteriano na placa de 96 poços, e constatou-se que a concentração bactericida foi de 31,25  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 3.1** – Resultados da concentração inibitória mínima dos ramnolipídeos frente a *C. acnes*.

Concentrações de ramnolipídeos em µg/mL testadas frente a <i>C. acnes</i>	Crescimento bacteriano observado
250	Não
125	Não
62,5	Não
31,25	Não
15,63	Não
7,81	Sim
3,91	Sim
1,95	Sim

**Fonte:** o próprio autor.

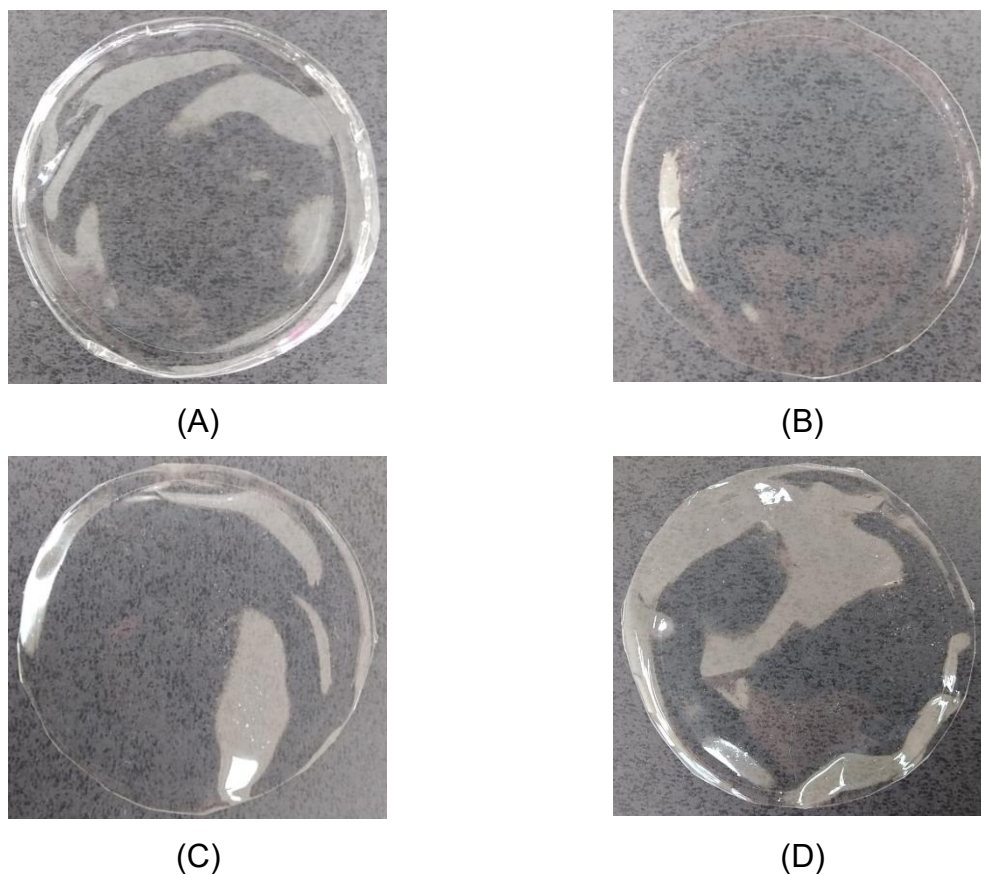
Fazli e Hertadi (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12 para a *C. acnes*, e obtiveram atividade antimicrobiana menor do que os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CIM = 125 µg/mL e CBM = 250 µg/mL). A acne é causada por um filotipo da *C. acnes* (IA) (AUBIN *et al.*, 2017). Dessa forma, o fato dos ramnolipídeos possuírem atividade antimicrobiana frente a essa bactéria, indica que esse biossurfactante tem potencial para ser utilizado em formulações antiacne.

Os resultados da análise hemolítica mostraram que o CC<sub>50</sub> dos ramnolipídeos foi de 181,93 µg/mL. As dispersões poliméricas para a obtenção dos filmes contêm as concentrações de 30, 60 e 90 µg/mL, correspondentes aos filmes com 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m), esse resultado indica que as concentrações de ramnolipídeos são seguras para serem utilizadas nas formulações. Na literatura, encontram-se valores de CC<sub>50</sub> acima de 600 µg/mL, para ramnolipídeos testados em células fibroblásticas dérmicas humanas (ABO-ZEID *et al.*, 2022; ALI *et al.*, 2022).

### 3.3.2 OBTENÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS BIOADESIVOS

Os filmes obtidos são transparentes, uniformes, não apresentam partículas insolúveis, sinais de bolhas e quebras ou áreas frágeis (Figura 3.1). Não se observou diferenças visuais entres os filmes.

**Figura 3.1** – Características macroscópicas dos filmes poliméricos contendo diferentes concentrações de ramnolipídeos: (A) 0,0%, (B) 0,1%, (C) 0,2% e (D) 0,3%.



Os resultados da caracterização físico-química e das propriedades mecânicas estão demonstrados na Tabela 3.2.

A variação de massa não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os filmes estudados, no entanto, o desvio padrão de cada formulação demonstrou que a homogeneidade dos filmes pode ser melhorada.

Os resultados de espessura e densidade foram diferentes estatisticamente entre os filmes, contudo, não se observou a correlação entre a concentração de ramnolipídeos e esses parâmetros.

**Tabela 3.2** – Resultados da caracterização físico-química e das propriedades mecânicas dos filmes poliméricos nas quatro concentrações de ramnolipídeos estudadas (0,0; 0,1; 0,2 e 0,3%, m/m).

Característica	0,0%, m/m	0,1%, m/m	0,2%, m/m	0,3%, m/m
Varição de massa (mg)	32,30±10,00 <sup>a</sup>	34,80±14,40 <sup>a</sup>	30,40±10,90 <sup>a</sup>	29,5±8,50 <sup>a</sup>
Espessura (mm)	0,069±0,002 <sup>a</sup>	0,063±0,002 <sup>b</sup>	0,079±0,004 <sup>c</sup>	0,072±0,004 <sup>a</sup>
Densidade (g/mL)	2,12±0,08 <sup>a</sup>	2,31±0,08 <sup>b</sup>	1,83±0,11 <sup>c</sup>	1,97±0,08 <sup>ac</sup>
pH	5,5±0 <sup>a</sup>	5,5±0 <sup>a</sup>	5,5±0 <sup>a</sup>	5,5±0 <sup>a</sup>
Solubilidade (%)	92,81±3,14 <sup>a</sup>	89,90±8,36 <sup>a</sup>	93,60±5,94 <sup>a</sup>	93,04±4,95 <sup>a</sup>
TVA (10 <sup>-11</sup> g/msPa)	3,88±1,40 <sup>a</sup>	2,81±1,28 <sup>a</sup>	5,27±0,08 <sup>a</sup>	4,73±0,16 <sup>a</sup>
Resistência à dobra	300±0 <sup>a</sup>	300±0 <sup>a</sup>	300±0 <sup>a</sup>	300±0 <sup>a</sup>
Força de bioadesão (N)	0,0724±0,0033 <sup>a</sup>	0,0768±0,0017 <sup>a</sup>	0,0779±0,0013 <sup>a</sup>	0,0771±0,0023 <sup>a</sup>
Módulo de Young (Mpa)	125,91±7,87 <sup>a</sup>	161,84±3,53 <sup>b</sup>	100,04±12,19 <sup>c</sup>	102,91±12,78 <sup>c</sup>
Resistência a Tração (N/mm <sup>2</sup> )	9,29±0,82 <sup>a</sup>	12,57±0,66 <sup>b</sup>	7,48±0,91 <sup>a</sup>	7,76±2,25 <sup>a</sup>
Alongamento na ruptura (%)	13,96±1,71 <sup>a</sup>	15,45±1,60 <sup>a</sup>	14,42±4,11 <sup>a</sup>	14,25±2,93 <sup>a</sup>

TVA = transmissão de vapor de água. As letras diferentes representam diferença estatística  $p < 0,05$ , e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas reais.

**Fonte:** o próprio autor.

A presença ou não de ramnolipídeos não afetou o pH das formulações, sendo essa medida adequada a superfície da pele, que apresenta pH entre 4,1 e 5,8 (PROKSCH, 2018), evitando possíveis irritações dérmicas.

Os resultados da solubilidade são um reflexo dos constituintes das formulações, todos os componentes são altamente solúveis em água (FANOUS *et al.*, 2020; GOMARI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2020).

Os filmes obtidos apresentaram baixos valores de transmissão de vapor de água quando comparados com filmes de PVA puro ( $6,97 \cdot 10^{-7}$  g/msPa) (SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2021). Esse parâmetro é importante porque está relacionado com a estabilidade físico-química de produtos (BASCHETTI e MINELLI, 2020). Observa-se correlação positiva entre a permeação de vapor de água e a espessura dos filmes, essa relação é comum em filmes hidrofílicos. A literatura relata que o efeito da espessura em filmes hidrofílicos ocorre devido a dois fatores: 1) quanto mais espesso é o filme, maior é a pressão parcial do vapor de água de equilíbrio na superfície interna e, 2) pelo intumescimento do polímero que ocorre como resultado de interações intermoleculares atrativas entre o filme e as moléculas de água (BERTUZZI *et al.*, 2007; MCHUGH, AVENA-BUSTILLOS e KROCHTA, 1993).

A resistência à dobra não foi afetada pela presença e concentração

de ramnolipídeos, sendo os quatro filmes analisados resistentes ao dobramento (EHTEZAZI, ALGELLAY e HARDY, 2019).

A presença de ramnolipídeos aumentou de forma não significativa ( $p < 0,05$ ) os valores de força de bioadesão. Esses valores são semelhantes aos encontrados no capítulo anterior para os filmes de quercetina (Tabela 2.3), sugerindo que a força de bioadesão tenha relação com os polímeros Kollicoat® IR e PVP.

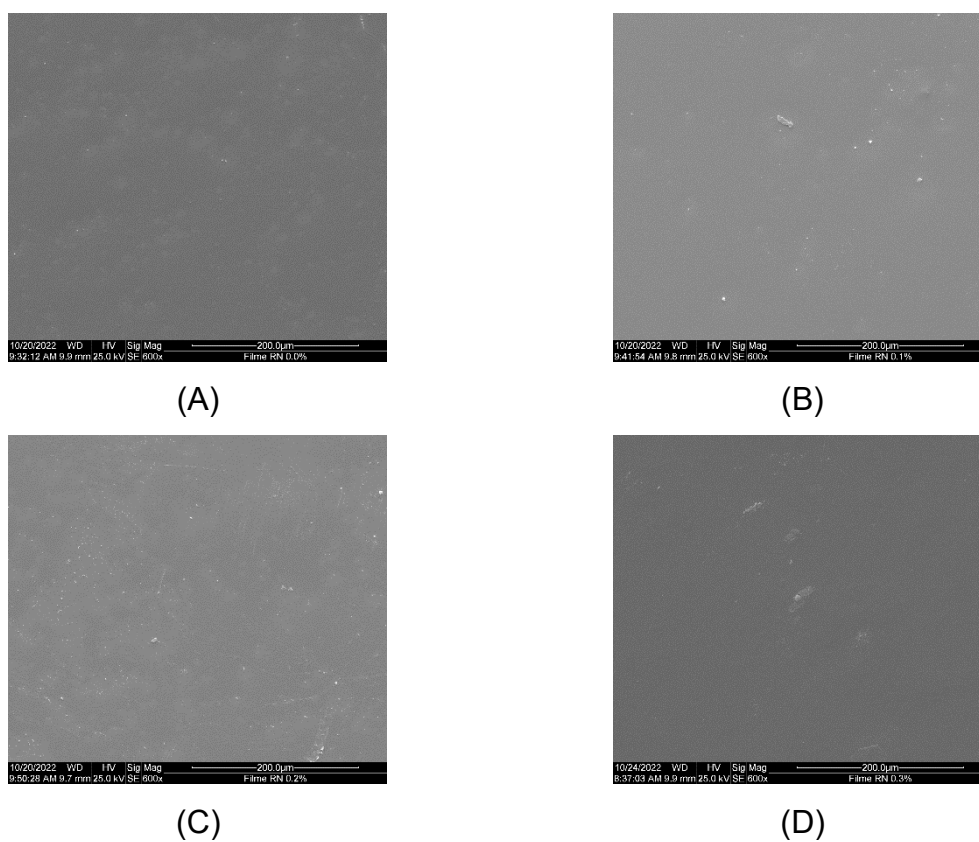
Os filmes estudados são mais rígidos do que os do capítulo anterior (Tabela 2.4), apresentando valores mais altos do módulo de Young e resistência a tração e menores valores de alongamento na ruptura. Esses filmes apresentam os atributos de tração ideais para filmes poliméricos orodispersíveis: módulo de Young  $< 550$  Mpa, resistência a tração  $> 2$  N/mm<sup>2</sup> e alongamento na ruptura  $> 10\%$  (GUPTA *et al.*, 2021).

### 3.3.3 MEV

As micrografias das amostras analisadas são mostradas na Figura 3.2.

A morfologia da superfície dos quatro filmes é composta por uma grande área lisa, indicando a formação de filmes claros e transparentes, não se observou diferenças na superfície causadas pela presença e diferentes concentrações de ramnolipídeos. Resultados semelhantes foram observados por Chan, Senin e Naimah (2009) quando os autores avaliaram a estrutura de filmes formados por álcool polivinílico. Kolter *et al.* (2013) estudaram blendas poliméricas contendo Kollicoat® IR e observaram micrografias lisas para o polímero e sugeriram que esse material forma dispersões aquosas estáveis, segundo os autores, quando o material apresenta dispersões instáveis, eles podem resultar em filmes porosos.

**Figura 3.2** – MEV da superfície dos filmes com ramnolipídeos nas concentrações: (A) 0,0%, (B) 0,1%, (C) 0,2% e (D) 0,3%.

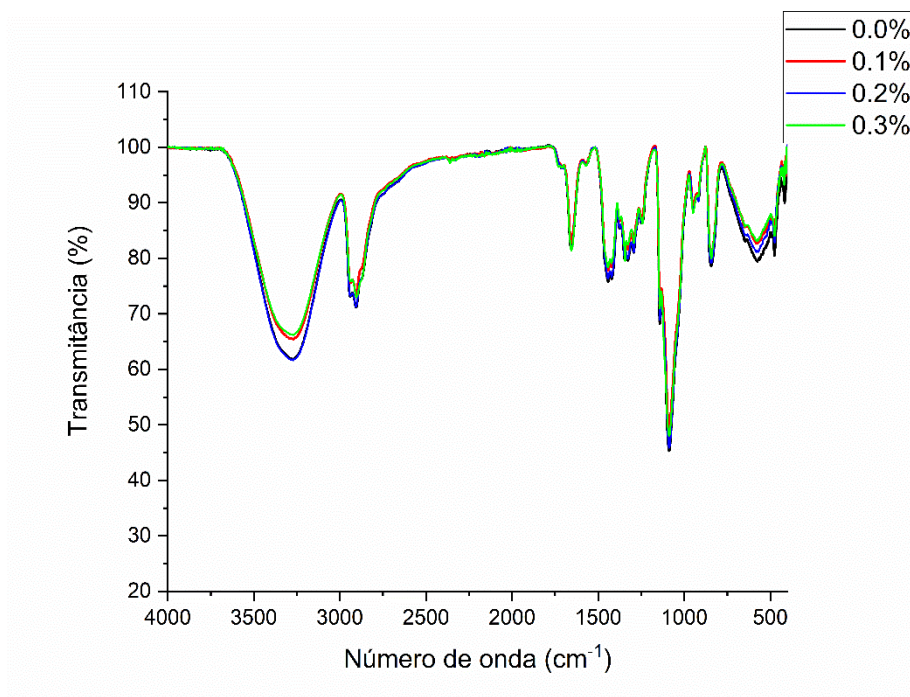


Fonte: o próprio autor.

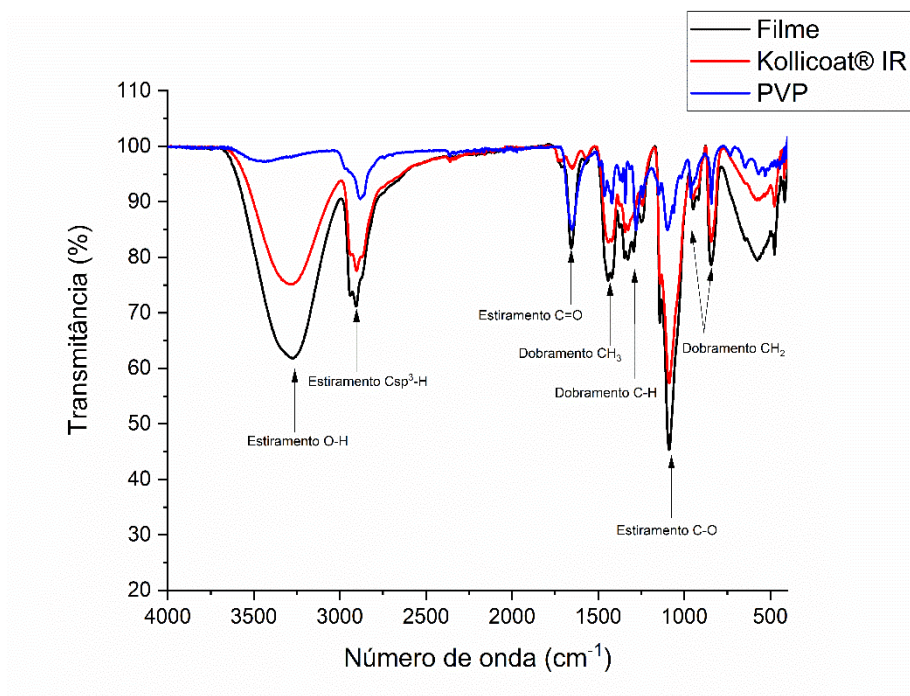
### 3.3.4 FTIR

Os espectros de FTIR (Figura 3.3) mostraram que os ramnolipídeos não causaram mudança nos sinais observados e que as bandas dos filmes são predominantemente as mesmas do Kollicoat® IR.

**Figura 3.3** – FTIR dos (A) quatro filmes poliméricos com 0,0%, 0,1%, 0,2% e 0,3% de ramnolipideos sobrepostos e (B) o filme sem ativo (0,0%, m/m) sobreposto com Kollicoat® IR e PVP.



(A)



(B)

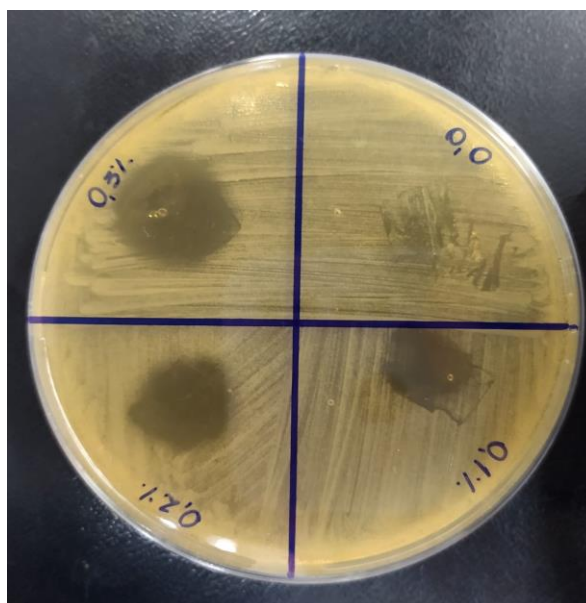
Fonte: o próprio autor.

Na Figura 3.3 observa-se bandas largas e intensas centradas em 3650-3000  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento O-H de álcoois. Uma banda em 2890  $\text{cm}^{-1}$  característico de estiramento  $\text{Csp}^3\text{-H}$ ; uma banda em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento C=O da carbonila do grupo funcional amida do polímero PVP; uma banda em 1450  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao dobramento  $\text{CH}_3$ ; o sinal em 1340  $\text{cm}^{-1}$ , decorrente do dobramento C-H; o sinal intenso em 1100  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído a vibração de estiramento C-O; e as bandas em 960 e 840  $\text{cm}^{-1}$ , são referentes ao dobramento  $\text{CH}_2$  (ABDELGHANY *et al.*, 2015; FOUAD *et al.*, 2011; PAVIA *et al.*, 2010).

### 3.3.5 TESTE ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DOS FILMES POLIMÉRICOS

Observa-se na Figura 3.4 que houve difusão dos ramnolipídeos no ágar, indicando que a formulação, quando intumescida, libera o princípio ativo estudado. Esta análise também indicou que a ação antibacteriana obtida foi proporcional a concentração de ramnolipídeos, sendo 364,74; 375,31 e 655,06  $\text{mm}^2$  as áreas dos halos de inibição encontradas para as concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m), respectivamente. O filme sem a impregnação do composto não atrapalhou o crescimento bacteriano em ágar RCM. Hajfarajollah *et al.* (2015) adsorveram 5 g/L de ramnolipídeos em filmes de polipropileno e avaliaram a atividade antimicrobiana desses filmes em ambientes com atmosfera controlada, em oxigênio ou ar, contra bactérias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e obtiveram resultados favoráveis frente as bactérias Gram positivas, sendo 580,81 e 650,25  $\text{mm}^2$  as áreas dos halos de inibição mensuradas para *Bacillus subtilis*, em oxigênio e ar, respectivamente; e 538,24 e 484,00  $\text{mm}^2$  as áreas dos halos de inibição mensuradas para *Staphylococcus aureus*, em oxigênio e ar, respectivamente.

**Figura 3.4** – Teste de difusão em ágar RCM dos filmes poliméricos com 0,0; 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m) de ramnolipideos.

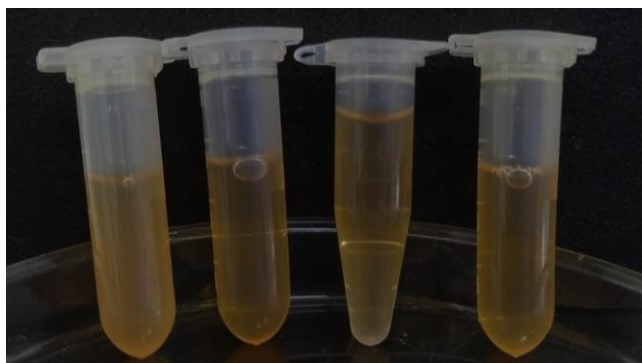


**Fonte:** o próprio autor.

A análise de difusão em caldo foi realizada para confirmar os resultados da difusão em ágar. Como os filmes avaliados apresentam elevada solubilidade em água (Tabela 3.2), eles se dissolvem no caldo, que é um meio aquoso. Dessa forma os constituintes no filme polimérico interagem mais facilmente com as bactérias.

Os microtubos mostrados na Figura 3.5 estão na seguinte ordem (da esquerda para a direita): 0,0; 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m). Observa-se que os filmes contendo ramnolipídeos impediram o crescimento bacteriano em caldo RCM e que o controle (filme 0,0%, m/m) ficou turvo indicando a presença de bactérias.

**Figura 3.5** – Teste de difusão em caldo RCM dos filmes poliméricos com 0,0; 0,1; 0,2 e 0,3% (m/m) de ramnolipídeos.



**Fonte:** o próprio autor.

Os quatro filmes obtidos apresentam propriedades mecânicas e físico-químicas semelhantes, sendo que as concentrações testadas não são citotóxicas. As quatro formulações provavelmente não provocam irritação dérmica por apresentarem pH próximo ao da pele humana, além de aderir ao tecido biológico e serem resistentes aos testes mecânicos. Dentre eles, o filme com a concentração de 0,3% (m/m) de ramnolipídeos demonstrou ser o mais promissor devido a sua maior atividade antimicrobiana.

### 3.4 CONCLUSÃO

Os ramnolipídeos possuem grande potencial para serem utilizados no tratamento da acne por apresentarem atividade antimicrobiana contra o *C. acnes* em concentrações seguras (CIM de 15,63  $\mu\text{g/mL}$ , CBM de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  e  $\text{CC}_{50}$  de 181,93  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os filmes poliméricos contendo ramnolipídeos foram eficazes frente ao *C. acnes*, no ensaio *in vitro*, nas três concentrações testadas (0,1; 0,2 e 0,3%, m/m), sendo o filme de maior concentração o mais promissor por apresentar maior atividade antimicrobiana.

Além disso, essas formulações apresentaram aspecto homogêneo; propriedades pouco rígidas; pH semelhante ao da pele humana, o que ajuda a reduzir o risco de possíveis irritações dérmicas; e bioadesividade, característica essa que

contribui com o aumento da adesão de pacientes ao tratamento pela facilidade de uso e por não precisar reaplicar a formulação várias vezes ao longo do dia.

Essa pesquisa necessita ser complementada com estudos *in vivo*, que garantam a eficácia e segurança da formulação em humanos, visando obter um bioproduto que possa ser comercializado.

## REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, A. M. *et al.* Combined DFT/FTIR structural studies of monodispersed PVP/Gold and silver nano particles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 646, p. 326–332, 2015.

ABO-ZEID, Y. *et al.* Rhamnolipid Nano-Micelles versus Alcohol-Based Hand Sanitizer: A Comparative Study for Antibacterial Activity against Hospital-Acquired Infections and Toxicity Concerns. **Antibiotics**, v. 11, n. 605, p. 1–22, 2022.

ALI, A. M. *et al.* Rhamnolipid Nano-Micelles Inhibit SARS-CoV-2 Infection and Have No Dermal or Eye Toxic Effects in Rabbits. **Antibiotics**, v. 11, p. 1–20, 2022.

AMMAR, H. O. *et al.* Polymeric matrix system for prolonged delivery of tramadol hydrochloride, part II: Biological evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 1065–1070, 2009.

ASTM. **ASTM E96: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. [s.l.: s.n.].

AUBIN, G. G. *et al.* Interaction of *Cutibacterium (formerly Propionibacterium) acnes* with bone cells: A step toward understanding bone and joint infection development. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–9, 2017.

BASCETTI, M. G.; MINELLI, M. Test methods for the characterization of gas and vapor permeability in polymers for food packaging application: A review. **Polymer Testing**, v. 89, p. 1–12, 2020.

BATUBARA, I.; MITSUNAGA, T.; OHASHI, H. Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: Antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. **Journal of Wood Science**, v. 55, n. 3, p. 230–235, 2009.

BERTUZZI, M. A. *et al.* Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 972–978, 2007.

BRUSCHI, M. L. *et al.* Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: *In Vitro* Release Kinetics , Syringeability , Rheological , Textural

, and Mucoadhesive Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074–2089, 2007.

CAMILIOS-NETO, D. *et al.* **Produção direcionada e processo de purificação de di-ramnolípídeos obtidos por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa***. Brasil, 2020.

CHAN, K. S.; SENIN, H. B.; NAIMAH, I. Structural and mechanical properties of polyvinyl alcohol (PVA) thin film. **AIP Conference Proceedings**, v. 1136, p. 366–369, 2009.

CHORACHOO, J.; AMNUAIKIT, T.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Liposomal encapsulated rhodomirtone: A novel antiacne drug. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 9. ed. Wayne: Clinical And Laboratory Standards Institute, 2012.

COUTO, R. O. DO *et al.* Combining amino amide salts in mucoadhesive films enhances needle-free buccal anesthesia in adults. **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 205–215, 2017.

EHTEZAZI, T.; ALGELLAY, M.; HARDY, A. Next Steps in 3D Printing of Fast Dissolving Oral Films for Commercial Production. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 13, p. 1–15, 2019.

FANOUS, M. *et al.* Development of immediate release (IR) 3D-printed oral dosage forms with focus on industrial relevance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 155, p. 1–11, 2020.

FAZLI, R. R.; HERTADI, R. Production and characterization of rhamnolipids from bioconversion of palm oil mill effluent by the halophilic bacterium *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 38, n. 3, p. 1–6, 2018.

FERNÁNDEZ, J. R. *et al.* SIG1459: A novel phytyl-cysteine derived TLR2 modulator with *in vitro* and clinical anti-acne activity. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 9, p. 993–999, 2018.

FOUAD, E. A. *et al.* Technology evaluation: Kollicoat IR. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 5, p. 693–703, 2011.

FOX, L. *et al.* Treatment modalities for acne. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1–20, 2016.

GARCÍA, M. C. *et al.* Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 75–86, 2017.

GOMARI, S. R. *et al.* New insight into the influence of rhamnolipid bio-surfactant on the carbonate rock/water/oil interaction at elevated temperature. **Resources**, v. 7, p.

1–12, 2018.

GUIDI, A. C. *et al.* Stem bark extract of *Poincianella pluviosa* incorporated in polymer film: Evaluation of wound healing and anti-*staphylococcal* activities. **Injury**, v. 51, n. 4, p. 840–849, 2020.

GUO, R. *et al.* Bioadhesive film formed from a novel organic-inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 3, p. 574–583, 2011.

GUPTA, A. *et al.* Formulation and evaluation of a topical niosomal gel containing a combination of benzoyl peroxide and tretinoin for antiacne activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 171–182, 2015.

GUPTA, M. S. *et al.* Orodispersible films: Conception to quality by design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 178, p. 113983, 2021.

HAJFARAJOLLAH, H. *et al.* Rhamnolipid biosurfactant adsorption on a plasma-treated polypropylene surface to induce antimicrobial and antiadhesive properties. **RSC Advances**, v. 5, p. 33089–33097, 2015.

IZUMI, E. *et al.* Terpenes from *copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

JADHAV, J. *et al.* Fermentative production of rhamnolipid and purification by adsorption chromatography. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 234–241, 2018.

KATHE, K.; KATHPALIA, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 487–497, 2017.

KOLTER, K. *et al.* Polyvinyl acetate-based film coatings. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 2, p. 470–479, 2013.

KUMAR, G. *et al.* Antibacterial Screening of Selected Indian Medicinal Plants Against Acne Inducing Bacteria. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 34–47, 2007.

LI, X.-Q. *et al.* Mucoadhesive buccal films of tramadol for effective pain management. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 67, n. 3, p. 231–237, 2017.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: Glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 4, p. 255–261, 2009.

LUCENA, C. A. A. DE *et al.* Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. v. 27, p. 35–41, 2017.

LUNTER, D. J.; ROTTKE, M.; DANIELS, R. Oil-in-oil-emulsions with enhanced substantivity for the treatment of chronic skin diseases. **Journal of Pharmaceutical**

**Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1515–1519, 2014.

MAHTO, A. *Acne vulgaris*. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 6, p. 386–389, 2017.

MCHUGH, T. H.; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 899–903, 1993.

OSHIRO JUNIOR, J. A. *et al.* Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 4th. ed. Bellingham: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, G. G. *et al.* Polymeric films loaded with vitamin e and *Aloe vera* for topical application in the treatment of burn wounds. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PRASAD, S. B. *Acne vulgaris: A review on pathophysiology and treatment*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 4, p. 54–59, 2016.

PROKSCH, E. pH in nature, humans and skin. **Journal of Dermatology**, p. 1–9, 2018.

RANJAN, P. *et al.* Formulation Development and Evaluation of Emulgel of Clindamycin Phosphate for Effective Treatment of Acne. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics Open**, v. 9, n. 4, p. 202–207, 2019.

REPKA, M. A.; MCGINITY, J. W. Physical-mechanical, moisture absorption and bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose hot-melt extruded films. **Biomaterials**, v. 21, n. 14, p. 1509–1517, 2000.

SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M. *et al.* Cellulose nanofibers from olive tree pruning as food packaging additive of a biodegradable film. **Foods**, v. 10, p. 1–15, 2021.

SHAHTALEBI, M. A. *et al.* Formulation of Herbal Gel of Antirrhinum majus Extract and Evaluation of its Anti- *Propionibacterium acne* Effects. **Advanced Biomedical Research**, n. 1, p. 1–10, 2018.

SOUZA, M. K. S. *et al.* Development, characterization and optimization of a new bone cement based on calcium–strontium aluminates and chitosan-glycerin solution. **Ceramics International**, v. 48, n. 21, p. 31866–31879, 2022.

VECINO, X. *et al.* Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 911–923, 2017.

VORA, J.; SRIVASTAVA, A.; MODI, H. Antibacterial and antioxidant strategies for acne treatment through plant extracts. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 13, p.

128–132, 2018.

WANG, M. *et al.* Electrospun Janus zein–PVP nanofibers provide a two-stage controlled release of poorly water-soluble drugs. **Materials and Design**, v. 196, p. 1–10, 2020.

WANG, Y. *et al.* The Anti-Inflammatory Activities of *Propionibacterium acnes* CAMP Factor-Targeted Acne Vaccines. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 2355–2364, 2018.

XU, N. *et al.* Alpha- and gamma-mangostins exhibit anti-acne activities via multiple mechanisms. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, p. 1–8, 2018.

## Capítulo 4

---

### CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

---

## CONCLUSÃO GERAL

A quercetina é um flavonoide amplamente encontrado na natureza que tem sido estudado devido suas propriedades farmacológicas, sendo uma delas, a atividade antiviral. Apresenta baixa citotoxicidade e atividade contra o vírus HSV-1 em baixas concentrações, se tornando um agente ativo promissor no tratamento dos processos inflamatórios causados por esse vírus. Além disso, os filmes obtidos nesse trabalho são seguros (atóxicos) e foram eficazes frente ao HSV-1-KOS nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, principalmente no início do processo infeccioso, como foi evidenciado até o quarto dia de tratamento.

Os ramnolipídeos são biossurfactantes muito estudados produzidos por bactérias, eles têm sido comercializados nos últimos anos, aumentando o interesse em suas propriedades farmacológicas. Possuem grande potencial para serem utilizados no tratamento da acne por apresentarem atividade antimicrobiana contra o *Cutibacterium acnes*, em concentrações baixas e seguras. Os filmes poliméricos contendo ramnolipídeos foram eficazes frente ao *C. acnes*, no ensaio *in vitro*, nas três concentrações testadas.

As formulações obtidas, utilizando a mesma plataforma polimérica, para ambos princípios ativos apresentaram aspecto homogêneo; propriedades pouco rígidas; pH semelhante ao da pele humana, o que ajuda a reduzir o risco de possíveis irritações dérmicas; e bioadesividade, característica essa que contribui com o aumento da adesão de pacientes ao tratamento pela facilidade de uso e por se manter no local de ação por maior tempo, diminuindo o número de reaplicações ao longo do dia.

Em ambos os casos, as formulações e seus respectivos agentes ativos foram promissores nos tratamentos estudados, podendo se obter no futuro bioprodutos eficazes e seguros, que possam ser comercializados.

## PERSPECTIVAS

Como proposta para trabalhos futuros de filmes contendo quercetina,

será o estudo de possível sinergismo entre a quercetina e o aciclovir, melhorando a resposta de ambos os agentes ativos no tratamento dessa doença.

Em relação à pesquisa dos filmes contendo ramnolipídeos, tem-se a necessidade de ser complementada com estudos *in vivo*, que garantam a eficácia e segurança da formulação em humanos, visando obter um bioproduto que possa ser comercializado.