



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO



**Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação
modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e
metronidazol para tratamento da periodontite**

Amanda Cristina Funari Silva

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Amanda Cristina Funari Silva

Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

Ribeirão Preto

2022

Amanda Cristina Funari Silva

Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana T.M.C. Vicentini

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 30/05/2022. A versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

<p>SILVA, AMANDA C. F.</p>	<p>Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite</p>		<p>DOUTORADO FCFRP-USP 2022</p>
--------------------------------	---	--	---

Autorizo a reprodução e divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Amanda Cristina Funari.

Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

93p.; 30cm.

Orientador: de Freitas, Osvaldo

Co-orientadora: Vicentini, Fabiana T.M.C.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

1. Metronidazol. 2. Periodontite. 3. Metaloproteinases (MMP). 4. Doxiciclina 5. Filme polimérico. 6. Inibição MMP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Amanda Cristina Funari Silva

Título do trabalho: Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana T.M.C. Vicentini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço ao professor Osvaldo, pelo acolhimento e generosidade em dividir conosco seus pensamentos e conhecimentos. Ser sua aluna é um privilégio. À Profa. Fabiana, pela confiança depositada em mim, sem ao menos me conhecer. À Maíra, pela relação de amizade que construímos que está muito além da relação profissional que compartilhamos no decorrer dos últimos anos. Aos amigos de laboratório pela boa convivência, em especial à Ana Clara. À minha família e amigos, pela presença e compreensão compartilhados no dia a dia.

RESUMO

SILVA, A. C. F Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite. 93p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória de ordem multifatorial e resultado da ação de microrganismos do biofilme dental, com a instalação de bactérias gram-negativas patogênicas, como por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*. Na ausência de diagnóstico e tratamento adequado, pode haver formação de um sulco, denominado bolsa periodontal. Nesse caso, a resposta imunológica promove ativação de mediadores que levarão ao recrutamento de leucócitos, interleucinas e metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), que devido à sua atividade proteolítica são responsáveis por degradar o tecido conjuntivo e induzir a reabsorção óssea, levando a mobilidade do dente. O tratamento atual consiste em procedimentos de raspagem e alisamento radicular, associados a antibióticos de uso sistêmico, metronidazol (MDZ), por exemplo. A doxiciclina (DOX), um fármaco antimicrobiano da classe das tetraciclina, é considerada inibidora das MMPs, e é aprovada para uso clínico em dose subantimicrobiana, por via oral para a periodontite nos EUA. Dessa forma, nesse trabalho foi desenvolvido e caracterizado sistema filmógeno (SFC) com liberação modificada e aplicação bucal, intrabolsa periodontal, com o intuito de favorecer o tratamento da doença sem os inconvenientes da administração sistêmica de antibióticos, além de colaborar com a inibição das MMPs devido ao uso da DOX. O filme é composto por MDZ, em suas duas formas (base e benzoato) para modular a liberação deste fármaco, DOX, quitosana e propilenoglicol como plastificante e foi obtido pelo método de *casting*. O perfil de liberação dos fármacos *in vitro* a partir do SFC foi realizado e demonstrou a tendência de liberação dos fármacos, sendo $95,59\% \pm 4,84$ para o MDZ e $77,16\% \pm 4,97$ para a DOX ao final de 7 dias. O perfil de permeação *in vitro* também foi realizado, ao final de 7 dias teve perfil gradual e ascendente para ambos os fármacos. Análises da umidade residual foram realizadas com valores de 19,87% para o filme inerte e 31,11% para SFC. Ensaio de bioadesão foram realizados com tecido esofageal suíno e o trabalho de adesão foi de $1,906 \text{ N.mm} \pm 1,07$ para o filme inerte e $0,956 \text{ N.mm} \pm 0,92$ para SFC. A capacidade do SFC em inibir MMPs foi avaliada, via zimografia em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) copolimerizado com gelatina em três condições: concomitantemente ao estímulo de LPS para expressão de MMPs, pré-estímulo e pós estímulo e teve sua atividade constatada em inibir a atividade enzimática das MMPs, possivelmente por quelar metais importantes na atividade dessas proteinases. Análises estatísticas foram realizadas via ANOVA e pós-teste Tukey, teste t-Student também foi realizado quando pertinente.

Palavras-chave: metronidazol, periodontite, metaloproteinases (MMP), inibição MMP, doxiciclina, liberação modificada de fármacos.

ABSTRACT

SILVA, A. C. F Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite. 93p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Periodontitis is a multifactorial infectious-inflammatory disease and results of dental biofilm microorganisms' action with gram-negative bacteria proliferation, such as *Porphyromonas gingivalis*. The absence of diagnosis and appropriated treatment can favor periodontal pocket formation. The immune response promotes activation of mediators that will lead to the recruitment of leukocytes, interleukins and metalloproteinases (MMPs) from the extracellular matrix, which due to their proteolytic activity are responsible for degrading the connective tissue and inducing bone resorption, resulting in tooth mobility. The current recommended treatment is scaling and root planning procedures, associated with systemic antibiotics, for example, metronidazole (MDZ). Doxycycline (DOX), an antimicrobial drug of the tetracycline class, is considered a MMPs inhibitor for periodontitis in the USA. This study presents the development and characterization of the drug modified delivery system containing MDZ as an antimicrobial and DOX, for local action in the periodontal pocket, in order to eliminate infection, without antimicrobial oral administration inconvenient, besides of reducing degradation of macromolecules of connective tissue and minimize bone resorption. A film was developed with DOX, chitosan and an association of MDZ in its two forms, base and benzoate (BMDZ) was used to modulate the release. Propylene glycol was used as a plasticizer and the system were obtained by the casting method. The drug release profile was done and demonstrated the drug release trend, with $95.59\% \pm 4,84$ for MDZ and $77.16\% \pm 4,97$ for DOX at the end of 7 days. The *in vitro* permeation profile was performed and after 7 days, was gradual and ascending profile for both drugs. Moisture content analysis were done and was 19.87% to inert film and 31.11% to film containing all drugs. Bioadhesion assays were done with porcine tissue and the work of adhesion was $1.906\text{ N.mm} \pm 1.07$ for inert film and $0.956\text{ N.mm} \pm 0.92$ to SFC. The ability of SFC to inhibit MMPs was evaluated with polyacrylamide gel zymography (SDS-PAGE), copolymerized with gelatin under three conditions concomitantly with LPS stimulation for MMP expression, pre-stimulation and post-stimulation and DOX shows to be an inhibitor to MMPs enzymatic activity possibly because it chelates important metals to the activity of these proteinases. Statistical analysis was performed via ANOVA and Tukey post-test, t- Student test was also performed when relevant.

Keywords: metronidazole, periodontitis, metalloproteinases (MMP), MMP inhibition, doxycycline, modified drug release.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	13
2.	Objetivo	18
3.	Metodologia	19
3.1	Reagentes.....	19
3.2	Preparação do sistema filmógeno	21
3.2.1	Preparação da dispersão de quitosana.....	21
3.2.2	Preparação de sistema filmógeno piloto.....	21
3.2.3	Otimização do sistema filmógeno piloto	22
3.3	Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos no sistema de liberação.	23
3.3.1	Quantificação dos Fármacos.....	23
3.3.2	Quantificação simultânea de metronidazol e benzoato de metronidazol	23
3.3.3	Quantificação do hclato de doxiciclina.....	24
3.3.4	Teor dos fármacos no sistema filmógeno.....	25
3.4	Avaliação “in vitro” do comportamento dos fármacos no sistema de liberação filmógeno.....	25
3.4.1	Preparação do meio receptor	25
3.4.2	Ensaio de liberação in vitro dos fármacos a partir dos filmes	26
3.4.3	Ensaio de permeação dos fármacos a partir do filme	27
3.5	Caracterização do sistema de liberação filmógeno	28
3.5.1	Espessura	28
3.5.2	Umidade residual	29
3.5.3	Estudo de captação de água pelo sistema filmógeno	29
3.5.4	Estudo de perda de massa pelo sistema filmógeno	29
3.5.5	Propriedades mecânicas.....	30
3.5.6	Propriedades bioadesivas	30
3.6	Avaliação da citotoxicidade do SFC	31

3.6.1	Linhagem e cultivo celular	31
3.6.2	Citotoxicidade.....	32
3.7	Avaliação “in vitro” do efeito do SFC na expressão/atividade de MMPs	33
3.7.1	Ensaio para determinação de relação dose - resposta: produção de MMPs frente ao estímulo de LPS em células HaCaT	33
3.7.2	Zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS -PAGE) utilizando gelatina como substrato para MMPs	34
3.7.3	Avaliação do efeito do sistema de liberação filmógeno na inibição/diminuição da expressão/atividade de MMPs	35
4.	Resultados e Discussão	37
4.1	Preparação do sistema filmógeno piloto.....	37
4.2	Quantificação dos Fármacos.....	40
4.2.1	Quantificação simultânea de metronidazol e benzoato de metronidazol e validação parcial do método analítico	40
4.2.2	Quantificação do hclato de doxiciclina.....	44
4.3	Teor dos fármacos no sistema filmógeno piloto	56
4.3.1	Metronidazol e Benzoato de Metronidazol	56
4.3.2	Hiclato de Doxiciclina	56
4.4	Avaliação “in vitro” do comportamento dos fármacos.....	56
4.4.1	Ensaio de liberação “in vitro” dos fármacos a partir dos filmes	56
4.4.2	Ensaio de permeação dos fármacos a partir do sistema filmógeno	60
4.5	Caracterização do sistema filmógeno.....	63
4.5.1	Espessura	63
4.5.2	Umidade residual	64
4.5.3	Estudo de captação de água pelo sistema filmógeno	64
4.5.4	Estudo de perda de massa pelo sistema filmógeno	66
4.5.5	Propriedades mecânicas.....	69
4.5.6	Propriedades bioadesivas	71

4.6	Avaliação da citotoxicidade do SFC	74
4.6.1	Citotoxicidade.....	74
4.7	Avaliação “in vitro” do efeito do SFC na expressão/atividade de MMPs	76
4.7.1	Determinação de relação dose - resposta: produção de MMPs frente ao estímulo de LPS em células HaCaT	76
4.7.2	Avaliação do efeito do SFC na inibição/diminuição da expressão/atividade das MMPs	79
5.	Conclusão.....	85
6.	Referências	86

1. Introdução

Doença periodontal (DP) é o termo utilizado para o conjunto de alterações patológicas que atinge o periodonto, sendo este, o tecido que envolve e serve de apoio para os dentes. Usualmente, este termo é utilizado para designar inflamações rotineiras no consultório odontológico, como gengivites e periodontites, ambas causadas pela microbiota do biofilme dental, entretanto, essas alterações podem ainda designar neoplasias, problemas decorrentes de traumas ou ainda problemas de ordem genética (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

A gengivite é facilmente reversível com higiene bucal, enquanto a periodontite exige maior cuidado, uma vez que, a inflamação não está limitada apenas à gengiva, mas também aos tecidos de suporte dental. É uma doença de ordem multifatorial com prevalência mundial entre 20-50%, e em casos mais graves ou por falta de tratamento adequado, pode resultar em perda dos dentes (BENJAMIN, 2010; CASTRO et al., 2015; NAZIR, 2017).

A periodontite, portanto, é uma doença infecto-inflamatória, uma vez que a superfície do dente constitui um ambiente propício para a instalação de bactérias patogênicas que estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, levando a inflamação do tecido (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Entretanto, embora seja agravada por má higiene oral, o acúmulo de tártaro subgengival por si só, não desencadeia a doença, a periodontite tem associação etiológica com bactérias específicas, sendo as principais: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tanarella forsythensis* (CARVALHO; CABRAL, 2007; GARLET, 2010).

A *Porphyromonas gingivalis*, é um coco-bacilo Gram negativo anaeróbio estrito, pertencente à família Bacteroidaceae. Considerado não somente um importante agente causador da periodontite, mas também um fator de progressão e agravamento da doença, a infecção causada por essa bactéria gera lesão tecidual, via produção de fatores de virulência (por exemplo, lipopolissacarídeo - LPS), que promovem ativação do sistema imune e resposta inflamatória no hospedeiro (BOZKURT et al., 2017; CARVALHO; CABRAL, 2007; CASTRO et al., 2015).

A *P. gingivalis* adere às células da cavidade oral e utiliza componentes bacterianos, como fimbrias (apêndices finos capazes de aderir, por exemplo, a fibroblastos, células epiteliais), proteases e peptidases para multiplicar-se (CASTRO et al., 2015). As proteases estão relacionadas com a destruição tecidual, atenuação e modulação do sistema imunológico, via degradação da matriz proteica extracelular, ativação de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), inativação de fatores de complemento e estimulação da morte celular por apoptose (CARVALHO; CABRAL, 2007).

A doença pode tomar proporções em que há formação de um sulco, denominado bolsa periodontal, devido à perda progressiva do tecido conjuntivo gengival e ósseo alveolar, resultado da resposta inflamatória que promove ativação de mediadores que levarão ao recrutamento de leucócitos, aumentando a produção de MMPs além de outras interleucinas (BOZKURT et al., 2017; CASTRO et al., 2015; FREITAS, 2017). Essas proteinases não são apenas responsáveis por aumentar a inflamação, mas também por degradar o tecido conjuntivo e induzir a reabsorção óssea, devido à sua atividade proteolítica (BOZKURT et al., 2017).

As MMPs são enzimas proteolíticas Zn^{2+} dependentes que degradam componentes da matriz extracelular, são secretadas como proenzimas (ProMMPs), por neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e incluem colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e MMPs tipo membrana. São classificadas de acordo com sua especificidade ao substrato e estrutura (GARCIA, 2005).

Em geral, são compostas por um domínio catalítico que possui um sítio de ligação Zn^{2+} e um sítio de ligação catalítica específica, além disso, possuem pelo menos dois átomos de Ca^{2+} que parecem ter a função de estabilizar a estrutura terciária e um domínio da hemopexina (proteína que se liga ao grupo heme com alta afinidade) (GARCIA, 2005; GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; LEHERER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN; RAMAMURTHY, 1983).

As MMPs têm papel importante em vários processos biológicos de cicatrização e reparação tecidual. Entretanto, quando não têm sua liberação controlada estão envolvidas na progressão de uma série de doenças, tais como aterosclerose, artrite, alguns tipos de câncer, hipertensão e problemas ósseos como

osteopenia, uma vez que têm a capacidade de ativar osteoclastos que induzem a reabsorção óssea (ARAÚJO et al., 2011).

O tratamento atual para a periodontite consiste em procedimentos de raspagem e alisamento radicular, para limpeza cuidadosa das bolsas periodontais, de modo a eliminar a placa e o tártaro e assim, diminuir a infecção e inflamação. Em casos mais avançados da doença, antibióticos de administração por via oral com ação sistêmica, geralmente metronidazol, são indicados para tratar a infecção, principalmente em pacientes recorrentes (ELKAYAM et al., 1988; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Para que estes fármacos atinjam concentrações terapêuticas no sítio de ação, é necessário o uso de doses muito altas que podem levar, por sua vez, ao aparecimento de efeitos adversos indesejados, além do risco em relação à resistência microbiológica (ELKAYAM et al., 1988). Dessa forma, o uso de antibióticos em sistemas de liberação local para a periodontite é uma interessante alternativa, uma vez que esses fármacos serão colocados diretamente na bolsa periodontal (SOSKOLNE et al., 1998).

Independente do tratamento para controle e eliminação da infecção estarem clinicamente bem estabelecidos, é relevante a implementação de medidas farmacológicas que colaborem para a diminuição do efeito das MMPs na degradação do tecido conjuntivo e ósseo na periodontite. Posto que, sobretudo, há geração de danos consideravelmente negativos e constrangedores para o paciente que convive com DP.

A doxiciclina, fármaco antimicrobiano da classe das tetraciclinas (TC), é considerada inibidora das MMPs, tais como, gelatinases e colagenases, independente de sua ação antimicrobiana ou seja, quando em dose subantimicrobiana, é aprovada para uso clínico, pelo FDA (United States Food and Drug Administration - registrada como Periostat® -Doxiciclina, uso oral, 20 mg), para tratamento da periodontite em dose subantimicrobiana (DDS), apresentando efeitos satisfatórios quanto à redução da perda dos tecidos gengivais e subjacentes (CASTRO et al., 2015; GOLUB et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010).

Golub et al. (1983), relataram que as TC suprimiram a reabsorção de colágeno que ocorre durante a periodontite e sugeriram que essa ação pode

ser expressiva também em outras condições patológicas, com degradação excessiva de macromoléculas. O mecanismo de ação proposto inicialmente, baseia-se na capacidade das TCs inibirem diretamente as MMPs já ativadas, pela ligação dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} em seu domínio catalítico. Outros mecanismos foram propostos, como por exemplo, a inibição da expressão do precursor inativo das pro-MMPs, pelas TCs, bloqueando a ativação desses zimogênios (GOLUB et al., 2008).

Smith et al., (1999) atribuem a inibição das MMPs pela DOX à estrutura das enzimas, inferindo que a DOX desestabiliza a conformação dos domínios catalíticos e de hemopexina das MMPs (SMITH et al., 1999). Enquanto Garcia et al., 2005, defendem a hipótese de que a inibição acontece devido a ligação entre o Zn^{2+} e DOX, que ocasiona o rompimento da ligação com o Ca^{2+} e portanto, o bloqueio do sítio ativo (GARCIA, 2005).

Embora existam muitas informações sobre o uso e segurança da doxiciclina - em dose subantimicrobiana (DDS) e o fármaco já esteja sendo comercializado (administração via oral) com aprovação pelo FDA, para utilização no tratamento da periodontite, alguns grupos questionam sua utilização devido à possibilidade de atividade antibiótica e desenvolvimento de resistência, ainda que em DDS (FERES et al., 1999).

Frente aos resultados positivos quanto ao uso da DOX em dose subantimicrobiana em oposição aos questionamentos sobre o desenvolvimento de resistência microbiana com o medicamento indicado, por via oral, utilizar um sistema de liberação de fármaco local intrabolsa periodontal, é uma estratégia interessante, uma vez que, possibilita diminuição ainda maior da dose, além de eliminar efeitos antibióticos sistêmicos, mantendo o efeito frente às MMPs, objetivando melhora clínica, não somente devido a eliminação da infecção, mas principalmente, devido a possibilidade de inibição da reabsorção óssea e degradação de fibras colágenas com menos efeitos colaterais ao paciente com DP.

Sendo assim, atrelar o uso da doxiciclina em dose subantimicrobiana junto à administração do metronidazol com efeito antimicrobiano, em um único sistema de liberação tópica sustentada pode somar vantagens ao tratamento, uma vez que, as concentrações pré-determinadas de ativos no local são mantidas, minimizando a ocorrência de efeitos farmacoterapêuticos

indesejados, atingindo dois efeitos importantes que contribuirão para evolução positiva do quadro clínico: eliminar a infecção, e diminuir a degradação de macromoléculas importantes na construção do tecido conjuntivo minimizando a reabsorção óssea.

Dessa forma, nesse trabalho foi desenvolvido e caracterizado farmacotecnicamente, sistema filmógeno de liberação modificada contendo DOX e MDZ, sendo o segundo, associado em duas formas, base e benzoato de metronidazol com a finalidade de modular a liberação deste antimicrobiano e favorecer a manutenção das doses de fármaco na bolsa periodontal.

2. Objetivo

Desenvolver e caracterizar formulação filmógena contendo metronidazol e doxiciclina e avaliar seu potencial no tratamento da periodontite.

Metas

Desenvolver sistema de liberação filmógeno

Desenvolver método analítico para quantificação dos fármacos a partir do sistema filmógeno.

Avaliar o comportamento dos fármacos no sistema de liberação filmógeno: liberação dos fármacos a partir dos filmes e ensaio de permeação dos fármacos a partir dos filmes.

Caracterizar o sistema de liberação filmógeno quanto aos parâmetros: espessura, umidade residual, estudo de captação de água, estudo de perda de massa, propriedades mecânicas e mucoadesivas.

Avaliar in vitro a citotoxicidade da formulação desenvolvida.

Avaliar in vitro o efeito da formulação desenvolvida na expressão/atividade de MMPs

3. Metodologia

3.1 Reagentes

- 2,5 % Tripsina – 10x (Gibco[®])
- Acetonitrila (JTBaker[®])
- Ácido acético glacial (Synth[®])
- Ácido Clorídrico 37% (Synth[®])
- Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1) (Sigma Aldrick[®])
- Água ultrapurificada (Sistema Simplicity, Millipore[®])
- Antibiótico-Antimicótico (10,000 unidades de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B) (Gibco[®])
- Ázida sódica (Sigma Aldrick[®])
- Azul de bromofenol (Sigma Aldrick[®])
- Benzoato de metronidazol (Henrifarma[®])
- Bicarbonato de sódio (Sigma Aldrick[®])
- CelLytic M (Sigma Aldrick[®])
- Cloreto de cálcio (Synth[®])
- Cloreto de potássio (Sigma Aldrick[®])
- Cloreto de sódio (Sigma Aldrick[®])
- Dihidrogenofosfato de potássio (Sigma Aldrick[®])
- DMEM low glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrick[®])
- EDTA (etilenodiamino tetra acético) (Synth[®])
- Fosfato de sódio bibásico (Synth[®])
- Fosfato dissódico (Sigma Aldrick[®])
- Gelatina (Sigma Aldrick[®])
- Glicerol (Sigma Aldrick[®])
- Glicina (Sigma Aldrick[®])
- Hiclato de Doxiciclina (Fagron[®])
- Hidróxido de sódio (Synth[®])
- Hidroxipropilmetilcelulose K100 (Colorcon[®])

LPS (lipopolissacarídeo obtido a partir de *Escherichia coli* 0111:B4)
(Sigma Aldrick®)

Metanol (JTBaker®)

Metronidazol Base (Henrifarma®)

Padrão analítico metronidazol, benzoato de metronidazol e hclato de doxiciclina (Sigma Aldrick®)

Persulfato de amônia (Sigma Aldrick®)

Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ (Bio-rad®)

Propilenoglicol (Synth®)

QC Colloidal Commassie Stain (Bio-rad®)

Quitosana de médio peso molecular 190 - 310 KDa (Sigma Aldrick®)

Resazurina (sal sódico) (Sigma Aldrick®)

SDS (dodecilsulfato de sódio) (Sigma Aldrick®)

Soro Fetal Bovino (Gibco®)

TEMED (tetrametiletilenodiamina) (Sigma Aldrick®)

Triton X-100 (Sigma Aldrick®)

Trizma-base® (Sigma Aldrick®)

3.2 Preparação do sistema filmógeno

3.2.1 Preparação da dispersão de quitosana

A quitosana de médio peso molecular 190 - 310 KDa foi adicionada na quantidade de 1% (m/m), a uma solução aquosa (água ultrapurificada) de ácido acético glacial pH 2,0, aferido com pHmetro digital (Digimed[®], DM-22), e o pH, reajustado quando necessário. O conjunto foi mantido em agitação de 400 rpm por 24 h, ou até a completa dispersão do polímero. Em seguida, a dispersão foi colocada no homogeneizador ultra-turrax (IKA[®], T25), por 10 minutos, velocidade 2 e desaerada em banho de ultrassom por 30 minutos, sem aquecimento.

3.2.2 Preparação de sistema filmógeno piloto

O sistema filmógeno, piloto foi preparado pela adição de hidroxipropilmetilcelulose K100 (HPMC K100 LV) e propilenoglicol à dispersão de quitosana, preparada conforme descrito no item **3.2.1** e mantidos em agitação *overnight* (12h, 400 rpm). Os fármacos MDZ e BMDZ foram adicionados e mantidos sob agitação de 150 rpm por 2h, para desfavorecer a formação de bolhas de ar na dispersão polimérica. Na sequência, a DOX foi adicionada sob luz amarela, uma vez que este fármaco é fotossensível e a agitação mantida por mais 1 h. As quantidades estão descritas na **Tabela 1**.

Os filmes foram obtidos pela técnica de “casting” (evaporação do solvente), depositando 70 g da dispersão final em placas de poliestireno (12 cm x 12 cm, área de 144 cm²) e submetidos à secagem em câmara climática (Tecna[®] TE-4003) a 30°C e 30% de umidade relativa por 72 horas.

Tabela 1: Composição do sistema filmógeno piloto.

Componente	Sistema Filmógeno Piloto (g)
HPMC K100	3,0 g
Propilenoglicol	1,0 g
MDZ	0,180 g
BMDZ	0,360 g
DOX	0,120 g
Dispersão de quitosana 1%qsp 100 g

3.2.3 Otimização do sistema filmógeno piloto

O sistema filmógeno piloto foi aprimorado para atender aos objetivos propostos. A versão escolhida para seguir com os estudos de caracterização farmacotécnica conteve as seguintes alterações, quando comparada ao descrito no item **3.2.2**: 1) a percentagem de quitosana na dispersão inicial foi de 2,0% (m/m), preparada conforme descrito no item **3.2.1**; 2) a esta dispersão não foi adicionado HPMC; 3) os fármacos foram inicialmente dispersos em propilenoglicol, utilizando gral e pistilo, sob proteção da luz branca na proporção descrita na **Tabela 2**. Sequencialmente, a dispersão de quitosana adicionada à dos fármacos homogeneizada em gral e pistilo, cuidadosamente, até completa dispersão dos fármacos/propilenoglicol no polímero.

A dispersão polimérica (70 g) foi depositada em placas de poliestireno (12 cm x 12 cm, área de 144 cm²) e, submetidas à secagem em câmara climática (Tecnal[®] TE-4003) a 30°C e 30% de umidade relativa por 24 horas, em média.

Tabela 2: Composição do sistema filmógeno.

Componente	Sistema Filmógeno (g)
Propilenoglicol	1,0 g
MDZ	0,180 g
BMDZ	0,360 g
DOX	0,120 g
Dispersão de quitosana 2%qsp 100 g

3.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos no sistema de liberação.

3.3.1 Quantificação dos Fármacos

As análises foram realizadas usando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE, Shimadzu[®]), controlador CBM-20A, bomba LC-20AT detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD) SPDM20A, degaseificador (DGU-20A5R), forno CTO -20A e auto-amostrador (SIL-20AHT).

3.3.2 Quantificação simultânea de metronidazol e benzoato de metronidazol

O método analítico utilizado foi previamente desenvolvido e validado no laboratório P&D Farmacotécnico para quantificação de metronidazol (MDZ) e benzoato de metronidazol (BMDZ) e apresentado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo na forma de relatório no âmbito do Programa Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas Fase II- Processo nº 2012/51863-6 (2016). As condições cromatográficas utilizadas foram gradiente linear com composição de fase móvel inicial de metanol:água ultrapurificada 40:60 (v/v) e ao final de 20 minutos, 90:10 (v/v), coluna de fase reversa C-18 (modelo Shim-pack, Shimadzu[®]) com 4,6 mm x 25 cm e diâmetro de partícula de 5 µm,

acoplada a pré-coluna C18 correspondente, a 40°C, com vazão de 0,8 mL/min e detecção 320 nm. O tempo de eluição totalizou 25 min. A aquisição e análise dos dados foram feitas com o *software* Shimadzu® LabSolution.

Para as quantificações das amostras provenientes dos ensaios realizados, utilizou-se curvas analíticas preparadas em metanol, com o intervalo linear de 0,5 a 50 µg/mL, com ambos os padrões analíticos. Para o cálculo do total da forma ativa do fármaco (MDZ), os valores de BMDZ foram expressos em MDZ. A conversão foi realizada com base na relação do peso molecular entre metronidazol (MM = 171,15) e benzoato de metronidazol (MM = 275,26).

A seletividade, precisão e a exatidão do método previamente validado foram refeitas para efeito de revalidação analítica, devido as alterações na composição da forma farmacêutica para a qual o método foi desenvolvido, atendendo ao recomendado pela a RDC 166 de RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017).

3.3.3 *Quantificação do hiclato de doxiciclina*

As condições cromatográficas se basearam no método preconizado pela Farmacopeia Britânica para a quantificação do hiclato de doxiciclina (DOX) com modificações para adequar-se aos objetivos do trabalho. (“BP”, 2019) A fase móvel é composta por mistura de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 0,06 M acrescido de 4 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético), pH 6,0, 40:60 (v/v) fluxo isocrático com vazão de 1 mL/min em coluna de fase reversa C18 (Gemini Phenomenex 250 x 4,6 mm, 5 µm) e temperatura controlada a 30°C. O tempo de eluição totalizou 5 min e a detecção ocorreu a 355 nm. A aquisição e análise dos dados foram feitas com o *software* Shimadzu® LabSolution.

Para as quantificações das amostras provenientes dos ensaios realizados, utilizou-se curvas analíticas preparadas em fase móvel, com o intervalo linear de 1,0 a 10,0 µg/mL com o padrão analítico.

A validação do método analítico foi realizada, atendendo ao preconizado pela RDC 166 (ANVISA, 2017), com os seguintes parâmetros avaliados: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

3.3.4 Teor dos fármacos no sistema filmógeno

3.3.4.1 Metronidazol e Benzoato de Metronidazol

Amostras dos filmes, aproximadamente 10 mg, foram adicionados de 5 mL de metanol e deixados em banho de ultrassom por 1 h. Após a filtração da dispersão em membrana de nylon 0,22 μm , as amostras foram diluídas 10 vezes em fase móvel e os fármacos quantificados no filtrado por CLAE. Os teores foram expressos em MDZ via relação da massa molecular entre metronidazol (MM = 171,15) e benzoato de metronidazol (MM = 275,26). O ensaio foi realizado em triplicata e o teor expresso em porcentagem de fármaco encontrada na amostra referente ao valor teórico esperado.

3.3.4.2 Hiclato de Doxíciclina

Amostras dos filmes, aproximadamente de 10 mg, dos filmes foram adicionados de 5 mL de acetonitrila e mantidos em contato por 1,5 h, sendo agitadas em vórtex por 60 s a cada 30 minutos. Optamos por evitar o banho de ultrassom para a DOX, pois, devido ao seu potencial quanto a agente quelante, a agitação poderia favorecer reações com metais provenientes do vidro e liberados no processo, desfavorecendo a quantificação real do fármaco. Após a filtração da dispersão em membrana de nylon 0,22 μm as amostras foram diluídas 10 vezes em fase móvel e o fármaco quantificado no filtrado por CLAE. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor expresso em porcentagem de fármaco encontrada na amostra referente ao valor teórico esperado.

3.4 Avaliação “in vitro” do comportamento dos fármacos no sistema de liberação filmógeno

3.4.1 *Preparação do meio receptor*

A solução receptora para os ensaios de liberação e permeação *in vitro* foi constituída por tampão fosfato de sódio pH 6, com molaridade de 30 mM e EDTA 4 mM.

3.4.2 *Ensaio de liberação in vitro dos fármacos a partir dos filmes*

3.4.2.1 Preparo das membranas de celulose

As membranas de celulose (Fisherbrand®) foram previamente hidratadas em água destilada em ebulição, pelo tempo total de 30 minutos, a água foi trocada a cada 10 minutos.

3.4.2.2 Liberação “in vitro” dos fármacos

A avaliação dos perfis de liberação do MDZ, BMDZ e DOX a partir dos filmes foi realizada em células de difusão vertical tipo “Franz” preenchidas com meio receptor (volume 30 mL) (item 3.4.1) acopladas a um sistema de circulação de água com controle de temperatura, tornando possível a realização do ensaio a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação constante de 300 rpm. Devido à DOX ser fotossensível, luz amarela foi utilizada para a realização do teste. O compartimento doador foi isolado do receptor com membrana previamente hidratada (item 3.4.2.1). No compartimento doador, sobre a membrana, foram colocados 200 μL de meio receptor e amostras dos filmes, com área de 1,76 cm^2 obtidos com molde. Alíquotas de 1,0 mL do líquido receptor foram coletadas, filtradas em membrana de nylon 0,22 μm nos seguintes tempos: 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210; 240; 270; 300; 360 minutos e 24 h; 48 h; 72 h e 168 h (7 dias), para quantificação, por CLAE de acordo com o método analítico correspondente e o volume equivalente foi repostado com solução receptora a cada coleta. Os filmes remanescentes contidos nas células de difusão foram reservados e os fármacos extraídos utilizando-se acetonitrila como solvente, filtrados em membrana de nylon 0,22 μm e também quantificados pelo método correspondente.

3.4.3 Ensaio de permeação dos fármacos a partir do filme

3.4.3.1 Preparo de tecido esofageal suíno

Os esôfagos, previamente obtidos e armazenados em freezer -20°C, foram lavados em água corrente, para remoção de possíveis restos de alimentos. O esôfago foi seccionado e a parte da mucosa ficou em contato com o filme para a realização do experimento, conforme **Figura 1**.

Figura 1: Preparo da membrana esofageal suína.



3.4.3.2 Ensaio de permeação in vitro

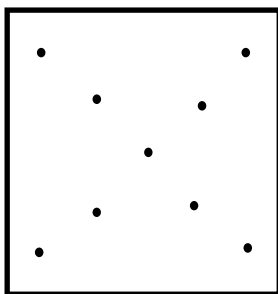
A avaliação dos perfis de permeação do MDZ, BMDZ e DOX a partir dos filmes foi realizada em células de difusão vertical tipo “Franz” (30 mL) preenchidas com meio receptor (item 3.4.1) acopladas a um sistema de circulação de água com controle de temperatura, tornando possível a realização do ensaio a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação constante de 300 rpm. Devido à DOX ser fotossensível, luz amarela foi utilizada para a realização do teste. O compartimento doador foi isolado do receptor com tecido esofageal de suíno, previamente preparado. No compartimento doador, sobre o tecido, foram colocados 200 μL de meio receptor e amostras dos filmes com área de 1,76 cm^2 . Alíquotas de 1,0 mL do líquido receptor foram coletadas, filtradas em membrana de nylon 0,22 μm nos seguintes tempos: 1 h; 4 h; 6 h; 24 h; 48; 120 h e 144 h e 168h (7 dias), para quantificação por CLAE de acordo com o método analítico correspondente e o volume equivalente foi repostado com solução receptora a cada coleta. Os filmes remanescentes contidos nas células de difusão e o tecido biológico utilizado foram reservados e os fármacos extraídos utilizando-se acetonitrila como solvente, filtrados em membrana de nylon 0,22 μm e também quantificados pelo método correspondente.

3.5 Caracterização do sistema de liberação filmógeno

3.5.1 *Espessura*

A espessura dos filmes foi obtida utilizando-se micrômetro (Mitutoyo®) com resolução de 0,01 mm. Nove pontos diferentes do filme foram medidos, conforme esquema demonstrado na **Figura 2**, o resultado foi expresso como a média dos valores com desvio padrão relativo.

Figura 2: Representação esquemática dos nove pontos onde a espessura do filme foi medida.



3.5.2 *Umidade residual*

O teor de umidade residual dos filmes foi obtido com analisador de umidade acoplado a fonte de radiação halógena com resolução de 0,01% (Ohaus MB45). Para a realização das análises, aproximadamente 0,5 g de amostra foi utilizada. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade.

3.5.3 *Estudo de captação de água pelo sistema filmógeno*

Amostras dos filmes com área de 1,76 cm² foram pesados e imersos pelo tempo de 1 h e 7 dias, em placas de polipropileno de 6 cm de diâmetro contendo 10 mL da solução descrita no item 3.4.1 e mantidos à 25°C ± 2 °C. Após o tempo estabelecido o excesso de líquido foi removido com papel absorvente e o filme foi pesado. A quantidade de líquido absorvido pela amostra foi determinada pelo ganho de massa, em relação à massa inicial do corte, em porcentagem. A análise foi realizada em sextuplicata para cada um dos tempos avaliados.

3.5.4 *Estudo de perda de massa pelo sistema filmógeno*

Amostras dos filmes com área de 1,76 cm² foram mantidos em estufa (Odontobrás. MOD-EL-1.4) a 50 °C por 1 h, com o intuito de eliminar a umidade residual presente nos filmes. Após esse processo, os filmes foram pesados e

imersos por 7 dias em placas de polipropileno de 6 cm de diâmetro contendo 10 mL da solução descrita no item **3.4.1** e mantidos à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o tempo estabelecido o líquido foi removido e o material foi mantido em estufa à 50°C até a secagem completa. A perda de massa foi expressa como a redução da massa do filme em relação à massa inicial, em porcentagem. A análise foi realizada em sextuplicata.

3.5.5 Propriedades mecânicas

Os valores de tensão na ruptura (mPa) e alongação (em %) dos filmes foram avaliados em analisador de textura (TA-XT *plus*, Stable Micro Systems) equipado com conjunto de garras para tensionamento e célula de carga de 5 Kg. Amostras com 6 mm de largura e 80 mm de comprimento foram obtidas e as espessuras foram registradas em 6 pontos no decorrer do comprimento do filme, para cálculo adequado dos parâmetros analisados. O experimento foi realizado em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e quintuplicata para cada filme. Os valores de alongação e tensão dos filmes foram determinados pelo *software* Exponent[®].

3.5.6 Propriedades bioadesivas

As propriedades bioadesivas foram determinadas em analisador de textura (TA-XT *plus*, Stable Micro Systems), o filme foi aderido ao corpo de prova, com fita dupla face cortada nas mesmas dimensões do filme (Fixa forte, 3M[™] Scotch[®]) e fixado no acessório superior. A superfície livre do tecido esofageal suíno foi umedecida com 100 μL de solução descrita no item **3.4.1**. Em seguida, o dispositivo superior do equipamento foi movimentado para baixo (módulo de compressão) até encontrar a superfície da mucosa esofageal suína, mantendo contato por 120 segundos em módulo de compressão de 0,1 N. Após este período, o acessório foi movimentado em módulo de tensão à velocidade constante de $1\text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ até que o corpo de prova se destacasse da mucosa. A força necessária para destacar o filme da mucosa é considerada a

força de adesão, enquanto a área do pico é o trabalho de adesão, ambos determinados pelo *software* Exponent[®]. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

3.6 Avaliação da citotoxicidade do SFC

3.6.1 Linhagem e cultivo celular

3.6.1.1 Preparo do meio de cultura

Para o preparo de 1L de meio de cultura completo, foram adicionados 45 g DMEM *low glucose*, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio em aproximadamente 800 mL de água ultrapurificada sob agitação em béquer até completa dissolução. A mistura foi suplementada com 1 % (v/v) de solução de antibiótico e antifúngicos composta por 10,000 unidades de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (LATORRE et al., 2021). O conteúdo foi vertido em balão volumétrico de 1 L, o pH, quando necessário, foi acertado para 7,4, utilizando-se solução de NaOH ou HCl 0,1M. Ao final, o meio de cultura assume coloração vermelha. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm dentro do fluxo laminar para evitar contaminações. O preparo de meio de cultura incompleto ocorreu da mesma maneira descrita acima, entretanto, o soro fetal bovino não foi adicionado.

3.6.1.2 Preparo de PBS (solução salina de tampão fosfato) 1x

Para o preparo de PBS 1x, foram adicionados a um béquer 800 mL de água ultrapurificada, 137 mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM de KH₂PO₄, essa mistura foi mantida sob agitação até completa dissolução dos componentes, quando foi transferida para balão volumétrico de 1L e o volume de água foi completado. O pH final dessa solução foi igual a 7,4 (YAMAIZUMI et al., 1978).

A solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm dentro do fluxo laminar para evitar contaminações.

3.6.1.3 Cultivo de células HaCaT

As células HaCaT são da linhagem dos queratinócitos epidérmicos humanos e foram gentilmente doadas pelo laboratório NanoGeneSkin. As células foram cultivadas em meio de cultura completo, preparado conforme descrito no item **3.6.1.1** e incubadas a 5% de CO₂ a 37°C em garrafas de cultivo celular para a formação da monocamada celular. (LATORRE et al., 2021)

Após atingir 70-80% de confluência foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas com tripsina diluída 2x, por aproximadamente 5 minutos, para desagregá-las da garrafa. Após a desagregação, as células foram centrifugadas a 1700 rpm por 7 minutos (Centrífuga Eppendorf®, 5430 R) e ressuspendidas em meio de cultura completo, contadas usando a câmara de Neubauer (Kasvi®) e utilizadas conforme protocolos descritos a seguir.

3.6.2 *Citotoxicidade*

As células HaCaT foram cultivadas conforme descrito no item **3.6.1**. Sequencialmente, as células foram transferidas na densidade de 1,0x10⁴ células por poço para placas de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 h em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada, para a formação da monocamada celular.

O sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e 200 µL das soluções teste contendo o sistema filmógeno completo diluído em DMEM incompleto foram adicionadas nas seguintes concentrações: 80 µg/mL; 40 µg/mL; 20 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL; 2,5 µg/mL; 1,25 µg/mL; 0,625 µg/mL. A formulação inerte, sem os fármacos, também foi avaliada na concentração de 80 µg/mL.

As células foram novamente incubadas sob as mesmas condições e após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h o sobrenadante foi removido e as células foram

lavadas com PBS 1X. Adicionou-se 200 µL de solução de resazurina a 25 µg/mL preparada em meio celular incompleto em cada poço (LATORRE et al., 2021). As placas foram levadas para a incubadora por 4 horas. Após esse tempo, a fluorescência foi determinada por meio de leitor de placas (Synergy 2, Biotek®), sob as condições excitação λ 530/25 nm, emissão λ 590/35 nm). Os resultados obtidos para as células incubadas com as diferentes concentrações foram comparados com as culturas incubadas somente com meio, considerando 100% de viabilidade celular.

3.7 Avaliação “in vitro” do efeito do SFC na expressão/atividade de MMPs

3.7.1 Ensaio para determinação de relação dose - resposta: produção de MMPs frente ao estímulo de LPS em células HaCaT

As células HaCat foram cultivadas conforme descrito no item 3.6.1 e transferidas para placas de 6 poços, na densidade celular de $1,0 \times 10^5$ células por poço em meio DMEM completo e incubadas a 37°C por 24 h em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada, para a formação da monocamada celular (DI CAPRIO et al., 2015; PARK et al., 2012).

Na sequência, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e 2 mL das soluções teste foram adicionadas, contendo a solução de LPS (lipopolissacarídeo obtido a partir de *Escherichia coli*) diluído em meio DMEM incompleto, nas concentrações de 10 e 20 µg/mL e tempos de exposição de 24 h, 48 h e 72 h. O controle de produção basal de MMPs também foi avaliado (DI CAPRIO et al., 2015; MORGANTI et al., 2017).

Após 24 h, 48 h e 72 h o sobrenadante foi removido e armazenado em freezer -20 °C em tubo tipo *ependorf*® para posterior análise conforme descrito no item 3.7.2 (zimografia). As células aderidas foram lavadas com PBS 1x e lisadas com 600 µL de CellLytic M, por 15 minutos a 37 °C. com o auxílio de *scraper* (Kasvi®), as células lisadas foram transferidas para tubo tipo *ependorf*® e centrifugadas por 30 minutos a 7 000 RCF (Centrífuga *ependorf*®, 5430 R).

O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -20°C para seguir com as análises de zimografia (HERATH et al., 2011; MOHAMAD et al., 2020).

3.7.2 Zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS -PAGE) utilizando gelatina como substrato para MMPs

As amostras provenientes do ensaio descrito no item 3.7.1, foram submetidas à eletroforese (Sistema Mini Protean Tetra Cell - BioRad®), sendo os géis de corrida (10 %) e concentração (5 %), preparados conforme **Tabela 3** (VICENTINI et al., 2008).

Tabela 3: Composição dos géis de concentração (5%) e corrida (10%) usados no experimento de zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (SDS – PAGE).

Componentes	Gel de	Gel de
	concentração	separação
	5%	10%
Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	255 µL	1333 µL
Gelatina 100 mg/mL –	-----	160 µL
SDS 5%	-----	160 µL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	-----	1500 µL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	375 µL	-----
H ₂ O ultrapurificada	855 µL	1127 µL
TEMED	7,5 µL	20 µL
Persulfato de amônio 10%	7,5 µL	20 µL

As amostras foram diluídas em tampão de amostra, contendo 12,5 % de Tris-HCl (Trizma-base®) 0,5 M pH 6,8, 25 % de glicerol, 1,25 % de solução de azul de bromofenol 1 %, 2 % de SDS e 59,25 % de água ultrapurificada e aquecidas em banho maria por 10 minutos à 37°C. Padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards Kalleidoscope®) foi utilizado (IVAN et al., 2014; VICENTINI et al., 2008).

O tampão de corrida utilizado foi constituído por Tris-HCl (Trizma-base®) 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,15 %, com pH final de 8,3. As condições de

pré-corrída utilizadas foram de $i = 10 \text{ mA}$, $P = 90 \text{ W}$, já as condições de corrída foram $U = 250 \text{ V}$ e $i = 20 \text{ mA}$, $P = 90 \text{ W}$ e $U = 250 \text{ V}$ (Power Suply, GSR) e totalizaram 80 minutos, em média. Após a saída do corante, aguardou-se 5 minutos para finalizar a eletroforese (FONSECA et al., 2010; VICENTINI et al., 2008).

Ao término da eletroforese, o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 h com solução de Triton X-100 2,5 % sob agitação constante e posteriormente incubado por 12 h a 37°C em tampão de reação constituído de Tris-HCl (Trizma-base[®]) 0,05 M, pH 7,4, 5 mM CaCl_2 e 0,02 % de azida sódica (FONSECA et al., 2010; IVAN et al., 2014; VICENTINI et al., 2008).

Após incubação do gel no tampão de reação, a coloração foi realizada sob agitação, por pelo menos 2 h em corante QC Colloidal Coomassie Stain. A atividade proteolítica foi melhor observada após descoloração do gel com solução de ácido acético 20 % (VICENTINI et al., 2008).

3.7.3 Avaliação do efeito do sistema de liberação filmógeno na inibição/diminuição da expressão/atividade de MMPs

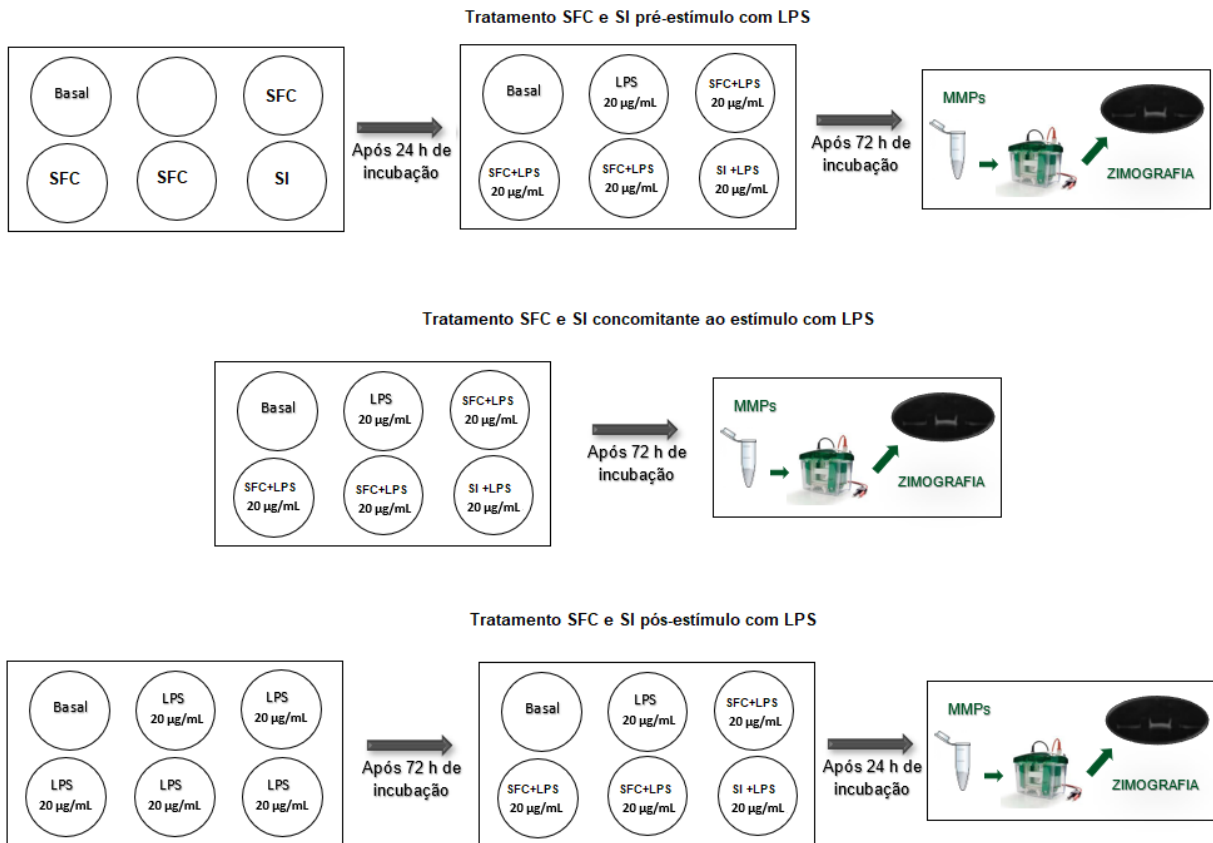
De acordo com os resultados nos ensaios descritos nos itens **3.7.1** e **3.7.2** que estabeleceram parâmetros em termos de concentração de LPS e tempo de incubação, foi avaliada a capacidade do sistema filmógeno em diminuir a expressão/atividade das metaloproteinases.

Os ensaios foram realizados em três condições de exposição das células mediante ao estímulo de LPS e às diferentes concentrações do sistema filmógeno, denominado como tratamento, sendo elas: a) pré: tratamento realizado pré estímulo com LPS (20 $\mu\text{g/mL}$); b) concomitante: tratamento realizado junto ao estímulo de LPS (20 $\mu\text{g/mL}$); c) pós: tratamento realizado após o estímulo de LPS (20 $\mu\text{g/mL}$), conforme esquematizado e respeitando os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (item **3.6.2**).

Ao final do período de incubação, as células foram lisadas, centrifugadas e o sobrenadante avaliado quanto a expressão/atividade de metaloproteinases conforme descrito no item **3.7.1**. Culturas de células não estimuladas, com o intuito de verificar se há produção basal de MMPs, assim como culturas

estimuladas somente com LPS, foram utilizadas como controles (DI CAPRIO et al., 2015; FONSECA et al., 2010; IVAN et al., 2014; VICENTINI et al., 2008).

Figura 3: Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito do sistema de liberação filmógeno (SFC) bem como do filme inerte, sem adição dos fármacos (FI), na inibição/diminuição da expressão/atividade de MMPs. Considere que cada poço contém 1×10^5 células em meio DMEM incompleto.



4. Resultados e Discussão

4.1 Preparação do sistema filmógeno piloto

Baseado na experiência e resultados com o sistema de liberação desenvolvido anteriormente no laboratório de P&D Farmacotécnico e apresentado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo na forma de relatório no âmbito do Programa Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas Fase II- Processo nº 2012/51863-6 (2016), também para o tratamento da doença periodontal, decidimos iniciar o desenvolvimento do filme com os fármacos em questão, utilizando a zeína como opção de polímero.

Em primeiro momento no desenvolvimento desses sistemas, espera-se as seguintes características farmacotécnicas: a) uniformidade, a ser avaliada a olho nu quanto a cristalização dos fármacos e outros componentes da fórmula; b) maleabilidade de modo a facilitar o manuseio dos filmes, o que será relevante em escala laboratorial, industrial ou na prática clínica. A inserção de um dispositivo intrabolsa é um procedimento delicado, uma vez que a região está em processo inflamatório e o espaço de inserção do dispositivo é extremamente limitado, uma vez que a profundidade média da bolsa está entre 5 a 12 mm (BRUSCHI et al., 2006).

As zeínas são proteínas provenientes do endosperma dos grãos de milho e apresentam característica de polimerização bem elucidada na literatura no que diz respeito a formação de filmes (BECK, M.I.; TOMKA, I.; WAYSEK, 1996). No entanto, o filme contendo MDZ, BMDZ e DOX teve aspecto não condizente com o esperado, resultando em um sistema pouco maleável, quebradiço e com fármaco cristalizado após a secagem em câmara climática com 30% de umidade e temperatura de 35°C.

Dessa forma e com o objetivo de modular a dissolução, liberação e permanência do sistema de liberação no local de ação, optamos por associar dois polímeros, sendo eles de diferentes solubilidades em meio aquoso. Nesse sentido, após busca bibliográfica, os polímeros de escolha para a obtenção do sistema piloto foram a quitosana e a hidroxipropilmetilcelulose K100 (HPMC K100 LV).

A quitosana é produto da reação de desacetilação da quitina, polissacarídeo insolúvel extraído do exoesqueleto de crustáceos e, consiste na transformação do grupo acetamida (NHCOH_3) em amina (NH_2) via reação de hidrólise básica em altas temperaturas. Essa reação leva a produção de um biopolímero, por sua vez, solúvel em soluções aquosas de caráter ácido, em consequência da protonação dos grupos aminos (NH_3^+) recém formados em sua cadeia polimérica que permitem maior solvatação pela água e consequente solubilidade (AZEVEDO et al., 2007; SORLIER et al., 2001).

Possui características biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicas e conhecida capacidade formadora de filme, por isso, é amplamente utilizada para o desenvolvimento desses sistemas de liberação (AZEVEDO et al., 2007; KUMAR, 2000; NOEL et al., 2008). Suas propriedades físico-químicas estão diretamente ligadas ao grau de desacetilação e massa molar aparente parâmetros estes, inversamente proporcionais (MOURA et al., 2011; SORLIER et al., 2001). Dessa forma, optamos por utilizar a quitosana de médio peso molecular para que pudéssemos carregar a quantidade de fármacos proposta.

Outro motivo pelo qual a quitosana passou a ser um polímero de nossa escolha é a quantidade de estudos correlacionando sua utilização à reparação óssea, podendo ser, dessa forma, um agente de sinergismo com a DOX (MORAES et al., 2017; VENKATESAN; KIM, 2014; WANG et al., 2002). No mais, apresenta propriedades quelantes, o que pode ser uma vantagem para o sistema (KUMAR, 2000).

O HPMC K100 LV é um polímero semissintético derivado de celulose com propriedades formadoras de filmes flexíveis, de caráter não iônico e estável entre os pH 2,0 e 13,0, o que lhe permite a associação com a quitosana, uma vez que ela deve ser dispersada em meio ácido, como descrito anteriormente.(COLORCON, 2009). Sua associação com a quitosana pareceu uma alternativa promissora, em um primeiro momento, no sentido de modular a liberação dos fármacos.

Como plastificante, utilizamos o propilenoglicol com o intuito de favorecer as propriedades mecânicas (FREDERIKSEN; GUY; PETERSSON, 2015; ROY et al., 2009).

A associação de metronidazol em suas duas formas, base e benzoato (MDZ e BMDZ, respectivamente) foi utilizada de modo a colaborar com a

modulação da liberação dos fármacos. Posto que a solubilidade do MDZ é 10 mg/mL e do BMDZ é 0,1 mg/mL e a forma benzoato, em meio aquoso sofre hidrólise, revelando-se na forma base e ativa do fármaco, combiná-los contribuirá para o efeito prolongado desejado (MATHEW; GUPTA; BETHEA, 1994). A dose utilizada no sistema piloto baseou-se em estudos preliminares do grupo (Processo PIPE nº 2012/51863-6). Como não houve cristalização do fármaco após a secagem do filme, a quantidade foi mantida, objetivando o efeito antimicrobiano desejado com base no valor de MIC (Concentração Inibitória Mínima) relatado pela literatura para a *P. gingivalis* de 1,0 µg/mL (T. LARSEN, 2002).

A doxiciclina é comercializada em 2 formas: a) doxiciclina monohidratada, forma menos solúvel e geralmente usada na formulação de comprimidos e cápsulas (Vibramicina[®] 100 mg, por exemplo), pois possui menos efeitos adversos gastrointestinais; b) cloridrato de doxiciclina hemietanolato-hemihidrato, comumente chamado de hiclato de doxiciclina, considerada a forma mais solúvel, entretanto, com mais efeitos adversos gastrointestinais, por isso, é utilizada principalmente em géis de ação local (Atridox[®]) e comprimidos com menor dosagem (Periostat[®] - hiclato de doxiciclina), sendo portanto a escolhida para a formulação piloto (SANTOS, 2014).

Em se tratando da DOX não há, comercialmente, um produto para aplicação local em dose subantimicrobiana, entretanto, alguns estudos já foram realizados com géis a 1% de concentração e se mostraram seguros e com respostas positivas quanto à inibição das MMPs (MADI et al., 2018). Além disso, há o produto comercial Atridox[®], contendo 10% de DOX e utilizado com ação antimicrobiana no tratamento local de infecções, portanto, respaldados por essas informações, optamos por trabalhar abaixo da faixa do produto comercial com ação antibacteriana desse fármaco (JAVALI; VANDANA, 2012). A partir da avaliação do comportamento da DOX, se necessário, reavaliaremos a quantidade, pautados inicialmente pelos valores de MIC para a *P. gingivalis* relatados pela literatura de 0,5 µg/mL (T. LARSEN, 2002).

O sistema obtido pela associação desses dois polímeros, HPMC K100 (polímero com caráter mais hidrofílico) e quitosana (polímero com caráter menos hidrofílico), atendeu as características farmacotécnicas esperadas e,

portanto, o filme descrito na **Tabela 1**, foi definido como o sistema piloto e para dar sequência ao processo de desenvolvimento do sistema filmógeno, experimentos iniciais de liberação foram realizados para determinar a tendência de comportamento dos fármacos nesse sistema e serão melhor descritos no item **4.4.1**. A proporção utilizada de polímeros nos forneceu dados importantes, por exemplo, para o MDZ e BMDZ a liberação esteve controlada durante todo o experimento, que durou 7 dias, atendendo aos objetivos pré-estabelecidos.

Entretanto, para a DOX algumas mudanças foram necessárias, uma vez que, nos primeiros minutos, já houve aproximadamente 60% de liberação da DOX, por isso, a formulação piloto inicial foi aperfeiçoada quanto a proporção de polímeros, com o intuito de atender aos parâmetros farmacotécnicos requeridos pelo objetivo do projeto.

Inicialmente, alteramos a proporção de HPMC K 100: quitosana utilizada de 3:1, para 2:1; seguidos de 1:1 e 0,5:1. Em nenhum desses casos, os gráficos de liberação apresentaram mudanças significativas e a liberação da DOX seguiu sendo de no mínimo 48% nos primeiros minutos.

Dessa forma, decidimos retirar o HPMC K100 da formulação e aumentar a concentração da dispersão de quitosana no sistema. O filme descrito na **Tabela 2**, atendeu as exigências farmacotécnicas requeridas pelo estudo e foi determinado como o sistema de escolha para seguir com a caracterização.

Ainda no decorrer do desenvolvimento se fez necessário o uso de agente quelante na formulação para estabilizar o comportamento da DOX, uma vez que esse fármaco forma quelatos em meios aquosos (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000). Dessa forma, ao adequar o sistema, 0,1% de EDTA foi adicionado à composição otimizada, denominada SFC (sistema filmógeno completo).

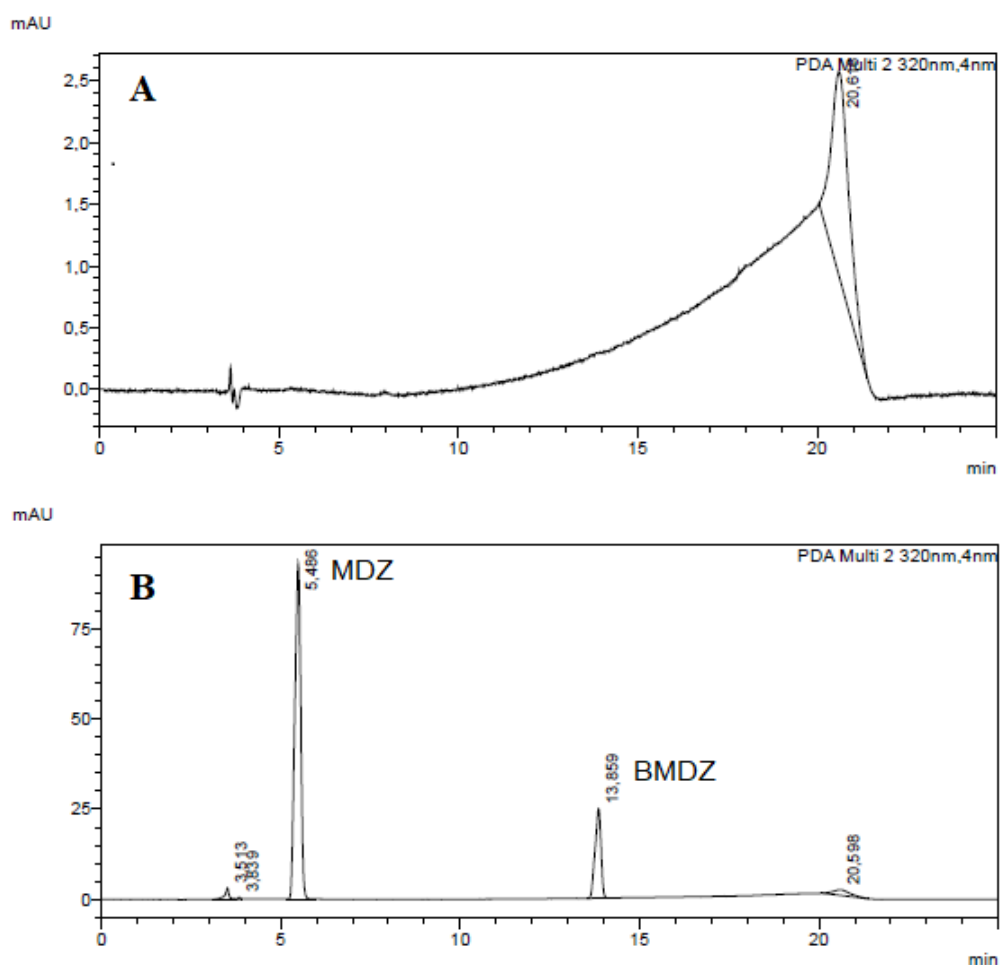
4.2 Quantificação dos Fármacos

4.2.1 Quantificação simultânea de metronidazol e benzoato de metronidazol e validação parcial do método analítico

4.2.1.1 Seletividade

Ainda que na presença dos componentes da matriz, o método analítico deve identificar e quantificar os fármacos com confiança, conferindo seletividade em relação aos adjuvantes, por exemplo. Sendo assim, foram realizadas análises em triplicata do filme inerte a 320 nm pelo mesmo método de extração descrito no item 3.3.4.1 e, os dados foram comparados aos cromatogramas contendo MDZ e BMDZ também extraídos do filme, de modo a certificar que não houve coeluição dos ativos com os demais componentes (Figura 4).

Figura 4: Cromatogramas (A) formulação inerte (B) sistema filmógeno. Condições cromatográficas: gradiente linear com condição inicial de fase móvel sendo, metanol:água ultrapurificada 40:60 (v/v) e final de 90:10 (v/v), 40°C, com vazão de 0,8 mL/min e detecção 320 nm, volume de injeção 10 µL.



4.2.1.2 Precisão

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados via desvio padrão relativo (DPR, %), referente a série de análises realizadas no nível de repetibilidade, contendo 6 réplicas de análise na concentração de teste de 20 µg/mL realizadas a partir do produto acabado, pelo mesmo analista e equipamento. É recomendável que o desvio não ultrapasse o valor de 5%, conforme **Tabela 4**.

Tabela 4: Dados de precisão em nível de repetibilidade (n=6), para o método analítico utilizado para a quantificação do metronidazol (MDZ) e benzoato de metronidazol (BMDZ).

Réplicas	Concentração de MDZ quantificada (µg/mL)	Concentração de BMDZ quantificada (µg/mL)
R1	21,87	20,80
R2	22,04	20,81
R3	23,22	21,33
R4	21,35	20,11
R5	22,00	20,50
R6	22,66	21,81
MÉDIA	22,19	20,89
DPR (%)	2,06	2,88

4.2.1.3 Exatidão

A exatidão foi expressa em porcentagem de recuperação (R) e obtida por meio do grau de concordância entre os resultados, em três níveis de concentração, sendo: baixo 5,0 µg/mL; médio 20,0 µg/mL e alto 50,0 µg/mL ao valor teórico aceito como verdadeiro. Os níveis de recuperação do fármaco estão entre 98,1% e 98,9%, apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Dados de exatidão para o método analítico utilizado para as quantificações do metronidazol (MDZ) e do benzoato de metronidazol (BMDZ). DPR (desvio padrão relativo), R (recuperação).

Níveis de concentração	MDZ (µg/mL)	DPR (%)	R (%)	BMDZ (µg/mL)	DPR (%)	R (%)
Baixo (5,0 µg/mL)	5,42	1,34	106,9	4,80	0,84	98,3
	5,34			4,86		
	5,28			4,79		
Médio (20,0 µg/mL)	20,54	0,84	102,0	20,65	4,53	98,1
	20,20			19,00		
	20,44			19,24		
Alto (50,0 µg/mL)	50,02	1,38	99,1	49,25	0,49	98,9
	49,83			49,73		
	48,75			49,44		

4.2.1.4 Recuperação a partir do tecido suíno esofageal

Para verificar possível perda na quantificação dos analitos no processo de extração a partir do tecido biológico, análises foram realizadas com 3 níveis de concentração do intervalo de linearidade seguindo o mesmo procedimento de extração descrito no item **3.4.3**. Ao final, a porcentagem de recuperação dos 3 níveis foi calculada e comparada com os resultados da recuperação das amostras preparadas em fase móvel. Todos os valores foram próximos a 100% de recuperação dos fármacos, portanto apresentaram o mesmo comportamento levando a acreditar que o processo de extração dos fármacos a partir do tecido biológico não alterou os valores de quantificação. Diante disso, foi possível utilizar para todas as quantificações provenientes do ensaio de permeação, a curva analítica diluída em fase móvel.

Tabela 6: Recuperação (R) do metronidazol e benzoato de metronidazol a partir de tecido biológico suíno.

Metronidazol			Benzoato de Metronidazol		
Concentração teórica (µg/mL)	R (µg/mL) ± DP	R (%)	Concentração teórica (µg/mL)	R (µg/mL) ± DP	R (%)
0,5	0,49 ± 0,03	98,67	0,5	0,49 ± 0,02	98,00%
25,0	25,0 ± 0,10	100,20	25,0	25,01 ± 0,10	100,04%
50,0	50,05 ± 0,32	100,09	50,0	49,60 ± 0,54	99,19%

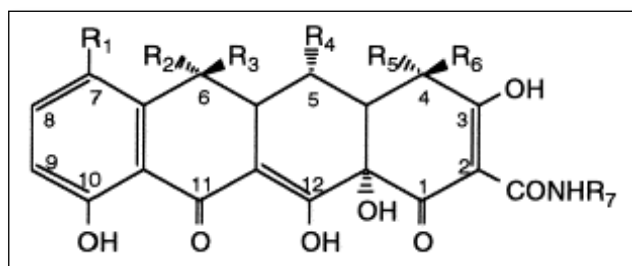
Resultados expressos em média e desvio padrão, n=3

4.2.2 Quantificação do hiclato de doxiciclina

4.2.2.1 Desenvolvimento do método analítico

Tetraciclinas são caracterizadas quimicamente por possuírem um núcleo tetracíclico conjugado com um grupo carboxiamida (C2), conforme mostrado na **Figura 5** (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000). Físico-quimicamente, comportam-se como compostos anfóteros, ou seja, devido ao grande número de grupos funcionais ionizáveis, apresentam diferentes valores de pKa e, por isso, reagem como ácidos ou bases de acordo com o meio em que se encontram. Além dessa característica, a presença de grupos doadores de elétrons nessas moléculas favorece a formação de quelatos em várias posições (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000; PEREIRA-MAIA et al., 2010).

Figura 5: Estrutura geral das tetraciclinas.



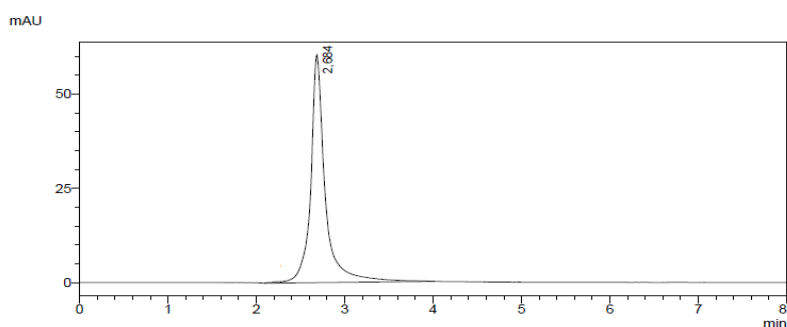
Adaptado de Oka, Ito, Matsumoto, 2000.

A formação dos complexos metálicos com o Ca^{2+} e Mg^{2+} , por exemplo, acontece principalmente nos carbonos β cetônicos (C10 e C12) e no grupamento carboxamida (C2), onde também acontecem as ligações com proteínas plasmáticas em meio biológico e grupos silanóis na fase estacionária nos processos de cromatografia, sendo este o maior desafio no desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para separação e quantificação das TCs (KIRCHBERG et al., 2019; KUBO M, MATSUDA H, TANAKA M, KIMURA Y, OKUDA H, HIGASHINO M, TANI T, 1958; OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000).

Desta forma, é necessária a preparação especial da coluna e amostra para que haja reprodutibilidade no método analítico desenvolvido. A literatura relata o uso de agentes quelantes na fase móvel e diluente como forma de melhorar parâmetros cromatográficos, tal como fator de cauda. Os principais agentes quelantes descritos são EDTA e ácido oxálico (“BP”, 2019; KIRCHBERG et al., 2019; MOHAMMAD et al., 2018; OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000).

As tetraciclinas têm seu espectro de absorção entre 270 – 360 nm (DENOBILE; DE SOUZA NASCIMENTO, 2004; OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000). Neste trabalho, a melhor condição de análise foi no 355 nm. A proporção entre fase aquosa e fase orgânica foi testada, bem como a molaridade das soluções tampão contendo ou não EDTA e a vazão da fase móvel. Inicialmente, proporção definida para a FM foi de 1:1 (v/v), tampão fosfato de sódio, pH 6 30 mM: acetonitrila, baseados em testes preliminares com o intuito de avaliar a proporção necessária. O pico cromatográfico obtido está demonstrado na **Figura 6**.

Figura 6: Cromatograma do hidrato de doxiciclina (DOX, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), solução preparada em fase móvel (1:1 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 30 mM,), detecção a 355 nm, volume de injeção 20 μL , vazão 1 mL/min.

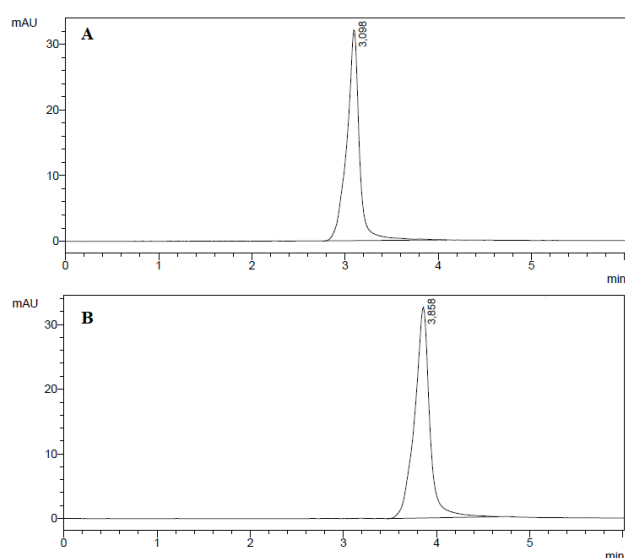


Nessa ocasião alguns testes foram realizados, como: ajuste fino em relação à vazão com alteração para 0,8 mL/min, entretanto não apresentou resposta para a hipótese de retardar o tempo de eluição da DOX além de aumentar a assimetria do pico cromatográfico. Além disso, ao iniciar o protocolo de validação, o método não apresentou linearidade. Sendo assim, outras proporções, solventes e aditivos (como adição de metanol, ácido acético, ácido trifluoroacético, dietilamina) foram testadas ainda sem a adição de EDTA, no entanto, todas sem sucesso.

A **Figura 7** contém os cromatogramas referentes aos testes contendo EDTA. A adição desse componente, portanto, tem a função de quelar os grupos silanois bem como possíveis resíduos metálicos da fase estacionária e assim, desfavorecer ligações indesejáveis do analito à esses grupos (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000; SANTOS NETO, 2009).

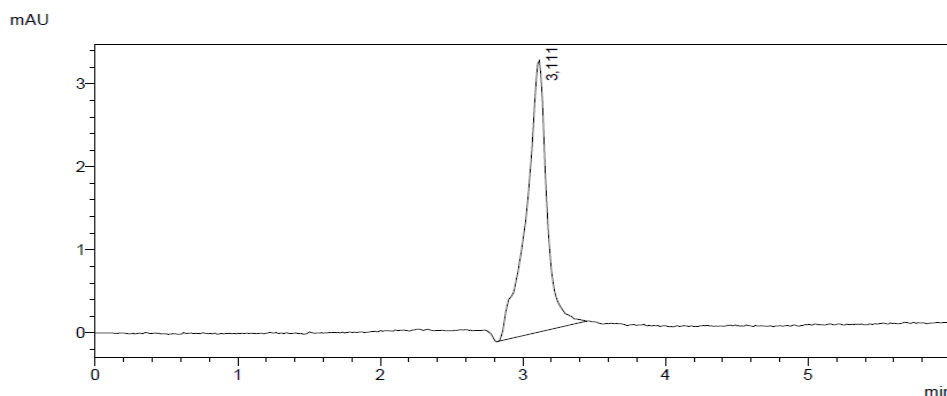
Devido a polaridade da DOX e como tentativa de retardar seu tempo de retenção, a concentração de solvente orgânico foi diminuída após a adição de 2 mM de EDTA ao tampão fosfato de sódio (30 mM), o que anteriormente não havia sido possível, uma vez que ocorria grande perda da eficiência cromatográfica. Nessa ocasião também houve ajuste fino na vazão da corrida cromatográfica (1 mL/min e 0,8 mL/min).

Figura 7: Cromatograma do hidrato de doxiciclina (DOX, 10 µg/mL), solução preparada em fase móvel (40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio H 6, 30 mM, EDTA 2mM, detecção a 355 nm, volume de injeção 20 µL.:(**A**): vazão 1 mL/min; (**B**): 0,8 mL/min.



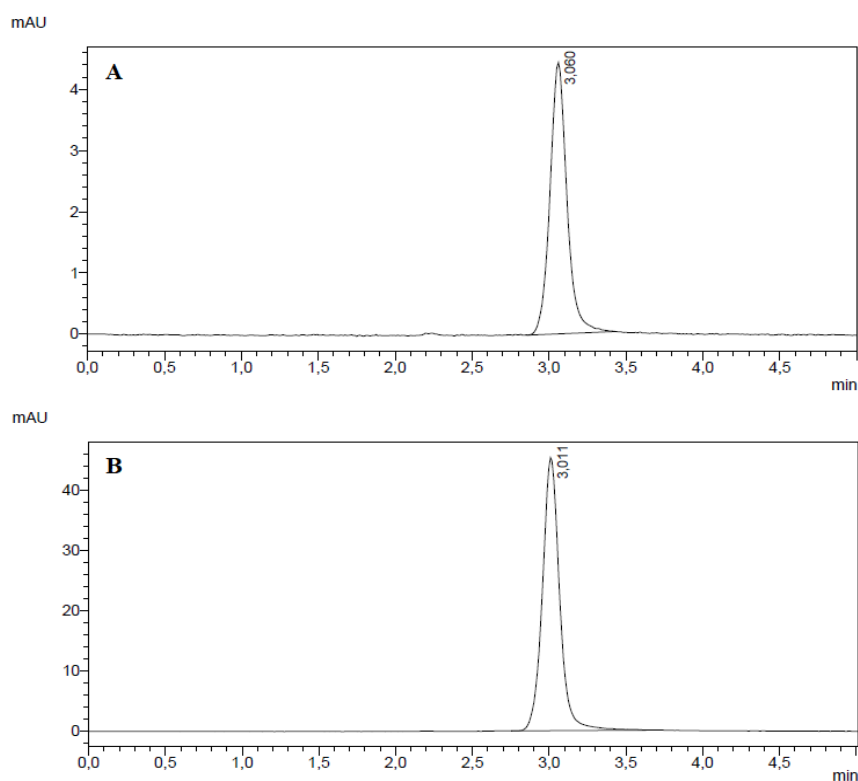
Conforme cromatograma apresentado, o pico ainda se mostrou ligeiramente assimétrico e ao diminuir a vazão houve pequeno deslocamento para direita, entretanto, devido ao alargamento do pico, mantivemos a opção de vazão a 1 mL/min. O protocolo de validação foi novamente iniciado, entretanto, para os menores níveis de concentração testados (1 µg/mL) houve perda de assimetria e eficiência, conforme **Figura 8**.

Figura 8: Cromatograma do hclato de doxiciclina (DOX, 1 µg/mL), solução preparada em fase móvel (40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 30 mM, EDTA 2mM) detecção a 355 nm, volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min.



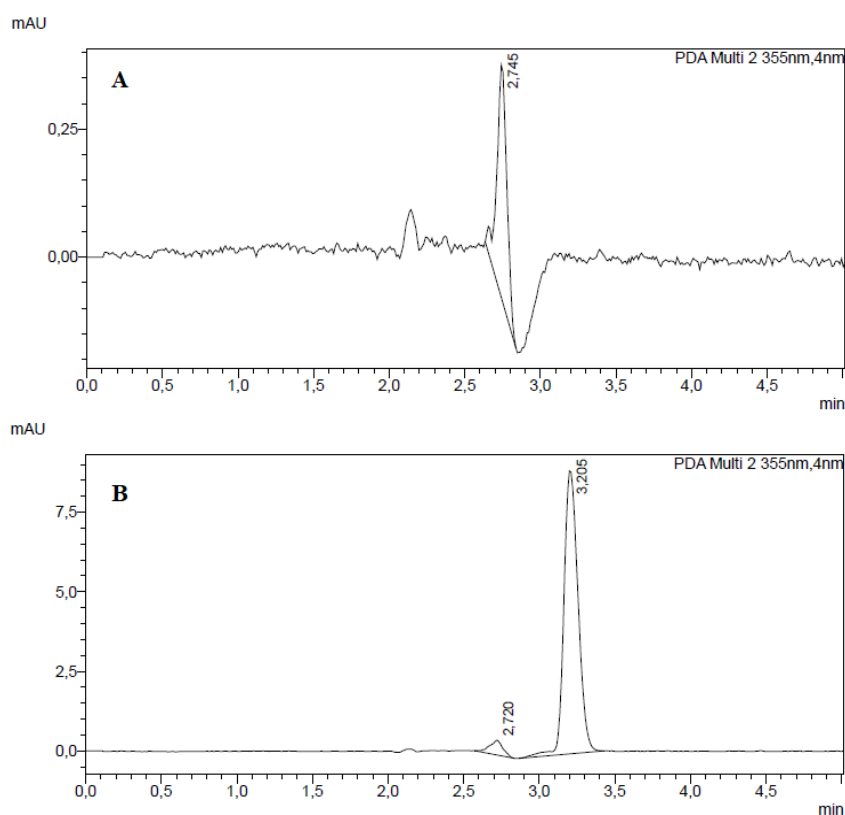
Como alternativa à solução desse problema, alteramos a força cromatográfica com aumento da molaridade do tampão para 60 mM, uma vez que, pode haver a desprotonação dos grupos silanois da fase estacionária (FE), o que levará ao fenômeno de repulsão do analito, quando este possuir grupos ionizáveis, como é o caso da DOX. Dessa forma, diferentes concentrações de um mesmo analito vão interagir diferentemente com a FE, de acordo com sua força iônica. Sendo assim, com o aumento da força iônica da FM, haverá retardo nas interações que ocorrerão entre o analito e a fase estacionária, diminuindo a repulsão entre a FE e o analito. A concentração de EDTA adicionada também foi ajustada e passou a ser de 4 mM para a estabilização da fase estacionária. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na **Figura 9** (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, 2006; SANTOS NETO, 2009).

Figura 9: Cromatograma do hidrato de doxiciclina (DOX), solução preparada em fase móvel (40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM) detecção a 355 nm, volume de injeção 20 μ L, vazão 1 mL/min: **(A):** 1 μ g/mL; **(B):** 10 μ g/mL.



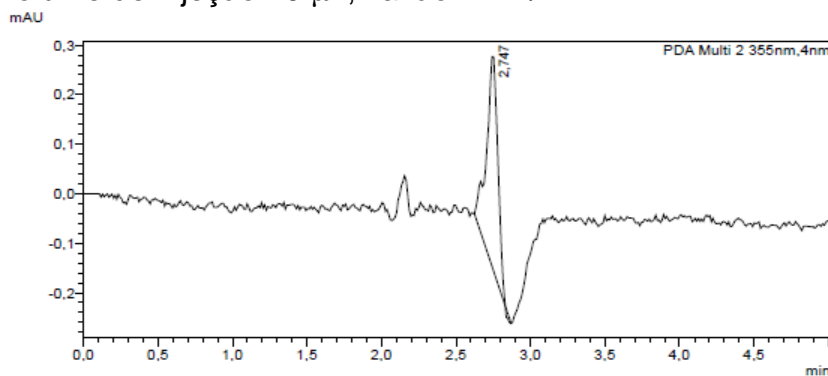
Uma vez solucionado o problema relacionado à composição da fase móvel para a concentração de 1 μ g/mL de DOX (**Figura 8**), a seletividade do método proposto foi realizada avaliando o filme inerte em triplicata nas mesmas condições de extração descritas no item **3.3.4.2**. Os dados obtidos foram comparados aos cromatogramas originados a partir dos filmes contendo DOX de modo a certificar que não houve coeluição dos demais componentes com o ativo (**Figura 10**).

Figura 10: Cromatogramas (A) formulação inerte, (B) sistema filmógeno (FM 40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM) detecção a 355 nm, volume de injeção 20 μ L, vazão 1 mL/min).



O pico presente no tempo 2,745 minutos apesar da proximidade com o tempo de retenção da DOX refere-se a fase móvel utilizada (**Figura 11**), como evidenciado pela **Figura 10 (B)**.

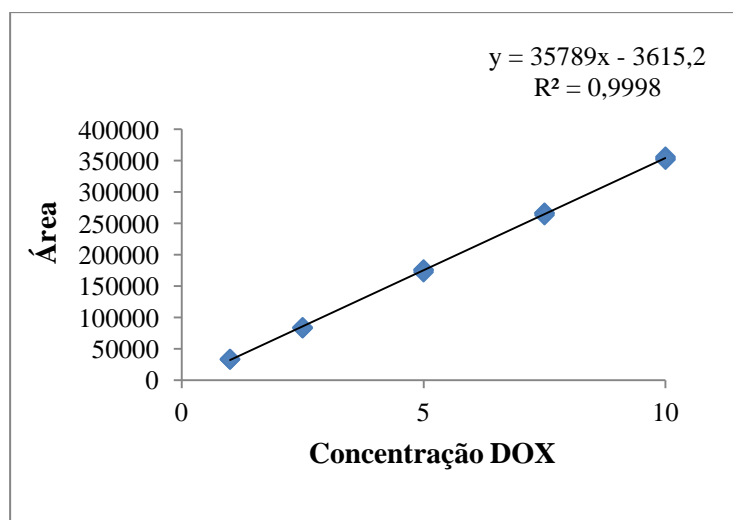
Figura 11: Cromatograma referente a injeção de fase móvel, (FM 40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM) detecção a 355 nm, volume de injeção 20 μ L, vazão 1 mL/min.



4.2.2.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade, segundo preconizado pela agência regulatória cabível ANVISA, (2017) foram preparadas três curvas analíticas partindo de soluções padrão intermediárias e independentes na concentração de 25 µg/mL de DOX utilizando acetonitrila como diluente. A partir destas soluções, as seguintes concentrações foram obtidas: 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 µg/mL, em fase móvel (40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato pH 6, 60 mM, 4 mM de EDTA). A **Figura 12** apresenta o gráfico da área em relação às concentrações de DOX, bem como a equação do modelo de regressão linear.

Figura 12: Curva analítica com valores em triplicata e equação do modelo de regressão linear para o hidrato de doxiciclina (DOX). Condições de análise: FM 40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM, detecção a 355 nm, volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min.



A análise estatística apresentada na **Tabela 7** sumariza os parâmetros avaliados. O teste F avalia a significância da regressão e é obtido via análise de variância (ANOVA), onde quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, inferimos linearidade ao método. O teste Cochran também realizado avalia a variância dos dados de área obtida entre os níveis de concentração pré estabelecidos e de acordo com os resultados apresentados ($C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$) as variâncias entre os níveis são constantes conferindo aos dados a característica de homoscedasticidade (ANVISA, 2018).

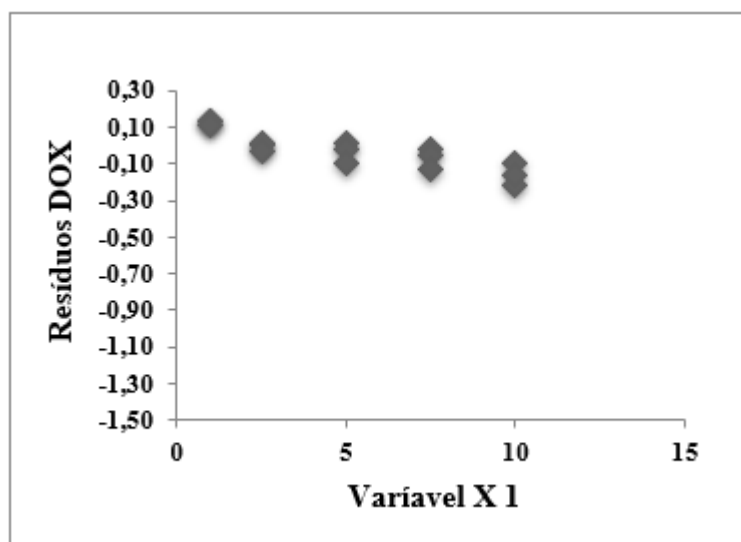
Tabela 7: Análise estatística de regressão linear. Condições de análise: FM 40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM, detecção a 355 nm, volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min.

	Resposta obtida	Critério de aceitação
Coeficiente de correlação (R)	0,9999	$R \geq 0,99$
Coeficiente de determinação (R²)	0,9998	$R^2 \geq 0,98$
Teste F	F calculado 5,85E+32	F calculado > F tabelado*
Teste de Cochran*	C calculado 0,371	C calculado < C crítico**

*F tabelado = 4,66. ** C crítico = 0,684 com 5% de significância.

A avaliação da distribuição aleatória dos dados de resíduos em função da resposta analítica foi realizada visualmente e está apresentada **Figura 13** (ANVISA, 2018).

Figura 13: Gráfico de distribuição de resíduos em função da resposta analítica para DOX. Condições de análise: FM 40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM, detecção a 355 nm, volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min.



A presença de *outliers* no conjunto de dados foi avaliada ponto a ponto pelo teste de Grubbs (Z) e os dados estão apresentados na **Tabela 8**. O Z crítico tabelado para a análise de 15 réplicas e nível de significância de 2,5% foi de 2,548.(ANVISA, 2018) Para valores de Z calculado maiores que Z crítico tabelado, o dado é tratado como um *outlier*. Não houve a presença de *outliers* nos dados tratados.

Tabela 8: Teste de Grubbs (Z) para a detecção de *outliers*. Condições de análise: FM 40:60 v/v acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 6, 60 mM, EDTA 4 mM, detecção a 355 nm, volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min).

Concentração Teórica (µg/mL)	Fator Resposta	Z calculado
1,0	33961,0	0,7498
1,0	34101,0	0,5927
1,0	33158,0	1,6507
2,5	33680,4	1,0646
2,5	33834,8	0,8914
2,5	33228,4	1,5717
5,0	35350,8	0,8095
5,0	35111,2	0,5407
5,0	34509,6	0,1343
7,5	35626,9	1,1193
7,5	35500,4	0,9773
7,5	35128,8	0,5604
10,0	35183,5	0,6218
10,0	35652,6	1,1481
10,0	35412,0	0,8781
MÉDIA	34629,3	
DESVIO PADRÃO	891,3	
CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	Z calculado < Z crítico tabelado (2,548)	

4.2.2.3 Precisão

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados via desvio padrão relativo (DPR, %), referente a série de análises realizadas no nível de repetibilidade, contendo 6 réplicas de análise na concentração de teste de 5 µg/mL realizadas a partir do produto acabado, mesmo analista e equipamento. É recomendável que o desvio não ultrapasse o valor de 5%, conforme **Tabela 9** (ANVISA, 2018).

Tabela 9: Dados de precisão em nível de repetibilidade (n=6), para o método analítico utilizado para a quantificação da DOX.

Réplicas	Concentração de DOX quantificada (µg/mL)
R1	4,68
R2	4,71
R3	4,49
R4	4,65
R5	4,78
R6	4,65
MÉDIA	4,66
DPR (%)	2,08

4.2.2.4 Exatidão

A exatidão foi expressa em porcentagem de recuperação (R) e obtida por meio do grau de concordância entre os resultados, em três níveis de concentração, sendo: baixo 2,5 µg/mL; médio 5,0 µg/mL e alto 10,0 µg/mL ao valor teórico aceito como verdadeiro. Os níveis de recuperação do fármaco estão entre 95,8% e 98,1%, apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10: Dados de exatidão para o método analítico utilizado para as quantificações da DOX.

Níveis de concentração	Concentração obtida de DOX ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	R (%)
Baixo (2,5 $\mu\text{g/mL}$)	2,39	1,06	95,8
	2,37		
	2,42		
Médio (5,0 $\mu\text{g/mL}$)	4,84	0,43	96,7
	4,86		
	4,81		
Alto (10 $\mu\text{g/mL}$)	9,82	0,32	98,1
	9,84		
	9,78		

4.2.2.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Segundo a RDC 166, 2017 (ANVISA) para métodos utilizados para doseamento, que abrange quantificações provenientes de ensaios de liberação, uniformidade de conteúdo e potência, a determinação desses parâmetros não é necessária. Por isso, considera-se o menor nível do intervalo de linearidade como LQ real do método validado (ANVISA, 2017).

4.2.2.6 Robustez

A robustez é um parâmetro usado para indicar a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas mudanças. Na verdade, o parâmetro da robustez está envolvido desde o início do desenvolvimento de um método analítico, e já no decorrer do desenvolvimento desse método, foi possível entender que a quantificação da DOX seria um processo que exigiria controle absoluto dos parâmetros envolvidos: pH e vazão da FM além do condicionamento da coluna analítica com agente quelante, conforme razões e justificativas apresentadas no item **4.2.2.1**.

Pautados por isso, conforme prevê a RDC 166 que regulamenta a validação de métodos analíticos, salientamos que há susceptibilidade dos parâmetros do método e por isso, as variáveis devem ser minuciosamente controladas para que não haja comprometimento da segurança da quantificação (ANVISA, 2017).

4.2.2.7 Recuperação a partir do tecido suíno

Para verificar possível perda na quantificação da DOX no processo de extração a partir do tecido biológico, análises foram obtidas em 3 níveis de concentração do intervalo de linearidade seguindo o mesmo procedimento de extração descrito no item 3.4.3. Ao final, a porcentagem de recuperação dos 3 níveis foi calculada e comparada com os resultados da recuperação das amostras preparadas em fase móvel. Todos os valores foram próximos a 100% (**Tabela 11**) de recuperação, portanto apresentaram o mesmo comportamento, levando a acreditar que o processo de extração dos fármacos a partir do tecido biológico não alterou os valores de quantificação. Diante disso, foi possível utilizar para todas as quantificações provenientes do ensaio de permeação, a curva analítica diluída em fase móvel.

Tabela 11: Recuperação de doxiciclina a partir de tecido biológico suíno.

DOXICICLINA		
Concentração teórica (µg/mL)	Recuperação (µg/mL) ± DP	Recuperação (%)
1,0	0,93 ± 0,04	92,67%
5,0	5,10 ± 0,30	102,00%
10,0	9,96 ± 0,29	99,63%

Resultados expressos em média e desvio padrão, n=3

4.3 Teor dos fármacos no sistema filmógeno piloto

4.3.1 Metronidazol e Benzoato de Metronidazol

O teor de fármaco nos filmes foi expresso em MDZ (forma base) devido a hidrólise da forma benzoato (BMDZ). A conversão foi realizada em função da relação entre a massa molecular das duas formas, sendo 171,25 g/mol para o MDZ e 275,26 g/mol para o BMDZ (JOHANSEN; LARSEN, 1985). O teor encontrado foi de 105,6% com coeficiente de variação de 4,3%. A recomendação para formas farmacêuticas previamente descritas são valores entre 90-110%, devido ao coeficiente de variação abaixo de 5% e a diferença existente entre as formas farmacêuticas, podemos inferir que houve homogeneidade na distribuição do fármaco ("BP", 2019).

4.3.2 Hiclato de Doxiciclina

O teor de DOX nos filmes foi de 106,7% com coeficiente de variação de 3,0% e os valores recomendados para formas farmacêuticas já descritas (gel, comprimidos e cápsulas), são 95-105%, não há produto comercial que possibilite comparação na forma farmacêutica de filme, entretanto, devido ao coeficiente de variação abaixo de 5% e a diferença existente entre as formas farmacêuticas, podemos inferir que houve homogeneidade na distribuição do fármaco ("BP", 2019).

4.4 Avaliação "in vitro" do comportamento dos fármacos

4.4.1 Ensaio de liberação "in vitro" dos fármacos a partir dos filmes

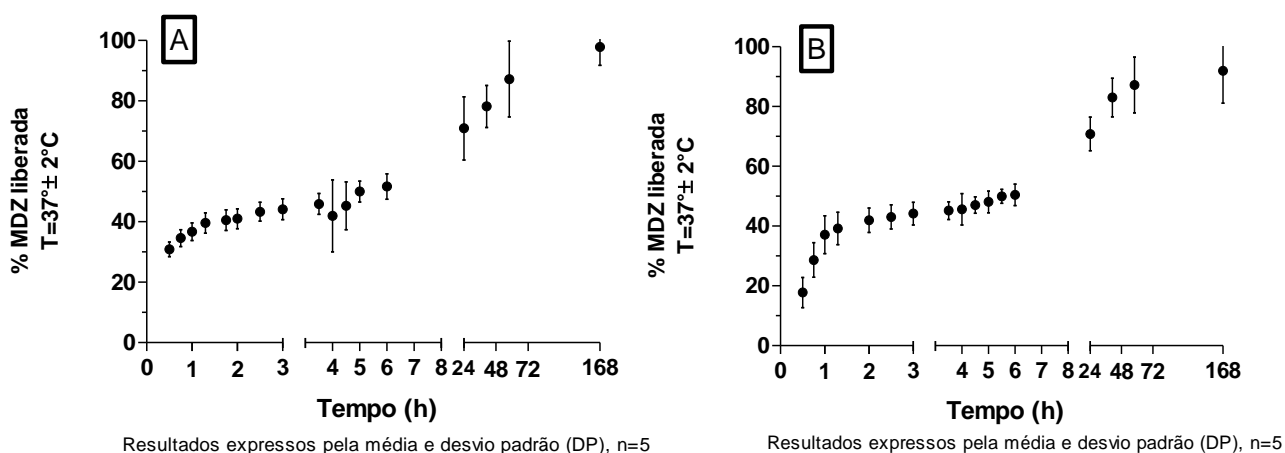
O experimento de liberação nos permite conhecer a tendência de dissolução do(s) fármaco(s) a partir da forma farmacêutica para que ocorra a liberação dos fármacos e é um parâmetro importante e complexo no desenvolvimento farmacotécnico. No que diz respeito aos filmes poliméricos, são algumas variáveis envolvidas, por exemplo: a difusão de água no sistema e

o intumescimento dos polímeros que permitirá a dissolução dos fármacos, para que possa, em função dos eventos farmacocinéticos, proporcionar a ação farmacológica para o qual foi designado (LAMOUDI; CHAUMEIL; DAOUD, 2016).

A **Figura 14** representa o perfil de liberação expresso em MDZ total (forma base e benzoato, conversão feita via relação de MM das formas) a partir da formulação piloto (**Tabela 1**) e da formulação otimizada, conforme **Tabela 2**. Como já citado, a estratégia de usar o MDZ em suas duas formas é utilizada para proporcionar a liberação prolongada do ativo, nesse caso, por até 7 dias (168 h). A liberação de MDZ total chegou a $95,45\% \pm 3,20$ para o filme piloto **Figura 14 (A)** $95,59\% \pm 4,84$ para **Figura 14 (B)** e aconteceu de maneira gradual, em ambos os casos.

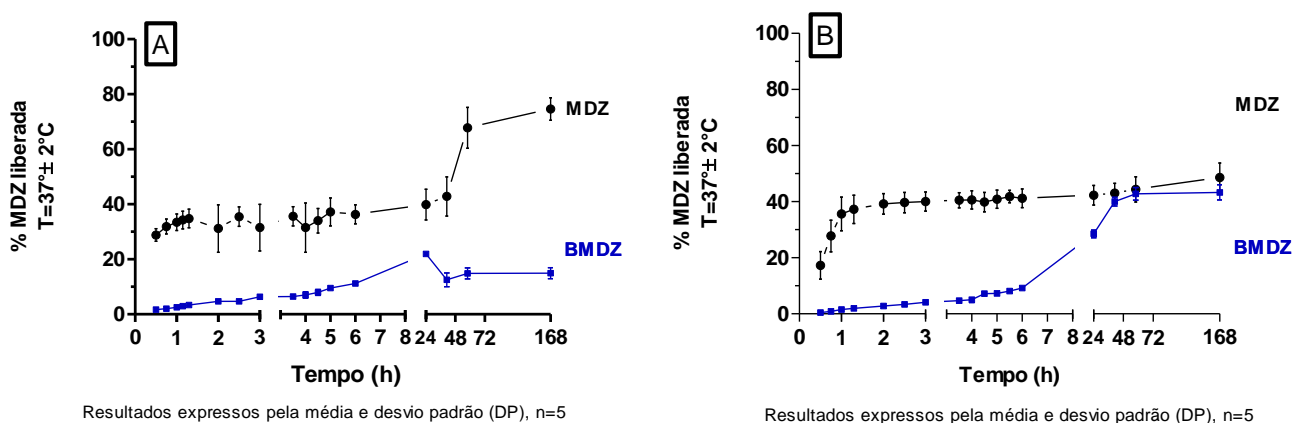
O valor de MDZ total remanescente extraído dos filmes após o ensaio foi de $4,4\% \pm 0,35$ para o filme piloto **(A)**, e $4,5\% \pm 0,55$ para o filme otimizado (SFC) **(B)**, referente a quantidade inicial utilizada nos filmes, o que corrobora com o obtido no ensaio de liberação, chegando próximo ao total de 100% do fármaco.

Figura 14: Perfil de liberação do MDZ total (base e benzoato) a partir do sistema filmógeno piloto **(A)** e do sistema filmógeno otimizado (SFC) **(B)** em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 por 7 dias (168 h).



A **Figura 15** representa o perfil de liberação do MDZ a partir da formulação para as duas formas separadas de modo a demonstrar a participação de cada uma na manutenção da liberação do ativo.

Figura 15: Perfil de liberação do MDZ no sistema filmógeno, separadamente a partir das duas formas, sistema filmógeno piloto (**A**) e do sistema filmógeno otimizado (SFC) (**B**) em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 por 7 dias (168 h).



Como demonstrado nos gráficos, o MDZ base nos primeiros tempos de experimento é liberado mais rapidamente, quando comparado ao BMDZ para ambos os sistemas, que só apresentou aumento perceptível nos valores de liberação a partir da sexta hora de experimento.

É interessante ressaltar que, a partir do tempo de 24 h para o sistema piloto (**A**) que possui em sua composição, HPMC K100 (**Tabela 1**), sendo, portanto, um sistema com mais caráter hidrofílico, nota-se diminuição dos valores quantificados de BMDZ, e por se tratar-se de um ensaio acumulativo, essa perda de ativo não é esperada, sendo assim, podemos sugerir que começa acontecer a hidrólise do BMDZ em MDZ, demonstrada também pelo pico crescente de liberação do MDZ, a partir do tempo de 24 h, que mantinha até então sua liberação estabilizada. Possivelmente, o BMDZ já começou a ser clivado em MDZ, durante a captação de água pelo sistema, devido aos grupamentos -OH presentes no decorrer da cadeia polimérica do HPMC K100 que facilita a solvatação pela água (AZEVEDO et al., 2007; KUMAR, 2000).

Já no sistema otimizado, composto apenas por quitosana, polímero com caráter menos hidrofílico e em maior quantidade, também é possível ver o aumento da liberação de BMDZ, porém devido ao menor poder de

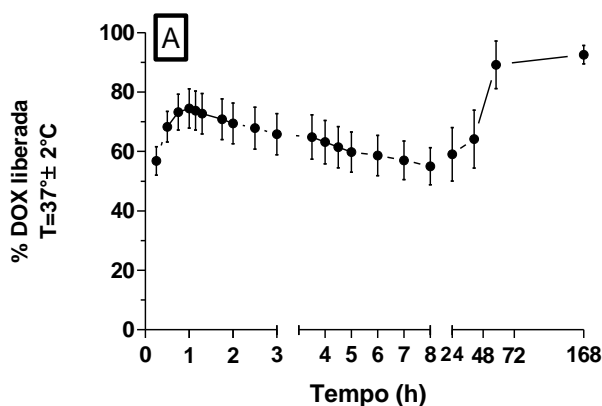
intumescimento da quitosana, a hidrólise do BMDZ acontece de forma mais branda durante todo o experimento, sendo melhor evidenciada no tempo de 48h, onde se estabiliza a quantidade de BMDZ e consegue-se notar aumento na concentração de MDZ, **Figura 15 (B)** (LIZARDI-MENDOZA; ARGÜELLES MONAL; GOYCOOLEA VALENCIA, 2016; NOEL et al., 2008).

Embora a diferença na liberação dos sistemas seja notável, no que diz respeito a velocidade de hidrólise do BMDZ, esse fenômeno ocorre durante todo o ensaio, de modo a manter a liberação do MDZ total crescente para ambos os sistemas (**Figura 14**).

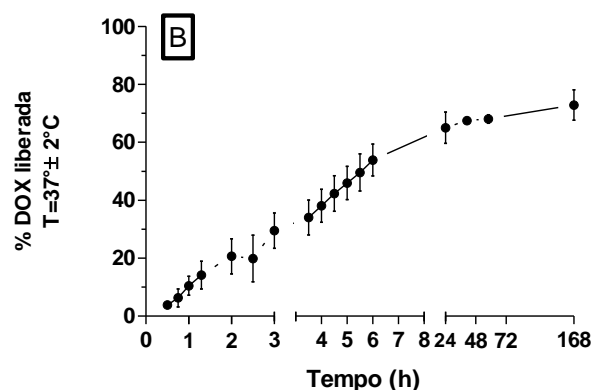
A **Figura 16** demonstra a liberação da DOX a partir do sistema filmógeno piloto, sendo ao final dos 7 dias (168 h) $92,57\% \pm 8,01$ (**A**) e do sistema otimizado (SFC) (**B**), sendo $77,16 \pm 4,97$ para o sistema otimizado, considerando a quantidade inicial contida na formulação.

Como mencionado no **item 4.2.2.1** a DOX forma quelatos com íons metálicos em meios aquosos (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000). Inicialmente, no desenvolvimento do sistema piloto (**A**), não foi utilizado nenhum agente quelante na formulação para desfavorecer a instabilidade no comportamento da DOX. Dessa forma, ao otimizar o sistema, EDTA foi adicionado na composição conforme descrito no **item 4.1** e seu efeito é notado na **Figura 16 (B)**, onde a liberação do fármaco se mostrou crescente no decorrer do tempo de experimento.

Figura 16: Perfil de liberação da DOX no sistema filmógeno piloto (**A**) e do sistema filmógeno otimizado (SFC) (**B**) em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 por 7 dias (168 h).



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP) n=5

A quantidade de DOX remanescente no filme piloto foi de $1,11\% \pm 0,20$, enquanto no filme otimizado foi de $19,87 \pm 5,47$ favorecendo a hipótese de que a adição do agente quelante foi essencial para atender aos objetivos iniciais da formulação de liberação modificada por 7 dias dos fármacos que a compõe.

4.4.2 *Ensaio de permeação dos fármacos a partir do sistema filmógeno*

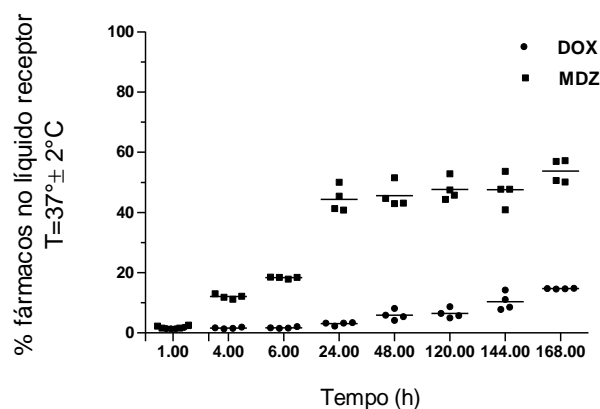
O ensaio de permeação foi realizado somente com o sistema otimizado (SFC) Enos possibilitou a compreensão de como os fármacos contidos no sistema filmógeno se comportam em contato com membrana biológica, previamente preparada como descrito no item **3.4.3.1**. O esôfago suíno foi escolhido devido a sua similaridade com o mesmo tecido humano (HENRIQUE et al., 2020),

Além de possuir fármacos para atuar como agentes antimicrobianos (MDZ e BMDZ), o filme também tem como objetivo ter ação de inibição das MMPs (DOX).

As MMPs envolvidas nos processos de degradação da fibra colágena estão presentes tanto no meio intra como extracelular (RABKIN, 2017). Dessa forma, para favorecer a ação de inibição das MMPs, o tempo e a velocidade com que a permeação acontecerá, irá influenciar a permanência da DOX na membrana biológica. Embora a DOX seja considerada “altamente permeável”, de acordo com os critérios estabelecidos pelo BCS (Biopharmaceutics Classification System), seu caráter hidrofílico ($\log P = -1,90$) pode desfavorecer a permeação em membranas biológicas quando em determinados sistemas (JANTRATID, 2009).

A **Figura 17** demonstra a permeação dos fármacos, DOX e MDZ total, durante 7 dias de experimento. A permeação aconteceu de forma gradual, tanto para o MDZ quanto para a DOX. Nestas condições experimentais, ao final do experimento, quantificou-se no líquido receptor, cerca de $53,74\% \pm 3,90$ de MDZ total (BMDZ + MDZ) e, $14,70\% \pm 0,11$ para a DOX.

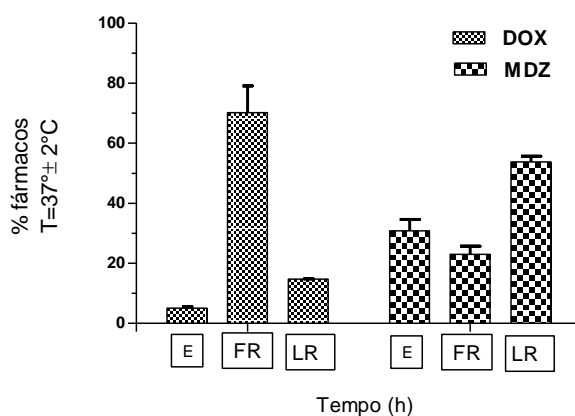
Figura 17: Perfil de permeação *in vitro* dos fármacos MDZ e DOX a partir do sistema filmógeno, em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 por 7 dias (168 h), 37°C ± 2 em membrana esofageal suína.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5

A **Figura 18** contém as porcentagens quantificadas de MDZ (MDZ+BMDZ) e DOX, referente à quantidade de ativo na formulação, no líquido receptor (ao final do experimento), no esôfago e no filme remanescente, sendo: para a DOX, no líquido receptor (LR) 14,70% ± 0,11; no filme remanescente (FR) 74,33% ± 3,92 e no esôfago (E): 4,86% ± 0,26 e para o MDZ: no líquido receptor (LR) 53,74% ± 3,90; no filme remanescente (FR) 23,01% ± 5,32 e esôfago (E): 30,83% ± 7,57.

Figura 18: Percentagem dos fármacos (DOX e MDZ total) nas três condições analisadas no experimento de permeação *in vitro* a partir dos filmes, em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 por 7 dias (168 h), 37°C ± 2: esôfago (E), filme remanescente (FR) e líquido receptor (LR).



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5, sendo: E: esôfago; FR: filme remanescente; LR: líquido receptor

Por meio dos resultados obtidos (**Figura 17**), podemos afirmar que a DOX está deixando a formulação filmógena de forma gradual e lenta, o que também foi visto no experimento de liberação *in vitro* (**Figura 16**).

A presença de DOX no líquido receptor junto ao apresentado na **Figura 17**, que evidencia o perfil de permeação favorecem a hipótese de que a liberação e consequente permeação acontecem de maneira contínua. Assim como, ao quantificarmos altos valores de DOX no filme remanescente (FR), (**Figura 18**), mesmo após 7 dias, podemos sugerir que a formulação, ainda íntegra, tem potencial de liberação da DOX, sendo portando, promissora para o efeito prolongado.

Cerca de 75% da DOX ainda estava no filme remanescente ao final dos 7 dias, esse fenômeno pode ser atribuído a condição experimental na qual este ensaio foi realizado, diferente do experimento de liberação, em que a membrana de celulose não é fator limitante para que ocorra a passagem da DOX para o líquido receptor, na permeação, a membrana biológica é considerada fator limitante, uma vez que, neste caso a captação de água acontece de forma mais lenta, gerando uma zona de saturação de fármaco entre o sistema de liberação e o esôfago. Dessa forma, o fenômeno de dissolução ocorrerá mais lentamente, como evidenciado pela **Figura 17**.

Já para o MDZ, a permeação através da membrana biológica ocorreu de maneira mais rápida (**Figura 17**), uma vez que, após 7 dias de experimento, havia mais fármaco no meio receptor e na membrana biológica, quando comparado ao fármaco restante no filme (**Figura 18**), o que pode ser explicado pela alta hidrofiliabilidade do MDZ (MAHFOUZ; HASSAN, 2010).

A continuidade nos valores encontrados para essas condições experimentais, tanto nos ensaios de liberação quanto nos de permeação *in vitro*, principalmente para a DOX, cuja ação esperada é contra a expressão e/ou atividade de MMPs é um achado importante, uma vez que, após estabelecida a inflamação com desbalanço entre MMPs e seus inibidores, a produção e liberação dessas proteases acontece também de maneira contínua, até que cesse o processo inflamatório, dessa forma, uma formulação que seja capaz de prolongar e manter a liberação dos seus ativos, atende muito bem essa condição (VISSE; NAGASE, 2003).

4.5 Caracterização do sistema filmógeno

Com o intuito de melhor entender o sistema, as análises descritas neste tópico foram realizadas para o filme otimizado (SFC), para filmes contendo apenas BMDZ, apenas MDZ, apenas DOX e para o filme inerte (sem os fármacos). As dispersões foram preparadas e os filmes obtidos da mesma maneira descrita no **(item 3.2.3)**.

4.5.1 Espessura

A **Tabela 12** mostra os valores de espessura para os filmes. A bolsa periodontal possui reduzido espaço para a inserção do sistema de liberação, por isso, a espessura é um parâmetro importante para os filmes designados ao tratamento intrabolsa (DONOS, 2018).

O Periochip[®], opção comercial disponível, tem espessura de 350 μm e contém gliconato de clorexidina, com o intuito de tratamento adjuvante na doença periodontal e é recomendado para bolsas com profundidade ≥ 5 mm (Dexcel[®] Pharma, UK).

O sistema filmógeno teve espessura de 180 μm em média e, pode ser considerado uma boa opção para o tratamento das bolsas, uma vez que a espessura menor pode favorecer o manuseio pelo profissional na hora de realizar o procedimento, além do conforto ao paciente. É importante ressaltar que, no âmbito da pesquisa farmacotécnica é um grande avanço o desenvolvimento de um filme mais fino, duradouro e que ainda contenha grande quantidade de ativos.

Tabela 12: Média das medidas das espessuras de nove pontos dos filmes obtidos pelo método de *casting*, utilizando micrometro de resolução de 0,01 mm.

Sistema inerte (μm)	Sistema contendo apenas MDZ (μm)	Sistema contendo apenas BMDZ (μm)	Sistema contendo apenas DOX (μm)	Sistema filmógeno completo (μm)
134 \pm 0,013	160 \pm 0,011	113 \pm 0,010	132 \pm 0,016	180 \pm 0,011

Resultados expressos pela média (n=9) e DP

Não houve grandes variações entre as medidas, o que pode ser constatado pelos valores de desvio padrão próximos de zero e nos permite inferir que no que diz respeito à distribuição da dispersão e ao método de secagem em câmara climática com circulação de ar há uniformidade no sistema.

4.5.2 Umidade residual

A **Tabela 13** apresenta os valores de umidade residual para os filmes. O valor de umidade residual para o sistema inerte foi menor (19,87%) que o sistema filmógeno completo (31,11%). Essa diferença de umidade pode ser justificada pela adição dos fármacos, uma vez que a DOX e o MDZ conferem maior caráter hidrofílico à formulação, que pode ser observado nos valores dos filmes contendo cada uma delas separadamente (21,43% MDZ e 26,40% DOX). Já a contribuição do BMDZ talvez não seja tão importante, pois além da sua menor hidrofiliabilidade, a porcentagem de umidade encontrada no filme contendo somente ele foi menor (14,95%) do que a do sistema inerte (19,87%).

Tabela 13: Análises de umidade residual dos filmes em analisador de umidade acoplado a fonte de radiação halógena com resolução de 0,01%, expressos em porcentagem de umidade residual (%).

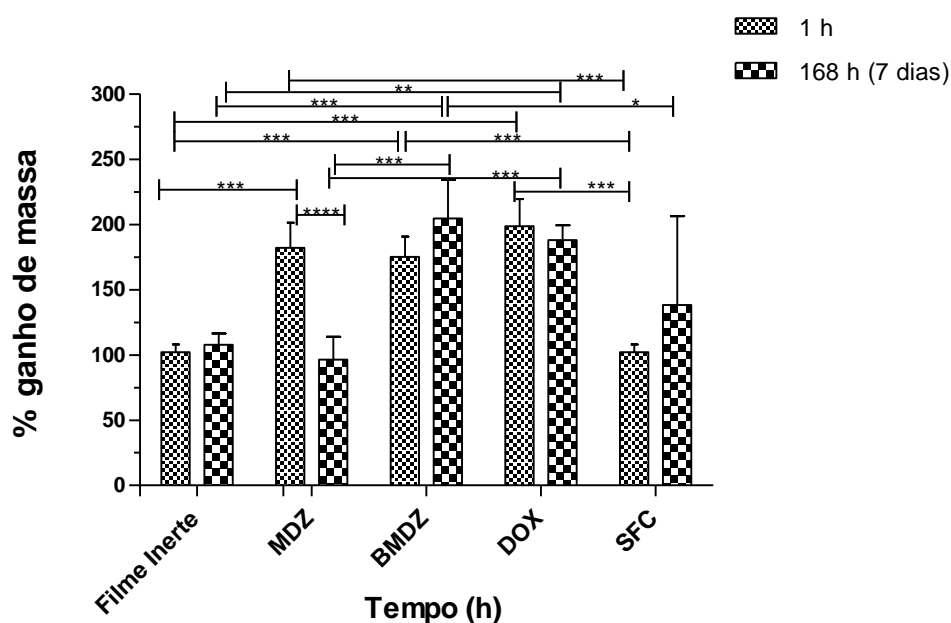
Sistema inerte	Sistema contendo apenas MDZ	Sistema contendo apenas BMDZ	Sistema contendo apenas DOX	Sistema filmógeno completo
19,87%	21,43%	14,95%	26,40%	31,11%

4.5.3 Estudo de captação de água pelo sistema filmógeno

A captação de água pelo sistema é importante para diversos processos após a aplicação para o qual é destinado, como por exemplo, a liberação dos fármacos e a bioadesão, fenômenos que dependem da presença de água para ocorrerem (HAMED I et al., 2022; PEPPAS; SAHLIN, 1996). A **Figura 19**

apresenta os valores de captação de água, representados pelo ganho de massa das formulações, na primeira hora e durante 7 dias.

Figura 19: Valores em porcentagem referentes ao ganho de massa dos filmes, ao final da primeira hora e depois de 7 dias (168 h) de experimento onde foram submersos em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6, sendo: filme inerte: filme contendo apenas quitosana, EDTA e propilenoglicol; MDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e MDZ; BMDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e BMDZ; DOX: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e DOX; SFC: sistema filmógeno completo.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=6. Análise estatística foi realizada via teste t- Student, bicaudal, não pareado, para diferença de tempos (1 h e 168 h), sendo **** p < 0,0001) e One way ANOVA, seguidos de pós teste Tuckey para demais análises, Diferença estatística *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05.

Conforme esperado houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os filmes com diferentes composições. Para o SFC, a captação de água atinge o equilíbrio, basicamente, na primeira hora. Esse fenômeno pode ser importante para a bioadesão e dissolução dos fármacos, permitindo sua liberação e consequente ação no alvo.

Ao analisar o filme contendo, apenas MDZ, entre os tempos de 1 h e 7 dias, há uma queda significativa na massa do filme ($p < 0,0001$), o que pode ser atribuído a dissolução do MDZ e maior saída do compartimento filmógeno para a água, quando comparado aos demais fármacos (BMDZ e DOX). A

Figura 20 ilustra os filmes ao final de 7 dias do experimento. Os filmes inerte, com DOX e o SFC permaneceram intactos até o final do experimento, enquanto os filmes de MDZ sofreram erosão ou seja, com o intumescimento, a interação polímero/polímero reduziu e a polímero/água aumentou, o que será melhor explicado no **item 4.5.4**.

Enquanto nos filmes de BMDZ, forma mais hidrofóbica do MDZ, ainda que seja possível observar o começo do processo de erosão, ao final dos 7 dias, há manutenção da forma original, embora aumentada (**Figura 20, filme 5**).

Ainda, ao final dos 7 dias de experimento, não houve diferença estatisticamente considerável entre o SFC e o filme inerte, conjecturando que há formação de ligações internas entre a rede polimérica e os fármacos utilizados que controlam a absorção de água pelo sistema polimérico como um todo (**filme 2, figura 20**).

Figura 20: Filmes ao final de 7 dias (168 h), submersos em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6, sendo: 1) filme inerte; 2) sistema filmógeno completo; 3) filme contendo apenas DOX; 4) filme contendo apenas MDZ; 5) filme contendo apenas BMDZ.



4.5.4 Estudo de perda de massa pelo sistema filmógeno

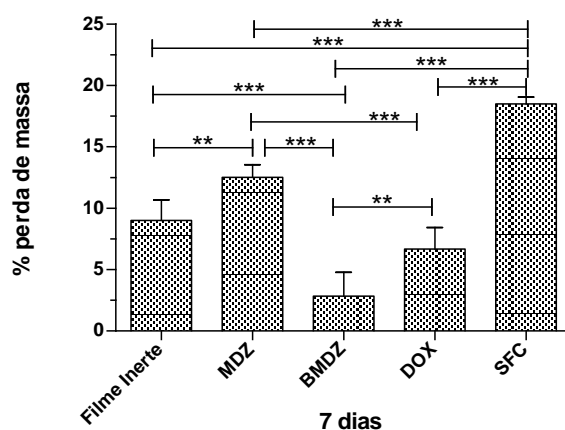
A **Figura 21** representa a perda de massa dos filmes no decorrer de 7 dias de experimento. A perda de massa para o SFC, totalizou menos de 20% da massa total do filme, e é atribuída a dissolução dos fármacos e solubilização de parte do polímero e adjuvantes, também observada no filme inerte. Junto aos experimentos de liberação discutidos no **item 4.4.1** e de captação de água (**item 4.5.3**) pelo sistema, nota-se que os fenômenos ocorreram em sincronia e mostraram-se suficientes para que houvesse a liberação do fármaco de modo gradual e de acordo com a **Figura 22, filme 2**, sem que o filme se desfaça, o que favorece a manutenção do filme na bolsa periodontal, por um período de no mínimo, 7 dias.

Para esses sistemas e nessas condições experimentais, é possível deduzir a contribuição de cada fármaco na perda de massa do SFC, uma vez que, para o filme de MDZ, houve cerca de 15% de perda de massa, sendo o maior responsável pela maior afinidade de água do sistema. Em contrapartida, os demais fármacos equilibram o filme, criando certa estabilidade com a malha de polímero e plastificante que evitam a erosão do sistema, diferente do que acontece nos filmes contendo apenas MDZ (**figura 22, filme 4**).

Para melhor entender esse fenômeno, analisando comparativamente o gráfico apresentado na **Figura 21** e a **Figura 22**, notamos que, embora a quitosana tenha conferido forma aos filmes e os tenha mantido em volume até o final dos 7 dias (**filme 1**) quando os fármacos foram adicionados, além de conferir massa, regeram a captação de água que além de levar a diferentes perdas de massa pelos sistemas (em maioria, pela dissolução dos fármacos no meio), também teve participação no comportamento do sistema quanto à erosão da matriz polimérica.

Ainda nessas figuras, ao analisar a perda de massa para o filme de MDZ, nota-se que é menor em porcentagem que o SFC, entretanto, ao analisar a imagem (**figura 22, filme 4**), o SFC (**figura 22, filme 2**) embora tenha perdido mais massa em porcentagem, uma vez que tem mais fármacos, se manteve na forma original. Sugerindo que, nesta condição experimental, a DOX estabiliza a malha polimérica formada no filme de quitosana.

Figura 21: Valores em porcentagem referentes à perda de massa dos filmes, ao final de 7 dias (168 h) de experimento, onde foram submersos em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 e secos em estufa, T= 50°C, *overnight* (12h), sendo: filme inerte: filme contendo apenas quitosana, EDTA e propilenoglicol; MDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e MDZ; BMDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e BMDZ; DOX: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e DOX; SFC: sistema filmógeno completo.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=6. Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Tuckey. Diferença estatística *** p < 0,001, ** p < 0,01.

Figura 22: Filmes ao final de 7 dias (168 h), após serem submersos em tampão fosfato de sódio 30 mM, 4mM de EDTA, pH = 6 e, secos em estufa 50 °C *overnight* (12h), sendo: 1) filme inerte; 2) sistema filmógeno completo; 3) filme contendo apenas DOX; 4) filme contendo apenas MDZ; filme contendo apenas BMDZ.



Tanto para os experimentos de liberação e permeação *in vitro*, como para os experimentos de captação de água e perda de massa, é possível notar que ao final do período de avaliação definido por nós, em 7 dias, o filme permaneceu intacto, ainda, há uma quantidade de fármaco considerável, sendo cerca de 23% para o MDZ e 74% para DOX, em média, melhor explicados no **item 3.4.3**.

Ainda que a quantidade de fármaco se esgote, a quitosana, polímero base desse sistema, tem relatada na literatura, capacidade de agir como promotor de osteogênese e angiogênese. Em estudos recentes, pesquisadores constataram a capacidade de regeneração óssea por hidrogel a base de quitosana (CHEN et al., 2021; LI et al., 2019). Desta forma, o filme ter sua estrutura mantida pode ser um adicional positivo ao tratamento sugerido, neste trabalho, para a periodontite.

4.5.5 Propriedades mecânicas

Figura **23** contém os dados de tensão de ruptura dos filmes e refere-se à resistência à deformação plástica, com mudança dimensional permanente devido ao deslocamento de átomos e moléculas, impedindo o retorno ao seu estado original. A quitosana é conhecida por sua propriedade formadora de filmes com boas características mecânicas para aplicação em indústria farmacêutica (HAMEDI et al., 2022; LIZARDI-MENDOZA; ARGÜELLES MONAL; GOYCOOLEA VALENCIA, 2016; NOEL et al., 2008).

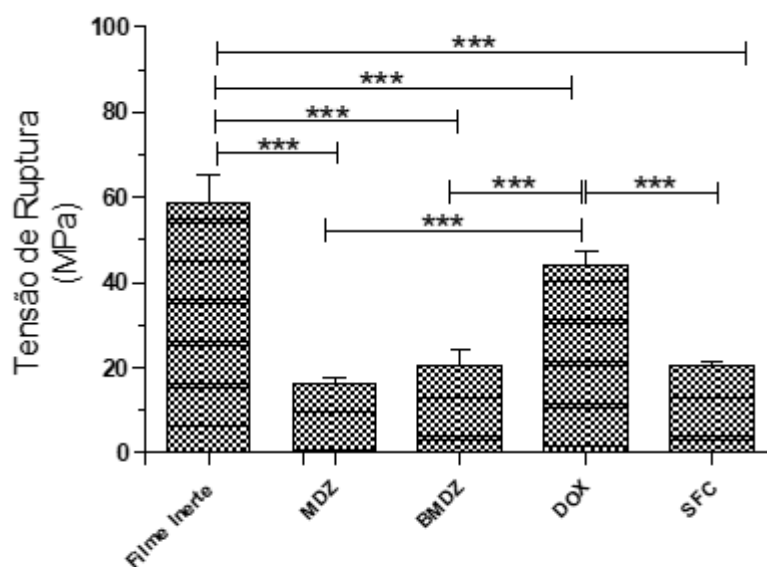
Os filmes contendo apenas quitosana tiveram tensão de ruptura, 58,6 MPa \pm 6,59, em média. Este valor está condizente com o descrito na literatura para filmes contendo quitosana (PRATEEPCHANACHAI et al., 2017).

Ainda que a adição dos fármacos tenha reduzido a resistência à ruptura dos filmes para 19,95 MPa \pm 1,77, provavelmente por desestabilizar a malha de polímeros, criando novas ligações estruturais polímero-fármaco que foram menos resistentes à tração exercida pelo equipamento, do que as ligações poliméricas, os filmes apresentam boas características de manuseio e não são quebradiços (ZHANG et al., 2015). A título de comparação, de modo a deixar os resultados mais palpáveis, a tensão de ruptura de filmes de PVC (policloreto

de vinila), utilizados para embalar alimentos é 22 MPa, enquanto que filmes de LPDE (polietileno de baixa densidade), com a mesma finalidade é 20 MPa (THAKHIEW; DEVAHASTIN; SOPONRONNARIT, 2010).

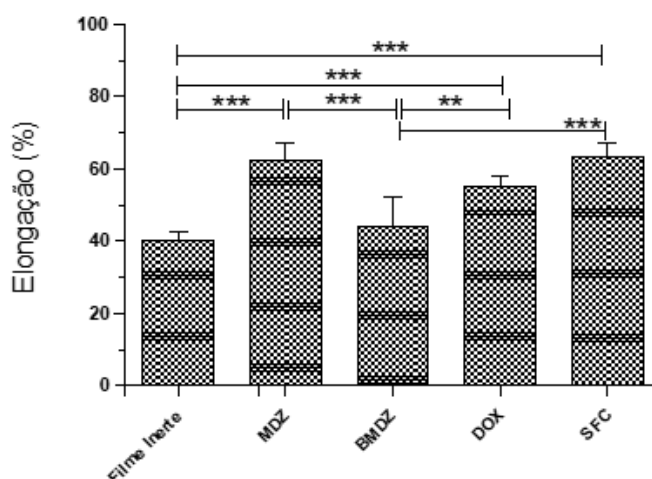
Na **Figura 23** estão as porcentagens de alongação para os filmes. O SFC teve alongação média 65 %, enquanto o filme inerte teve 40 % em média de alongação. A adição dos fármacos a matriz polimérica com o plastificante propilenoglicol, principalmente MDZ e DOX, como demonstrado no gráfico, flexibilizou a cadeia de quitosana, diminuindo a atração intermolecular e favorecendo a mobilidade do polímero, permitindo assim que o SFC ficasse mais flexível (ZIANI et al., 2008). Os filmes de PVC e LDPE tem alongação de 60% e 70%, respectivamente (THAKHIEW; DEVAHASTIN; SOPONRONNARIT, 2010).

Figura 23: Tensão de ruptura dos filmes, em analisador de textura com conjunto de garras, no modo de tensão e célula de carga de 5 Kg, sendo: filme inerte: filme contendo apenas quitosana, EDTA e propilenoglicol; MDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e MDZ; BMDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e BMDZ; DOX: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e DOX; SFC: sistema filmógeno completo.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5. Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Tukey. Diferença estatística *** p < 0,001.

Figura 24: Porcentagem de alongação dos filmes, em analisador de textura com conjunto de garras para tensionamento e célula de carga de 5 Kg, sendo: filme inerte: filme contendo apenas quitosana, EDTA e propilenoglicol; MDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e MDZ; BMDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e BMDZ; DOX: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e DOX; SFC: sistema filmógeno completo.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5. Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Tuckey. Diferença estatística *** p < 0,001, ** p < 0,01.

4.5.6 Propriedades bioadesivas

A bioadesão acontece por diferentes mecanismos, entretanto, para a quitosana, dois deles são mais descritos na literatura: a teoria eletrônica e a teoria de adsorção. O primeiro consiste na formação de ligações eletrostáticas, devido ao sítio de protonação presente na quitosana dispersa em meio ácido. O segundo refere-se às ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals que promovem ligações entre a glicosamina, presente na quitosana e, a superfície hidratada, a qual deseja-se aderir (HAMEDI et al., 2022; KUMRIA et al., 2018).

A **Figura 25** ilustra o experimento de propriedades bioadesivas.

Figura 25: Filmes aderidos com fita adesiva ao corpo de prova (A); aparato utilizado no ensaio de bioadesão (B); filme aderido ao tecido esofageal suíno (C).

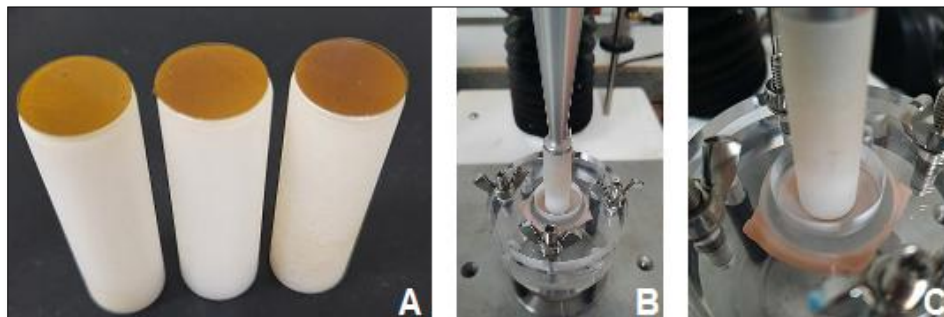
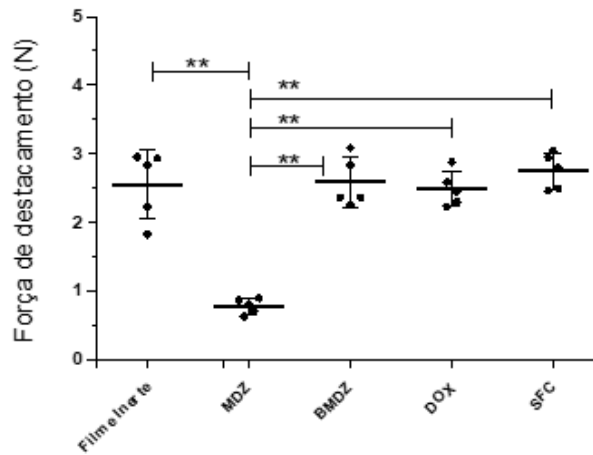


Figura 26 e a **Figura 27** resumem os resultados referentes à força de destacamento e trabalho de bioadesão. Para ambos, o MDZ demonstrou diferença estatística significativa quando comparado ao filme inerte ($p < 0,001$ para ambos), diminuindo a capacidade bioadesiva da quitosana, já conhecida descrita (ARANAZ et al., 2012; KUMAR, 2000; PEPPAS; SAHLIN, 1996; VENKATESAN; KIM, 2014).

A explicação está, possivelmente, na maior quantidade de água que o MDZ é capaz de captar e reter, como demonstrado nos **itens 4.5.2** e **4.5.3** aumentando a hidrossolubilidade do sistema que passará a formar ligações cruzadas internas que implicam no aumento da interação polímero-água e não polímero-membrana biológica, assim haverá diminuição das cadeias que penetram o tecido, diminuindo a força bioadesiva (AHUJA, ALKA; ROOP K. KHAR, 2011).

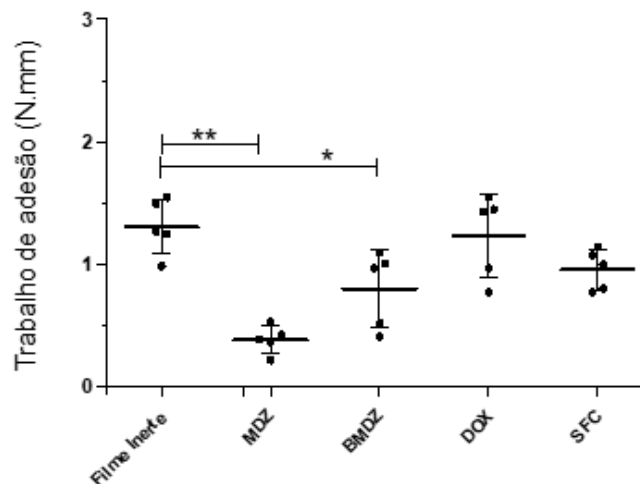
O mesmo não ocorreu para os demais sistemas, inclusive para o SFC, possivelmente e em concordância com os demais dados de caracterização do sistema apresentados anteriormente, porque a adição do BMDZ e da DOX equilibrou as ligações e permitiu que a força de destacamento se mantivesse em valores próximos ao filme inerte (**Figura 26**) e ainda que os valores de trabalho de bioadesão para o SFC estejam ligeiramente abaixo do valores para o filme inerte, diferença atribuída a umidade residual do sistema (**item 4.5.2**), são estatisticamente iguais.

Figura 26: Força de destacamento dos filmes em tecido esofageal suíno, célula de carga de 5 Kg, sendo: filme inerte: filme contendo apenas quitosana, EDTA e propilenoglicol; MDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e MDZ; BMDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e BMDZ; DOX: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e DOX; SFC: sistema filmógeno completo.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5. Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Tukey. Diferença estatística ** p < 0,01.

Figura 27: Trabalho de adesão dos filmes em tecido esofageal suíno, célula de carga 5 Kg, sendo: filme inerte: filme contendo apenas quitosana, EDTA e propilenoglicol; MDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e MDZ; BMDZ: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e BMDZ; DOX: filme contendo apenas quitosana, EDTA, propilenoglicol e DOX; SFC: sistema filmógeno completo.



Resultados expressos pela média e desvio padrão (DP), n=5. Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Tukey. Diferença estatística ** p < 0,01; * p < 0,05.

4.6 Avaliação da citotoxicidade do SFC

4.6.1 Citotoxicidade

Para a determinação da citotoxicidade de compostos o parâmetro mais utilizado é a viabilidade celular. Para tal, alguns métodos colorimétricos são utilizados, como por exemplo: ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina), vermelho neutro e resazurina. Optamos pelo o método da resazurina, cujo objetivo é a avaliação metabólica celular e é considerado mais sensível quando comparado aos demais (WENDE et al., 2014).

A resazurina (sal de resazurina, não fluorescente) é um indicador de oxidação-redução e, uma vez em contato com células em atividade metabólica ativa é reduzida à resorufina, fluorescente. Dessa maneira, o sinal de fluorescência será diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (WENDE et al., 2014).

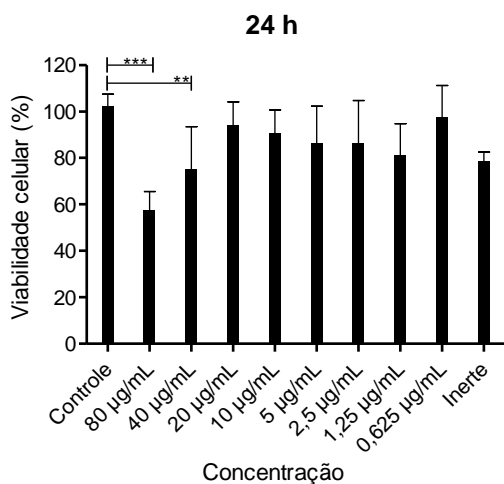
Os experimentos foram realizados em 4 tempos de incubação das células, 24h, 48h, 72h e 96h com o SFC (sistema filmógeno completo), nas concentrações de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg/mL e com a formulação inerte na concentração de 80 µg/mL e os resultados de viabilidade celular estão apresentados na **Figura 28**.

Os tempos foram baseados na literatura, de acordo com o tempo de incubação relatado para as células HaCat induzirem a produção/expressão de metaloproteinases (MMPs) estimuladas com endotoxinas (LPS-lipopolissacarídeo), conforme descrito no **item 3.7.1** (DI CAPRIO et al., 2015; WANG et al., 2016).

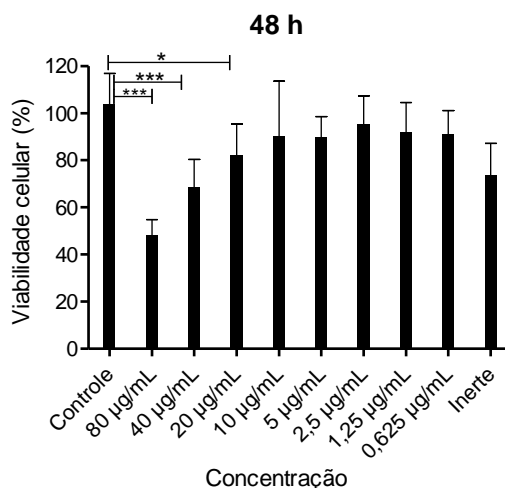
A análise estatística demonstrou diferença significativa, na viabilidade celular em relação ao controle, para as concentrações acima de 40 µg/mL (tempo de 24h); 20 µg/mL (tempo de 48h); 10 µg/mL (tempo de 72h); 20 µg/mL (tempo de 96h). Dessa forma, para todos os tempos avaliados não houve efeito citotóxico significativo, abaixo da concentração 5 µg/mL, o que permite trabalhar com segurança nas concentrações propostas para o ensaio de

avaliação proposto e descrito no **item 3.7.3** (1,25; 0,625; 0,3125; 0,156; 0,078 $\mu\text{g/mL}$).

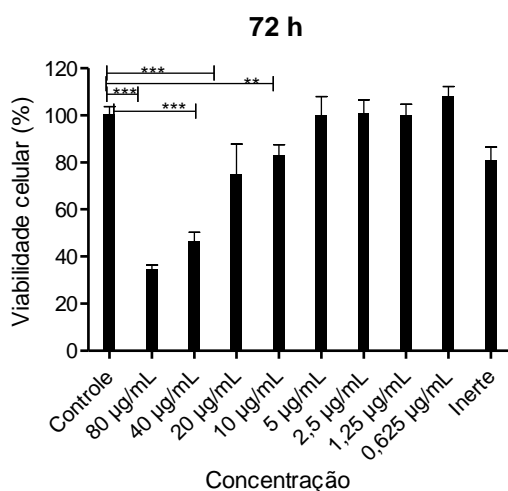
Figura 28: Resultados do ensaio de citotoxicidade para o SFC nas concentrações de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 $\mu\text{g/mL}$ e filme inerte na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, pelo método da redução da resazurina para avaliação da viabilidade celular.



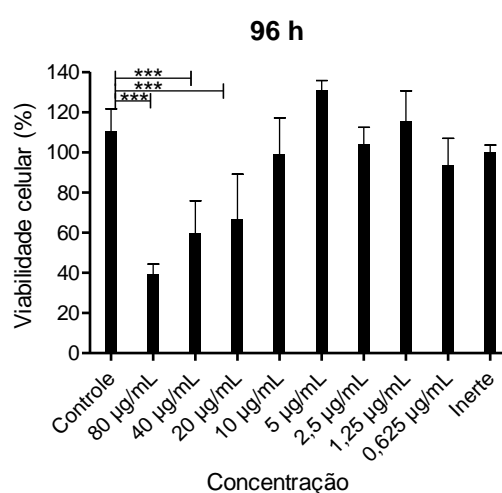
Resultados expressos pela média e DP, n= 6. Controle: apenas meio de cultura; SFC: sistema filmógeno completo; Inerte: formulação contendo apenas quitosana, propileno glicol e EDTA, na maior concentração testada (80 $\mu\text{g/mL}$). Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Dunnet. Diferença estatística *** p < 0,001, ** p < 0,01.



Resultados expressos pela média e DP, n= 6. Controle: apenas meio de cultura; SFC: sistema filmógeno completo; Inerte: formulação contendo apenas quitosana, propileno glicol e EDTA, na maior concentração testada (80 $\mu\text{g/mL}$). Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Dunnet. Diferença estatística *** p < 0,001, * p < 0,05.



Resultados expressos pela média e DP, n= 6. Controle: apenas meio de cultura; SFC: sistema filmógeno completo; Inerte: formulação contendo apenas quitosana, propileno glicol e EDTA, na maior concentração testada (80 $\mu\text{g/mL}$). Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Dunnet. Diferença estatística *** p < 0,001, ** p < 0,01.



Resultados expressos pela média e DP, n= 6. Controle: apenas meio de cultura; SFC: sistema filmógeno completo; Inerte: formulação contendo apenas quitosana, propileno glicol e EDTA, na maior concentração testada (80 $\mu\text{g/mL}$). Análise estatística foi realizada via one way ANOVA, seguidos de pós teste Dunnet. Diferença estatística *** p < 0,001.

4.7 Avaliação “in vitro” do efeito do SFC na expressão/atividade de MMPs

4.7.1 Determinação de relação dose - resposta: produção de MMPs frente ao estímulo de LPS em células HaCaT

A destruição tecidual na doença periodontal ocorre após infecção bacteriana, sendo a *Porphyromonas gingivalis*, bactéria Gram negativa, um dos principais agentes causadores da periodontite (BOZKURT et al., 2017).

Fatores de virulência liberados por essas bactérias são compostos por lipopolissacarídeos (LPS) presentes em sua parede celular e, o acúmulo dessas endotoxinas no local da infecção, nesse caso, o periodonto, levará a ativação da cascata de mediadores pró inflamatórios, tais como: interleucinas (principalmente, IL-1 β , IL-6, IL-8), TNF- α (fator de necrose tumoral), PGE₂ (prostaglandina E₂) que conseqüentemente, levarão a indução da expressão das MMPs, enzimas envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular (PANAGAKOS, 1996; YANG et al., 2021).

As MMPs são, portanto, uma família de enzimas composta por 23 subtipos descritos e são responsáveis pela remodelação tecidual, possuindo papel fundamental em diversos processos fisiológicos, desde à morfogênese até os processos de cicatrização. Entretanto, quando há desbalanço entre sua expressão e inibição, realizada fisiologicamente pelos TIMPs (glicoproteínas inibidoras teciduais de MMPs) haverá dano tecidual, podendo levar à progressão de diversas doenças, de origem primária inflamatória ou não, dentre elas: psoríase, ateroma, infarto, artrite, câncer, doença periodontal, esclerose múltipla, entre outras (RABKIN, 2017; SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005; VIDAL DE SOUZA ARAÚJO et al., 2010; VILELA et al., 2015).

A literatura evidencia a capacidade das células HaCaT em desencadear a resposta inflamatória, levando a expressão de MMPs, quando estimuladas com LPS. Lee et al. (2008), utilizaram LPS purificado de *Escherichia coli*, bactéria que assim como a *P. gingivalis*, é gram negativa, para induzir inflamação em células HDPCs (isoladas da polpa dentária humana) e conseguiram verificar, via *Western blot* a presença de mediadores inflamatórios

(DI CAPRIO et al., 2015; KIM et al., 2008; MORGANTI et al., 2017; YANG et al., 2021).

Dessa forma, utilizamos as células HaCaT e LPS de *E. coli*, como modelo para a expressão de MMPs. As concentrações utilizadas de LPS foram de 10 µg/mL e 20 µg/mL e os tempos de estímulo foram 24 h, 48 h e 72 h, ambos os parâmetros foram baseados em experimentos prévios descritos na literatura pertinente (DI CAPRIO et al., 2015; JUNG et al., 2017; KIM et al., 2008; MORGANTI et al., 2017; WANG et al., 2016).

A zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina (conforme descrito no **item 3.7.2**) substrato para as MMPs 2 e 9 que possuem atividade conhecida gelatinolítica, além de serem comumente encontradas em fluido crevicular de pacientes com periodontite, devido a sua capacidade em degradar a fibra de colágeno tipo IV, foi utilizada (**Figura 29**) (CHANG; YANG; HSIEH, 2001; NOVAK et al., 2005; VIEIRA COLOMBO et al., 2015). Esta técnica é sensível para a análise da atividade das gelatinases. Ainda que neste trabalho tenha sido utilizada de modo qualitativo, há relatos na literatura de quantificação de até 10 pg de gelatinases por zimografia, sendo uma técnica segura para este fim.

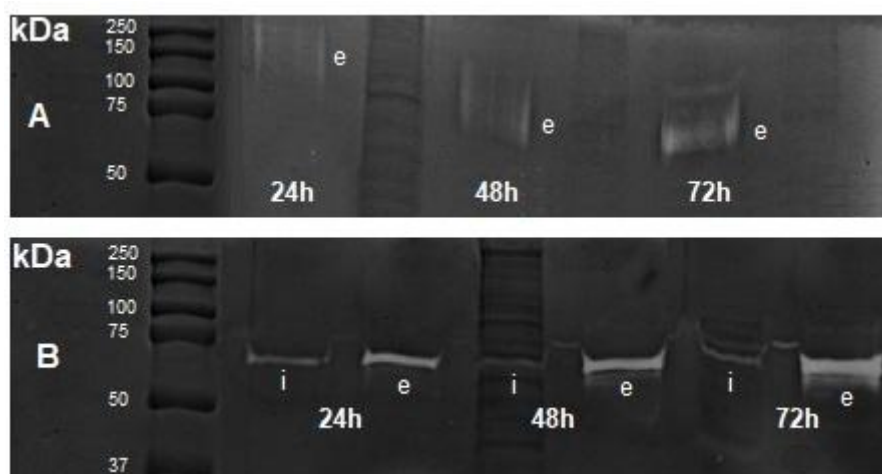
Outras MMPs, por exemplo tipos 1 e 8, também possuem atividade gelatinolítica, e podem, portanto, serem observadas, entretanto, a intensidade e nitidez da banda não serão as mesmas observadas para as MMP com atividade gelatinolítica específica (KLEINER; STETLERSTEVENSON, 1994; SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005).

É importante ressaltar que as MMPs são excretadas em sua forma latente, pro-MMPs (zimogênio). Essas formas necessitam de clivagem para serem ativadas, processo pela qual a ligação do Zn²⁺ com a cisteína, presente nas pró-enzimas é rompida, gerando assim um sítio catalítico na molécula. Em processos fisiológicos a ativação acontece pela ação de outras proteinases, já *in vitro* se dá pelo uso de reagentes específicos, como detergentes desnaturantes, pH baixo ou tratamento térmico. A clivagem gera uma redução, em média, de 8 a 10 kDa por enzima, dessa forma, o peso molecular para a pro-MMP-2 é 72 kDa, enquanto a pro-MMP-9 tem peso de 92 kDa (SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005; VISSE; NAGASE, 2003).

Ainda, as MMPs podem ser encontradas na forma de complexos (**Figura 29 (B)**) com seus inibidores (TIMPs, com pesos que variam de 21 a 28 kDa, em média), com peso molecular maior, acima de 100 kDa, em média. A regulação da expressão de MMPs e TIMPs é dependente de tempo e concentração, ao passo que, baixas concentrações de TIMP estimulam a ativação das MMPs (CANDELARIO-JALIL; YANG; ROSENBERG, 2009; RIBEIRO et al., 2008; ROSENBERG, 2002).

Os resultados estão apresentados na **Figura 29**. A análise foi feita tanto no sobrenadante celular (MMPs no ambiente extracelular), quanto após a lise celular (MMPs no ambiente intracelular), utilizando CellLytic™, detergente não desnaturante, utilizado para extração de proteínas em cultura de células (CHOI; LIM; LIM, 2013; FONSECA et al., 2010).

Figura 29: Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e gelatina como substrato para as MMPs, (A) células incubadas com 10 µg/ml de solução contendo LPS purificado de *E. coli*, durante 24 h, 48 h e 72 h; (B) células incubadas com 20 µg/mL de solução contendo LPS purificado de *E. coli*, durante 24 h, 48 h e 72 h; (i) refere-se as MMPs no meio intracelular avaliadas após a lise celular com CellLytic™ e (e) refere-se as MMPs avaliadas no meio extracelular (sobrenadante)



A presença de MMPs pode ser comprovada por dois parâmetros: (i) atividade gelatinolítica visual, uma vez que houve a descoloração do gel, pela ausência de proteína, consequência da degradação de gelatina, sugerindo

assim a presença das MMPs-2 e/ou 9; (ii) padrão de peso molecular que nos confirma a presença de banda ligeiramente abaixo de 75 kDa, sugerindo a presença da MMP-2 (SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005).

É possível verificar um efeito diretamente proporcional do tempo de incubação com a indução das MMPs, de modo que, embora tenha sido feita apenas a análise qualitativa das bandas de inibição, é visualmente nítida a diferença nas espessuras. A **Figura 29 (A)**, sugere a presença de complexos de MMPs e seus inibidores, para o tempo de 24 h (LPS, 10 µg/mL). Ainda, não houve presença de banda referente ao meio intracelular.

Já a **Figura 29 (B)**, evidencia presença maior de MMPs quando o estímulo foi feito com a maior concentração de LPS (20 µg/mL), confirmada pela degradação do substrato de maneira nítida e concentrada (banda branca no fundo escuro). E dentre os tempos de estímulo, a banda de maior largura, visualmente notada, foi para o estímulo de 72 h, sendo portanto, este o tempo de estímulo escolhido.

4.7.2 Avaliação do efeito do SFC na inibição/diminuição da expressão/atividade das MMPs

Como previamente relatado neste trabalho, além de fármacos antimicrobianos, as tetraciclina têm sido vastamente investigadas como potencial inibidores das MMPs, levando, inclusive o FDA (Food and Drug Administration, United States) a aprovar a doxiciclina (DOX), medicamento desta classe, em dose subantimicrobiana, Periostat[®], para uso com este fim, no tratamento da periodontite (PETERSON, 2004).

Inúmeros autores relatam a propriedade da DOX em inibir com sucesso a ação proteolítica das MMPs, não somente da periodontite, mas em diversas outras doenças inflamatórias em que as proteinases estão presentes e levam ao dano tecidual descontrolado, como exposto no **item 4.7.1** (GRIFFIN; CEBALLOS; VILLARREAL, 2011).

O grande leque de aplicabilidade da DOX enquanto inibidora das MMPs em doenças inflamatórias é instrumento de estudo de diversos grupos, a exemplo disso, Samartzis et al., (2019), demonstraram *in vitro* a redução

quanto à inibição na expressão de MMP -2 e 9 em células endometriais de cultura primária, utilizando DOX, em doses subantimicrobianas (1µg/mL) (SAMARTZIS et al., 2019).

Di Caprio et al., (2015), em estudo utilizando queratonócitos sugerem que o uso de DOX, em baixas doses, pode ser alternativa considerada no tratamento de doenças inflamatórias de pele, uma vez que houve diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-8, TNF- α , and IL-6, avaliados por ELISA, pós tratamento (DI CAPRIO et al., 2015).

Santa-Cecilia et al., (2019), em revisão bibliográfica, expõe o potencial da DOX como tratamento adjuvante na doença de Alzheimer, pela inibição das MMPs, atuando como substância neuroprotetora, uma vez que, nesta doença há neurodegeneração e neuroinflamação em níveis progressivos (SANTA-CECÍLIA et al., 2019).

Em vista disso e para melhor entender a ação da DOX frente as MMPs, nosso estudo foi realizado em três condições frente ao estímulo de LPS, sendo elas: a) pré tratamento; b) concomitantemente ao tratamento; c) pós tratamento, para todas as condições foram avaliados o filme inerte e o SFC, conforme ilustrado na **Figura 30**.

A avaliação da inibição acontece pela comparação visual entre o controle de estímulo de LPS 20 µg/mL, realizado para todos as condições separadamente e o tratamento em questão. O controle de células para avaliar a produção basal de MMPs também foi realizado, não houve banda referente a expressão de MMPs.

Embora a literatura relate a ação positiva da quitosana na osteogênese, não observamos inibição na atividade das MMPs, quando o filme inerte foi utilizado como tratamento, em nenhuma das condições estudadas. Dessa forma, acreditamos que a quitosana atue por outros mecanismos que não a inibição das proteases que degradam a matriz extracelular (WANG et al., 2002).

Para o SFC, quando foi realizado o pré-tratamento, ou seja, quando as células foram incubadas por 24h com o filme e, sequencialmente iniciou-se o estímulo por 72h com 20 µg/mL de LPS, foi possível observar a inibição na atividade das MMPs, nas maiores concentrações testadas (0,625 e 1,250 µg/mL), para a inibição enzimática extracelular (**tratamento pré-estímulo, A**)

onde a comparação com o controle de estímulo é visivelmente maior do que a banda referente aos tratamentos.

Quando avaliado o meio intracelular (**tratamento pré-estímulo, B**), após a lise das células aderidas, é possível notar que houve sugestiva inibição da atividade semelhante na maioria das concentrações, com bandas claras, pouco visíveis, estando as duas maiores concentrações com ausência de banda.

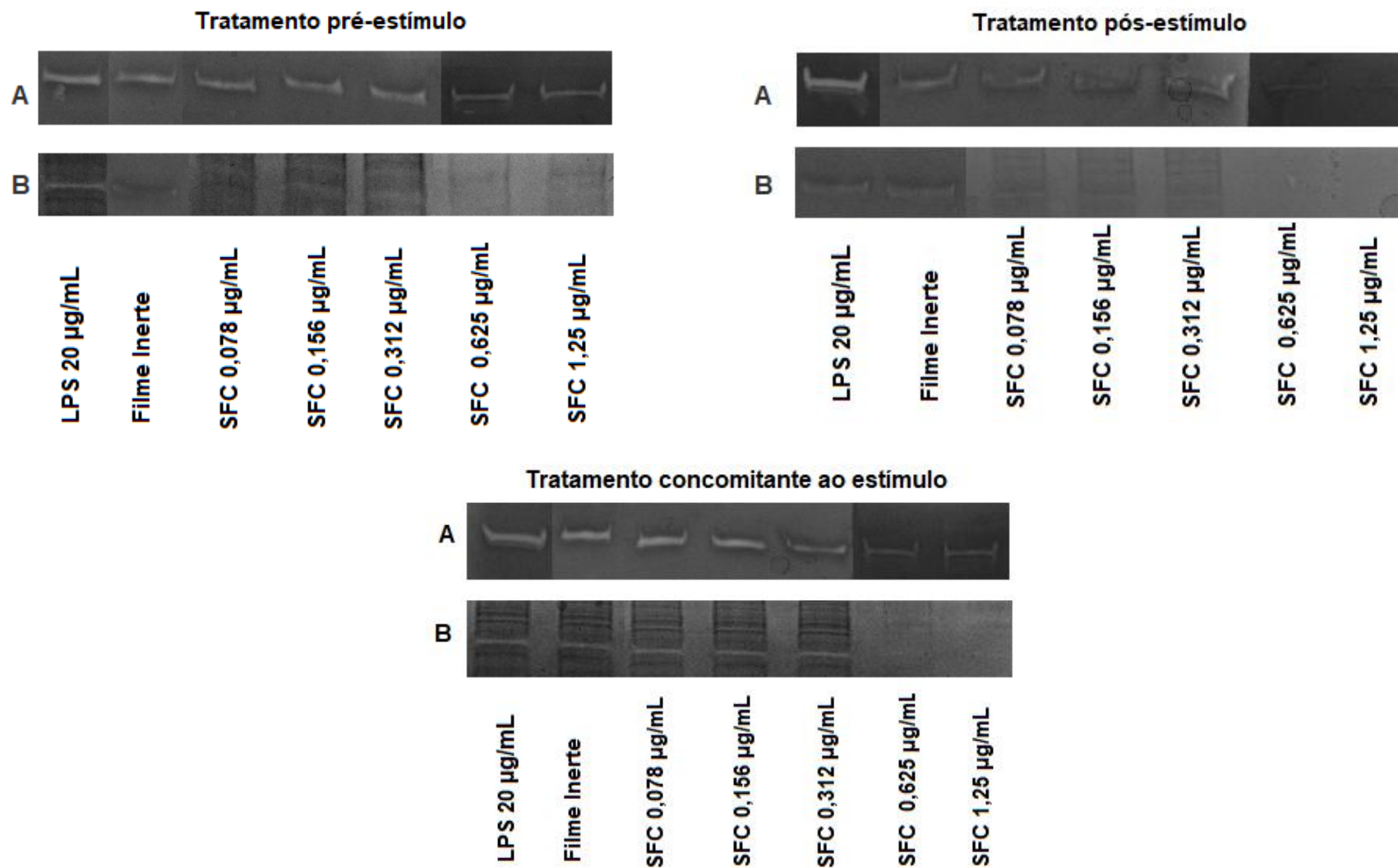
Para o tratamento concomitante ao estímulo, ou seja, com a adição conjunta e mantida por 72 h de LPS 20 µg/mL e SFC., a inibição aconteceu de maneira diferente. Quando avaliado o meio extracelular (**tratamento concomitante ao estímulo, (A)**) houve diminuição nas bandas de MMPs proporcional ao aumento na concentração de SFC, conforme é possível ver na **Figura 30**.

Diferente do que foi observado no meio intracelular, (**tratamento concomitante ao estímulo, (B)**), onde apenas para as duas maiores concentrações houve inibição da atividade das MMPs, sendo que para a concentração de 1,25 µg/mL, a ausência de banda pode sugerir a inibição total.

Para o tratamento pós estímulo, em outros termos, após a estimulação com LPS 20 µg/mL por 72 h, seguido da adição do SFC em diferentes concentrações por 24 h, observou-se falta de nitidez nas bandas de atividade enzimática para todas as concentrações em (**tratamento pós-estímulo, (A)**), implicando em inibição da atividade das MMPs, sendo, novamente, dependente da concentração.

Por fim, no **tratamento pós-estímulo B**, houve aumento da inibição proporcional ao aumento da concentração de SFC, levando até a inibição completa da atividade gelatinolítica das MMPs, nas concentrações de 0,625 µg/mL e 1,25 µg/mL.

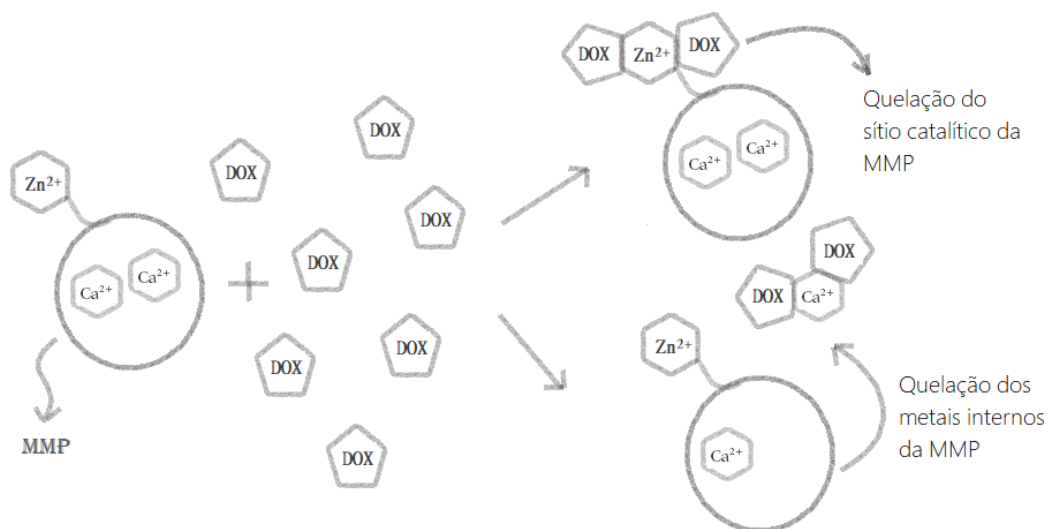
Figura 30: Atividade enzimática das MMPs, realizada por zimografia em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) copolimerizado com gelatina, substrato para as MMPs, frente ao tratamento com o filme inerte e o sistema filmógeno completo (SFC), realizado em diferentes tempos, sendo: pré-estímulo, concomitante ao estímulo e pós-estimulo com 20µg/mL de LPS em duas condições: (A) atividade enzimática extracelular, avaliada no meio de cultura e (B) intracelular, avaliada após a lise celular, utilizando CellLytic™.



Ainda que o mecanismo de inibição da DOX quanto às MMPs não esteja bem estabelecido, existem algumas possibilidades para justificar essa atividade que englobam desde a ação direta nas MMPs, inibindo sua atividade até a inibição de sua expressão, por inibir citocinas pró-inflamatórias que induzem a expressão das MMPs, indiretamente (GRIFFIN; CEBALLOS; VILLARREAL, 2011).

Os dois principais possíveis mecanismos de inibição da atividade, estão ilustrados esquematicamente na **Figura 31** e, envolvem a inibição direta das MMPs e estão relacionados à propriedade quelante da DOX, já descrita nos **itens 3.3.3 e 3.4**. O primeiro deles é explicado pela quelação do sítio catalítico da MMPs, onde há a ligação com o Zn^{2+} , inibindo a atividade das MMPs. O segundo consiste no “sequestro” por meio da quelação de metais internos da MMPs, como os íons Ca^{2+} essenciais para que sua atividade aconteça (GRIFFIN; CEBALLOS; VILLARREAL, 2011).

Figura 31: Representação esquemática dos dois mecanismos de ação principais para a DOX em relação a inibição das MMPs.



Apesar da necessidade de avaliações mais específicas, como por exemplo, a quantificação da expressão gênica das MMPs e a quantificação de mediadores pró inflamatórios, os resultados obtidos mediante aos protocolos propostos, nos possibilitam algumas sugestões relevantes para a elucidação da atividade da DOX frente às MMPs.

Ao compararmos os tratamentos pré e pós-estímulo, nota-se que, durante as 24h em que o SFC esteve incubado com as células (para o tratamento pré-estímulo), a DOX pode ter quelado outros metais presentes no meio de cultivo e por isso, ao realizar o estímulo, foi necessária concentração maior para que pudéssemos observar algum efeito na inibição da atividade em relação ao observado para tratamento pós-estímulo, sendo que neste, foi possível observar uma inibição maior em menores concentrações de SFC, possivelmente por uma maior afinidade da DOX pelas MMPs já presentes no meio. A DOX tem afinidade maior pelo íon Zn^{2+} ; acredita-se, inclusive que é esta propriedade que a torna uma potencial inibidora das MMPs, frente as demais tetraciclina que, por sua vez, possuem mais afinidade pelo Cu^{2+} (BRION; LAMBS; BERTHON, 1985).

O ensaio realizado com tratamento concomitante evidencia a influência direta da concentração de DOX na atividade obtida.

Assim, os resultados sugerem a predominância do efeito quelato da DOX em relação aos metais importantes na atividade das MMPs, mas não excluem a possibilidade de influência da DOX, também na expressão das MMPs, como evidenciado por Hanemaaijer et al., (1997) e Jonat et al., (1996), onde, em cultura de fibroblastos, o primeiro demonstrou a inibição da expressão das MMP-8, pela DOX, constada pela quantificação do mRNA e da proteína codificadora (HANEMAAIJER et al., 1997) e o segundo constatou a inibição de IL-1, dificultando a cascata de citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam a expressão das MMPs (JONAT; CHUNG; BARAGI, 1996).

5. Conclusão

O filme proposto atendeu às características farmacotécnicas desejadas e elaboradas no objetivo desse trabalho, sendo biocompatível, de aplicação bucal intrabolsa periodontal e tendo sua caracterização documentada pelo período de 7 dias. De acordo com nossas condições experimentais, o fármaco antimicrobiano metronidazol, em suas duas formas, base e benzoato teve sua liberação controlada, mantendo-a em 7 dias, o que favorecerá à adesão do paciente com periodontite ao tratamento, com fármaco suficiente para este período mínimo de dias. A doxiciclina, fármaco utilizado como inibidor de proteases, também teve sua liberação controlada para o mesmo período, além de ter comprovação *in vitro* de sua ação inibitória na atividade das metaloproteinases, quando no SFC, possivelmente por quelar os íons metálicos importantes para a sua atividade. Ao final, chegamos a uma composição filmógena que atende aos requisitos farmacotécnicos e funcionais, o que a habilita a ser submetida a prova de conceito em condições reais de tratamento da bolsa periodontal.

6. Referências

- AHUJA, ALKA; ROOP K. KHAR, AND J. A. Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89–100, 2011.
- ANVISA. National Health Surveillance Agency, Brazil - RDC No. 166. **National Health Surveillance Agency**, 2017.
- ANVISA. Guia para tratamento estatístico de validação. **Guia N° 10/2017 - Versão 1**, p. 19, 2018.
- ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203–230, 2012.
- ARAÚJO, R. V. DE S. et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82, 2011.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.
- BECK, M.I.; TOMKA, I.; WAYSEK, E. Psycico-chemical characterization of zein as a film coating polymer: a direct comparison with ethyl cellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 141, p. 137–150, 1996.
- BENJAMIN, R. M. Oral Health: The Silent Epidemic. **Public Health Reports**, v. 125, n. 2, p. 158–159, 2010.
- BOZKURT, S. B. et al. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Induces a Pro-inflammatory Human Gingival Fibroblast Phenotype. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 144–153, 2017.
- BP.**, 2019. (Nota técnica).
- BRION, M.; LAMBS, L.; BERTHON, G. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 5. Formation of zinc complexes with tetracycline and some of its derivatives and assessment of their biological significance. **Agents and Actions**, v. 17, n. 2, p. 229–242, 1985.
- BRUSCHI, M. L. et al. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.
- CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 983–994, 2009.
- CARVALHO, C.; CABRAL, C. T. Papel da Porphyromonas Gingivalis. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 48, p. 167–171, 2007.
- CASTRO, M. L. et al. Downregulation of Proteinase-Activated Receptor-2, Interleukin-17, and Other Proinflammatory Genes by Subantimicrobial Doxycycline Dose in a Rat Periodontitis Model. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 2, p. 203–210, 2015.
- CHANG, Y. C.; YANG, S. F.; HSIEH, Y. S. Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 11, p. 679–682, 2001.
- CHEN, Y. et al. A novel photocrosslinked phosphate functionalized Chitosan-Sr5(PO4)2SiO4 composite hydrogels and in vitro biomineralization,

osteogenesis, angiogenesis for bone regeneration application. **Composites Part B: Engineering**, v. 222, n. June, p. 109057, 2021.

CHOI, W. Y.; LIM, H. W.; LIM, C. J. Anti-inflammatory, antioxidative and matrix metalloproteinase inhibitory properties of 20(R)-ginsenoside Rh2 in cultured macrophages and keratinocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 310–316, 2013.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COLORCON. **Product Information -METHOCEL™** Colorcon, 2009.

DENOBILO, M.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Validação de método para determinação de resíduos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetaciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 209–218, 2004.

DI CAPRIO, R. et al. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: An in vitro study. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

DONOS, N. The periodontal pocket. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 7–15, 2018.

ELKAYAM, R. et al. Sustained release device containing treatment of periodontal disease minocycline. **New York**, v. 7, p. 231–236, 1988.

FERES, M. et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. **Journal of clinical periodontology**, v. 26, n. 12, p. 775–83, 1999.

FONSECA, Y. M. et al. Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 596–601, 2010.

FREDERIKSEN, K.; GUY, R. H.; PETERSSON, K. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2015.

FREITAS, P. H. **Matrix metalloproteinase inhibition and antibiofilm activity by incorporation of doxycycline into dental adhesive - Thesis**. [s.l.] UNICAMP, 2017.

GARCIA, R. A. Molecular Interactions between Matrilysin and the Matrix Metalloproteinase Inhibitor Doxycycline Investigated by Deuterium Exchange Mass Spectrometry. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 1128–1136, 2005.

GARLET, G. P. Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1349–1363, 2010.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; LEHERER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN, R. .; RAMAMURTHY, N. S. Minocycline reduces gingival coiiia- genoiytic activity during diabetes Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **Joitrnai of Periodontal Research**, v. 18, p. 516–526, 1983.

GOLUB, L. M. et al. Subantimicrobial-Dose Doxycycline Modulates Gingival Crevicular Fluid Biomarkers of Periodontitis in Postmenopausal

Osteopenic Women. **Journal of Periodontology**, v. 8, n. 79, p. 1409–1418, 2008.

GRIFFIN, M. O.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. J. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: Possible mechanisms of action. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 102–107, 2011.

GUIMARÃES, D. A. et al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? **Rev Bras Hipertens**, v. 17, n. 4, p. 226–230, 2010.

HAMEDI, H. et al. Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, n. November 2021, p. 119100, 2022.

HANEMAAIJER, R. et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells: Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31504–31509, 1997.

HENRIQUE, F. et al. Xenotransplantation. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 1, p. 9–13, 2020.

HERATH, T. D. K. et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 8, p. 694–701, 2011.

IVAN, A. L. M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 124–133, 2014.

JANTRATID, E. ET AL. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Doxycycline Hyclate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2009.

JAVALI, M. A.; VANDANA, K. L. A comparative evaluation of atrigel hyclate) Atridox with scaling and root planing and combination therapy in treatment of periodontitis : A clinical study. v. 16, n. 1, p. 43–48, 2012.

JOHANSEN, M.; LARSEN, C. A comparison of the chemical stability and the enzymatic hydrolysis of a series of aliphatic and aromatic ester derivatives of metronidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 26, n. 3, p. 227–241, 1985.

JONAT, C.; CHUNG, F. Z.; BARAGI, V. M. Transcriptional down regulation of stromelysin by tetracycline. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 341–347, 1996.

JUNG, Y. et al. Eupatilin with PPAR α agonistic effects inhibits TNF α -induced MMP signaling in HaCaT cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 220–226, 2017.

KIM, H. H. et al. Eicosapentaenoic acid inhibits TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes, HaCaT cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 2, p. 343–349, 2008.

KIRCHBERG, M. et al. Extrudates of lipophilic tetracycline complexes: A new option for periodontitis therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, n. October, p. 118794, 2019.

KLEINER, D. E.; STETLERSTEVENSON, W. G. **Quantitative**

zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases*Analytical Biochemistry*, 1994.

KUBO M, MATSUDA H, TANAKA M, KIMURA Y, OKUDA H, HIGASHINO M, TANI T, N. K AND A. S. NII-Electronic Library Service. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 430–433, 1958.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Funcional Polymers**, p. 1–27, 2000.

KUMRIA, R. et al. Formulation and Evaluation of Chitosan-Based Buccal Bioadhesive Films of Zolmitriptan. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 13, n. 2, p. 133–143, 2018.

LAMOUDI, L.; CHAUMEIL, J. C.; DAOUD, K. Swelling, erosion and drug release characteristics of Sodium Diclofenac from heterogeneous matrix tablets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 93–100, 2016.

LATORRE, A. et al. Albumin-based nanostructures for uveal melanoma treatment. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 35, 2021.

LI, N. et al. Alkaline phosphatase enzyme-induced biomineralization of chitosan scaffolds with enhanced osteogenesis for bone tissue engineering. **Chemical Engineering Journal**, v. 371, n. April, p. 618–630, 2019.

LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. **Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

MADI, M. et al. The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 76, n. 1, p. 71–76, 2018.

MAHFOUZ, N. M.; HASSAN, M. A. Synthesis, chemical and enzymatic hydrolysis, and bioavailability evaluation in rabbits of metronidazole amino acid ester prodrugs with enhanced water solubility. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 841–848, 2010.

MATHEW, M.; GUPTA, D.; BETHEA, C. Stability of metronidazole in solutions and suspensions. v. 19, p. 27–29, 1994.

MOHAMAD, J. et al. Loss-of-Function Variants in SERPINA12 Underlie Autosomal Recessive Palmoplantar Keratoderma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 11, p. 2178–2187, 2020.

MOHAMMAD, A. et al. Development and validation of a stability-indicating ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for doxycycline hyclate: An optimization of the analytical methodology for a medical countermeasure (MCM) drug. **Analytical Methods**, v. 10, n. 16, p. 1842–1851, 2018.

MORAES, P. C. DE et al. Repair of Bone Defects with Chitosan-Collagen Biomembrane and Scaffold Containing Calcium Aluminate Cement. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, p. 287–295, 2017.

MORGANTI, P. et al. Anti-inflammatory, immunomodulatory, and tissue repair activity on human keratinocytes by green innovative nanocomposites. **Materials**, v. 10, n. 7, 2017.

MOURA, C. M. DE et al. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 4, p. 351–355, 2011.

NAZIR, M. A. International Journal of Health Sciences. **Prevalence of**

periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention, v. 1, n. 2, p. 360–363, 2017.

NOEL, S. P. et al. Chitosan films: A potential local drug delivery system for antibiotics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, n. 6, p. 1377–1382, 2008.

NOVAK, M. J. et al. Adjunctive Benefits of Subantimicrobial Dose Doxycycline in the Management of Severe, Generalized, Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 7, p. 762–769, 2005.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. **Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods**. [s.l.: s.n.]. v. 882

PANAGAKOS, F. S. Regulation of pulp cell matrix metalloproteinase production by cytokines and lipopolysaccharides. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 7, p. 358–361, 1996.

PARK, S. Y. et al. Pepsin-solubilised collagen (PSC) from Red Sea cucumber (*Stichopus japonicus*) regulates cell cycle and the fibronectin synthesis in HaCaT cell migration. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 487–492, 2012.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: A review. **Biomaterials**, v. 17, n. 16, p. 1553–1561, 1996.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: Uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PETERSON, J. T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. **Heart Failure Reviews**, v. 9, n. 1, p. 63–79, 2004.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. **Lancet. Periodontal diseases**, v. 366, p. 207–229, 2005.

PRATEEPCHANACHAI, S. et al. Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 253–261, 2017.

RABKIN, S. W. **The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 147

RIBEIRO, R. I. M. DE A. et al. Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 115–121, 2008.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 586–595, 2002.

ROY, A. et al. Effects of plasticizers and surfactants on the film forming properties of hydroxypropyl methylcellulose for the coating of diclofenac sodium tablets. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 3, p. 233–241, 2009.

SAMARTZIS, E. P. et al. Doxycycline reduces MMP-2 activity and inhibits invasion of 12Z epithelial endometriotic cells as well as MMP-2 and -9 activity in primary endometriotic stromal cells in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2019.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. The Neuroprotective Effect of Doxycycline on Neurodegenerative Diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 4, p. 981–986, 2019.

SANTOS NETO, Á. J. DOS. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida - parte 1. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009.

SANTOS, O. S. ET AL. Protonation Pattern , Tautomerism , Conformerism , and Physicochemical Analysis in New Crystal Forms of the Antibiotic Doxycycline. **Crystal Growth e Design**, v. 14, p. 3711–3726, 2014.

SMITH, G. N. et al. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline. **Arthritis and rheumatism**, v. 42, n. 6, p. 1140–6, 1999.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A M. et al. Técnicas de zimografia para el análisis de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73–83, 2005.

SORLIER, P. et al. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 3, p. 765–772, 2001.

SOSKOLNE, W. A. et al. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip™ in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 12, p. 1017–1021, 1998.

T. LARSEN. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17, n. 5, p. 267–71, 2002.

THAKHIEW, W.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 2, p. 216–224, 2010.

VENKATESAN, J.; KIM, S. K. **Chitosan for bone repair and regeneration**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2014.

VICENTINI, F. T. M. C. et al. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 948–957, 2008.

VIDAL DE SOUZA ARAÚJO, R. et al. Metaloproteinasas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, p. 82–88, 2010.

VIEIRA COLOMBO, A. P. et al. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 94, p. 27–34, 2015.

VILELA, P. D. G. F. et al. In vitro effect of caffeic acid phenethyl ester on matrix metalloproteinases (MMP-1 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-1) in lipopolysaccharide-activated human monocytes. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 9, p. 1196–1202, 2015.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

WANG, J. et al. MiR-125b inhibits keratinocyte proliferation and promotes keratinocyte apoptosis in oral lichen planus by targeting MMP-2 expression through PI3 K/Akt/mTOR pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 80, p. 373–380, 2016.

WANG, X. et al. Bone repair in radii and tibiae of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p. 4167–4176, 2002.

WENDE, K. et al. Redox-based assay for assessment of biological impact of plasma treatment. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 7, p. 655–663, 2014.

YAMAIZUMI, M. et al. One molecule of diphtheria toxin fragment a introduced into a cell can kill the cell. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 245–250, 1978.

YANG, X. et al. Liquiritin reduces lipopolysaccharide-aroused HaCaT cell inflammation damage via regulation of microRNA-31/MyD88. **International Immunopharmacology**, v. 101, n. PB, p. 108283, 2021.

ZHANG, Z. H. et al. Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 638–643, 2015.

ZIANI, K. et al. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2159–2165, 2008.

