



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019007561-9 A2



(22) Data do Depósito: 15/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) **Título:** FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO N-ACLIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM HUMANOS E/OU ANIMAL

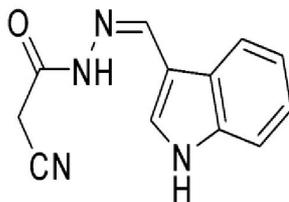
(51) **Int. Cl.:** A61L 15/28; A61L 15/64.

(52) **CPC:** A61L 15/28; A61L 15/64.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** BOLÍVAR PONCIANO GOULART DE LIMA; DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY; ROSEMARY SOUSA CUNHA LIMA; RICARDO OLÍMPIO DE MOURA; LIDIANE PINTO CORREIA; DEMIS FERREIRA DE MELO; LARYSSA MIRELLE DA SILVA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA.

(57) **Resumo:** A invenção refere-se ao processo de obtenção de filmes de quitosana com um derivado de N-acilidrazônico, de nomenclatura N?-((1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), para aplicações na saúde e/ou animal. A subunidade N-acilidrazônico baseia-se em um fragmento de caráter privilegiado, como atividade antiinflamatória. Assim, a presente invenção é uma associação da JR19 com o polímero de quitosana para formação de filmes, com o objetivo de promover uma nova proposta farmacoterapêutica para o tratamento de lesões cutâneas.



**“FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO *N*-  
ACILIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM  
HUMANOS E/OU ANIMAL”**

[001] A presente invenção refere-se à produção de filme de quitosana contendo um derivado *N*-acilidrazônico, de nomenclatura *N*-((1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), com estrutura química descrita na Figura 1, para aplicação farmacológica tópica. Em virtude da necessidade de novas propostas farmacoterapêuticas em lesões cutâneas, este derivado surge como uma importante classe de compostos químicos e sintéticos que apresentam pronunciadas propriedades biológicas anti-inflamatórias. Com isso, o sinergismo da atividade farmacológica da JR19 com as propriedades da quitosana, podem representar um sistema promissor no tratamento de inflamações tópicas e potencializar a biodisponibilidade farmacológica, representando segurança e conforto de aplicação para o tratamento destas inflamações.

[002] Apesar da variedade de curativos já comercializados, destinados para a regeneração de feridas, não há um produto existente que vai ao encontro de um curativo ideal, visto que a escolha do produto depende de vários fatores, como, condição do paciente, tipo da ferida e estágio da lesão (MOURA et al., 2013).

[003] Além disso, sabe-se que para realizar o tratamento das condições inflamatórias, utilizam-se na maioria dos casos, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), por ser a classe terapêutica mais prescrita pelos médicos. Estes AINEs exercem farmacologicamente por via de inibição das ciclooxigenases (COX- 1 e COX-2), as quais são os principais responsáveis por gerar efeitos clínicos indesejáveis, em especial nos compartimentos da região trato gastrointestinal e nos rins (CRISTINA et al., 2018; KROKOS et al., 2018; LALLANA et al., 2018).

Deste modo, existe uma necessidade real por materiais que possam acelerar o processo de cicatrização, além de propiciar uma maior segurança ao paciente.

[004] Os avanços mais recentes utilizados para tratar as lesões de pele, estão relacionados ao uso de materiais com atividade biológica que auxiliam o processo de cicatrização do tecido danificado, melhorando assim a aparência e funcionalidade do órgão (MUZZARELLI, 2009).

[005] Neste contexto, a quitosana, um polímero natural formado por unidades  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e produto do processo de desacetilação parcial da quitina, vem sendo utilizado no desenvolvimento destes novos curativos (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015; DIAS et al., 2013; YUDANOVA; RESHETOV, 2006).

[006] Estudos sobre filmes com propriedades cicatrizantes viabilizaram o desenvolvimento destes, como dispositivos de liberação controlada de fármacos, visto que os mesmos oferecem vantagens sobre outras formas farmacêuticas, tais como o aumento da biodisponibilidade oral e da área superficial (PEREIRINHA et al., 2014).

[007] Algumas patentes que utilizam biofilmes já foram depositadas a exemplo da PI BR 10 2014 023575 2 A2, que se refere a um filme com propriedades cicatrizantes a partir de biopolímeros com adição de *Ximenia americana* L, para tratamento de feridas; e a BR 10 2016 017854 1 A2 que trata do desenvolvimento de filmes poliméricos com óleo de copaíba e sua microemulsão para aplicação anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana. A patente de invenção WO 2016/079246 A1 que se refere a um filme bioadesivo, especialmente, adequado à aplicação na cavidade bucal que compreendem um polímero formador de película, uma substância bioadesiva e, opcionalmente, uma substância farmacológica.

[008] O uso da quitosana também já foi descrito em documentos de patentes, como na PI BR 11 2018 013105 9 A2, que descreve composições que contêm quitosana tratada, quitosana modificada e/ou quitosana modificada e tratada para uso em formulações para pele, cabelos e unhas, e métodos para reduzir a irritação e inflamação da pele induzida por agente tóxico.

[009] A presente invenção descreve o desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos de QTS incorporados com JR19, molécula esta, considerada uma estrutura privilegiada, por apresentar caráter inovador e promissor, devido a sua atividade anti-inflamatória *in vitro* (Apolinário 2016). Desta forma, a associação desses dois constituintes, apresentam uma nova proposta farmacoterapêutica para tratar doenças inflamatórias por via tópica em humanos e/ou animais.

[010] A utilização de filmes depende da etapa de neutralização para obtenção de filmes atóxicos. No presente invento, não se fez necessário a etapa de neutralização, tornando-se a método técnica mais rápida e barata. Os filmes desenvolvidos, não apresentaram toxicidade, conforme resultado confirmado pela análise de citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar.

[011] A caracterização da presente invenção pode ser descrita pelo desenvolvimento dos filmes de quitosana e quitosana+JR19, descrito abaixo:

[012] Os filmes de quitosana foram desenvolvidos a partir da dissolução do polímero em solução de ácido acético (1% v/v), sob agitação magnética, por um período de 24 horas. Em seguida, a solução resultante foi vertida em placas de Petri com diâmetro de 5,5 cm, em um volume de 5 mL.

[013] Para o desenvolvimento dos filmes incorporados com a JR19, a quantidade adicionada da molécula foi baseada em cálculos utilizando a área de superfície da lesão (Equação 1) e o peso dos animais, de forma que a dose final seja proporcional a de 20 mg/Kg, concentração que apresentou atividade anti-inflamatória oral *in vivo* e atoxicidade aguda em camundongos, segundo Apolinário (2016). Através dos cálculos foi definido 8,6 mg do fármaco para cada 5 mL da solução de quitosana. Em seguida, a molécula foi dissolvida em 5 mL de solução de quitosana, sob agitação magnética, para que ocorresse sua total homogeneização. Para ambas as soluções (com e sem incorporação da JR19) a secagem foi realizada na estufa com circulação de ar a 50°C, por um período de 24 horas.

[014] Equação 1.

$$A = \pi \times r^2 \quad (1)$$

**Onde:** A= área da superfície da lesão

$$\pi = 3,14$$

r = raio da área superficial da lesão

[015] Com o desenvolvimento dos filmes de quitosana e quitosana+JR19, podemos observar na figura 2 os filmes obtidos pela metodologia descrita, apresentando macroscopicamente, aspecto homogêneo, características de elasticidades e flexibilidade. Os filmes de QTS mostraram-se incolor, enquanto que os que continham a molécula apresentaram coloração amarelada, o que faz disso um indicativo da incorporação da mesma na matriz polimérica, visto que a cor da molécula em pó assemelhou-se ao do filme.

[016] A caracterização físico-química desse sistema é de extrema importância, pois fornece o maior número de informações sobre o produto obtido.

As caracterizações realizadas foram: ensaio de resistência ao dobramento, ensaio de tração, grau de intumescimento (GI), molhabilidade por medidas do ângulo de contato, microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), análise térmica por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) e avaliação *in vitro* da citotoxicidade por difusão em ágar.

[017] Exemplo 01. Resistência ao Dobramento.

[018] Uma forma de avaliar a viabilidade de aplicação de filmes para o desenvolvimento de curativos é verificar sua flexibilidade, através das análises de resistência mecânica a tração (Mpa) e deformação (%) (SASIKALA; DURAI; RATHINAMOORTHY, 2013). De acordo com Kouchak, Handali e Boroujeni (2015) e Bano et al. (2014) filmes poliméricos que apresentam menor grau de deformação e valores razoáveis de resistência a tração, são sugestivos de terem elevado potencial em aplicações médicas. Através da análise, verificou-se que para os filmes que continham a JR19, a espessura foi aumentada, conforme a Figura 3.

[019] Exemplo 02. Grau de Intumescimento (GI)

[020] Um curativo ideal deve absorver os fluídos biológicos presente na lesão cutânea enquanto o mesmo é aplicado, mantendo um ambiente úmido na região da ferida. A capacidade de absorção de água é um fator importante para determinação dos componentes utilizados para o desenvolvimento do curativo, a qual possibilita a prevenção da desidratação tecidual, inibição do crescimento de microrganismos e proteção à maceração da ferida (PANDIMA DEVI et al., 2012). Desta forma, de acordo os perfis de GI (FIGURA 4) dos filmes analisados, sugere-se que a molécula forneceu o aumento da capacidade de absorção do líquido em estudo, tornando-se um material atrativo para o desenvolvimento de sistemas que venha a absorver fluídos biológicos, como é o caso da produção de futuros curativos.

[021] Exemplo 03. Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

[022] A técnica é fundamentada na medida do ângulo de contato da gota, o qual avalia as características de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade do material em estudo. A Figura 5 ilustra os valores de molhabilidade dos filmes de QTS e QTS+JR19.

[023] Tais resultados revelam que a molécula JR19 quando associada com a QTS na forma de filme, promove modificações benéficas nas características físico-químicas do compósito e conseqüentemente em suas propriedades mecânicas, tornando-as atrativas para indústria farmacêutica no âmbito de desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, em especial para tratar lesões cutâneas.

[024] Exemplo 04. Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

[025] A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foi usada como técnica complementar para auxiliar na pesquisa de possíveis interações químicas entre a molécula JR19 e a QTS. A Figura 6 e Tabela 1 mostram os resultados das principais bandas observadas nos espectros de FTIR dos componentes estudados, e confirma a presença dos principais grupos funcionais da molécula em associação com a quitosana, na forma de filme.

[026] Tabela 1 – Principais bandas observadas nos espectros de FTIR das amostras.

Amostras	O-H	N-H	CH	C≡N	C=O	NH <sub>2</sub>	C-OH	C-O-C	Aromático
<b>JR19</b>	-	3280	2959	2264	1667	-	-	-	741
<b>QTS</b>	3323	3323	2879	-	1650	1594	1062	1020	-
<b>CHI+JR19</b>	3281	3281	2962	2266	1677	-	-	-	749
<b>Filme QTS</b>	3272	3272	2863	-	1636	1541	1070	1018	-
<b>Filme QTS+JR19</b>	3265	3265	2904	2279	1667	1539	1058	1020	741

Fonte: dados da pesquisa.

[027] Exemplo 05. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* – Método de Difusão em Ágar.

[028] A metodologia empregada nesta análise promoveu uma avaliação quantitativa, através da medição da extensão em milímetros do halo formado e uma análise qualitativa por meio da verificação da presença ou ausência da coloração celular pela ação do vermelho neutro. Através das análises realizadas neste estudo *in vitro* pôde-se constatar a atoxicidade celular dos filmes de QTS e QTS+JR19, visto que, os filmes desenvolvidos apresentaram viabilidade celular, respaldando assim, biocompatibilidade e segurança do mesmo em futuros estudos *in vivo*, conforme Figuras 6 e 7.

[029] DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

Figura 1 – Estrutura química da *N'*-(1*H*-indol-3yl) metileno-2-cianoacetohidrazida (JR19).

Figura 2 – Registros fotográficos do filme de QTS e filme de QTS+JR19.

Figura 3 – Registros fotográficos do filme de QTS (com fissura) e filme de QTS+JR19 (sem fissura) após 300 dobragens.

Figura 4 – Gráfico com os valores referente ao GI (%) dos filmes de QTS e QTS+JR19, nos tempos de 1, 2, 3 e 24 horas.

Figura 5 – Gráfico com os valores referente à molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato das amostras analisadas.

Figura 6 – Espectro de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras.

Figura 7 – Fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x e 20x dos controles negativos e positivos, revelando a ausência de descolorimento e descolorimento ao redor e sob as amostras, respectivamente.

Figura 8 – Fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x e 20x dos filmes de QTS e QTS+JR19, revelando a ausência de descolorimento ao redor e sob as amostras.

## REIVINDICAÇÕES

1. **“FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO *N*-ACLIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM HUMANOS E/OU ANIMAL”**, caracterizada por apresentar em sua composição uma quantidade eficaz de quitosana contendo um derivado *N*-acilidrazônico, de nomenclatura *N*-((1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19).
2. **“FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO *N*-ACLIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM HUMANOS E/OU ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um filme apresentando uma quantidade eficaz de quitosana, 50 mg para cada filme de 5,5 cm de diâmetro, contendo 8,6 mg de um derivado *N*-acilidrazônico, de nomenclatura *N*-((1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19) dotado de atividade anti-inflamatória e cicatrizante.
3. **“FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO *N*-ACLIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM HUMANOS E/OU ANIMAL”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender quaisquer umas das seguintes formas de apresentação: filme, película, membrana, géis, creme, pomadas, microemulsões e nanoemulsões para tratamento ou profilaxia de patologias inflamatórias agudas ou crônicas.
4. **“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO *N*-ACLIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM HUMANOS E/OU ANIMAL”**, caracterizado por apresentar as seguintes etapas:
  - a. Os filmes de quitosana foram desenvolvidos a partir da dissolução do polímero em solução de ácido acético (1% v/v), sob agitação magnética, por um período de 24 horas.
  - b. A solução resultante foi vertida em placas de Petri com diâmetro de 5,5 cm, em um volume de 5 mL;
  - c. A quantidade da molécula de JR19 adicionada foi baseada em cálculos utilizando a área de superfície da lesão e o peso dos animais, de forma que a dose final seja proporcional a de 20 mg/Kg;

- d. Foi adicionado a quantidade de 8,6 mg da molécula do JR19 para cada 5 mL da solução de quitosana;
- e. A molécula foi dissolvida em 5 mL de solução de quitosana, sob agitação magnética, para que ocorresse sua total homogeneização. A secagem foi realizada na estufa com circulação de ar a 50°C, por um período de 24 horas.



Figura 4

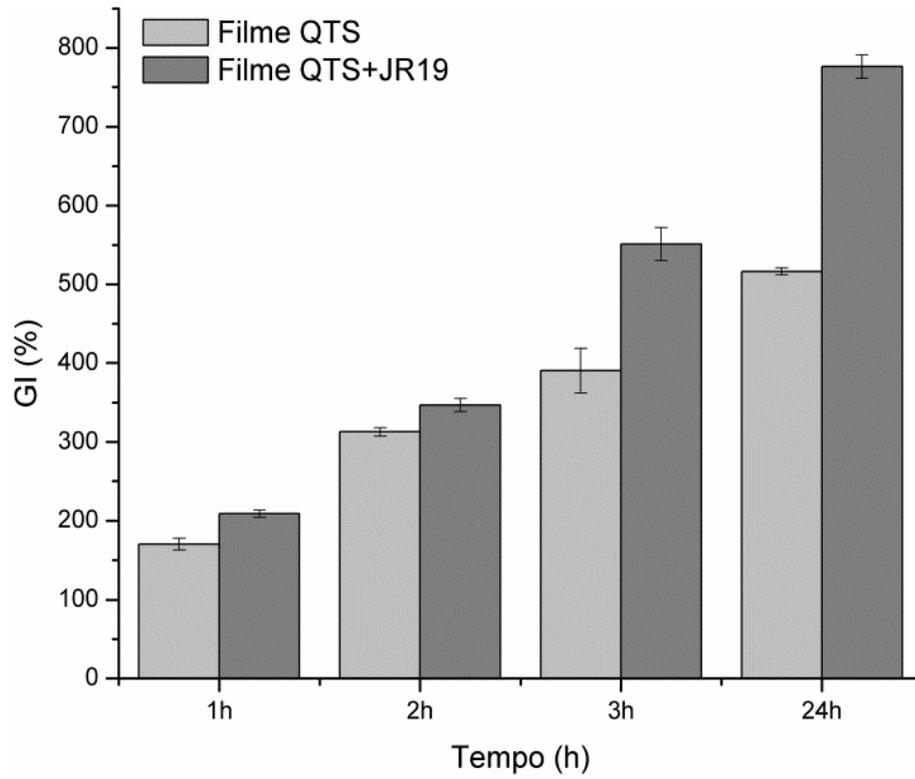


Figura 5

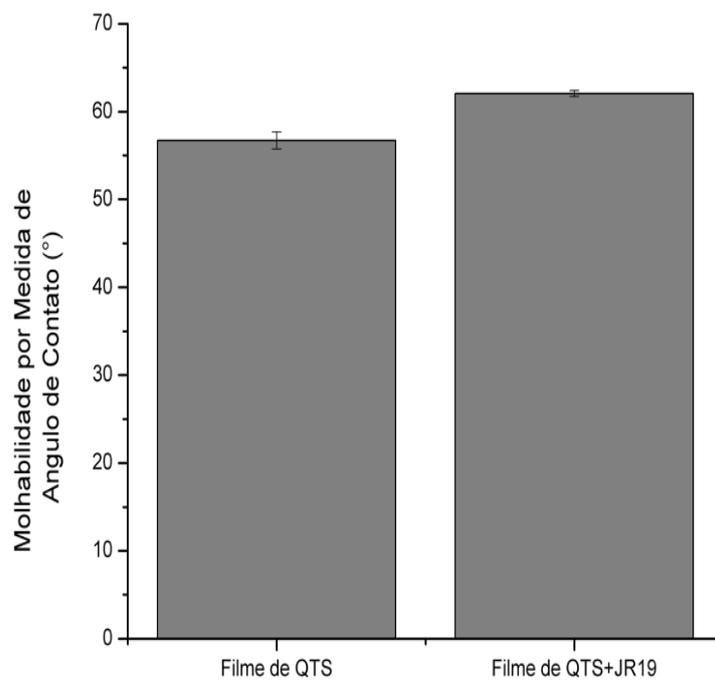


Figura 6

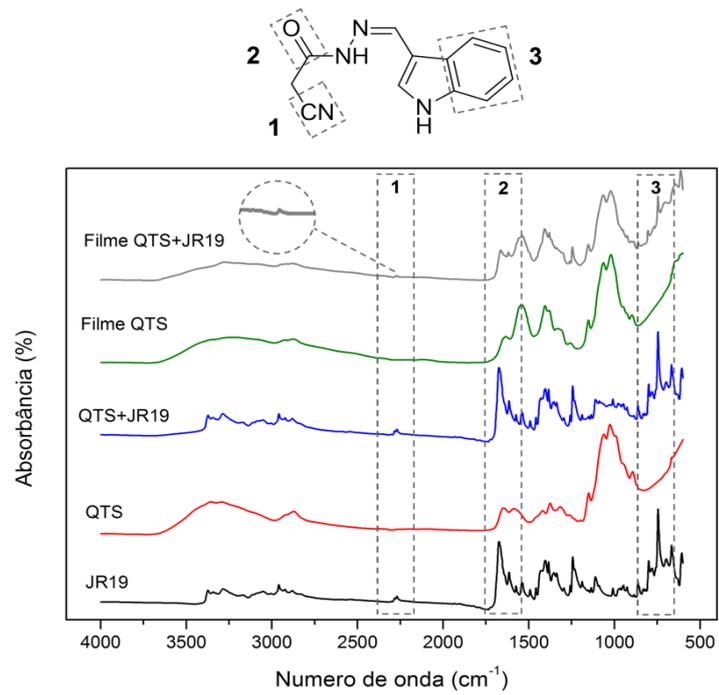


Figura 7

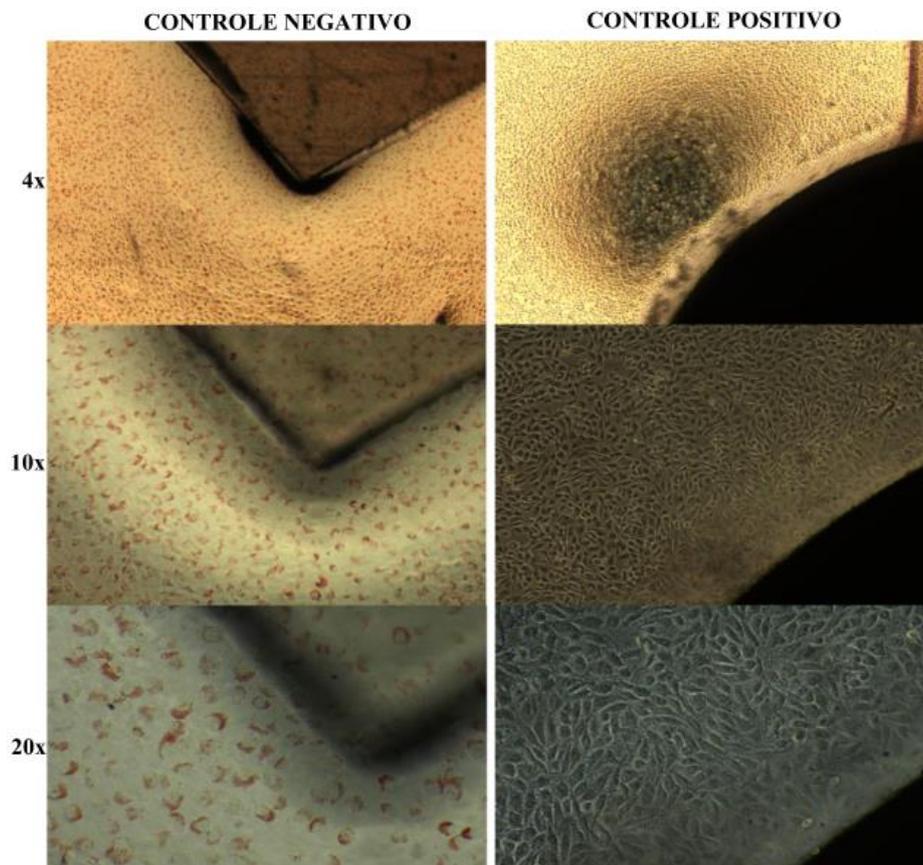
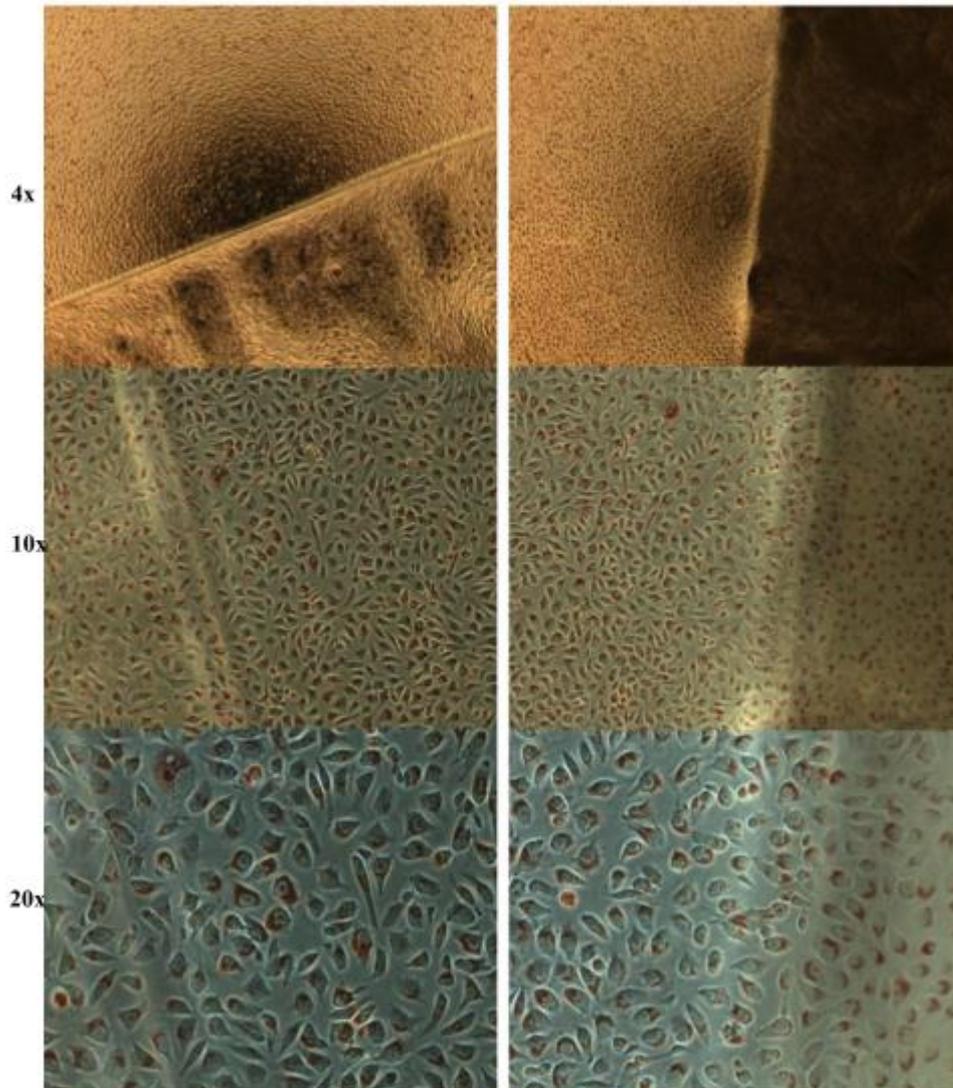


Figura 8



**“FILMES DE QUITOSANA CONTENDO UM DERIVADO N-ACLIDRAZÔNICO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM HUMANOS E/OU ANIMAL ”**

A invenção refere-se ao processo de obtenção de filmes de quitosana com um derivado de N-acilidrazônico, de nomenclatura N'-((1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), para aplicações na saúde e/ou animal. A subunidade N-acilidrazônico baseia-se em um fragmento de caráter privilegiado, como atividade antiinflamatória. Assim, a presente invenção é uma associação da JR19 com o polímero de quitosana para formação de filmes, com o objetivo de promover uma nova proposta farmacoterapêutica para o tratamento de lesões cutâneas.