










Análise microbiológica de membranas de quitosana com associações de n-acilidrazona: avaliação da eficiência



Microbiological analysis of chitosan membranes with n-acyldrazone associations: evaluation of efficiency

Brenda Beatriz Torres de Oliveira¹  Maria Eduarda Alves da Nóbrega¹ 
Camila Ananias Bezerra de Lima¹  Gabryella Garcia Guedes¹ 
Luciana Ramos Teixeira¹  Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno² 
Tharcia Kiara Beserra de Oliveira¹ 

¹ Faculdade de Medicina de Olinda. Olinda, Pernambuco, Brasil.

² Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Resumo

Objetivo: Verificar a potencialidade e a ação bactericida de membranas de quitosana (QTS) com associações de N-acilidrazona (JR19) em diferentes concentrações para o tratamento de feridas. **Metodologia:** Os filmes foram desenvolvidos a partir das soluções de QTS e acetato de polivinila (PVA). Foram analisados: F1, filme de QTS; F2, filme de QTS+PVA na proporção de 1:1; F3, filme com 8,6 mg de JR19 adicionados à solução de QTS usada em F1; F4, filme com 8,6 mg de JR19 e 1 mg de Sulfadiazina de prata (AgSD) adicionados a 10 ml da solução de F2; F5, filme com 1 mg de JR19 e 1 mg de AgSD adicionados a 10 ml da solução de F2. A constatação da atividade antimicrobiana dos filmes de polímero de QTS com derivados JR19 foi realizada pela técnica de difusão de discos em meio de cultura sólido Ágar Müller Hinton. **Resultados:** O F1 foi desprezado devido à forte repulsão eletrostática com meio de cultura sólido ágar, que causou deformação e inviabilizou a cultura. A ausência de atividade inibitória microbiana dos filmes F2, F3 e F5 sobre os *S. aureus* foi evidenciada pela formação de colônias bacterianas frente e verso sobre os filmes de polímero de QTS com derivados de JR19. **Conclusão:** A sinergia entre JR19 e AgSD na membrana F4

Autor correspondente:

Tharcia Kiara Beserra de Oliveira.

E-mail: tharca_kiara@hotmail.com

Fonte de financiamento: Não se aplica

Parecer CEP: Não se aplica.

Recebido em 12/09/2023

Aprovado em 04/06/2024

Como citar: Oliveira **BBT**, Nóbrega **MEA**, Lima **CAB**, Guedes **GG**, Teixeira **LR**, Damasceno **BPGL**, et al. Análise microbiológica de membranas de quitosana com associações de n-acilidrazona: avaliação da eficiência. An. Fac. Med. Olinda 2024; 1(12):56 doi - <https://doi.org/10.56102/afmo.2024.322>

é vantajosa para a cicatrização de feridas devido às suas propriedades complementares. No entanto, a segurança e a eficácia em ensaios clínicos precisam ser mais exploradas para uma terapia alternativa segura e eficaz.

Palavras-chave: Cicatrização; Feridas; Membranas; Quitosana.

Abstract

Objective: To verify the potential and bactericidal activity of chitosan (CS) films combined with N-acylhydrazone (JR19) in different concentrations for wound treatment. **Methodology:** Films were developed from chitosan (CS) + polyvinyl acetate (PVA) solutions. The F1 film consisted of CS and the F2 film consisted of CS + PVA in a 1:1 ratio. To incorporate JR19 in the polymeric solutions, 1 mg of sulfadiazine (AgSD) + 8.6 mg of JR19 were added in 10 mL of CS: PVA. Films formed from this solution were named F3, F4, and F5. The antimicrobial activity of films with JR19 derivatives was assessed using the disc diffusion technique in an Agar Müller Hinton solid culture medium. **Results:** The F1 film was discarded due to strong electrostatic repulsion with solid agar culture medium, deforming the film and hampering the culture. The F2, F3, and F5 films showed bacterial colony formations in front and verse, indicating no microbial inhibitory activity on *Staphylococcus aureus*. **Conclusion:** In the F4 film, the synergy between JR19 and AgSD showed complementary properties that facilitate wound healing. However, the safety and efficacy of this alternative therapy need further investigation in clinical trials.

Keywords: Chitosan; Healing; Membranes; Wounds.

INTRODUÇÃO

Estima-se que 5% da população do Ocidente tenha lesões crônicas e que 25% sofrerão dessa condição em 2050. A gravidade da situação aumenta quando considerados desenvolvimentos como a incapacidade física, o prejuízo à qualidade de vida, o risco de infecção, a internação, a amputação e a evolução para o óbito¹.

Nos últimos anos, tem crescido o número de pacientes com lesões de pele em unidades hospitalares, o que compromete a saúde dessa população, e a porcentagem de afetados nas clínicas médicas chega a 42,6%. Esse aumento independe de idade ou de sexo, sendo responsável por longas internações hospitalares². Diante disso, e por ser um fato de grande preocupação na medicina, métodos de terapia dessas feridas têm sido desenvolvidos, buscando eficácia e bons resultados^{4, 5, 6, 7, 8}.

Estudos e pesquisas científicas têm sido conduzidos para desenvolver materiais promissores, com baixo custo e alta eficiência, como a membrana de polímero. Essa membrana substitui a pele, é de fácil manejo e cria uma barreira física que impede infecções e é capaz de absorver exsudatos. Além disso, não necessita de manutenção diária, com troca do curativo e limpeza

da ferida^{9,10,11}. Com o avanço dos estudos referentes a esses polímeros, diversos produtos passaram a ser empregados para facilitar a reparação do tecido lesionado. Evidências apontam a existência de mais de 2 mil tipos de coberturas sintéticas ou biológicas disponíveis no mercado internacional. Esses produtos são biodegradáveis e biocompatíveis, e são empregadas técnicas para impedir a reabsorção e as falhas do material^{12,13,14,15}.

Curativos usam polímeros biológicos e sintéticos, como ácido hialurônico, alginato e quitosana (QTS), escolhidos por serem seguros e compatíveis com o corpo, por se degradarem naturalmente e por terem propriedades antibacterianas¹⁶. Esses polímeros são compostos de nanofibras que melhoram a cicatrização devido à alta relação de volume, área superficial, proliferação e diferenciação celular. Essa melhora se dá pela capacidade das nanofibras de mimetizar a composição do tecido, permitindo a organização celular e melhorando a adesão, a migração e o transporte celular por conta de suas múltiplas fibras aleatoriamente³ dispostas e interconectadas com alta porosidade, responsáveis pela regeneração de tecidos, cartilagens, ossos e vasos sanguíneos^{12,13,14}.

Esse trabalho objetivou verificar a potencialidade e a ação bactericida de membranas de QTS com associações de N-acilidrazona (JR19) em diferentes concentrações para o tratamento de feridas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenvolvimento dos filmes

Os filmes foram desenvolvidos a partir da solução de QTS preparada em solução de ácido acético 1% (v/v), com concentração final de 1% (m/v); e da solução de acetato de polivinila (PVA) preparada em água aquecida, com concentração final também de 1% (m/v). A partir dessas duas soluções poliméricas, foram produzidas as seguintes amostras, conforme descrito na Tabela 1: um filme apenas de QTS, nomeado F1; e um filme de QTS + PVA na proporção 1:1, nomeado F2. Então, 8,6 mg de JR19 foram adicionados à solução de QTS usada em F1, resultando em F3. Também foram adicionados 8,6 mg de JR19 + 1 mg de Sulfadiazina de prata (AgSD) a 10 ml da solução de F2, que resultou em F4, e 1 mg de JR19 + 1 mg de AgSD a 10 ml da solução de F2, que resultou em F5. Para a incorporação da JR19 nas soluções poliméricas, a solução com material adicionado foi colocada sob agitação magnética por um período de 24 horas.

As soluções resultantes foram vertidas em placas de Petri de plástico com 5,5 cm de diâmetro, num volume de 10 ml, e inseridas em uma estufa de circulação de ar na temperatura de 50 °C por um período de 24 horas, de forma a promover a evaporação do solvente e a formação dos filmes. As formulações foram desenvolvidas no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos da Universidade Estadual da Paraíba.

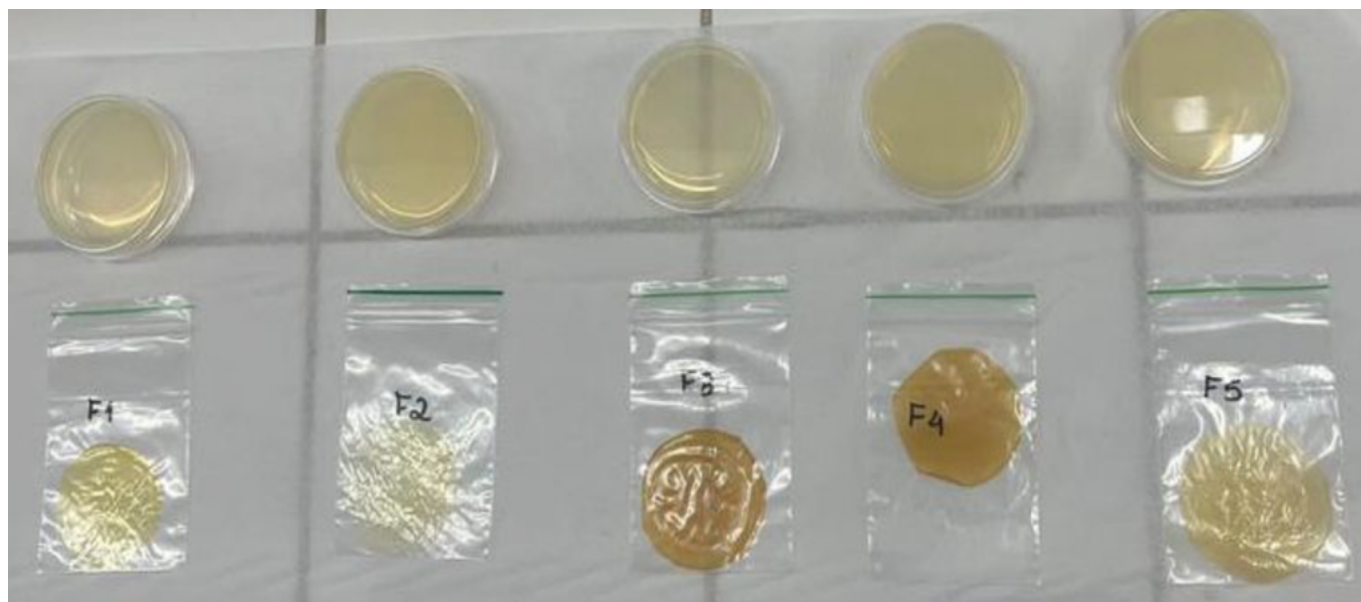
Tabela 1. Amostras utilizadas no estudo

Amostra	Proporção QTS: PVA (m/m)	JR19 (mg)	AgSD (mg)
F1	1:0	-	-
F2	1:1	-	-
F3	1:0	8,6	-
F4	1:1	8,6	1,0
F5	1:1	1,0	1,0

Fonte: dados da pesquisa.

Atividade antimicrobiana

A constatação da atividade antimicrobiana dos filmes de polímero de QTS com derivados de JR19 foi realizada pela técnica adaptada de difusão de discos em meio de cultura sólido Ágar Müeller Hinton (**Figura 1**) em placa de Petri de vidro 60 x 15 mm, semeando o inóculo bacteriano com o auxílio de um *swab* estéril^{14,18}.

Figura 1. Filmes de QTS com e sem derivados de JR19

Fonte: dados da pesquisa.

Para os testes de sensibilidade antimicrobiana, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (*S. aureus*). As cepas bacterianas foram ativadas em tubos de ensaio contendo ágar nutriente e mantidas em estufa a 37 °C por 18 horas. Em seguida, foi preparada uma solução salina a 0,9% e feito um inóculo bacteriano equiparado à escala MacFarland de 0,5, que corresponde a aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml)^{18,19}.

A partir de uma cultura da cepa selecionada, uma única colônia foi semeada em caldo BHI e incubada a 37 °C por aproximadamente 18 horas. Em seguida, após turvação do meio, com *swab* estéril previamente mergulhado na suspensão bacteriana, a cultura foi semeada em estrias nas placas de Ágar Müeller Hinton, em duas direções, por toda a superfície do meio, por fim passando o *swab* em toda a volta da placa e deixando o inóculo secar por 5 a 10 minutos^{15,17,18}. Então, com uma pinça estéril, os filmes dos polímeros de QTS com diferentes concentrações de derivados de JR19 foram depositados nas placas inoculadas.

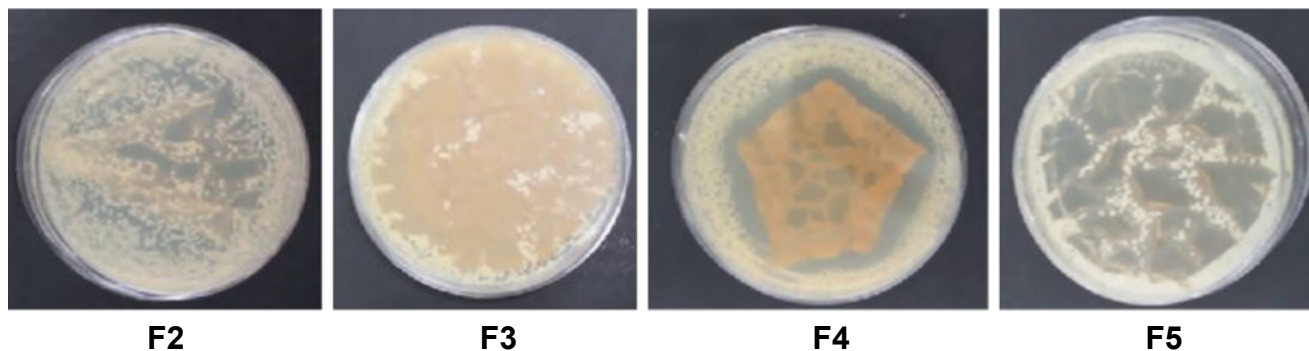
O filme F1 apresentou forte repulsão em relação ao meio ágar de cultura e foi descartado; por sua vez, os filmes F2 e F4 apresentaram leve repulsão e foram hidratados com soro fisiológico para melhorar sua aderência^{5,6,7}. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em uma estufa bacteriológica. Após esse período, a interpretação dos resultados foi adaptada às normas do *National Committee For Clinical Laboratory*, com observação macroscópica da presença de colônias isoladas ao redor e sobre os filmes analisados^{2,3}.

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado no Laboratório de Microbiologia da UFPE, de acordo com o ISO 17 025, seguindo normas específicas para laboratórios que realizam ensaios microbiológicos. Foram adotados protocolos de biossegurança rigorosos para prevenir riscos à saúde humana e ambiental^{3,4}.

RESULTADOS

Após incubação a 37 °C por 24 horas, os resultados demonstraram, em nível macroscópico, que, na cultura com o filme F4, não foi identificada a presença de colônias bacterianas sobre o filme, tendo, portanto, apresentado atividade antibacteriana, com formação de um halo de inibição do crescimento do *S. aureus*, evidenciado na Figura 2^{3,6,7}. O Filme F1 foi desprezado devido à forte repulsão eletrostática com o meio de cultura sólido ágar, que o deformou e inviabilizou a cultura^{10,11}. A ausência de atividade inibitória microbiana dos filmes F2, F3 e F5 sobre os *S. aureus* foi evidenciada pela presença de formação de colônias bacterianas frente e verso sobre os filmes analisados, como mostra a Figura 2.

Figura 2. Resultados da atividade inibitória microbiana dos filmes de polímero de QTS com derivados de JR19 sobre os *S. aureus*.



Fonte: autores

DISCUSSÃO

Nos resultados, observa-se a ausência do filme F1, composto apenas por QTS, desprezado devido à forte repulsão eletrostática ao meio de cultura sólido ágar, que o deformou e inviabilizou a análise. Essa repulsão foi possivelmente gerada devido a unidades monoméricas de β -(1→4) -2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1→4) -2-acetamida-2-desoxi-D-glicose da QTS, que reagiram com o meio de cultura^{10, 11, 12}.

Evidenciamos que a membrana F2 demonstrou ausência de atividade inibitória microbiana sobre os *S. aureus*, permitindo maior crescimento bacteriano em comparação às culturas dos outros filmes testados. Esse resultado sugere que os compostos JR19 e AgSD, incluídos na composição final do filme, seriam os principais responsáveis pela inibição do crescimento dessas bactérias nos meios de cultura^{13, 14, 15}.

Da mesma forma, observou-se que a membrana F3 também apresentou ausência de atividade inibitória microbiana sobre os *S. aureus*. A composição de QTS associada a 8,6 mg de JR19 do F3 não contribuiu para a ação antimicrobiana, um possível indicativo de que a sulfadiazina de prata seria o principal composto responsável pela sensibilidade bacteriana^{4, 6, 7}.

A membrana F4 apresentou considerável ação antimicrobiana, observada pela ausência de formação de colônias bacterianas e a presença de um halo de inibição da bactéria *S. aureus*. Sendo o F4 o filme com maior atividade promissora antibacteriana, ficou demonstrado o excelente desempenho antimicrobiano da AgSD na concentração de 1mg na inibição do crescimento da *S. aureus*. Com isso, o F4 se mostrou o filme com maior atividade promissora antibacteriana. A composição da membrana possivelmente apresentou ação bactericida por sua interação com a parede celular de peptidoglicano, levando ao rompimento da parede da bactéria, e por seu efeito bacteriostático, evidenciado pela formação de um halo de inibição, que impediu o crescimento do *S. aureus*^{5,6}.

Apesar de a membrana F5 ter sido acrescida de material antimicrobiano, houve ausência de atividade inibitória sobre os *S. aureus*. Possivelmente, a adição de JR19 e AgSD não foi suficiente para obter resultados antimicrobianos eficazes.

A considerável ação antimicrobiana apresentada pela membrana F4, observada pela ausência de formação de colônias bacterianas de *S. aureus*, sugere que a combinação específica com concentração de 8,6 mg de JR19 foi eficaz para inibir o crescimento das bactérias. A combinação desses compostos com membrana de QTS como tratamento adjuvante na cicatrização de feridas cutâneas é um aspecto importante dos testes *in vitro*. Como mencionado, a F4 mostrou considerável ação antimicrobiana, sugerindo que a inclusão do JR19 na concentração de 8,6 mg e do PVA contribuiu para potencializar a inibição do crescimento do *S. aureus* no meio de cultura^{6, 7, 8}.

Wanderley e colaboradores (2020) desenvolveram filmes de QTS contendo JR19, um derivado N-acilidrazônico, para criar uma formulação terapêutica, tendo feito análises das propriedades físico-químicas e mecânicas e da biocompatibilidade dos filmes. Os resultados mostraram a presença de JR19 nos filmes, com características identificadas por calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e difração de raios-X¹⁷.

Além da ampla ação antimicrobiana, a AgSD é segura e eficaz na prevenção de infecções secundárias e na promoção da cicatrização de feridas. Ao combiná-la em membranas para cicatrização, cria-se um ambiente propício à regeneração tecidual, estimulando o reparo da pele danificada. No entanto, é crucial conduzir estudos clínicos adicionais para avaliar sua segurança e eficácia como alternativa terapêutica para a cicatrização de feridas¹⁹.

A ação combinada da JR19 e da AgSD no processo de cicatrização pode ser vantajosa por suas propriedades complementares. Enquanto a JR19 atua como agente antimicrobiano e anti-inflamatório, prevenindo infecções e reduzindo a inflamação no local da ferida, a AgSD exibe atividade bactericida contra uma ampla gama de bactérias, incluindo aquelas frequentemente associadas a infecções cutâneas. A prata possui propriedades bactericidas e bacteriostáticas que ajudam a controlar infecções cutâneas. Diante dos resultados, podemos concluir que o F4 apresentou excelente atividade antibacteriana, e sua utilização seria promissora na prevenção de infecções e cicatrização de lesões cutâneas^{10, 11}.

Assim, supõe-se que ocorra inibição do crescimento bacteriano na presença do F4, possivelmente relacionada às diferenças estruturais e químicas do composto em relação aos outros filmes testados. Essa possível inibição bacteriana pode estar relacionada às diferenças químicas e estruturais do polímero de QTS com derivados de JR19, capaz de interferir na aderência da parede bacteriana de peptidoglicanos, ou à inibição do crescimento bacteriano devido à possível ação antimicrobiana dos componentes bioativos do polímero F4 por meio de difusão, o que poderia explicar a formação do halo inibição ao redor do filme^{18, 19}.

CONCLUSÃO

A sinergia entre JR19 e AgSD presente na membrana F4 é vantajosa devido às suas propriedades complementares. A combinação desses compostos em membranas para cicatrização pode promover a regeneração dos tecidos danificados, estimulando o processo de reparo da pele. Contudo, a segurança e a eficácia dessa abordagem em ensaios clínicos precisam ser mais exploradas para garantir essa alternativa terapêutica para a cicatrização de feridas.

É importante notar que os resultados são específicos para testes *in vitro* e podem não refletir completamente o desempenho dessas membranas em ambiente *in vivo*. Além disso, a eficácia de uma membrana como cicatrizante depende de múltiplos fatores, incluindo a gravidade da ferida e a resposta individual do paciente.

CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar

AGRADECIMENTOS

Programa de Desenvolvimento Institucional de Iniciação Científica (PRODIIC), Faculdade de Medicina de Olinda (FMO).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

BBTO, MEAN e CABL: conceituação, investigação, metodologia e redação. **GGG:** metodologia. **LRT e BPGLD e TKBO:** conceituação, redação – rascunho original e redação – revisão e edição. Todos os autores aprovaram a versão final a ser publicada.

REFERÊNCIAS

1. Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Akhtar, M., Ali, M. R., & Alam, M. M. (2014). A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(2), 69–80. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>
2. Wang, A. P., Zhang, J. M., Meng, Y. L., Deng, L. Q., Lv, Y. F., Li, C., & Wang, J. Q. (2012). Effects of different sources and levels of dietary gossypol on gossypol residues in plasma and milk of lactating cows. *Journal of dairy science*, 95(9), 5127–5132. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4870>
3. Mao, Z., Bai, J., Jin, X., Mao, W., & Dong, Y. (2021). Construction of a multifunctional 3D nanofiber aerogel loaded with ZnO for wound healing. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 208, 112070. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112070>
4. Alven, S., Nqoro, X., & Aderibigbe, B. A. (2020). Polymer-Based Materials Loaded with Curcumin for Wound Healing Applications. *Polymers*, 12(10), 2286. <https://doi.org/10.3390/polym12102286>
5. Alven S, Peter S, Mbese Z, Aderibigbe BA. Polymer-Based Wound Dressing Materials Loaded with Bioactive Agents: Potential Materials for the Treatment of Diabetic Wounds. *Polymers (Ba-*

- sel). 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/polym14040724>. PMID: 35215637; PMCID: PMC887461
6. Tarakanov, R., Shagdarova, B., Lyalina, T., Zhuikova, Y., Il'ina, A., Dzhililov, F., & Varlamov, V. (2023). Protective Properties of Copper-Loaded Chitosan Nanoparticles against Soybean Pathogens *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *Polymers*, 15(5), 1100. <https://doi.org/10.3390/polym15051100>
 7. Brunetti B, Sanchez MA, Roccia F, Ramieri G. A modified upper lip lift approach for columella reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2020;73(12):2239-2260. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.05.014>
 8. Ou, Q., Zhang, S., Fu, C., Yu, L., Xin, P., Gu, Z., Cao, Z., Wu, J., & Wang, Y. (2021). More natural more better: triple natural anti-oxidant puerarin/ferulic acid/polydopamine incorporated hydrogel for wound healing. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00973-7>
 9. Sen, C. K. (2019). Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in Wound Care*, 8(2), 39-48. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0946>
 10. Ran, L., Peng, S. Y., Wang, W., Wu, Q., Li, Y. C., & Wang, R. P. (2022). In vitro and in vivo Evaluation of the Bioactive Nanofibers-Encapsulated Benzalkonium Bromide for Accelerating Wound Repair with MRSA Skin Infection. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 4071-4086. <https://doi.org/10.2147/ijn.s380786>
 11. Lindholm, C., & Searle, R. (2016). Wound management for the 21st century: Combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*, 13(S2), 5-15. <https://doi.org/10.1111/iwj.12623>
 12. Ramona, L., Alexandru, A., Irina, R., Andreea-Isabela, S., & Daniela Ailincăi. (2021). Double functionalization of chitosan based nanofibers towards biomaterials for wound healing. *Reactive and Functional Polymers*, 167, 105028. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105028>
 13. Zhong, Y., Xiao, H., Seidi, F., & Jin, Y. (2020). Natural polymer-based antimicrobial hydrogels without synthetic antibiotics as wound dressings. *Biomacromolecules*, 21(7), 2983-2995. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00760>
 14. Venegas-Cervera, G. A., et al. (2021). Biocompatibility studies of polyurethane Electrospun membranes based on arginine as chain extender. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32(11), 104. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06581-z>
 15. Yang, Y., Liang, Y., Chen, J., Duan, X., & Guo, B. (2022). Mussel-inspired adhesive antioxidant antibacterial hemostatic conductive hydrogel wound dressing via photopolymerization for infected skin wound healing. *Bioactive Materials*, 8, 341-354. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.014>
 16. Assis, A. C. L., Moreira, L. M. C. C., Rocha, B. P., Pereira, M. R. B., de Melo, D. F., Moura, R. O., Azevedo, E. P., Oshiro-Junior, J. A., & Damasceno, B. P. G. L. (2021). N-acylhydrazone Derivative-Loaded Cellulose Acetate Films: Thermoanalytical, Spectroscopic, Mechanical and Morpho-

- logical Characterization. *Polymers (Basel)*, 13(7), 1-16. <https://doi.org/10.3390/polym13142345>
17. Wanderley, D. M. S., Melo, D. F., Silva, L. M., Souza, J. W. L., Pina, H. V., Lima, D. B., Amoah, S. K. S., Borges, S. M. P., Fook, M. V. L., Moura, R. O., Lima, R. S. C., & Damasceno, B. P. G. L. (2020). Biocompatibility and mechanical properties evaluation of chitosan films containing an N-acylhydrazonic derivative. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 155, 105547. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105547>
 18. Wasiak, J., Cleland, H., Campbell, F., & Spinks, A. (2013). Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(3), CD002106. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002106.pub4>
 19. Atiyeh, B. S., Costagliola, M., & Hayek, S. N. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 33(2), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.06.010>