



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**RUBENS TELES MONTEIRO**

**MEMBRANAS DENSAS E POROSAS OBTIDAS A PARTIR DE ALGINATO E  
QUITOSANA INCORPORADAS COM SINVASTATINA PARA ATUAR COMO  
CURATIVO BIOATIVO DE FERIDAS DA PELE**

**FORTALEZA**

**2023**

RUBENS TELES MONTEIRO

MEMBRANAS DENSAS E POROSAS OBTIDAS A PARTIR DE ALGINATO E  
QUITOSANA INCORPORADAS COM SINVASTATINA PARA ATUAR COMO  
CURATIVO BIOATIVO DE FERIDAS DA PELE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.  
Coorientadora: Prof. Dra. Fabia Karine Andrade.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M779m Monteiro, Rubens Teles.

Membranas densas e porosas obtidas a partir de alginato e quitosana incorporadas com sinvastatina para atuar como curativo bioativo de feridas da pele / Rubens Teles Monteiro. – 2023.  
93 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

Coorientação: Prof. Dr. Fabia Karine Andrade.

1. Curativos. 2. Alginato. 3. Quitosana. 4. Sinvastatina. 5. Liberação controlada de fármacos. I. Título.  
CDD

---

RUBENS TELES MONTEIRO

MEMBRANAS DENSAS E POROSAS OBTIDAS A PARTIR DE ALGINATO E  
QUITOSANA INCORPORADAS COM SINVASTATINA PARA ATUAR COMO  
CURATIVO BIOATIVO DE FERIDAS DA PELE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 14/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Fabia Karine Andrade (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Raquel Petrilli Eloy  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Dr. Niédja Fittipaldi Vasconcelos  
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

A Deus.

Aos meus pais, Rinaldo Monteiro e Maria  
Perpetua Teles Monteiro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, saúde, proteção e por mais uma grande vitória.

Ao meu amado pai Rinaldo Monteiro por ser a inspiração do homem que quero ser. Guardarei sempre no coração seu amor e seus grandes ensinamentos, vejo essa tese como uma homenagem ao nosso sonho quando trabalhávamos na nossa farmácia.

A minha amada mãe Maria Perpetua Teles Monteiro, tanto tenho para agradecer. Uma mulher guerreira que sempre com muito amor lutou, ensinou, cuidou e investiu tudo no meu sucesso e dos meus irmãos. Muito obrigado mamãe!

Ao meu amado filho, amigo e companheiro Pedro Rubens Tenório Teles Monteiro por todo amor e carinho. Que orgulho tenho em ser teu pai, que dádiva é poder vê-lo crescer e estar ao seu lado, acompanhando e ajudando no seu desenvolvimento.

Aos meus amados irmãos Ruan Teles Monteiro, Reinaldo Teles Monteiro e Antônio Fernando Monteiro da Silva por toda a confiança que depositam em mim, em que mesmo na distância, estão sempre próximos sofrendo com minhas tristezas e vibrando com minhas conquistas.

À minha linda e amada esposa Natália Suiã dos Santos Cavacante por, com muito amor, estar ao meu lado. Dividindo comigo tantas lutas e alegrias. Agradeço a Deus por ter me dado uma esposa tão maravilhosa. Juntos temos construído uma linda história.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira por ter me acolhido com tanta dedicação nesse projeto, pela excelente orientação e por ter contribuído com tanto empenho na minha formação. Muito obrigado professor pela confiança depositada!

À minha coorientadora Profa. Dra. Fábila Karine Andrade por toda ajuda no decorrer do trabalho, sempre com entusiasmo e dedicação. Muito obrigado professora!

Aos professores participantes da banca examinadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa, Dr. André Luis Coelho da Silva, Dra. Niédja Fittipaldi Vasconcelos e Dra. Raquel Petrilli Eloy pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus preciosos amigos do Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes (NPL), do Laboratório de pesquisa em biomateriais e bioprodutos (LPB), do Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA), do Centro de Desenvolvimento e Ensaios Farmacêuticos (CEDEFAR) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Peterson Y. G. de Medeiros, Hugo Anderson D. Medeiros, Niédja F. Vasconcelos, Erika Patricia C. G. Luz, Ana Lorena B. Soares, Raimundo Nonato F. Moreira Filho, Rosi Arcanjo, Thamyres F. Da Silva, Carla L. B. Reis, Lana C. S. Garcia, Karina A B Nogueira, Silvia S.

Otaviano, Jhon Alef C. Da Silva, Regiane Pinheiro, Aline Bessa, Isabela A. Dos Santos, Francisco Fabio P. de Souza, Wallady Barroso, Sandy D. L. Gomes, Rodolpho R. C. Monteiro, Jamilly Salustiano e tantos outros por todo carinho, parceria, incentivo, reflexões, críticas e ajuda nos momentos difíceis.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará pela oportunidade, aos professores de Engenharia Química por todos os ensinamentos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa durante o decorrer do curso.

*“A persistência é o caminho do êxito”*

Charles Chaplin

## RESUMO

Recentemente, muitos estudos têm sido desenvolvidos na busca de curativos que possuam capacidade de modular a liberação de fármacos, pois os curativos tradicionais (gazes, algodão, bandagens, entre outros) não são eficientes na cicatrização de feridas complexas. O presente trabalho produziu cinco membranas distintas para administração sustentada da sinvastatina, diferenciando-as pela quantidade de camadas (mono ou bicamada), pelo polímero utilizado (alginato ou quitosana) e pela porosidade (denso ou poroso). As diferentes porosidades foram preparadas por dois processos de secagem, evaporação do solvente por convecção e por liofilização. As membranas foram caracterizadas por meio de análises físico-químicas, térmicas, morfológicas e mecânicas. A sinvastatina foi utilizada por possuir efeito anti-inflamatório, sua liberação foi estudada utilizando células de difusão de Franz e também foi avaliada a estabilidade do fármaco na membrana em relação ao tempo. A citotoxicidade das membranas foi avaliada utilizando células de fibroblastos e queratinócitos. Os resultados mostraram que os diferentes processos de secagem, a quantidade de camadas e o uso de diferentes polímeros interferiram diretamente nas características morfológicas e propriedades físico-químicas, proporcionando a cada uma das cinco membranas características distintas. As membranas porosas se mostraram mais apropriadas para feridas com maior produção de exsudato, já as densas para feridas em partes do corpo com maior movimento. O estudo de liberação *in vitro* mostrou que as membranas em bicamada podem sustentar uma liberação mais prolongada do fármaco do que a membrana em monocamada, o que pode beneficiar na redução de trocas de curativo. Os resultados do estudo de estocagem evidenciaram que após 6 meses todas as membranas mantiveram cerca de 98% do conteúdo inicial do fármaco, e também sem alterar sua aparência visual. O ensaio de atividade antimicrobiana mostrou que a membrana de quitosana, apesar da menor absorção de umidade do que as de alginato, possui atividade bacteriostática, sendo assim adequada para feridas infeccionadas e o ensaio de viabilidade celular constatou que as membranas produzidas não são citotóxicas. Portanto, todas as membranas estudadas apresentaram características promissoras para utilização no tratamento de diferentes tipos de lesões na pele, como superficiais ou profundas, agudas ou crônicas, infeccionadas e em diferentes locais da pele.

**Palavras-chave:** Curativos; Alginato; Quitosana; Sinvastatina; Liberação controlada de fármacos.

## ABSTRACT

Recently, many studies have been developed in the search for dressings that have the capacity to modulate the release of drugs, as traditional dressings (gauze, cotton, bandages, among others) are not efficient in healing complex wounds. The present work produced five different membranes for the sustained administration of simvastatin, differentiating them by the number of layers (mono or bilayer), the polymer used (alginate or chitosan) and the porosity (dense or porous). The different porosities were prepared by two drying processes, evaporation of the solvent by convection and freeze-drying. The membranes were characterized through physicochemical, thermal, morphological and mechanical analyses. Simvastatin was used because it has an anti-inflammatory effect, its release was studied using Franz diffusion cells and the stability of the drug in the membrane in relation to time was also evaluated. The cytotoxicity of the membranes was evaluated using fibroblast and keratinocyte cells. The results showed that the different drying processes, the number of layers and the use of different polymers directly interfered in the morphological characteristics and physical-chemical properties, providing each of the five membranes with distinct characteristics. Porous membranes proved to be more appropriate for wounds with greater exudate production, while dense membranes for wounds in parts of the body with greater movement. The in vitro release study showed that bilayer membranes can sustain a longer release of the drug than the monolayer membrane, which can benefit from reducing dressing changes. The results of the storage study showed that after 6 months, all membranes maintained around 98 % of the initial drug content, and also without changing their visual appearance. The antimicrobial activity test showed that the chitosan membrane, despite lower moisture absorption than alginate membranes, has bacteriostatic activity, thus being suitable for infected wounds and the cell viability test found that the membranes produced are not cytotoxic. Therefore, all membranes studied showed promising characteristics for use in the treatment of different types of skin lesions, such as superficial or deep, acute or chronic, infected and in different locations on the skin.

**Keywords:** Dressings; Alginate; Chitosan; Simvastatin; Controlled release of drugs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Formula estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de $\alpha$ -L-guluronato e M, os copolímeros de $\alpha$ -D-manuronato.....	24
Figura 2	- Formula estrutural da quitina e da quitosana.....	26
Figura 3	- Representação esquemática da formação dos complexos polieletrólitos (PEC), entre as cadeias de alginato e quitosana.....	27
Figura 4	- Forma ativa da atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina, destacando a similaridade com o mevalonato.....	30
Figura 5	- Formula estrutural da sinvastatina.....	31
Figura 6	- Representação da concentração plasmática em função do tempo de administração de um sistema de liberação convencional e controlada de fármaco.....	33
Figura 7	- Sistemas de liberação do princípio ativo em uma matriz polimérica.....	34
Figura 8	- Disposição das camadas nas membranas.....	39
Figura 9	- Esquema de interação entre alginato, íons cálcio e sinvastatina.....	40
Figura 10	- Fluxograma de produção das membranas.....	41
Figura 11	- Imagens da membrana em monocamada e das membranas em bicamada (vistas pela parte inferior) .....	50
Figura 12	- Imagens laterais da membrana em monocamada e das membranas em bicamada (2 cm <sup>2</sup> ) .....	50
Figura 13	- Grau de intumescimento em função do tempo (a) para as membranas e camadas apenas de alginato e (b) para as membranas e camadas que possuem quitosana.....	55
Figura 14	- Estabilidade em solução em função do tempo para as membranas e camadas apenas de alginato e para as membranas e camadas que possuem quitosana por um período de 96 h (tempo recomendado para troca do curativo) .....	56
Figura 15	- Micrografias eletrônicas de varredura superficiais (esquerda) e transversais	

(direita) das membranas em bicamada.....	58
Figura 16 - Espectros de FTIR para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina.....	65
Figura 17 - Curvas TGA (preto) e DTG (vermelho) para as membranas e para as membranas carregadas com sinvastatina .....	67
Figura 18 - As curvas DSC de membranas de alginato com e sem incorporação da sinvastatina.....	69
Figura 19 Liberação in vitro da sinvastatina, apresentada como uma porcentagem da quantidade inicial de fármaco nas membranas versus tempo (h) para membranas. Os resultados são apresentados como porcentagem média e DP (n=3) .....	73
Figura 20 - Placa de poços usada no teste antibacteriano.....	76
Figura 21 - Citotoxicidade indireta das membranas antes e após a incorporação de sinvastatina para cultura de 24 horas com queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos (L929) .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características que devem ser consideradas para promover as condições ideais em um curativo.....	22
Tabela 2	- Curativos de alginato disponíveis comercialmente.....	25
Tabela 3	- Trabalhos que utilizaram matrizes poliméricas para liberação transdérmica de princípio ativo.....	28
Tabela 4	- Interpretação dos mecanismos de liberação por difusão.....	35
Tabela 5	- Valores médios de peso, espessura, teor de umidade e grau de intumescimento dos cinco tipos de membranas e de cada tipo de camada inferior .....	51
Tabela 6	- Valores médios de TPVA para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina.....	61
Tabela 7	- Valores médios de tensão e deformação para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina.....	63
Tabela 8	- Quantidade de sinvastatina presente nas membranas após 15, 45, 90 e 180 dias.....	71
Tabela 9	- Parâmetros cinéticos de modelos matemáticos de liberação de sinvastatina.	74
Tabela 10	- Principais características e tratamento adequado para cada tipo de membrana.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca	Cálcio
CAD	Camada Inferior de Alginato Densa
CAP	Camada Inferior de Alginato Porosa
CQD	Camada Inferior de Quitosana Densa
CQP	Camada Inferior de Quitosana Porosa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EUA	Estados Unidos da América
TNF	Fator de Necrose Tumoral
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
IL-6	Interleucina-6
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
MBAD	Membrana em Bicamada de Alginato Densa
MBAD+S	Membrana em Bicamada de Alginato Densa Incorporada com Sinvastatina
MBAP	Membrana em Bicamada de Alginato Porosa
MBAP+S	Membrana em Bicamada de Alginato Porosa Incorporada com Sinvastatina
MBQD	Membrana em Bicamada de Quitosana Densa
MBQD+S	Membrana em Bicamada de Quitosana Densa Incorporada com Sinvastatina
MBQP	Membrana em Bicamada de Quitosana Porosa
MBQP+S	Membrana em Bicamada de Quitosana Porosa Incorporada com Sinvastatina
MMAD	Membrana em Monocamada de Alginato em Densa
MMAD+S	Membrana em Monocamada de Alginato em Densa Incorporada com Sinvastatina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C-Reativa

PEC	<i>Polyelectrolyte Complex</i>
PET	<i>Polyethylene Terephthalate</i>
PVA	Poli Álcool Vinílico
HaCat	Queratinócitos humanos
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
TPVA	Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UK	<i>United Kingdom</i>
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
$K_P$	Constante cinética (Korsmeyer-Peppas)
$K_H$	Constante cinética (Higuchi)
$\varepsilon$	Deformação máxima
$M_t/M_\infty$	Fração de liberação do fármaco
F	Força
g	Gramas(s)
°C	Graus Celsius
h	Hora
L	Litro
$L_0$	Comprimento inicial
$\Delta L$	Variação de comprimento
m	Massa
$\mu\text{L}$	Microlitro
mg	Miligrama (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
MPa	Mega pascal
n	Parâmetro que caracteriza o mecanismo de difusão
N	Newton
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
Q	Quantidade final de fármaco liberada
s	Segundo (s)
t	Tempo
$\sigma$	Tensão
v	Volume
W	Peso

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	20
2.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	20
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
3.1	<b>Curativos e feridas na pele</b> .....	21
3.2	<b>Alginato</b> .....	23
3.3	<b>Quitosana</b> .....	25
3.4	<b>Estatinas e sinvastatina</b> .....	28
3.5	<b>Liberação controlada de fármacos</b> .....	32
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	<b>Materiais</b> .....	36
4.2	<b>Preparação da membrana em monocamada de alginato densa (MMAD)</b> ..	36
4.3	<b>Preparação da camada inferior de alginato densa (CAD) e da membrana em bicamada de alginato densa (MBAD)</b> .....	36
4.4	<b>Preparação da camada inferior de alginato porosa (CAP) e da membrana em bicamada de alginato porosa (MBAP)</b> .....	37
4.5	<b>Preparação da camada inferior de quitosana densa (CQD) e da membrana em bicamada de quitosana densa (MBQD)</b> .....	38
4.6	<b>Preparação da camada inferior de quitosana porosa (CQP) e da membrana em bicamada de quitosana porosa (MBQP)</b> .....	39
4.7	<b>Incorporação de sinvastatina em membranas de alginato de camada única (MMAD+S) e bicamadas (MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S)</b> .....	40
4.8	<b>Caracterização das membranas</b> .....	41
4.8.1	<i>Peso e espessura</i> .....	41
4.8.2	<i>Teor de umidade</i> .....	42
4.8.3	<i>Grau de intumescimento</i> .....	42
4.8.4	<i>Estabilidade em solução</i> .....	42

4.8.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	43
4.8.6	<i>Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)</i> .....	43
4.8.7	<i>Análises mecânicas</i> .....	44
4.8.8	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR)</i> .....	44
4.8.9	<i>Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i> .....	44
4.8.10	<i>Uniformidade na Incorporação e Perda do fármaco pós lavagem</i> .....	45
4.8.11	<i>Teste de prateleira</i> .....	45
4.8.12	<i>Liberção in vitro</i> .....	46
4.8.13	<i>Ensaio de atividade antimicrobiana</i> .....	46
4.8.14	<i>Ensaio de citotoxicidade indireta</i> .....	47
4.8.15	<i>Análise estatística</i> .....	48
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1	<b>Caracterização das membranas</b> .....	49
5.1.1	<i>Aspectos visuais e morfológicos das membranas</i> .....	49
5.1.2	<i>Peso e espessura</i> .....	51
5.1.3	<i>Teor de umidade</i> .....	52
5.1.4	<i>Grau de intumescimento</i> .....	53
5.1.5	<i>Estabilidade em solução</i> .....	55
5.1.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	56
5.1.7	<i>Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)</i> .....	59
5.1.8	<i>Análise mecânica</i> .....	62
5.1.9	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR)</i> .....	64
5.1.10	<i>Propriedades térmicas</i> .....	65
5.1.11	<i>Uniformidade na Incorporação e Perda do fármaco pós lavagem</i> .....	70
5.1.12	<i>Teste de prateleira</i> .....	70
5.1.13	<i>Liberção in vitro</i> .....	71
5.1.14	<i>Ensaio de atividade antimicrobiana</i> .....	75
5.1.15	<i>Ensaio de citotoxicidade indireta</i> .....	77
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	80
7	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	81

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
--------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico complexo, que envolve etapas progressivas: hemostasia (fase inicial que objetiva deter a hemorragia), inflamação (fase caracterizada pela presença de exsudato), proliferação celular (fase caracterizada pela formação do tecido de granulação) e remodelação tecidual (fase caracterizada pela deposição organizada de colágeno). Além disso, dependem do tipo de tecido lesado, incisão e evolução da lesão. Portanto, o tratamento local e adequado é fundamental para se criar um ambiente favorável para a cicatrização (ELDEEB *et al.*, 2022).

Por isso, nos últimos anos tem se buscado terapias que auxiliem no processo de cicatrização, destacando-se para esse fim o uso de curativos à base de polímeros naturais. Dentre eles, o alginato é um polissacarídeo obtido, principalmente, por dois métodos: síntese bacteriana ou extração a partir de algas marrons, como: *Laminaria Hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyriferas*. Extratos dessas diferentes fontes influenciam as proporções de monômeros de ácido manurônico (M) e gulurônico (G) presentes na cadeia de alginato. A variação na proporção desses monômeros (razão M/G) induz diretamente a gelificação, propriedades anti-inflamatórias e a liberação e encapsulação de moléculas alvo (RAUS; WAN NAWAWI, NASARUDDIN, 2021). O alginato é biocompatível, de baixo custo e possui propriedades cicatrizantes, por esse motivo é utilizado comercialmente como matéria-prima para curativos (*Algikura-Cremer*, Brasil; *Kaltostat-Convatec*, EUA; *BiatainColoplast*, Dinamarca; *Suprasorb-Lohmann e Rauscher*, Alemanha e Áustria; entre outros).

Outro polímero natural amplamente utilizado como matéria-prima de curativos é a quitosana, pois possui características biológicas únicas em comparação com outros polímeros naturais, incluindo propriedades antimicrobianas e antioxidantes (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2010). A quitosana consiste em uma cadeia polimérica obtida pela desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, encontrado principalmente no exoesqueleto de crustáceos.

A preparação de curativos a base de alginato e quitosana se enquadra nos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) 3, referente à "Saúde e Bem-estar", pois contribui na aprimoração de técnicas mais eficientes de reduzir os impactos negativos na vida do

enfermo e no sistema de saúde. Nos ODS 9, referente à "indústria, inovação e infraestrutura", pois proporciona o desenvolvimento de curativos inovadores e sustentáveis, que ajudam na resolução de um problema social. E nos ODS 12, referente à "produção e consumo responsáveis", pois reduz a geração de resíduos, por utilizar polímeros biodegradáveis de forma eficiente e sustentável.

A incorporação de algumas moléculas farmacêuticas em curativos produzidos a partir de polímeros naturais tem sido avaliada com o intuito de reunir a estes curativos novas propriedades, como: analgésica, anti-inflamatória, antibiótica (MAVER *et al.*, 2017; OKUR *et al.*, 2017). A sinvastatina, uma estatina que atua inibindo a hidroximetilglutaril-coenzima A, é um fármaco comumente usado como agente hipocolesterolêmico em doenças cardiovasculares. Recentemente, tem sido investigado seu efeito anti-inflamatório, demonstrando-se promissora para o tratamento de feridas, pois minimiza os sintomas comuns da inflamação, como calor, rubor e dor (AL-GHOUL *et al.*, 2014; YASASVINI *et al.*, 2017).

Importante destacar que a maioria dos curativos disponíveis no mercado atual são produzidos com uma camada única (WANG *et al.*, 2017), porém um curativo em multicamadas pode oferecer uma importante alternativa, pois possibilita modular a liberação do fármaco, controlando sua taxa de difusão através do curativo (THU; ZULFAKAR; NG, 2012; MAVER *et al.*, 2017). Também importante produzir, além de curativos densos (utilizando secagem por convecção), curativos com estrutura porosa, pois essas características morfológicas podem resultar em modificação favorável das características dos curativos, como permeação de vapor, troca de gases e liberação do composto ativo (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Para isso a liofilização é um método eficiente de secagem capaz de produzir membranas interligadas altamente porosas (RAHMANI DEL BAKHSHAYESH *et al.*, 2018). Dessa forma, é possível produzir curativos bioativos multicamadas, por meio de múltiplas e diferentes barreiras poliméricas, criadas variando-se parâmetros químicos e físicos.

Portanto, propõe-se produzir membranas em mono e bicamadas sobrepostas, densas e porosas, utilizando alginato e quitosana incorporadas com sinvastatina, para estudar suas propriedades físico-químicas e taxa de liberação do fármaco, a fim de serem usadas como potencial curativo para o tratamento de feridas da pele.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo principal desenvolver membranas em mono e bicamada de alginato/quitosana para liberação controlada de sinvastatina, visando sua aplicação como curativos bioativos para uma variedade de feridas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver cinco tipos de membrana: uma em monocamada e quatro em bicamada, variando o polímero (alginato ou quitosana) e o processo de secagem (liofilização ou convecção).
- Determinar as propriedades físico-químicas, térmicas, morfológicas e mecânicas.
- Determinar o perfil de liberação da sinvastatina nas membranas, utilizando células de difusão de Franz e a incorporação por meio do estudo do teste de prateleira, uniformidade na incorporação e perda do fármaco pós lavagem.
- Determinar a uniformidade da sinvastatina incorporada nas membranas bem como o perfil de liberação do fármaco e de estocagem.
- Estabelecer as propriedades bacterianas da camada de quitosana em bactérias gram-positivas e gram-negativas.
- Definir o perfil de toxicidade *in vitro* das membranas, utilizando linhagem de células estratégicas para aplicação como curativo de pele.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Curativos e feridas na pele

Ferida é qualquer ruptura superficial ou profunda na integridade da pele. Dessa forma pode ser causada por diversos fatores externos (relacionados a traumas ou cirurgias) ou internos (relacionadas a doenças facilitadoras ou causadoras do ferimento), por isso na prática clínica são encontradas variadas etiologias, como: queimaduras, traumatismos, ulcera vascular (venosa, arterial ou mista), úlceras por pressão, feridas exsudativas, feridas infeccionadas e feridas infectocontagiosas (erisipela, leishmaniose, tuberculose). Elas podem ser classificadas tanto quanto a complexidade (simples ou complexas), quanto ao tempo de cicatrização (agudas ou crônicas) (OLIVEIRA, 2019).

As simples são aquelas que cicatrizam espontaneamente de acordo com o tempo previsto para o tipo e extensão da lesão, seguindo os principais estágios da cicatrização fisiológica de maneira ordenada. Já as complexas são lesões que necessitam de orientação especializada para um tratamento efetivo, pois têm seu processo de evolução natural alterado, representando assim uma ameaça à viabilidade de um membro. São feridas extensas, profundas e/ou que reabrem recorrentemente (FERREIRA *et al.*, 2006).

As feridas agudas são lesões que possuem uma reparação no tempo adequado, sem complicações, diferente das crônicas que apresentam um tempo de cicatrização maior que o esperado e podem, inclusive, não cicatrizar, caso a causa da ferida não seja tratada e/ou não seja utilizado um curativo adequado (OLIVEIRA, 2019).

Os curativos podem ser definidos como uma ferramenta terapêutica que favorece o processo de cicatrização de uma ferida, a partir de uma atuação local sobre o tecido lesionado, correspondendo assim a um conjunto de procedimentos, como: limpeza, cobertura da ferida, absorção/drenagem de exsudatos (SMANIOTTO *et al.*, 2012).

Os mais aplicados por profissionais de saúde são os curativos tradicionais (algodão, gazes, bandagens naturais ou sintéticas). Amplamente disponíveis, sua função é efetuar a absorção de exsudatos e impedir o contato com agentes externos. Entretanto, os curativos tradicionais precisam ser removidos com frequência, causando dores e desconforto. Estes curativos também não são capazes de manter as condições necessárias para cicatrização,

como: alta umidade e ventilação. Dessa forma para o tratamento de feridas crônicas, estes curativos apresentam desempenho pouco satisfatório (REZVANIAN; MOHD AMIN; NG, 2016).

Frente a tal insuficiência de desempenho, há um crescente nível de interesse no desenvolvimento e sofisticação de curativos. Numerosas publicações nesta área revelam uma variedade de novas pesquisas que buscam um curativo que protejam a região lesionada, mas com um micro-ambiente úmido e que possua transporte adequado de gases e fluidos, controlando as condições fisiológicas, proporcionando uma menor possibilidade de infecção e provendo o isolamento térmico, para assim promover a restauração tecidual (BOATENG *et al.*, 2008). Na Tabela 1 tem-se um resumo das características que devem ser consideradas para promover as condições ideais em um curativo.

Tabela 1 - Características que devem ser consideradas para promover as condições ideais em um curativo

Não necessitar de trocas frequentes
Promover um ambiente úmido para auxiliar na cicatrização
Promover a angiogênese (síntese de vasos sanguíneos)
Ser livre de substâncias tóxicas e irritantes
Oferecer proteção mecânica e contra a entrada de microrganismos
Absorver o excesso de exsudato e proteger do excesso de umidade
Ser de baixo custo
Ter aderência não excessiva a fim de facilitar sua remoção
Não incomodar o paciente
Não provocar dor quando aplicado ou removido
Moldar-se à região da ferida
Ser resistente à água e facilmente removível
Permitir trocas gasosas
Não liberar partículas ou fibras não biodegradáveis na ferida
Manter na ferida a temperatura adequada
Aumentar a migração epitelial
Possibilitar a liberação de compostos bioativos
Auxiliar na síntese de tecidos conectivos

Fonte: adaptado de Boateng *et al.* (2008).

Duas alternativas para o desenvolvimento de curativos com estas características é a utilização de membranas porosas e/ou produzidas a base de polímeros naturais. Membranas porosas são aquelas que possuem uma alta porosidade em sua configuração,

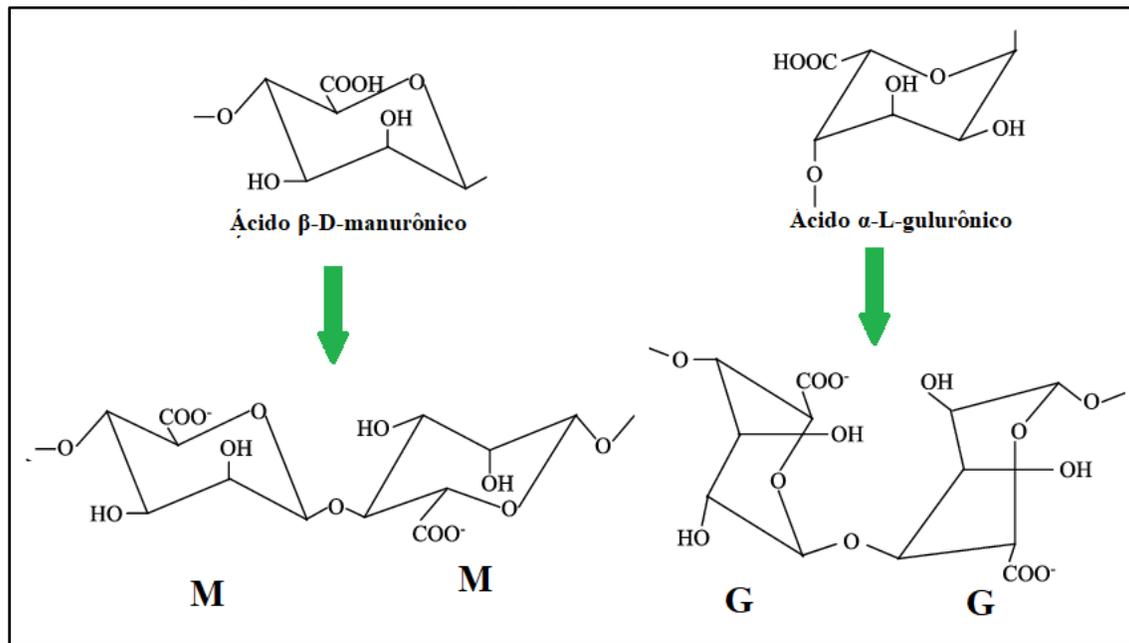
facilitando assim o transporte de nutrientes entre os poros e auxiliando na migração e crescimento celular. Esta configuração apresenta uma estrutura tridimensional com grande área superficial (em relação a uma membrana densa) que é vantajosa, pois resulta em uma maior adesão na pele (ARMENTADO *et al.*, 2011). Em relação a utilização de polímeros naturais se destacam o alginato e a quitosana, pois são atóxicos e biocompatíveis, apresentando propriedades cicatrizantes ideais para o preparo de membranas curativas. Sendo indicados como materiais adequados para utilização como curativo pela ANVISA (ANVISA, 2017; CRUZ, 2011).

### 3.2 Alginato

O alginato um é polissacarídeo natural linear composto por duas diferentes unidades de repetição, (1,4)- $\alpha$ -L-guluronato (unidade G) e (1,4)- $\beta$ -D-manuronato (unidade M), em variadas proporções e arranjos sequenciais (PAWAR; EDGAR, 2012). Os alginatos comerciais podem ser extraídos principalmente de três espécies de algas marrons: *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, nas quais o alginato compreende até 40% do seu peso seco (GEORGE; ABRAHAM, 2006; SANKALIA *et al.*, 2007).

Uma forma de melhorar as propriedades gelificantes do alginato é pelo processo de reticulação pela ligação cooperativa de cátions divalentes com os blocos homopoliméricos dos resíduos do guluronato, os blocos G (DONG *et al.*, 2006). Dentre os cátions bivalentes os mais utilizados são: cálcio, magnésio, estrôncio e bário, sendo mais comumente empregado o cálcio. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  localizam-se nas cavidades eletronegativas e as interações iônicas entre os blocos de guluronato e os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , formando assim um gel termoestável resistente (RODRIGUES, 2004). A Figura 1 mostra a formula molecular do alginato.

Figura 1 - Formula estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de  $\alpha$ -L-guluronato e M, os copolímeros de  $\alpha$ -D-manuronato.



Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre as principais propriedades do alginato, destacam-se sua biocompatibilidade, não toxicidade e baixo custo (LEE; MOONEY, 2012), podendo ser utilizado em várias aplicações médicas, como: prevenção de refluxo gástrico, impressão dentária, biocurativos e sistemas de liberação controlada (VARAPRASAD *et al.*, 2020).

No que diz respeito a sua utilização como biocurativo, por volta da década de 80, as fibras de alginato começaram a ser utilizadas para esse fim. Quando o alginato de cálcio, insolúvel em água, é colocado em contato com feridas com exsudato, parte dos íons cálcio são trocados pelos íons sódio dos fluidos corpóreos (FAN *et al.*, 2016). A lenta conversão do alginato de cálcio em alginato de sódio promove intensa absorção do exsudato da lesão, auxiliando na manutenção da umidade no leito da ferida.

Os curativos contendo alginato possuem capacidade de ativação de macrófagos e geram sinais pro-inflamatórios, indicativos do processo de cicatrização, conduzindo a rápida granulação e reepitelização do tecido. A Tabela 2 lista alguns dos curativos de alginato disponíveis comercialmente.

Tabela 2 – Curativos de alginato disponíveis comercialmente.

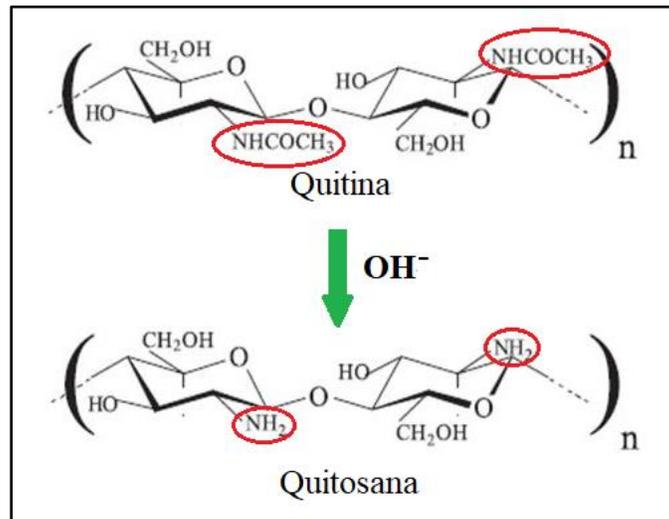
<b>Nome</b>	<b>Fabricante</b>
Algiderm®	Bard
Algikura	Cremer
AlgiSite®	Smith & Nephew
Algosteril®	Systagenix
Aquacel	ConvaTec
Biatain	Coloplast
Kalginat®	DeRoyal Industries
Kaltostat®	ConvaTec
Kendall	Covidien
Maxorb® Extra	Medline Industries
Nu-Derm®	Johnson & Johnson
PhytaCare®	Curafarm
Restore®	Hollister
SeaSorb®	Coloplast Sween
Silvercare	Vita Medical
Sorbsan®	UDL
Tegagen HG®	3M Health Care

Fonte: elaborado pelo autor

### 3.3 Quitosana

A quitosana é um polímero natural derivado da quitina (o segundo mais abundante encontrado na natureza, ficando atrás apenas da celulose), constituída de uma sequência linear de açúcares monoméricos  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) (CHOI *et al.*, 2016). A quitina é o principal constituinte de carapaças de crustáceos, para sua obtenção é necessário, primeiramente, a separação dos outros componentes dessa carapaça por processos químicos que envolve as seguintes etapas: desmineralização, desproteinização e descoloração. Após esses processos, a quitina obtida contém grupos acetil, os quais são removidos por desacetilação, utilizando solução concentrada de NaOH para obtenção da quitosana (YAMAURA, 2022). A Figura 2 mostra a fórmula molecular da quitina e da quitosana.

Figura 2 - Formula estrutural da quitina e da quitosana



Fonte: elaborado pelo autor.

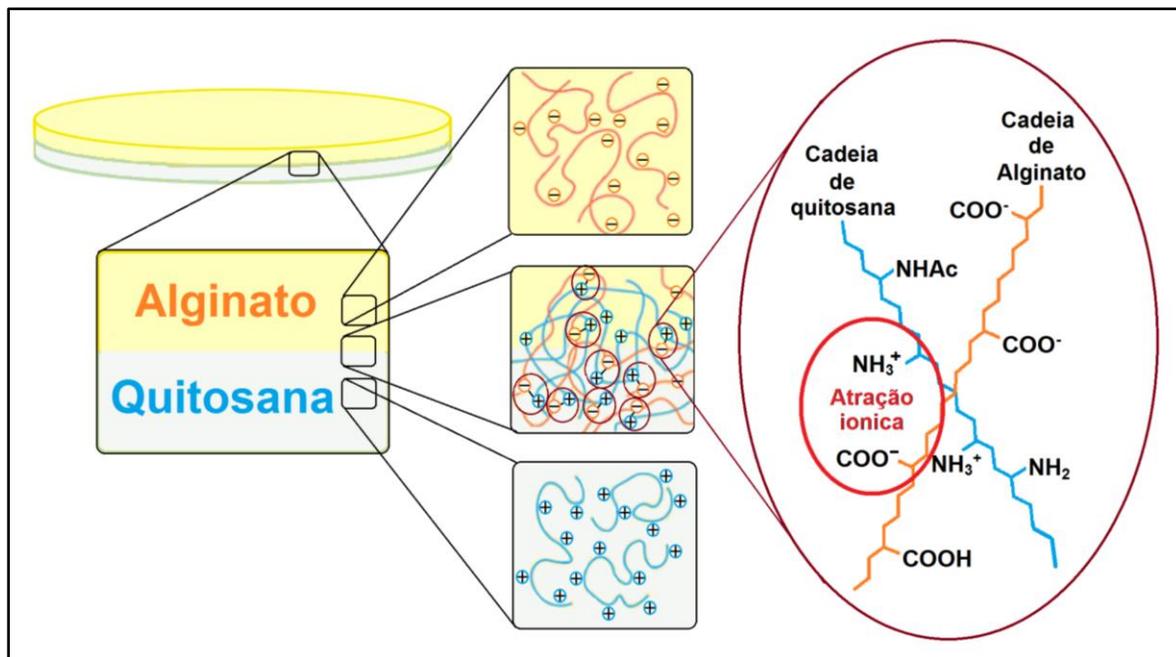
A quitosana possui uma grande importância econômica e ambiental, pois é um produto de origem natural, renovável, biodegradável e sua matéria-prima é proveniente de resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira. A utilização da quitosana em diversos campos de pesquisa tem contribuído de forma considerável para a redução do impacto ambiental causado pelo acúmulo dos resíduos da pesca nos locais onde estes são gerados e/ou estocados (YAMAURA, 2022).

Dentre as principais propriedades da quitosana, destacam-se sua bioadesividade, biocompatibilidade, ação antimicrobiana e proliferação celular (CLASEN *et al.*, 2006; ALEMDAROĞLU *et al.*, 2006). A quitosana pode ser utilizada em várias aplicações médicas, como: medicamentos oculares tópicos, lentes de contato, injeções intra-articulares, sistemas de liberação controlada e curativos (PELLÁ *et al.*, 2018; BUTOLA, 2018). Importante destacar que membranas de quitosana são capazes de apresentar excelente permeabilidade ao oxigênio, controlar a perda de água por evaporação e promover a drenagem de exsudato das lesões, influenciando em todos os estágios de cicatrização do tecido, como: inflamação, coagulação, síntese e deposição de matriz celular, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem (MI *et al.*, 2001).

A quitosana possui o maior caráter catiônico dentre os polímeros naturais, por esse motivo é amplamente utilizada em aplicações que envolvem a formação de complexos polieletrólitos com polímeros aniônicos. Assim quando em contato com o alginato pode

formar nos pontos de interação entre os polímeros forças de atração eletrostática entre os grupos carboxila do alginato (aniônicos) e grupos amina da quitosana (catiônicos) (BAKSHI *et al.*, 2020), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática da formação dos complexos polieletrólitos (PEC), entre as cadeias de alginato e quitosana.



Fonte: elaborado pelo autor.

Quando incorporado algum princípio ativo, como um fármaco, no alginato ou na quitosana, os complexos polieletrólitos formados ajudam a controlar a liberação desse princípio ativo (YAN *et al.*, 2000). A incorporação de fármacos em matrizes poliméricas contribui para uma maior interação com a lesão, pois resulta em uma ou mais funções ativas que melhoram a cicatrização, resultando nos chamados curativos bioativos, capazes de realizar a liberação de fármacos. Numerosos curativos bioativos são descritos na literatura, a Tabela 3 mostra trabalhos que utilizaram matrizes poliméricas para liberação transdérmica de princípios ativos.

Tabela 3 – Trabalhos que utilizaram matrizes poliméricas para liberação transdérmica de princípio ativo.

<b>Autores/Ano</b>	<b>Matriz polimérica/Princípio ativo</b>
Jian <i>et al.</i> , 2012	Galactomanana e goma xantana/Teofilina
Thu, Zulfakar e Ng, 2012	Alginato/Ibuprofeno
Boateng, Pawar e Tetteh, 2013	Óxido de polietileno (Polyox) e carragenina/estreptomicina e diclofenaco
Thu, Zulfakar e Ng, 2013	Alginato/Ibuprofeno
Ng e Tan, 2015	Alginato /Hidroxitirosol
Baptista <i>et al.</i> , 2016	O poli álcool vinílico (PVA)/Sinvastatina
Rezvanian, Amin e Ng, 2016	Alginato/Sinvastatina
Maver <i>et al.</i> , 2017	Tereftalato de polietileno (PET), alginato e viscose/Lidocaína e diclofenaco
Yasasvini <i>et al.</i> , 2017	Quitosana e álcool polivinílico (PVA)/Sinvastatina
Han, Yu e Wang, 2018	Alginato e carboximetilcelulose/Óleo essencial de canela
Ghosal <i>et al.</i> , 2019	Alginato/Diclofenaco
Okur <i>et al.</i> , 2019	Quitosana, alginato e carbopol/Mupirocina
Monteiro <i>et al.</i> , 2020	Alginato/Sinvastatina
Kiti e Suwantong, 2020	Alginato e Quitosana/Complexo de inclusão Curcumina- $\beta$ -Ciclodextrina
Rezvanian, Amin e Ng, 2021	Alginato e pectina/Sinvastatina

Fonte: elaborado pelo autor

### 3.4 Estatinas e sinvastatina

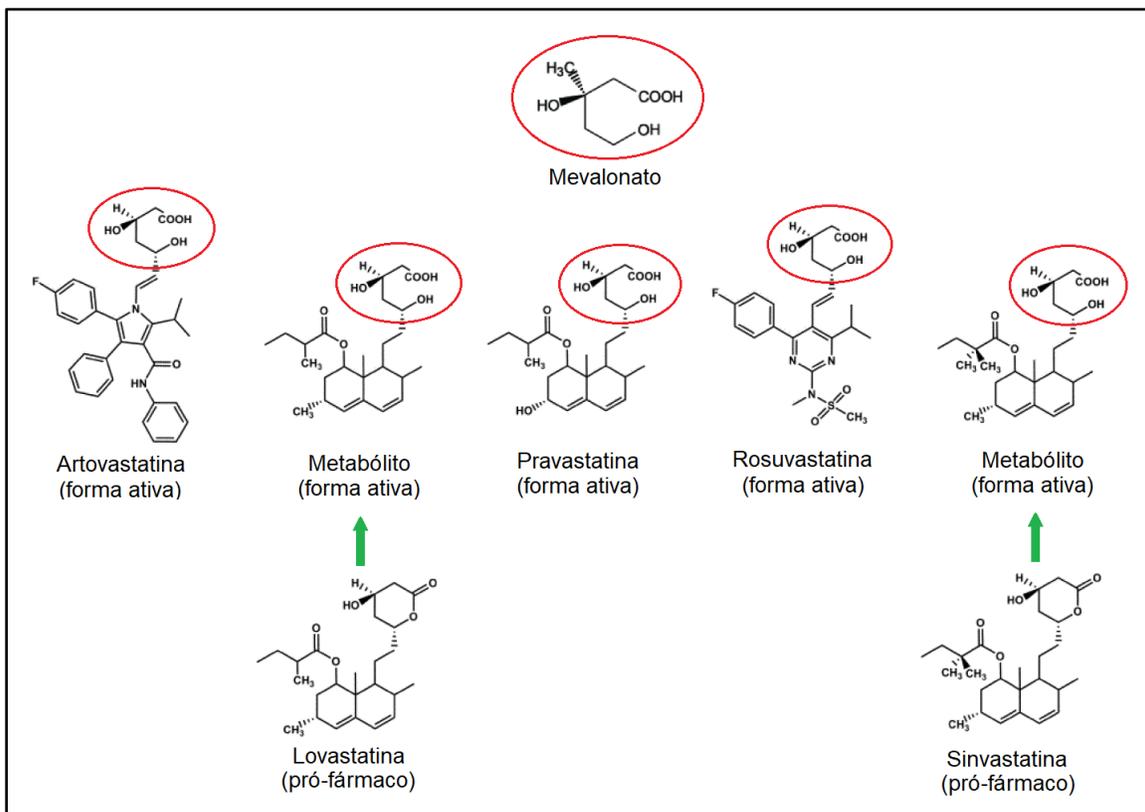
As estatinas são fármacos muito utilizados para a redução de níveis elevados de colesterol plasmático devido a eficiência do seu tratamento na diminuição da taxa de incidência de doenças coronárias, englobando um amplo grupo de risco (ALAM *et al.* 2009; GARIP *et al.*, 2010). Os agentes mais consumidos e estudados dessa família são: atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina (CARVALHO; CAMPO, 2007).

As estatinas possuem em geral um anel hexaidronaftalênico ligado a um éster metilbutirato, um hidróxiácido que forma um anel lactônico e são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, enzima essa que catalisa a conversão do HMG-CoA a mevalonato (ALAM *et al.* 2009; GARIP *et al.*, 2010). As principais estatinas podem ser divididas em sintéticas: atorvastatina e rosuvastatina; estas são hidrossolúveis, a atorvastatina por causa do seu grupo hidróxi polar e a rosuvastatina devido ao grupo metano sulfonamida (BASTARDA *et al.*, 2005). Ou naturais, isolados a partir do metabolismo de fungos: atorvastatina, lovastatina e sinvastatina; estas são lipossolúveis. A hidrofiliabilidade influi no potencial da estatina em passar pelas membranas celulares por difusão passiva (FONSECA, 2005), de modo que as estatinas hidrofílicas necessitam de moléculas ligantes para cruzar as membranas celulares, enquanto as lipofílicas entram facilmente nas células.

Carvalho e Campo (2007) descrevem que as estatinas agem no tratamento das disfunções do colesterol inibindo a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase de catalisar a conversão do HMG-CoA em mevalonato (o precursor do colesterol). Por se assemelharem ao substrato que a enzima HMG-CoA redutase se ligam, as estatinas competem pelas moléculas da enzima, reduzindo assim a quantidade de HMG-CoA redutase que se unirá com seu substrato para a geração do colesterol. Assim impedem a síntese do colesterol endógeno, ampliando nos hepatócitos a expressão dos receptores para LDL e proporcionando uma maior captação das lipoproteínas circulares.

Os mesmos autores destacam que em relação ao modo de administração, a atorvastatina, pravastatina e a rosuvastatina são ministradas em suas formas ativas, os hidróxiácidos, responsáveis por diminuir o colesterol plasmático. Enquanto que a lovastatina e a sinvastatina são pró-fármacos, pois são ministradas na forma inativa, lactona, e se ativarão após a hidrólise no fígado, a um  $\beta$ -hidróxiácido (metabólito ativo). Essa ministração de forma inativa confere a sinvastatina e a lovastatina uma maior seletividade pelo fígado que as estatinas ministradas de forma ativa. A Figura 4 mostra a forma ativa da atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina, destacando a similaridade com o mevalonato.

Figura 4 - Formas ativas da atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina, destacando a similaridade com o mevalonato.



Fonte: elaborado pelo autor.

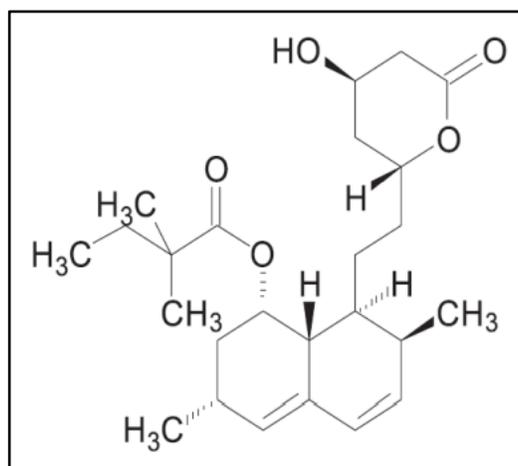
A inibição da HMG-CoA redutase, realizada pelas estatinas, pode levar a uma série de outras ações farmacológicas, os chamados efeitos pleiotrópicos, como: melhoria da disfunção endotelial mediada por óxido nítrico, estímulo de formação óssea, efeitos antioxidantes, proteção contra eventos oxidativos nas lipoproteínas de baixa densidade, propriedades anti-inflamatórias, inibição da proliferação celular com ações anticarcinogênicas, estabilização de placas ateroscleróticas, efeitos anticoagulantes, inibição da rejeição de enxertos após transplante de coração e rim, modificação da resposta imune em diversos níveis e o estímulo da reendotelialização. (FUKUI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2010; SUTHANTHIRAN; PRADEEP *et al.*, 2012; PRADEEP *et al.* 2010; NASSAR *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2008; FOLLI *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm procurado entender melhor como ocorre a ação anti-inflamatória de uma das principais estatinas: a sinvastatina, mesmo não sendo completamente entendida, os estudos demonstram que a sinvastatina (de maneira

independente de sua atividade hipocolesterolêmica) inibe uma variedade de substâncias inflamatórias. Devaraj *et al.* (2006) descreve que o efeito anti-inflamatório está relacionado com a capacidade de diminuição de alguns parâmetros inflamatórios, como: Proteína C-Reativa (PCR) e citocinas inflamatórias, dentre elas a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Adami *et al.* (2012) observaram uma redução na inflamação devido a inibição da migração de células trans-endoteliais de leucócitos, resultado da redução da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1).

A sinvastatina (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-hidroxi-6-oxotetraidro-2H-piran-2-il]etil}-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-hexaidronaftalen-1-il,2,2-dimetilbutanoato) é uma estatina derivada da lovastatina, produto da fermentação do fungo *Aspergillus terreus*, sendo sua fórmula estrutural apresentada na Figura 5. Esse fármaco se trata de um pó branco, cristalino, não higroscópico. Além disso, contém uma massa molar de 418,56 g/mol, ponto de fusão na faixa de 135 a 138°C, temperatura de transição de vidro de 25°C e pka = 4,18, insolúvel em água (30  $\mu\text{g/mL}$ ) (MURTAZA, 2012). Solúvel em clorofórmio, metanol, etanol, polietilenoglicol e hidróxido de sódio.

Figura 5 – Fórmula estrutural da sinvastatina



Fonte: Murtaza (2012).

É a estatina mais prescrita no Brasil, possui meia-vida biológica de 3 horas e biodisponibilidade de 5%, indicando metabolismo extenso de primeira passagem no fígado, sendo bem absorvida a partir do trato gastrointestinal. Oferece boa segurança, apesar dos poucos casos relatados sobre sua superdosagem, a dose máxima ingerida foi de 3,6 g.

Mesmo com essa dosagem, todos os pacientes se recuperaram sem maiores complicações (INFOMED, 2020).

Porém seu uso local para efeito anti-inflamatório é dificultado pelo fato da sinvastatina ser disponibilizada no mercado apenas em cápsulas e comprimidos (ainda não se produz comercialmente a sinvastatina para uso dermatológico local). Diversos estudos descrevem ação anti-inflamatória da sinvastatina. Musial *et al.* (2001) estudaram os efeitos anti-inflamatórios da sinvastatina em indivíduos com hipercolesterolemia, nele os autores observaram uma redução da PCR e TNF- $\alpha$  em todos os indivíduos estudados e que os níveis de IL-6 foram reduzidos em indivíduos com hipercolesterolemia acentuada.

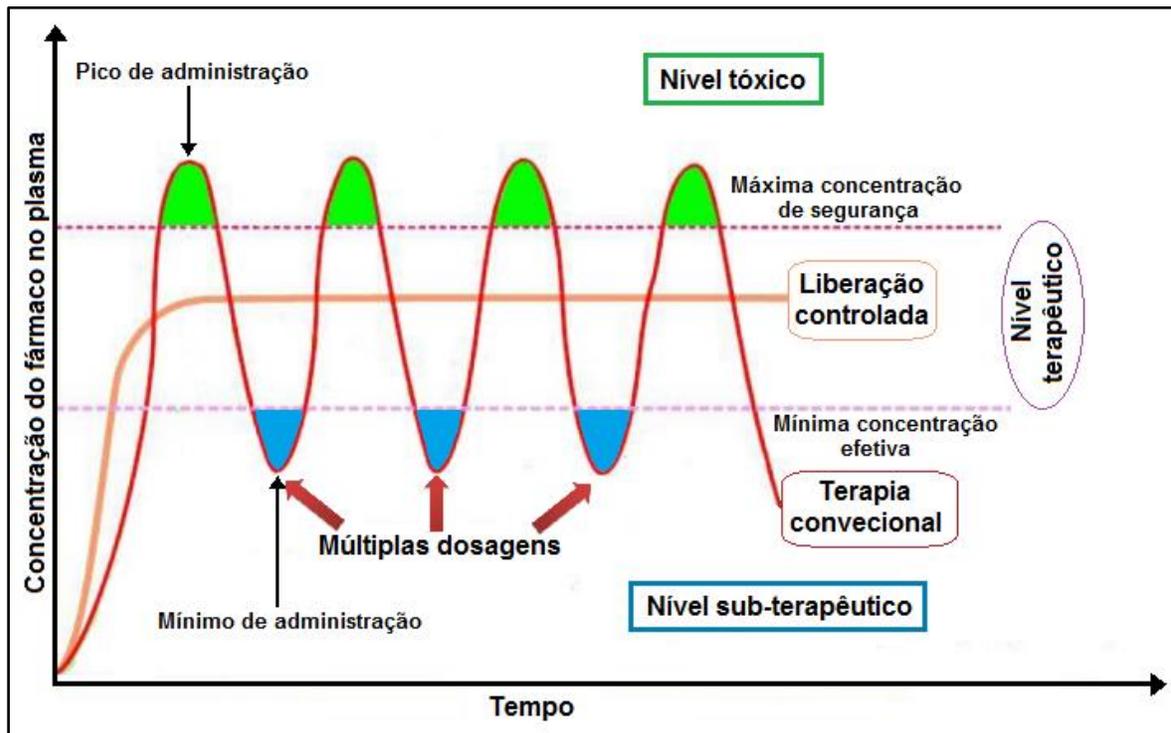
Adami *et al.* (2012) produziram uma pomada de sinvastatina 1%, capaz de reduzir o edema na orelha de ratos Wistar e a análise histológica revelou migração leucocitária, uma redução no inchaço e na espessura epidérmica. Já Al-Ghoul *et al.* (2017) estudaram os efeitos terapêuticos contra inflamação e vazamento precoces da mucosa intestinal pós-queimadura em camundongos. Os resultados revelaram efeitos protetores terapêuticos comparáveis à melatonina, contra o estresse oxidativo da mucosa intestinal e contra o vazamento transepitelial do intestino avaliado no íleo e no cólon.

Rezvaniyan, Amin e Ng (2021) confirmaram as propriedades anti-inflamatória da sinvastatina a partir da incorporação em um filme de hidrogel contendo alginato de sódio e pectina, investigando a eficácia em ferida diabética tipo I em ratos Wistar. A análise histológica revelou uma reepitelização aprimorada e deposição de colágeno. Além disso, os resultados mostraram uma taxa melhorada de síntese de colágeno e angiogênese.

### **3.6 Liberação controlada de fármacos**

Os curativos bioativos são projetados para, além de proteger, interagir com o ferimento, controlando a liberação do ativo. Desse modo é possível manter níveis de concentrações adequados. Isso significa que evita a alta (tóxica) ou a baixa (sub-terapêutica) concentração do fármaco no organismo, mas o mantém no nível terapêutico (BOATENG; CATANZANO, 2015). A Figura 6 representa a concentração plasmática em função do tempo de administração de um sistema de liberação convencional e controlada de fármaco.

Figura 6 - Representação da concentração plasmática em função do tempo de administração de um sistema de liberação convencional e controlada de fármaco.



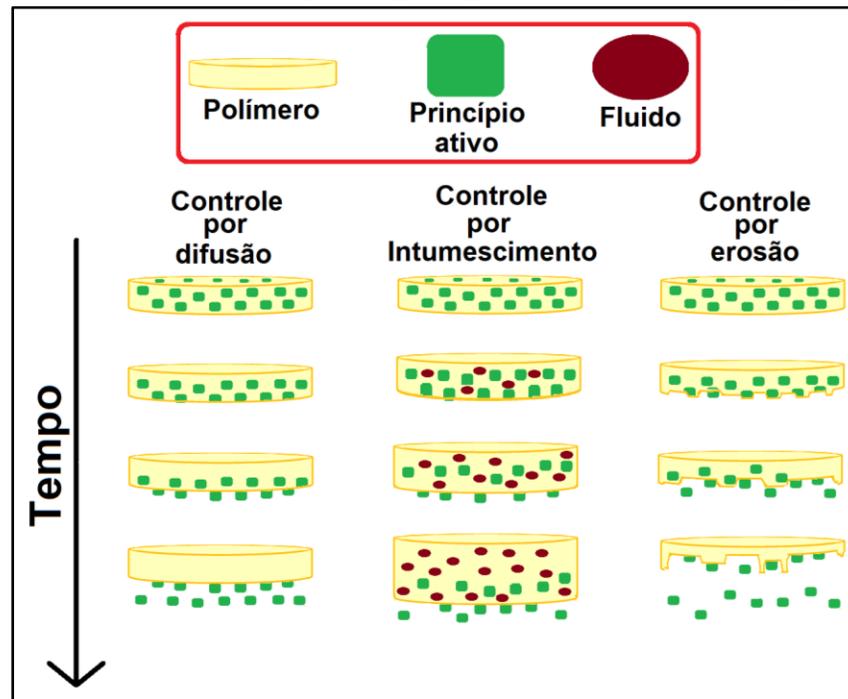
Fonte: Adaptado de Misal, Atish e Aqueel (2013).

O controle do sistema de liberação do princípio ativo em uma matriz polimérica pode ser feito por difusão, intumescimento e/ou erosão. No mecanismo de difusão, a liberação pode acontecer entre as cadeias do polímero ou através dos poros da matriz (MASOOD, 2007).

Nos controlados por intumescimento ocorre a hidratação da matriz polimérica, resultando em um intumescimento/relaxamento das cadeias, formando assim uma camada gelatinosa do polímero (estado maleável) que por sua vez liberam o fármaco. Também pode ocorrer uma erosão física, pois a penetração da água faz com que as cadeias do polímero se afastem (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Já nos sistemas controlados por erosão química, o material em contato com os fluídos aquosos sofre hidrólise da cadeia principal. Assim o perfil de liberação do fármaco depende da natureza desse fármaco (hidrofílico/hidrofóbico), taxa de degradação do polímero, permeabilidade e interação fármaco-matriz polimérica (LAO; VENKATRAMAN; PEPPAS, 2008). A Figura 7 mostra os sistemas de liberação do princípio ativo em uma matriz polimérica.

Figura 7 - Sistemas de liberação do princípio ativo em uma matriz polimérica.



Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar da quantidade e complexidade dos fenômenos envolvidos nos sistemas de liberação do princípio ativo em uma matriz, podem ser utilizados modelos cinéticos teóricos para prever o comportamento mais próximo do que seria observado em estudos de biodisponibilidade *in vivo* (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014). Os modelos mais aplicados em publicações científicas para descrever a cinética e auxiliar no entendimento do mecanismo de liberação são os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

O modelo de Higuchi é aplicado em diversos sistemas de liberação de princípio ativo hidrossolúvel e pouco solúvel. Descreve o perfil de liberação em matrizes sólidas e/ou semi-sólidas, assumindo que elas não sofrem alterações estruturais significativas quando na presença de água. Assim a liberação do fármaco acontece por entre os poros do material com um fluxo de difusão proporcional ao gradiente de concentração presente entre dois lados da superfície (lei de Fick), desse modo este modelo pode ser empregado para descrever sistemas transdérmicos (DASH *et al.*, 2010).

No entanto quando ocorre mais de um mecanismo de liberação, como difusão e intumescimento da matriz, a utilização da equação de Higuchi pode não ser adequada

(CACCAVO, 2019). Uma alternativa é o modelo de Korsmeyer-Peppas, conhecida por lei de potência, é empregado quando prevalece no mecanismo tanto o transporte Fickiano (difusão do fármaco) quanto o não Fickiano (relaxamento das cadeias poliméricas) (SACCHETIN *et al.*, 2016). As funções que descrevem os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas estão representadas nas equações 1 e 2, respectivamente.

$$Q = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_P t^n \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde Q é a quantidade final de fármaco liberada;  $M_t/M_\infty$  é a fração de liberação do fármaco no tempo t (h);  $K_H$  e  $K_P$  são as respectivas constantes cinéticas e n é o parâmetro que caracteriza o mecanismo de difusão, a Tabela 4 mostra as informações para interpretação dos valores de n. Destacando que Korsmeyer-Peppas só deve ser usado quando  $M_t/M_\infty < 0,6$  devido às condições de contorno. (NEMATPOURA *et al.*, 2020; WUA *et al.*, 2020).

Tabela 4 - Interpretação dos mecanismos de liberação por difusão.

Expoente de Liberação (n)			Mecanismos de transporte do fármaco
Estrutura Plana	Estrutura Cilíndrica	Estrutura Esférica	
n < 0,5	n < 0,45	n < 0,43	Difusão quase Fickiana
n = 0,5	n = 0,45	n = 0,43	Mecanismo de Difusão Fickiano
0,5 < n < 1	0,45 < n < 0,89	0,43 < n < 0,85	Difusão anômala (Não Fickiana) – tanto de difusão e relaxamento (erosão)
n = 1	n = 0,89	n = 0,85	Caso 2 – Transporte (liberação de ordem zero)
n > 1	n > 0,89	n > 0,85	Super caso 2 – Transporte (relaxação)

Fonte: Dash *et al.* (2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

As membranas foram produzidas usando alginato de sódio (90874, Dinâmica, Brasil), quitosana de baixo peso molecular (448869, lote STBG5431 V, Sigma-Aldrich, EUA), etanol (03467, lote 53522, Neon, Brasil), glicerol (V000123, Sigma-Aldrich, EUA) como plastificante, cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (C8103, lote DCBC6675 V, Sigma-Aldrich, EUA) como agente de reticulação e sinvastatina (PHR1438, Sigma-Aldrich, EUA) como um bioativo para melhorar as propriedades de cicatrização de feridas das membranas. Todos os reagentes de grau analítico foram utilizados sem purificação adicional, conforme recebido do fornecedor.

### 4.2 Preparação da membrana de alginato em monocamada densa (MMAD)

Para a produção da membrana em monocamada densa (MMAD) foi utilizado uma adaptação do trabalho de Ghosal *et al.* (2019), em que se misturou uma solução 5% (m/v) de alginato e 0,5% (v/v) de glicerol até a completa homogeneização. A baixa concentração de glicerol foi usada para evitar a solubilização do filme em água. Em seguida, realizou-se uma pré-reticulação com adição gradativa de 40 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  por 30 minutos a 900 rpm. 25 g dessa solução foram transferidas para placa de Petri (9 cm de diâmetro) e colocada em uma estufa a 40 °C por 10 horas (primeira secagem), formando uma membrana densa. Depois, a membrana foi reticulada por imersão durante 20 minutos em uma solução aquosa de 4 % (m/v) de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , lavada para retirada dos íons cálcio não reticulado e seca por 10 h a 40 °C (segunda secagem), obtendo por fim a MMAD.

### 4.3 Preparação da camada inferior de alginato densa (CAD) e da membrana em bicamada de alginato densa (MBAD)

Para a produção da membrana em bicamada de alginato densa (MBAD) foi realizado, inicialmente, o mesmo procedimento do filme em monocamada, porém, após a primeira secagem, adicionou-se sobre a membrana seca 25 g de uma solução 5% (m/v) de

alginato e 0,5% (v/v) de glicerol pré-reticulado pela adição gradativa de 20 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Formando sobre a membrana seca uma camada que, posteriormente, se tornará a camada inferior. Após a adição, a membrana com o gel sobreposto foi colocada pra secar na estufa a 40 °C por 10 horas (primeira secagem), formando sobre a membrana a camada inferior de alginato densa (CAD). Essa membrana em bicamada foi então reticulada por imersão durante 20 minutos em uma solução aquosa de 4% (m/v) de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Em seguida, foi realizada a lavagem e seca por 10 horas a 40 °C (segunda secagem), obtendo por fim a MBAD.

Bierhalz *et al.*, (2013) estudaram a reticulação de alginato em dois estágios: o primeiro envolveu uma adição de, aproximadamente, 8 mg de cloreto de cálcio em 400 mL de solução de alginato (1,5 g/100 ml) e 0,6 g de glicerol, formando uma solução homogênea. A segunda etapa envolveu a imersão total dos filmes de alginato em 50 mL de solução aquosa de cloreto de cálcio a 1,2% (m/v). No presente trabalho, também foi utilizado baixas concentrações de cálcio (40 e 20 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) no primeiro estágio para se obter uma solução pouco viscosa capaz de produzir as membranas, pois um menor grau de reticulação é favorável devido à rápida interação cálcio-alginato. No segundo processo, para melhor difusão através da interface da membrana, foi embebida com alta concentração de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de 4% (m/v) por 20 minutos.

#### **4.4 Preparação da camada inferior de alginato porosa (CAP) e da membrana em bicamada de alginato porosa (MBAP)**

Para a produção da membrana em bicamada de alginato porosa (MBAP) foi realizado inicialmente o mesmo procedimento da membrana em monocamada. Em seguida, adicionou-se sobre a membrana seca 25 g de uma solução 5% (m/v) de alginato e 0,5% (v/v) de glicerol pré-reticulado pela adição gradativa de 20 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (camada inferior). Após a adição, o filme com o gel sobreposto foi congelado a -18 °C por 24 horas em um ultra-freezer e então liofilizado sob temperatura de -47 °C e pressão inferior a 100 mmHg em um liofilizador (LIOTOP, L202) por 48 horas (primeira secagem), formando sobre a membrana a camada inferior de alginato porosa (CAP). A membrana em bicamada foi então reticulada por imersão durante 20 minutos em uma solução aquosa de 4 % (m/v)

de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Em seguida, foi realizada a lavagem e novamente congelado a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas em um ultra-freezer e liofilizado sob temperatura de  $-47\text{ }^\circ\text{C}$  e pressão inferior a 100 mmHg por 48 horas (segunda secagem), obtendo por fim a MBAP. O congelamento seguido de liofilização antes e após a reticulação também foi realizado por Cruz *et. al.* (2016), pois a liofilização anterior é necessária para a formação da membrana porosa, já a posterior para manutenção desses poros.

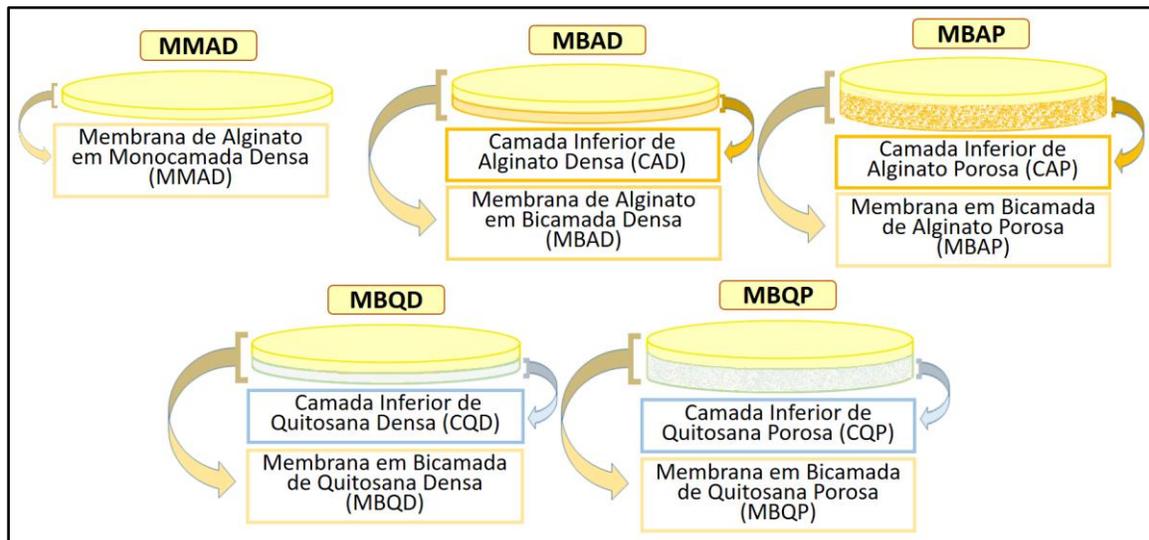
#### **4.5 Preparação da camada inferior de quitosana densa (CQD) e da membrana em bicamada de quitosana densa (MBQD)**

Para a produção da membrana em bicamada com a camada inferior de quitosana densa (MBQD) foi utilizado uma adaptação do trabalho de Kiti e Suwantong, (2020), em que se misturou uma solução 2% (m/v) de quitosana dissolvida em ácido acético (1% v / v) e 0,5% (v/v) de glicerol até a completa homogeneização, depois foram adicionados 5 mL de uma solução de NaOH 1,0 mol/L, visando ajustar o pH para o valor de 5,8. Esse ajuste de pH foi realizado com o intuito de produzir um curativo em bicamada com interação na interseção entre as camadas de alginato (camada superior) e quitosana (camada inferior) pois com o pH acima de 5,3 evita-se que a quitosana se dissolva nos processos de reticulação e lavagem, porém, menor que 6,3 para que se possa fazer uma solução filmogênica com a quitosana (SANTOS, 2006). Então 25 g dessa solução foram transferidas sobre a membrana de alginato seca e colocada em uma estufa a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  por 10 h (primeira secagem), formando sobre a membrana a camada inferior de quitosana densa (CQD). A membrana em bicamada foi então reticulada por imersão durante 20 min em uma solução aquosa de 4 % (m/v) de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Em seguida, foi realizada a lavagem e seco por 24 h a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  (segunda secagem), obtendo por fim a MBQD.

#### 4.6 Preparação da camada inferior de quitosana porosa (CQP) e da membrana em bicamada de quitosana porosa (MBQP)

Para a produção da membrana em bicamada com a camada inferior de quitosana porosa (MBQP) foi realizado inicialmente o mesmo procedimento da membrana em monocamada. Em seguida, adicionou-se sobre a membrana seca 25 g de uma solução 2% (m/v) de quitosana dissolvida em ácido acético (1% v/v) e 0,5% (v/v) de glicerol, com pH corrigido com NaOH para 5,8. Após a adição, o filme com o gel sobreposto foi congelado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas em um ultra freezer e então liofilizado sob temperatura de  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão inferior a 100 mmHg em um liofilizador (LIOTOP, L202) por 48 horas (primeira secagem), formando sobre a membrana a camada inferior de quitosana porosa (CQP). A membrana em bicamada foi então reticulada por imersão durante 20 minutos em uma solução aquosa de 4 % (m/v) de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Em seguida, foi realizada a lavagem e novamente congelado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas em um ultra freezer e liofilizado sob temperatura de  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão inferior a 100 mmHg por 48 horas (segunda secagem), obtendo por fim a MBQP. A Figura 8 mostra a disposição das camadas nas membranas.

Figura 8 – Disposição das camadas nas membranas.

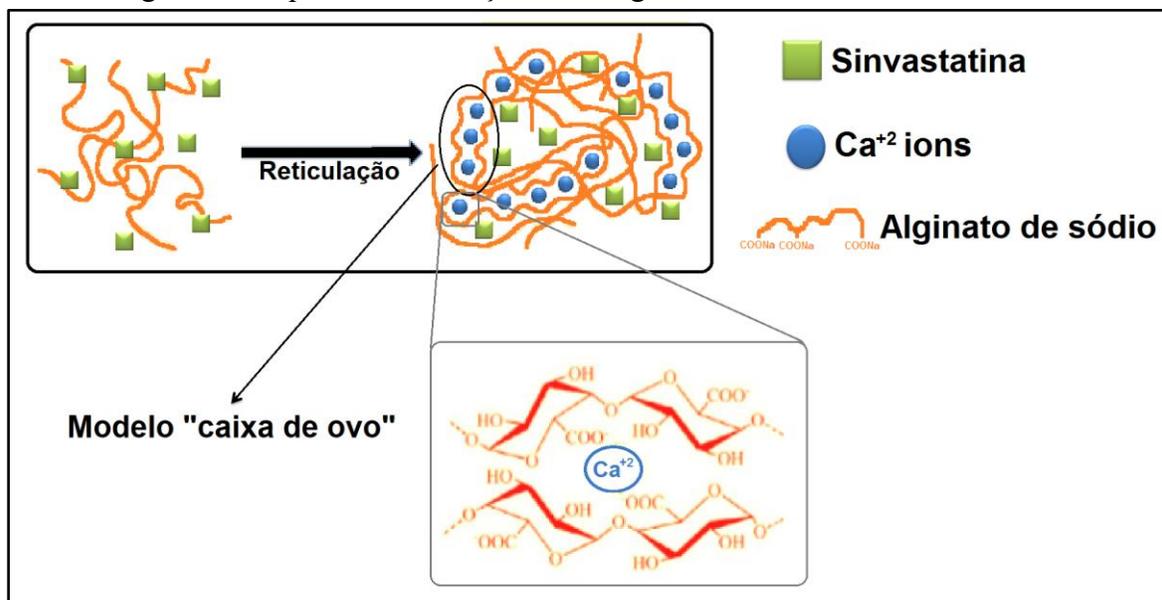


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.7 Incorporação de sinvastatina em membranas de alginato de camada única (MMAD+S) e bicamadas (MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S)

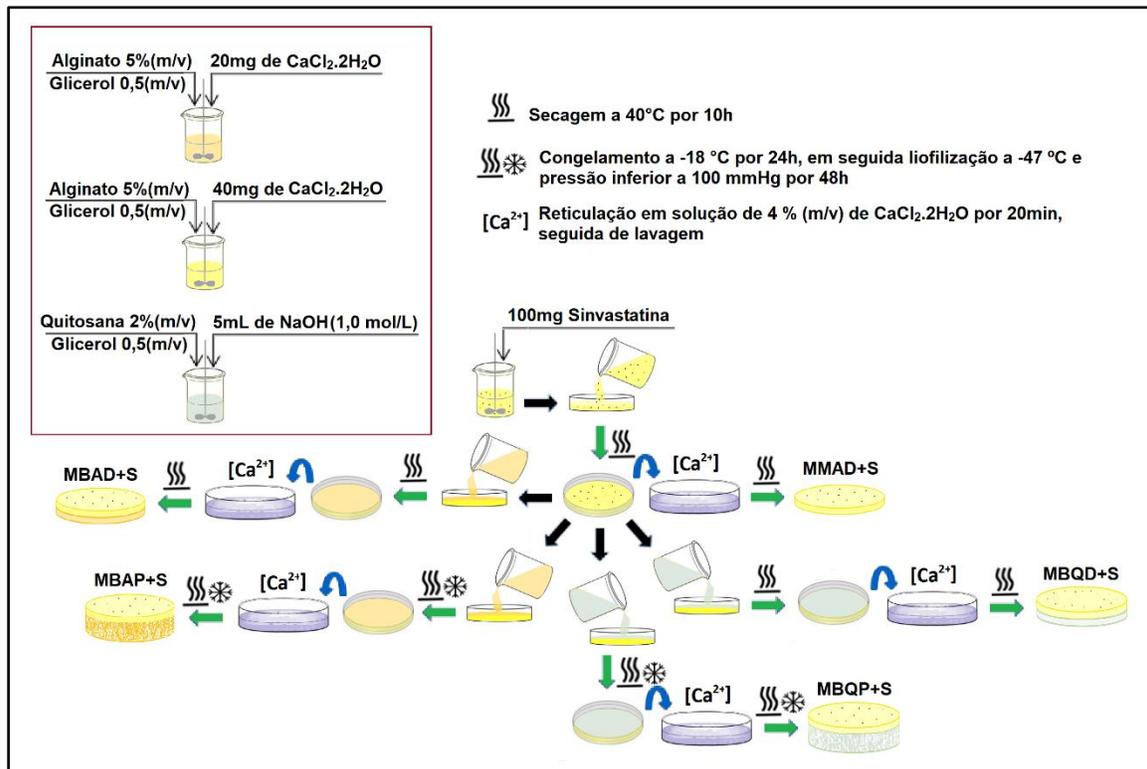
Misturou-se 100 mg de sinvastatina previamente dissolvida em 5 ml de etanol com a solução de alginato 5% (p/v) contendo glicerol 0,5% (v/v) até completa homogeneização. A Figura 9 mostra o esquema de interação entre alginato, íons cálcio e sinvastatina, onde podem ser observadas as ligações cruzadas entre o alginato e os íons cálcio, formando a estrutura denominada modelo “caixa de ovo”. Não há reação química entre a sinvastatina e a matriz, o que auxilia na liberação do fármaco (Rezvanian; Mohdamin; Ng, 2016). Apenas a camada superior das membranas de alginato de bicamada continha o fármaco. A Figura 10 mostra o diagrama de produção das membranas.

Figura 9 - Esquema de interação entre alginato, íons cálcio e sinvastatina



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 10 - Fluxograma de produção das membranas



Fonte: elaborado pelo autor.

## 4.8 Caracterização das membranas

### 4.8.1 Peso e espessura

A metodologia para o estudo do peso e espessura foi adaptado do trabalho de Ghosal *et al.* (2019). Foram cortadas das membranas amostras de  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ , em seguida essas amostras foram pesadas em uma balança digital. A espessura das amostras foi determinada usando um micrômetro digital (Quantumike IP65, Mitutoyo, JP), com precisão de 0,001 mm. O estudo do peso foi realizado em triplicata e uma média de dez medições para espessura em pontos aleatórios em cada uma das cinco membranas e para cada camada separadamente.

#### 4.8.2 Teor de umidade

O teor de umidade foi medido pelo método gravimétrico. As amostras ( $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ) foram aquecidas a  $105^\circ \text{C}$  e pesados a cada 10 minutos (em triplicata) até que o peso permanecesse constante (GHOSAL *et al.*, 2019). O estudo foi realizado em triplicata nas cinco membranas e para cada camada separadamente. A umidade foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \left( \frac{\text{Peso inicial da membrana} - \text{Peso final da membrana}}{\text{Peso inicial da membrana}} \right) \times 100$$

(Equação 3)

#### 4.8.3 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento das amostras ( $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ) foi calculado por imersão em tampão tris (hidroximetil) aminometano (TRIS)  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , em pH 7 a  $25^\circ \text{C}$ . As amostras secas foram pesadas no tempo zero, imersas em solução tampão e removidas em tempos definidos (intervalos de 5, 15 e 30 min e a seguir em intervalos de 30 min até o equilíbrio do intumescimento) e pesadas novamente. O excesso de solução tampão da amostra foi removido usando papel absorvente por 40 s em cada lado da membrana. O estudo foi realizado em triplicata nas cinco membranas e para cada camada separadamente.

$$\text{Grau de intumescimento(\%)} = \left( \frac{\text{Peso final da membrana} - \text{Peso inicial da membrana}}{\text{Peso inicial da membrana}} \right) \times 100$$

(Equação 4)

#### 4.8.4 Estabilidade em solução

A metodologia de estudo da Estabilidade em solução foi adaptada de Straccia *et al.* (2015) e Pereira *et al.* (2013). As amostras ( $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ) foram imersas em tampão TRIS  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ \text{C}$  por 96 h. Em seguida, as membranas foram removidas e pesadas a cada hora para caracterizar sua estabilidade (não degradação) ao longo do tempo. O

estudo foi realizado em triplicata para as cinco membranas e para cada camada separadamente.

#### 4.8.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas tanto na superfície quanto na área da seção transversal (obtida após fratura criogênica utilizando nitrogênio líquido). Antes das análises, as membranas foram metalizadas com uma fina camada de ouro sob atmosfera de argônio por um Sputter Coater Polaron SC500 (*FISONS Instruments, Ipswich, UK*). Em seguida, as imagens microscópicas foram obtidas em Quanta FEG-250 (*Thermo Scientific, Hillsboro, EUA*), operando com 15 kV de aceleração de tensão.

#### 4.8.6 Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)

A Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) das membranas foi determinada gravimetricamente de acordo com o método ASTM E96M-16, indicando a quantidade de vapor que permeia através das membranas por 24 h. Células de permeação (diâmetro: 24 mm; altura: 13,2 mm) contendo 2 ml de água deionizada, mantendo um espaço livre de 5,58 mm de altura dentro da célula. As membranas em forma de disco foram seladas na parte superior das células e colocadas em um dessecador vertical ARSEC DCV-040 com circulação de ar, contendo sílica gel previamente seca a 105 ° C por 24 h. As células de permeação foram mantidas a 37 ° C e 85% de umidade relativa controlada por pelo menos 24 horas e pesadas oito vezes ao dia, pelo menos em intervalos de uma hora (n=8). A TPVA foi calculada pela Equação 5. Essa metodologia foi baseada em Pereira *et al.* (2013) e Singh e Singh (2012)

$$TPVA \text{ (g/m}^2 \cdot \text{h)} = \frac{W}{A \times t} \quad \text{(Equação 5)}$$

onde W é o peso da amostra (g), t é o tempo (24 h) e A é a área transversal do filme exposto (m<sup>2</sup>).

#### 4.8.7 Análise mecânica

As propriedades mecânicas foram determinadas em uma máquina universal de ensaios (DL-3000, EMIC, Paraná, BR) no modo tração. Cada membrana foi cortada em forma retangular (9 x 80 mm) tipo IV, de acordo com ASTM D 638-98. A amostra foi fixada nas extremidades das garras de fixação (GR019) e alinhada verticalmente. Cada amostra foi esticada a uma velocidade de  $100 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  para atingir uma taxa de deformação constante. Os testes foram realizados a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A tensão ( $\sigma$ ) foi calculada por  $F/A$ , onde  $F$  é a força de carga em Newtons (N) e  $A$  é a área da seção transversal medida através da largura e espessura dos corpos de prova. A deformação ( $\epsilon$ ) foi calculada pela  $\Delta L/L_0$ , onde  $L_0$  é o comprimento inicial e  $\Delta L$  é a variação do comprimento exercida a partir do ponto inicial. O módulo de tensão foi calculado através da tensão (MPa)/tensão na região linear do gráfico. Dez espécimes ( $n = 10$ ) foram medidos para obter a média e o desvio padrão.

#### 4.8.8 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR)

Para verificar a estrutura química e os grupos funcionais das membranas, as análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 630, Agilent Technologies. Foram analisados os espectros entre  $4000$  e  $650 \text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$  (XIAO *et al.*, 2014).

#### 4.8.9 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

TGA e DSC foram usados para medir o comportamento da estabilidade térmica das membranas. As medições de TGA e DSC ocorreram em um analisador térmico simultâneo (STA 449 F3, Júpiter), varrendo de  $30$  a  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  a uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  sob uma atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ) a  $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  vazão em um cadinho de cerâmica de alumina (NETZSCH). Uma panela vazia foi usada como referência

#### 4.8.10 Uniformidade na Incorporação e Perda do fármaco pós lavagem

O método utilizado para estudo de uniformidade na Incorporação e Perda do fármaco pós lavagem foi adaptado de Thu e Ng (2013) e Bavarsad *et al.* (2016). Três amostras (1 cm x 1 cm) foram cortadas nos pontos central, intermediário e próximo da borda da membrana que continha o fármaco. Cada amostra foi medida embebendo-as em 20 mL de tampão TRIS 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo 20% de etanol a 37 °C e agitadas a 200 rpm. Após 96 h (tempo para completa liberação do fármaco), a absorbância da solução foi determinada usando um espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu, Japão) no comprimento de onda de 238 nm para sinvastatina. A concentração real de sinvastatina no filme foi calculada usando uma curva de concentração da sinvastatina. O teste foi realizado em triplicata antes e após a lavagem.

#### 4.8.11 Teste de prateleira

A aparência física de cada membrana (cor e integridade) e o conteúdo de sinvastatina (Equação 2) foram analisados em 15, 45, 90 e 180 dias a 25 ± 2°C (umidade relativa 60%). Para a análise, amostras (1 cm x 1 cm) obtidas de cada membrana foram imersas em 20 mL de tampão TRIS 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo 20% de etanol a 37°C e agitadas a 200 rpm. Após 96 h, a detecção de sinvastatina na solução foi medida por absorbância em espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu, Japão) a 238 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) para cada tempo testado. Foi utilizado como conteúdo inicial na membrana a quantidade de sinvastatina encontrada no resultado de incorporação.

$$\text{Conteúdo de sinvastatina (\%)} = \frac{\text{Conteúdo final na membrana} \times 100}{\text{Conteúdo inicial na membrana}} \quad (\text{Equação 6})$$

#### 4.8.12 Liberação *in vitro*

A liberação do fármaco *in vitro* das membranas foi avaliada usando células de difusão de Franz com capacidade receptora de 15 mL e área de difusão de 0,95 cm<sup>2</sup>. O

compartimento receptor foi preenchido com uma solução tampão (TRIS, pH 7,0 contendo 20% de etanol) (CHEN *et al.*, 2012). As membranas foram colocadas entre os compartimentos doador e receptor. Os experimentos foram realizados a 37°C e agitados a 200 rpm. Em intervalos regulares (0,5, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 h), 1 mL de solução tampão no compartimento receptor foi coletado e substituído pelo mesmo volume de solução tampão fresca. Para determinar a liberação da concentração de sinvastatina, as amostras foram analisadas em triplicata (n = 3) a 238 nm usando um espectrofotômetro UV (U-2900, Hitachi, Japão).

A porcentagem cumulativa de liberação de sinvastatina das membranas em relação à massa inicial foi plotada em função do tempo para determinar o perfil de liberação de sinvastatina. Os modelos Higuchi (Equação 1) e Korsmeyer-Peppas (Equação 2) foram usados para descrever o comportamento de liberação do fármaco.

#### **4.8.13 Ensaio de atividade antimicrobiana**

O teste foi realizado pelo método indireto onde foi feito um extrato da amostra em 1 mL PBS estéril pH 7,4 por 24 h à 37°C para liberação dos princípios ativos. A atividade bacteriana das amostras foi testada em bactérias gram-positivas e gram-negativas, *Escherichia Coli* (ATCC 11303), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foram retiradas 3 a 5 colônias das placas de ágar armazenadas na geladeira com alça estéril, ativadas em 5 mL meio Müeller-Hinton (MHB), Kasvi K25-1400, e incubadas por 24 h à 37 °C. Depois os falcons foram submetidos a centrifugação, 4 °C, 9000 rpm por 5 min. O Sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em novo meio. Uma alíquota de 1 mL da suspensão foi acondicionada em cubeta de plástico para a leitura da absorbância, à 620 nm, para ajuste da concentração da suspensão para  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Então 100 µL da amostra e 100 µL de suspensão de microrganismo foi colocado em placas de poliestireno de 96 poços com fundo em U. Após 18 h, o crescimento bacteriano foi avaliado por absorbância a 620 nm usando um leitor de microplacas automatizado (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, USA). O gráfico foi plotado em percentual comparados aos controles de bactéria com crescimento normal em meio de cultura.

$$\text{Inibição de bactérias (\%)} = \left( \frac{F_{\text{Amostra}} - F_{\text{Branco}}}{F_{\text{Controle}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

#### 4.8.14 Ensaio de citotoxicidade indireta

As membranas, cortadas em quadrados de 1 cm<sup>2</sup>, foram lavadas levemente com tampão Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> estéril (pH 7) e esterilizadas usando um Emissor de Luz UV Pulsado (SteriBeam, Alemanha) por dez ciclos. Método indireto foi usado para avaliar a citotoxicidade das membranas. Os extratos foram obtidos deixando as membranas em contato com 1 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado (contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina e 1 mmol<sup>-1</sup> piruvato de sódio) por 24 h a 37°C (5% CO<sub>2</sub> / 95% ar), conforme recomendado pela *International Organization for Standardization* - 10993-5 (2009). (Fibroblastos de camundongo (L929) e Queratinócitos humanos (HaCat) foram semeados em meio DMEM suplementando (10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de Penicilina-Estreptomicina. No ensaio, 100 µl de células HaCat e L929 a uma densidade de 6 × 10<sup>5</sup> células / mL em DMEM suplementado foram adicionados a cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços, seguido por incubação a 37 ° C por 24 h. O meio DMEM foi removido do poço e 100 µL do extrato das amostras foram adicionados a cada poço e incubados a 37 ° C por 24 h. Em seguida, o extrato foi removido de cada poço e 120 µL de resazurina (25 mg.L<sup>-1</sup> em DMEM suplementado) foram adicionados e metabolizados por 4 horas em condições de cultura padrão. Finalmente, 100 µL do meio contendo a resazurina metabolizada foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e medidos usando um espectrofotômetro (SpectraMax i3x, Molecular Device, EUA) em modo de fluorescência (λexcitação = 560 nm e λemissão = 590 nm). As células do controle negativo foram expostas apenas ao DMEM suplementado (meio de cultura padrão), e sua viabilidade foi ajustada para 100% para cálculo dos valores médios e desvio padrão (n = 4). A porcentagem de células metabolicamente ativas foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Células metabolicamente ativas(\%)} = \left( \frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

onde  $F_{\text{amostra}}$  representa a fluorescência dos poços, nos quais as células foram expostas ao extrato da amostra, e o controle  $F_{\text{controle negativo}}$  representa aquele em que as células foram expostas apenas ao meio DMEM suplementado. Esta metodologia foi baseada em Vasconcelos *et al.* (2020)

#### **4.8.15 Análise estatística**

ANOVA e o teste de Tukey foram realizados para os resultados a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as medidas das membranas em estudo ( $\alpha = 0,05$ ), usando o software 10.0 Statistical (StatSoft Inc. 2011, Tulsa, EUA).

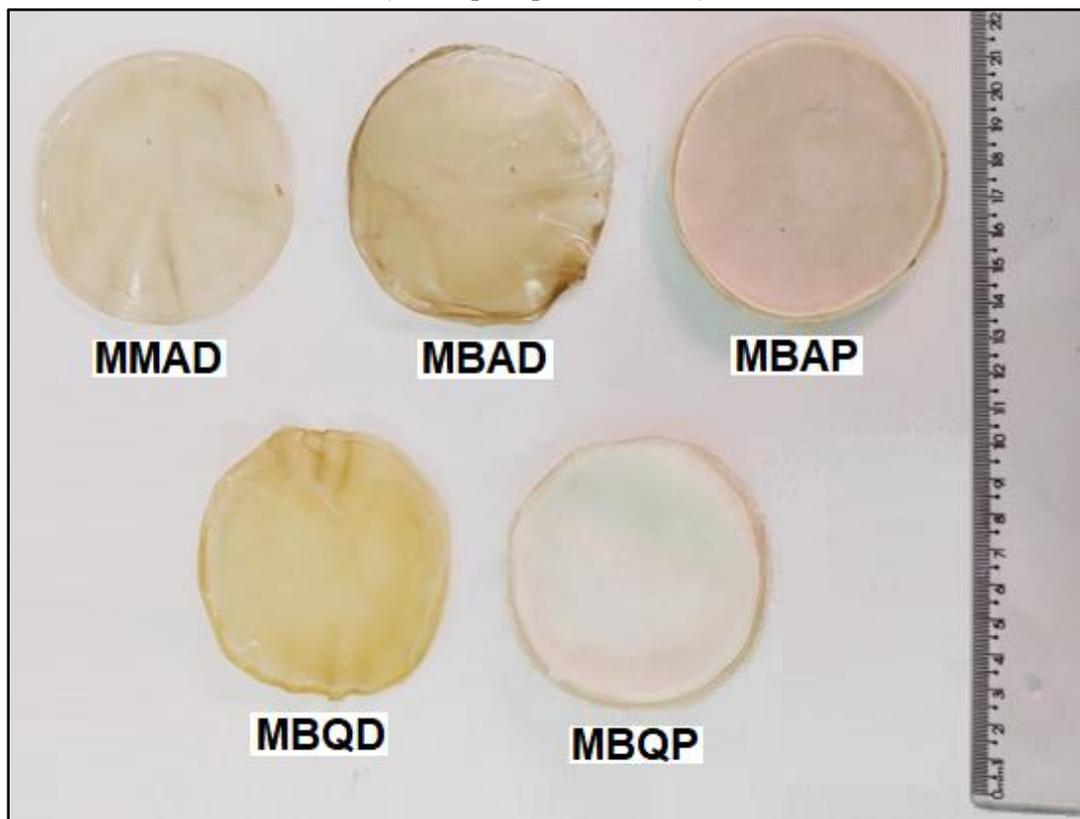
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das membranas

#### 5.1.1 Aspectos visuais e morfológicos das membranas

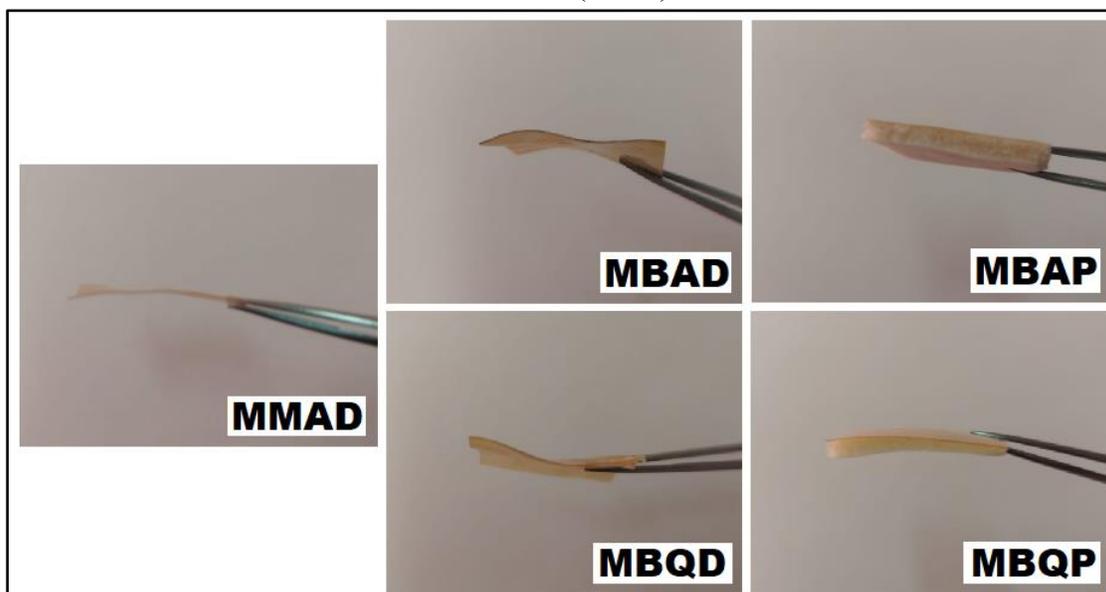
A Figura 11 mostra as imagens da membrana de alginato em monocamada densa (MMAD), membrana em bicamada de alginato densa (MBAD), membrana em bicamada de alginato porosa (MBAP), membrana em bicamada de quitosana densa (MBQD), e membrana em bicamada de quitosana porosa (MBQP) (vistas pela parte inferior) e a Figura 12 mostra suas imagens laterais (2 cm<sup>2</sup>). As membranas apresentaram coloração marrom claro, com exceção da MBQP que possui uma coloração branca. As membranas densas demonstraram uma aparência translúcida, enquanto as que possuem camada liofilizada se apresentaram totalmente opacas devido à presença de poros, que impedem a reflexão da luz. Não houve diferença visual na camada superior das membranas em bicamada, não ocorrendo separação entre as camadas. Os valores médios de peso, espessura, teor de umidade e grau de intumescimento dos cinco tipos de membranas e de cada tipo de camada inferior são mostrados na Tabela 5.

Figura 11 - Imagens da membrana em monocamada e das membranas em bicamada (vistas pela parte inferior).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12 – Imagens laterais da membrana em monocamada e das membranas em bicamada (2 cm<sup>2</sup>).



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Valores médios de peso, espessura, teor de umidade e grau de intumescimento dos cinco tipos de membranas e de cada tipo de camada inferior

Membranas	Peso (g)	Espessura (mm)	Teor de umidade (%)	Grau de intumescimento (%)
MMAD	0,099 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,143 ± 0,016 <sup>a</sup>	25,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	414,6 ± 23,3 <sup>a</sup>
CAD	0,111 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,158 ± 0,020 <sup>a</sup>	28,7 ± 1,4 <sup>b</sup>	570,9 ± 21,2 <sup>b</sup>
MBAD	0,218 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,292 ± 0,054 <sup>b</sup>	37,2 ± 1,8 <sup>c</sup>	1509,2 ± 119,8 <sup>c</sup>
CAP	0,102 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,991 ± 0,044 <sup>c</sup>	19,5 ± 0,9 <sup>d</sup>	917,0 ± 59,2 <sup>d</sup>
MBAP	0,212 ± 0,019 <sup>c</sup>	1,191 ± 0,064 <sup>d</sup>	28,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	1547,8 ± 41,4 <sup>c</sup>
CQD	0,030 ± 0,002 <sup>d</sup>	0,075 ± 0,004 <sup>e</sup>	9,9 ± 1,6 <sup>e</sup>	207,1 ± 19,8 <sup>e</sup>
MBQD	0,131 ± 0,011 <sup>e</sup>	0,222 ± 0,018 <sup>b</sup>	22,9 ± 1,5 <sup>af</sup>	574,5 ± 23,0 <sup>b</sup>
CQP	0,030 ± 0,002 <sup>d</sup>	0,741 ± 0,024 <sup>f</sup>	9,5 ± 2,0 <sup>e</sup>	390,0 ± 11,8 <sup>a</sup>
MBQP	0,140 ± 0,007 <sup>e</sup>	0,879 ± 0,030 <sup>g</sup>	22,5 ± 1,3 <sup>f</sup>	797,3 ± 34,5 <sup>f</sup>

\* Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 10); letras sobrescritas semelhantes mostram diferença estatística não significativa ( $\alpha = 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.1.2 Peso e espessura

Ao se comparar a membrana em monocamada densa (MMAD) com a camada inferior de alginato densa (CAD) que se diferenciam apenas pela diferença de concentração de cálcio na pré-reticulação, observa-se uma ligeira variação no peso. Na produção da membrana MMAD é utilizada uma concentração de cálcio mais alta, aumentando a interligação entre as cadeias poliméricas. Esse aumento torna o polímero mais rígido, porem com menos umidade resultando em um peso menor (REZVANIAN *et al.*, 2017; GHOSAL *et al.*, 2019; KITI; SUWANTONG; 2020).

A camada inferior de alginato porosa (CAP) apresentou um peso levemente menor que a camada inferior de alginato densa (CAD) devido à maior desidratação promovida pelo processo de liofilização nas condições estudadas, removendo uma maior quantidade de água que o processo de secagem por convecção e resultando assim em um menor peso. Vargas (2017) comparou a eficiência na remoção de água por convecção e liofilização em partículas de alginato, ao utilizar 40 °C no processo de convecção a remoção de água também foi menor que no processo de liofilização, porém ao se utilizar temperaturas maiores (50 e 60 °C) se obteve remoções maiores que na liofilização.

As camadas de quitosana (CQD e CQP) apresentaram peso e espessura menores que as camadas de alginato (CAD e CAP), resultado esperado devido à menor quantidade

de quitosana utilizada na produção de suas camadas. Porém não houve variação no peso entre a camada inferior de quitosana densa (CQD) e a camada inferior de quitosana porosa (CQP) por causa da menor quantidade de água presente nas camadas de quitosana.

Nenhuma diferença significativa de espessura foi observada entre a MMAD e a (CAD), apesar da diferença no grau de reticulação entre as amostras, provavelmente a técnica utilizada não foi sensível o suficiente para avaliar diferença entre as amostras. A (CAP) possui uma espessura muito maior, apesar do menor peso, essa maior espessura ocorre por causa da característica porosa da membrana após a secagem por liofilização. O mesmo efeito na espessura também foi observado nas camadas inferiores de quitosana, resultando em uma maior espessura para a (CQP) (DOLLY *et al.*, 2011).

A diferença nas propriedades das camadas inferiores resultou em variações nas propriedades das membranas em bicamada, de modo que a membrana em bicamada de alginato densa (MBAD) demonstrou um peso maior e uma menor espessura que a membrana em bicamada de alginato porosa (MBAP). Da mesma maneira que a membrana em bicamada de quitosana densa (MBQD) teve um peso similar, porém uma espessura bem menor que a membrana em bicamada de quitosana porosa (MBQP). Diferentes espessuras de curativos são encontradas tanto na literatura quanto no mercado, pois a limitação de aplicabilidade que a espessura pode proporcionar está correlacionada com outros fatores como: material utilizado, peso, intumescimento e capacidade de adesão do curativo à pele. Segundo Bierhalz, Westin e Moraes (2016), para evitar possíveis limitações, a espessura do curativo não deve ser maior que a espessura da pele. Como a espessura da derme varia entre 0,5 e 2 mm, dependendo da idade, sexo e localização (MA *et al.*, 2001), as formulações estão na faixa de aplicabilidade.

### ***5.1.3 Teor de Umidade***

Os resultados confirmaram a maior remoção de água pelo processo de liofilização, a menor umidade na membrana que possuía maior grau de reticulação e a menor quantidade de água para as membranas de quitosana (MBQD e MBQP) em relação as de alginato (MMAD, MBAD e MBAP).

Comparando a membrana em monocamada de alginato densa (MMAD) com a camada inferior de alginato densa (CDA), a MMAD apresentou menor umidade, por possuir um maior grau de reticulação. Isso ocorre porque um aumento nas interações da cadeia polimérica hidrofóbica, causada pelo aumento do teor de cálcio, influencia a quantidade de água na membrana de alginato (GAO; POLLET; AVÉROUS, 2017), tornando-se menos solúvel em meio aquoso e, conseqüentemente, diminuindo sua umidade. As camadas liofilizadas (CAP e CQP) demonstraram um menor teor de umidade que as camadas densas (CAD e CQD), confirmando assim a maior remoção de água pelo processo de liofilização. As camadas de alginato (CAD e CAP) obtiveram um maior teor de umidade que as camadas de quitosana (CQD e CQP), isso se deve a alta hidrofiliçidade do alginato (MAYET *et al.*, 2014).

A adição das diferentes camadas inferiores nos curativos em bicamada resultou em efeitos similares no teor de umidade, de modo que as membranas que possuíam em sua camada inferior camadas liofilizadas (MBAP e MBQP) tiveram um menor teor de umidade que as membranas q possuíam camada densa (MBAD e MBQD), já as membranas compostas por alginato (MBAD e MBAP) tiveram um maior teor de umidade que as de quitosana (MBQD e MBQP). O teor de umidade é uma propriedade importante para curativos, pois influencia a troca gasosa, a absorção de exsudato e a liberação do medicamento (BOATENG *et al.*, 2008).

#### **5.1.4 Grau de intumescimento**

A Figura 13 mostra o grau de intumescimento em função do tempo para as membranas e para cada tipo de camada inferior, os valores de equilíbrio foram todos superiores a 400%, demonstrando uma capacidade de absorção de exsudato favorável. Essa capacidade de absorção é essencial, pois além de manter a umidade na ferida, permite que a temperatura local seja regulada e que os compostos ativos sejam liberados, promovendo assim um processo de cicatrização mais significativo e conforto ao paciente.

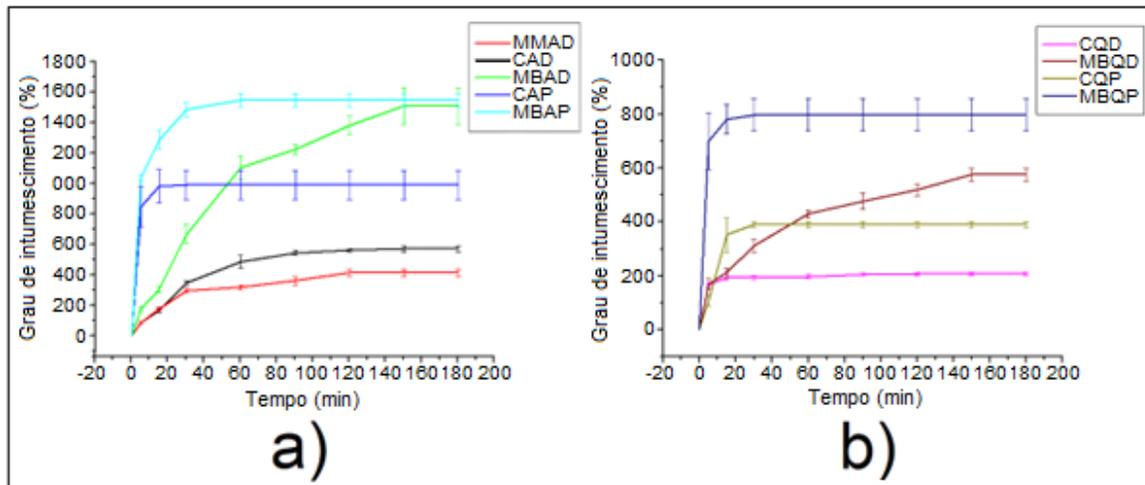
As membranas de bicamada de alginato (MBAD e MBAP) atingiram um maior grau de intumescimento, quase quatro vezes maior que o de monocamada (MMAD), demonstrando que o uso de mais uma camada resulta em um efeito sinérgico no

inchamento devido à contribuição mais significativa dos grupos carboxilato presentes na estrutura do alginato, que interagem fortemente com as moléculas de água. Essa forte interação com a água faz com que as membranas e camadas apenas de alginato (CAD, CAP, MMAD, MBAD e MBAP) possuam grau de intumescimento maior que as que possuíam quitosana (CQD, CQP, MBQD e MBQP).

O caráter poroso das camadas e, conseqüentemente, das membranas liofilizadas (CAP, CQP, MBAP e MBQP) proporcionaram um perfil de saturação da estrutura mais rápido do que as demais amostras secas em estufa (CAD, CQD, MMAD, MBAD e MBQD), devido aos poros que são preenchidos rapidamente pela água. Estes poros são produzidos a partir de cristais de gelo formados a baixas temperaturas e sua subsequente sublimação sob pressão reduzida (DOLLY *et al.*, 2011). A membrana em bicamada porosa (MBAP) apresentou inchaço mais significativo na primeira hora, porém atingiu valor semelhante a membrana em bicamada densa (MBAD) após três horas, esse alto intumescimento da MBAD ocorre por causa do espaço entre as camadas densas na membrana.

Comparando os valores obtidos com um produto comercial de alta absorção de exsudato, o grau de intumescimento do Actiformcool® foi de  $774,82 \pm 61,09$  % (AHMED; GETTI; BOATENG, 2021), valor superior ao das membranas densas MMAD e MBQD,  $414,64 \pm 23,26$  e  $574,47 \pm 23,05$ , respectivamente; porém menor que a MBQP,  $797,27 \pm 34,15$ ; e bem inferior às membranas MBAD e MBAP que apresentaram valores acima de 1500%. O grau de intumescimento influencia a capacidade de absorção do exsudato da ferida e a liberação do fármaco nos curativos.

Figura 13 - Grau de intumescimento em função do tempo (a) para as membranas e camadas apenas de alginato e (b) para as membranas e camadas que possuem quitosana.



Fonte: elaborado pelo autor.

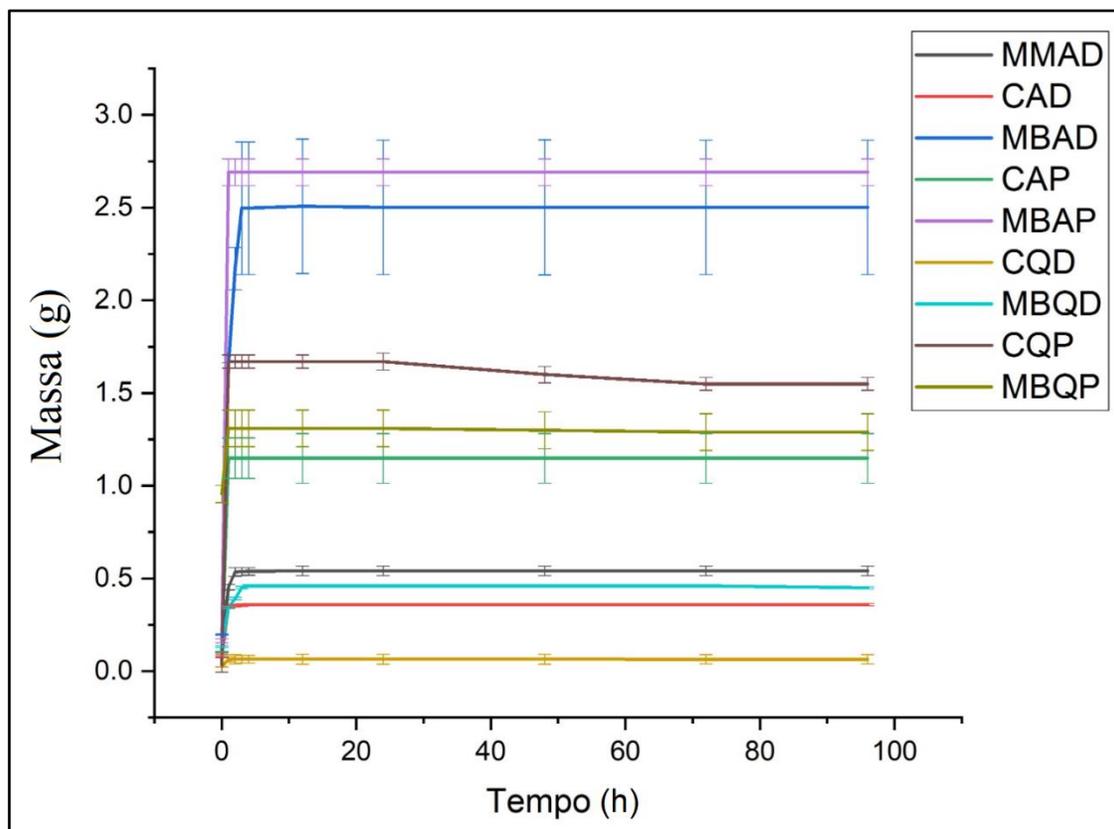
### 5.1.5 Estabilidade em solução

É necessário avaliar a estabilidade em solução, pois enquanto a membrana destinada a atuar como curativo na pele mantém sua integridade/estabilidade, ela conserva sua proteção e umidade na ferida, absorve o excesso de exsudato, auxilia na formação do tecido conjuntivo e fornece compostos bioativos a uma taxa de liberação controlada. (BOATENG *et al.*, 2008).

A Figura 14 mostra a estabilidade em solução em função do tempo para as membranas e para cada tipo de camada inferior por um período de 96 h (tempo avaliado no estudo de liberação *in vitro*). Inicialmente, houve aumento de peso nas primeiras horas para todas as membranas devido à absorção de água, e então os pesos permaneceram constantes até o final do ensaio. Observou-se mais água nas camadas e membranas porosas (CAP, CQP, MBAP e MBQP) devido à sua maior porosidade e a MBAD devido alguns pequenos espaços que possam se formar entre as camadas, o que também leva a um aumento no erro padrão. Destaca-se uma leve perda de peso para a CQP e MBQP por causa da maior solubilidade da quitosana (no pH produzido) que o alginato, sendo esta fragilidade da camada realçada após o processo de liofilização, porem essa perda de peso foi de menos de 8% nas 96 h.

Assim sendo as membranas demonstraram valores satisfatórios no período de teste, mesmo quando exposta a uma grande quantidade de umidade, comprovando a aplicabilidade das formulações e a eficácia dos processos de reticulação do alginato.

Figura 14 - Estabilidade em solução em função do tempo para as membranas e camadas apenas de alginato e para as membranas e camadas que possuem quitosana por um período de 96 h (tempo utilizado no estudo de liberação *in vitro*).



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

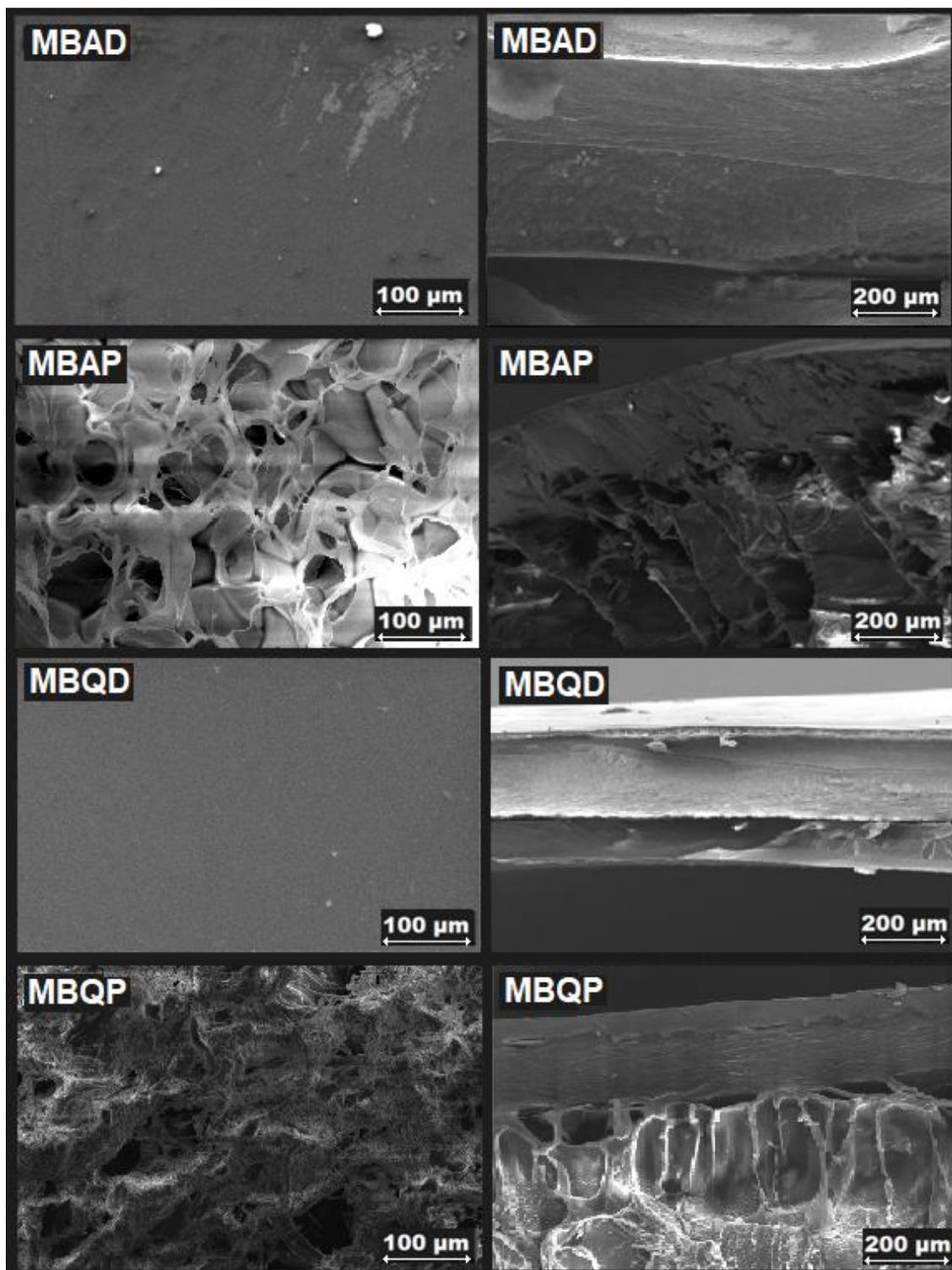
A Figura 15 apresenta as micrografias eletrônicas de varredura (MEV) para as amostras em bicamada (MBAD, MBAP, MBQD e MBQP), nelas é possível observar a morfologia da superfície da camada inferior (micrografias à esquerda) e morfologia transversal (micrografias à direita). A superfície das membranas densas (MBAD, MBQD) apresentaram topografia lisa, densa e sem porosidade, comumente observada em diversos

estudos que obtiveram membranas por evaporação de solvente por convecção (THU; NG, 2013; GANESAN, 2017; GHOSAL *et al.*, 2019). No entanto, alguns cristais dispersos na MBAD foram observados, provavelmente devido ao excesso de íons cálcio que não foram removidos após a lavagem. Características semelhantes foram encontradas por Ghosal *et al.* (2019) em filmes de alginato reticulados com íons de cálcio, com alguns cristais de íons  $\text{Ca}^{2+}$  permanecendo sob a superfície da amostra.

Por outro lado, as membranas porosas (MBAP e MBQP) apresentaram uma superfície irregular, com poros de diferentes tamanhos e formatos, que se interligam, formando uma estrutura com maior absorção (conforme observado nos resultados de grau de intumescimento). A presença desses poros na membrana auxilia na cicatrização, pois promove um microambiente adequado para a reparação do tecido lesado (BOEKEMA *et al.*, 2014).

As imagens à direita na Figura 15 mostram o corte transversal das membranas, na MBAD e MBQD é possível observar o ponto de interseção entre as camadas densas, destacando o local onde pode ocorrer espaço entre as duas camadas. No corte transversal das MBAP e MBQP foi possível identificar a interseção entre as diferentes camadas (densa e porosa), em que a camada liofilizada possui poros interligados, concordando com vários estudos da literatura (AHMED; GETTI; BOATENG, 2021; ZHOU *et al.*, 2021; VAKILIAN *et al.*, 2021 SUTAR *et al.*, 2021).

Figura 15 - Micrografias eletrônicas de varredura superficiais (esquerda) e transversais (direita) das membranas em bicamada.



Fonte: elaborado pelo autor.

Pelos resultados obtidos nos estudos acima foi possível avaliar a disposição e utilidade de cada camada nas membranas. Observou-se que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na pré-reticulação do alginato, os diferentes processos de secagem e o uso de diferentes polímeros interferiram diretamente nas propriedades físico-químicas da camada, por isso utilizou-se a camada de alginato densa e com maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (mais rígida) para produzir a membrana em monocamada e a parte superior de cada membrana em bicamada, possibilitando assim uma maior proteção contra agentes externos.

Os quatro tipos de camadas inferiores demonstraram características variadas, assim a utilização em contato com a pele de cada camada favorecerá de maneira mais eficiente a cicatrização de diferentes tipos de lesão. Dessa forma os estudos abaixo visam avaliar a incorporação e liberação da sinvastatina, estudando suas propriedades, a fim de projetar curativos ideais para diferentes tipos de ferida.

#### ***5.1.7 Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)***

A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) de uma membrana é um parâmetro importante para o processo de cicatrização, determinando o teor de umidade na ferida. O curativo com baixa TPVA apresenta algumas desvantagens, como acúmulo de exsudato, alta umidade na lesão e perda da maleabilidade do curativo (devido ao inchaço / expansão da membrana), causando dor e desconforto ao paciente. Porém um curativo com alta TPVA pode levar à desidratação da ferida, fazendo com que os tecidos de granulação grudem no curativo, prolongando assim o processo de cicatrização. Assim, um TPVA ideal é essencial para manter um nível adequado de hidratação na ferida (EVRANOS; AYCAN; ALEMDAR, 2019).

Os valores médios de TPVA para as membranas e para as membranas carregadas com sinvastatina são apresentados na Tabela 6. TPVA para a MMAD e para as camadas inferiores CAD, CAP, CQD, CQP foram de  $2881,08 \pm 160,13^a$ ,  $2981,80 \pm 233,58^a$ ,  $3694,27 \pm 243,57^b$ ,  $3282,08 \pm 224,01^{ab}$  e  $3705,20 \pm 77,32^b$   $\text{g/m}^2\text{24h}$ , respectivamente. Os resultados mostraram que as camadas liofilizadas (CAP e CQP) obtiveram uma TPVA maior que as camadas densas (CAD e CQD), pois os espaços vazios criados na sua estrutura, reduz o impedimento ao fluxo de água ou sua retenção na membrana, resultando em maiores

valores de TPVA. Por outro lado, as camadas de alginato (CAD e CAP) tiveram uma menor TPVA que as de quitosana (CQD e CQP) por causa da maior espessura.

Os valores de TPVA para as membranas em bicamada MBAD, MBAP, MBQD e MBQP foram de:  $2518,25 \pm 82,96^c$ ,  $2860,12 \pm 432,51^{ac}$ ,  $2650,99 \pm 201,22^{ac}$  e  $2893,72 \pm 312,71^{ac}$ , respectivamente. Comparando a MMAD com a MBAD, observou-se que como esperado o uso de duas camadas reduz a permeação de vapor de água, resultando em um TPVA mais baixo. As membranas compostas por camadas porosas e as de menores espessuras demonstraram uma tendência a maior TPVA, corroborando com os resultados individuais das camadas. É importante destacar que os valores de TPVA estão relacionados às características funcionais do material, como porosidade, espessura, e às propriedades do material de que é feito (ELSNER; ZILBERMAN, 2010).

Os valores de TPVA para as membranas incorporadas com sinvastatina MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S foram de  $2612,00 \pm 220,67^{ac}$ ,  $2063,05 \pm 158,97^d$ ,  $2632,66 \pm 257,83^{ac}$ ,  $2391,32 \pm 224,57^c$  e  $2647,51 \pm 367,23^{ac}$ , respectivamente. A adição de sinvastatina ajudou a diminuir o valor do TPVA, provavelmente devido às suas características hidrofóbicas, reduzindo a hidrofiliabilidade das membranas.

Tabela 6 - Valores médios de TPVA para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina

Membranas	TPVA (g/m <sup>2</sup> 24h)
MMAD	2881,08 ± 160,13 <sup>a</sup>
MMAD+S	2612,00 ± 220,67 <sup>ac</sup>
CAD	2981,80 ± 233,58 <sup>a</sup>
MBAD	2518,25 ± 82,96 <sup>c</sup>
MBAD+S	2063,05 ± 158,97 <sup>d</sup>
CAP	3694,27 ± 243,57 <sup>b</sup>
MBAP	2860,12 ± 432,51 <sup>ac</sup>
MBAP+S	2632,66 ± 257,83 <sup>ac</sup>
CQD	3282,08 ± 224,01 <sup>ab</sup>
MBQD	2650,99 ± 201,22 <sup>ac</sup>
MBQD+S	2391,32 ± 224,57 <sup>c</sup>
CQP	3705,20 ± 77,32 <sup>b</sup>
MBQP	2893,72 ± 312,71 <sup>ac</sup>
MBQP+S	2647,51 ± 367,23 <sup>a</sup>

Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo KHALIQ *et al.* (2022), os valores de TPVA ideais para fornecer um ambiente favorável para o crescimento de células epidérmicas e fibroblastos variam de aproximadamente 2000 a 2500 g/m<sup>2</sup>.24 h, sugerindo que as membranas carregadas com sinvastatina possuem uma TPVA adequada para serem aplicadas em curativos, os resultados de TPVA juntamente com os valores do grau de intumescimento mostram que as cinco membranas podem ser utilizadas em feridas exsudativas. Destacando a MBAD+S para feridas exsudativas que necessitem de uma maior hidratação e a MMAD+S para feridas mais superficiais.

### 5.2.9 *Análises mecânicas*

Os valores médios de tensão e deformação para as membranas e para as membranas carregadas com sinvastatina são apresentados na Tabela 7. As membranas densas em bicamada (MBAD, MBQD) apresentaram uma tendência a maior resistência à tração ( $\sigma$ ) quando comparada à membrana MMAD devido a sua maior espessura, mas sua deformação máxima ( $\epsilon$ ) apresentou tendência de diminuição devido a maior rigidez que uma camada extra provoca na membrana (NG; TAN, 2015). No entanto, não houve diferença estatística entre eles, pois ambos foram secos em estufa.

Quando comparados com as membranas porosas (MBAP, MBQP) foi possível observar que a camada liofilizada era mais frágil e menos flexível, pois o processo de liofilização produz uma estrutura mais porosa, diminuindo sua resistência ao estresse ( $\sigma$ ) e a deformação máxima ( $\epsilon$ ) (POURHAGHGOUY; ZAMANIAN, 2015). Já comparando as membranas de alginato (MBAD, MBAP) com as que possuíam a camada inferior de quitosana (MBQD, MBQP), a menor espessura das camadas de quitosana não resultou em variação significativa tanto na resistência à tração quanto no alongamento na ruptura.

Os resultados das membranas incorporadas com sinvastatina (MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S) demonstraram que a incorporação da sinvastatina não alterou estatisticamente as propriedades mecânicas das membranas. Esse efeito pode ocorrer devido à excelente dispersão e à não ocorrência de reação química entre o fármaco e o alginato (REZVANIAN; MOHDAMIN; NG, 2016).

Tabela 7 - Valores médios de tensão e deformação para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina

Membranas	$\sigma$ (MPa)	$\epsilon$ (%)
MMAD	22,27 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	15,12 $\pm$ 3,00 <sup>a</sup>
MMAD+S	23,27 $\pm$ 2,68 <sup>a</sup>	15,17 $\pm$ 2,48 <sup>a</sup>
MBAD	25,94 $\pm$ 2,85 <sup>a</sup>	14,01 $\pm$ 2,18 <sup>a</sup>
MBAD+S	26,13 $\pm$ 2,97 <sup>a</sup>	14,19 $\pm$ 2,22 <sup>a</sup>
MBAP	16,45 $\pm$ 3,33 <sup>b</sup>	6,29 $\pm$ 1,79 <sup>b</sup>
MBAP+S	16,78 $\pm$ 4,01 <sup>ab</sup>	6,29 $\pm$ 1,51 <sup>b</sup>
MBQD	23,91 $\pm$ 4,612 <sup>ab</sup>	14,51 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup>
MBQD+S	24,03 $\pm$ 4,31 <sup>ab</sup>	14,59 $\pm$ 2,93 <sup>a</sup>
MBQP	11,12 $\pm$ 4,63 <sup>b</sup>	6,70 $\pm$ 2,20 <sup>b</sup>
MBQP+S	11,90 $\pm$ 4,13 <sup>b</sup>	6,80 $\pm$ 2,07 <sup>b</sup>

\* Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 10); letras sobrescritas semelhantes mostram diferença estatística não significativa ( $\alpha = 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os valores de resistência à tração ( $\sigma$ ) das membranas estão dentro dos valores descritos na literatura para curativos ideais, entre 5 e 30 MPa (EVANS et al., 2013). Por outro lado, em relação à deformação máxima ( $\epsilon$ ), as membranas obtiveram valores pouco acima do comumente encontrado em membranas de alginato e quitosana. De acordo com Pires *et al.*, 2018, o valor de deformação máxima ( $\epsilon$ ) para esses curativos variaram entre 4 e 6%, esse aumento pode ser explicado pelo glicerol adicionado em todas as camadas, pois o uso de plastificante aumenta a elasticidade dos materiais. Os resultados da análise mecânica em conjunto com os resultados de espessura demonstram que os curativos densos (MMAD+S, MBAD+S, MBQD+S) são mais finos e possuem uma maior elasticidade, demonstrando assim serem apropriados para lesões em partes do corpo com maior movimento, pois diminuem o desconforto do paciente (devido a constrição/compressão). A literatura mostra que os valores encontrados de resistência à tração e deformação máxima no presente trabalho possuem um alto potencial para uso em aplicações médicas (KOUCHAK; HANDALI; BOROUJENI, 2015).

### **5.1.8 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR)**

A Figura 16 mostra os espectros de FTIR para as membranas e para as membranas carregadas com sinvastatina. Os resultados mostraram que tanto as membranas sem o fármaco quanto carregadas com sinvastatina apresentaram espectros muito semelhantes ao do alginato puro, com suas bandas de vibração características: a região localizada entre 3200 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  (relacionadas às vibrações de alongamento do grupo O–H) (LI *et al.*, 2012), duas bandas diferentes referente as vibrações de grupos carboxílicos (vibrações de alongamento assimétrico em torno de 1593  $\text{cm}^{-1}$  e vibrações de alongamento simétrico em torno de 1418  $\text{cm}^{-1}$ ) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012), pequenas bandas em 2930  $\text{cm}^{-1}$  (relacionados às vibrações de estiramento por grupos saturados C–H) e em 1325  $\text{cm}^{-1}$  (relacionados às vibrações de flexão dos grupos –OH) (REN *et al.*, 2016; KUILA; RAY, 2014) e por fim bandas em torno de 1032  $\text{cm}^{-1}$  (relacionado com a tensão simétrica dos grupos C–O–C) (DONG; YANG; DU, 2006).

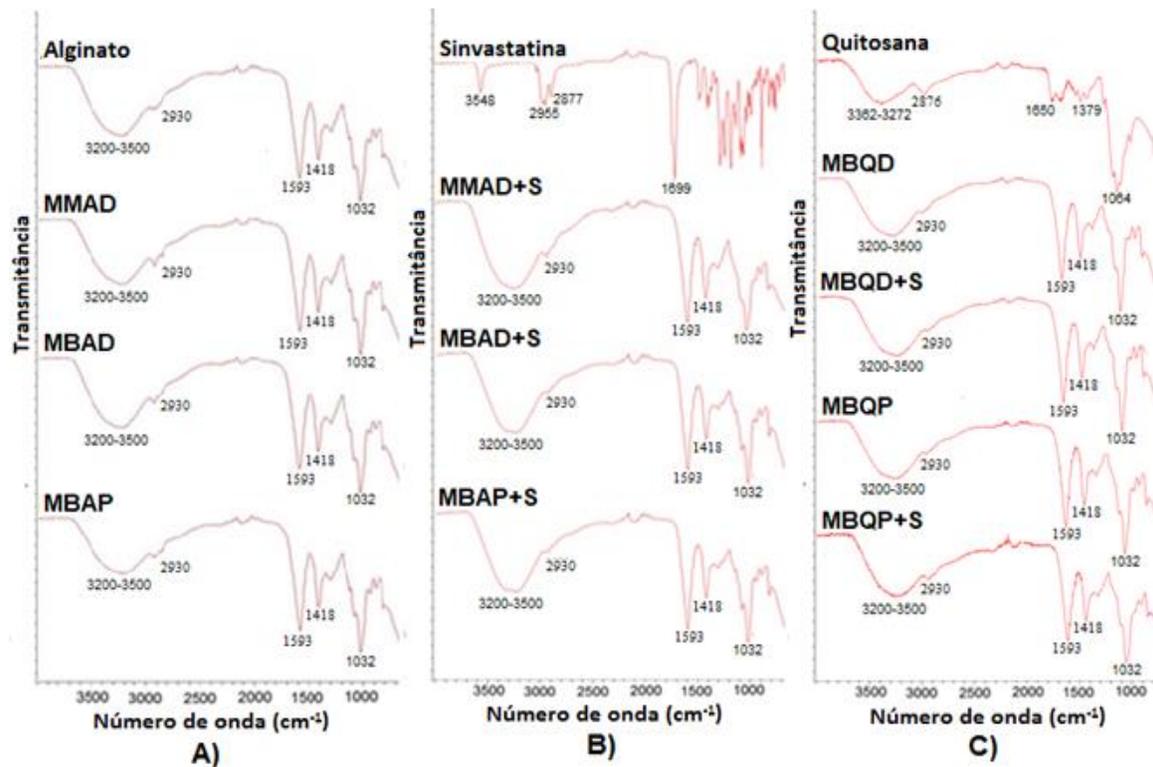
O espectro da sinvastatina possui picos característicos em: 3548  $\text{cm}^{-1}$  (vibração de alongamento OH), 2955  $\text{cm}^{-1}$ , 2877  $\text{cm}^{-1}$  (vibração de alongamento CH) e 1699  $\text{cm}^{-1}$  (vibração de alongamento CO e grupos carbonil CO) (REZVANIAN; MOHDAMIN; NG, 2016). Porém, sua adição não proporcionou diferença significativa no espectro das membranas, esses resultados indicam que não há interação químicas entre o fármaco e a matriz, destacando-se o espectro do alginato devido à baixa concentração de sinvastatina em relação à concentração do polímero (DONG; YANG; DU, 2006).

O espectro da quitosana apresentou seus picos característicos: a banda entre 3362  $\text{cm}^{-1}$  a 3272  $\text{cm}^{-1}$  (corresponde às vibrações de estiramento dos grupos OH e NH), a banda 2876  $\text{cm}^{-1}$  (atribuída à vibração de estiramento do grupo CH), a região 1650  $\text{cm}^{-1}$  (relacionada ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O) e a banda 1585  $\text{cm}^{-1}$  (atribuída à deformação da ligação –NH da amina) e a banda de absorção na região de 1064  $\text{cm}^{-1}$  (corresponde à vibração de estiramento dos grupos C-O-C), característica da estrutura sacarídica da quitosana (DI MARTINO *et al.*, 2017).

Porém, as bandas do espectro de alginato sobressaíram em relação aos da quitosana nas membranas MBQD, MBQD+S, MBQP e MBQP+S, não sendo possível observar

deslocamentos característicos da formação de complexo polieletrólítico, devido ao fato da interação ocorrer apenas nas superfícies das membranas. Segundo Charoenthai *et al.*, 2017 quanto maior a concentração de um determinado polímero em relação ao outro (como no caso da camada de alginato que é mais concentrada que a de quitosana) mais o espectro se aproxima desse polímero.

Figura 16 - Espectros de FTIR para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina.



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.2.10 Propriedades térmicas

As curvas termogravimétricas para as membranas e para as membranas incorporadas com sinvastatina são mostradas na Figura 17. Três eventos de perda de massa térmica podem ser observados para todas as amostras. O primeiro evento (50 - 150 °C) está relacionado à perda de água presente na estrutura molecular do alginato (que é altamente hidrofílica), incluindo moléculas de água solvatadas na superfície (evaporadas entre 40 e

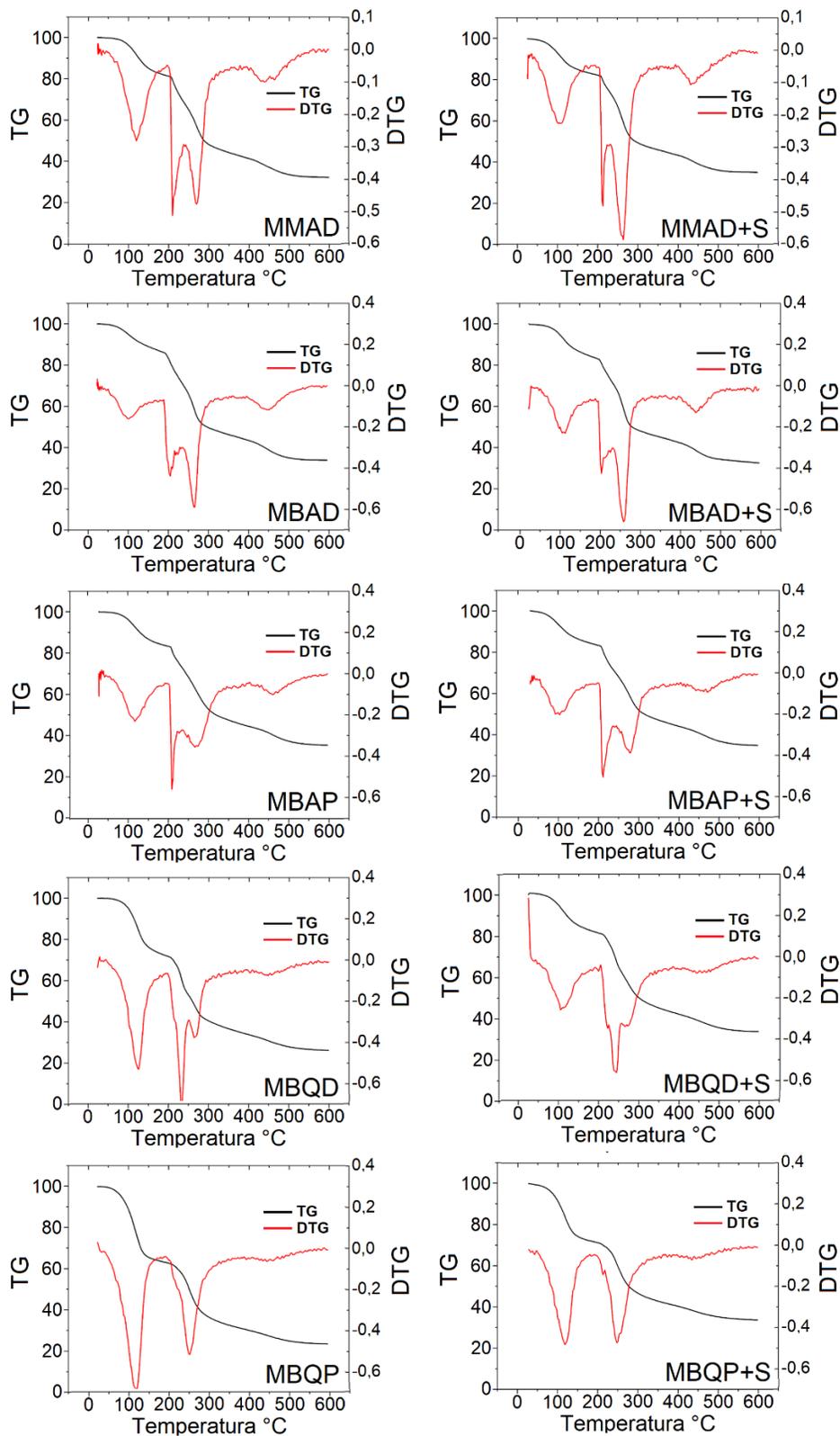
60 °C) e a água intrínseco à estrutura, que é estabilizada por pontes de hidrogênio com grupos hidroxila (removidos acima de 120 °C) (AVELLA *et al.*, 2007).

O segundo evento (150 - 350 °C) corresponde à perda de massa mais expressiva, caracterizando a temperatura de degradação térmica ( $T_{\text{Onset}}$ ) (PEREIRA *et al.*, 2013). Nesta faixa de temperatura ocorre o processo de degradação do alginato, que inclui a despolimerização e formação de cadeias de baixo peso molecular, como pode ser confirmado pelo pico duplo nas respectivas curvas DTG das amostras. Nenhum evento de perda de peso atribuído à sinvastatina foi identificado, embora haja relatos de redução significativa dos valores de  $T_{\text{Onset}}$  na literatura em matrizes poliméricas contendo sinvastatina (BAPTISTA *et al.*, 2016). Portanto, em nosso estudo, a incorporação do fármaco não alterou o perfil de degradação térmica das membranas de alginato.

O terceiro e último evento (350 - 600 °C) está relacionado à decomposição não oxidativa de oligômeros, monômeros e moléculas simples derivadas do processo anterior. Essa decomposição gera uma massa residual composta por cinzas e outros materiais inorgânicos insolúveis (como o carbonato de cálcio) e inorgânicos solúveis (como o carbonato de sódio e o cloreto de sódio), restos do processo de reticulação *in situ* e *ex situ* das membranas e o sal de alginato, respectivamente.

Para os filmes que continham camada de quitosana, observou-se dois picos mais acentuados: o primeiro próximo a 100°C devido ao processo de desidratação, ocorrendo assim a perda da água livre ligada à cadeia de quitosana (grupo OH e NH) e o segundo em torno de 300 °C, devido à desacetilação e despolimerização na camada de quitosana (BRITO; CAMPANA FILHO, 2007). Em todas as membranas pode-se observar um leve aumento na quantidade de massa residual devido à presença da sinvastatina, que gera maior quantidade de sais carbonatos, confirmando a presença do fármaco nas membranas.

Figura 17 - Curvas TGA (preto) e DTG (vermelho) para as membranas e para as membranas carregadas com sinvastatina



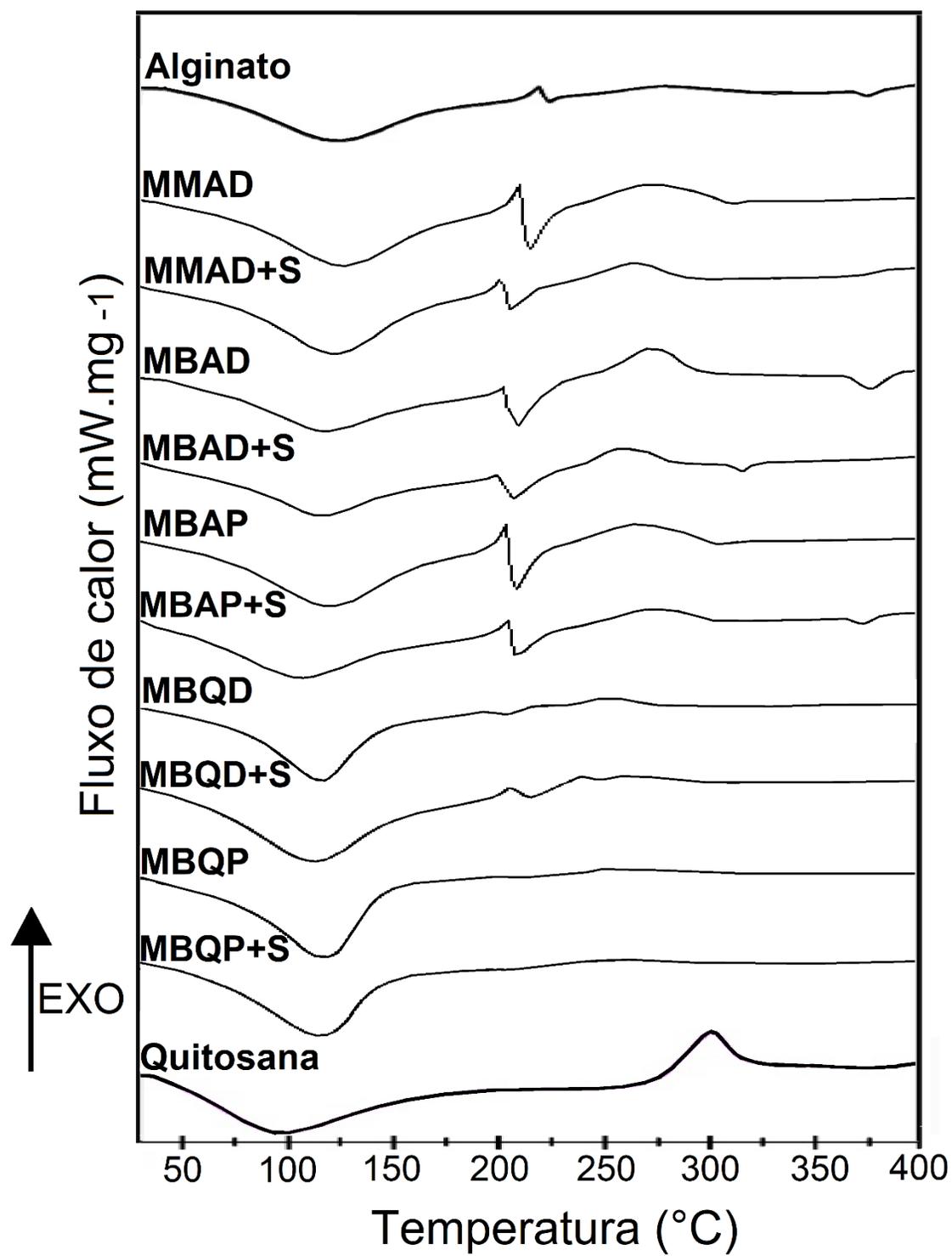
Fonte: elaborado pelo autor.

As curvas DSC de membranas de alginato com e sem a incorporação da sinvastatina são mostradas na Figura 18. As curvas DSC apresentaram três picos, sendo os dois iniciais endotérmicos e o último exotérmico. O primeiro pico endotérmico largo pode estar associado à absorção de energia destinada a quebrar as ligações das moléculas de água (intrínsecas e extrínsecas) presentes na estrutura do alginato. Também pode estar associado ao acúmulo de energia entre as cadeias reticuladas de alginato, o que promove menor rigidez da cadeia polimérica e maior maleabilidade da estrutura, caracterizando um processo de transição reversível (RUSSO; MALINCONICO; SANTAGATA, 2007).

O segundo pico endotérmico (em torno de 225 °C) está diretamente associado à quebra de ligações, promovida pelo processo de reticulação. Isso promove a perda total irreversível da estrutura polimérica. As membranas de alginato densas obtidas por evaporação apresentam estrutura mais compacta e com maior interação/reticulação entre as estruturas, conseqüentemente, a área do pico foi significativamente maior e mais definida. Finalmente, a degradação do polímero é atribuída ao pico exotérmico (275 – 300 °C) (PEREIRA *et al.*, 2013).

As membranas que continham a camada de quitosana também apresentaram um pico endotérmico, porém apresentou um desaparecimento do pico exotérmico (em comparação com o DSC da quitosana pura), indicando que houve perda de organização, devido à formação de ligações iônicas entre quitosana e alginato (ABRUZZO *et al.*, 2013). A incorporação de sinvastatina em membranas mono e bicamada de alginato não alterou as curvas DSC, confirmando que há estabilidade do fármaco com o polímero. Além disso, a ausência de novos picos nas curvas calorimétricas das membranas de alginato com sinvastatina confirma sua pureza.

Figura 18 - Curvas DSC de membranas de alginato com e sem incorporação da sinvastatina.



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.2.11 Uniformidade na Incorporação e Perda do fármaco pós lavagem

As amostras MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S não apresentaram distinção na quantidade de sinvastatina incorporada à membrana, incorporando  $95,46 \pm 1,24\%$  da sinvastatina (conteúdo inicial de cada membrana é de 25 mg de sinvastatina). Após a lavagem a quantidade de fármaco na membrana foi de  $94,60 \pm 1,58\%$  do fármaco adicionado, logo não houve perda significativa durante a lavagem. Uma pequena variação na quantidade de sinvastatina foi observada em diferentes regiões das membranas. A uniformidade na quantidade de fármaco entre as regiões central, intermediária e próxima da borda das membranas foi de  $95\% \pm 0,25\%$ .

Isso indica que o fármaco foi distribuído uniformemente e que os métodos de preparação são reprodutíveis e produzem membranas com composição homogênea. Outros trabalhos que utilizaram membranas de alginato produzidas por evaporação de solvente por convecção obtiveram resultados semelhantes. Por exemplo, Okur *et al.* (2019) encontraram uniformidade em torno de 85% para o antibacteriano mupirocina. Thu e Ng (2013) utilizaram gelatina para melhorar a uniformidade do fármaco na membrana e encontraram uniformidade em torno de 98% para o anti-inflamatório ibuprofeno.

### 5.2.12 Teste de prateleira

As membranas carregadas com sinvastatina (MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S) foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sob 60% de umidade relativa por 6 meses. A quantidade de sinvastatina foi medida após 15, 45, 90 e 180 dias, conforme mostrado na Tabela 8. Em todas as amostras, cerca de 98% do conteúdo inicial do fármaco ainda estava presente na membrana. Após 180 dias, não foram observadas alterações na estrutura e aspecto visual das membranas, permanecendo intactas e com a coloração acastanhado.

Tabela 8 - Quantidade de sinvastatina presente nas membranas após 15, 45, 90 e 180 dias.

Tempo (dias)	Sinvastatina (%)				
	MMAD+S	MBAD+S	MBAP+S	MBQD+S	MBQP+S
15	99,9 ± 1.8 <sup>a</sup>	99,9 ± 1.3 <sup>a</sup>	99,9 ± 1.4 <sup>a</sup>	99,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	99,8 ± 2,6 <sup>a</sup>
45	99,9 ± 1.6 <sup>a</sup>	99,8 ± 1.6 <sup>a</sup>	99,9 ± 1.5 <sup>a</sup>	99,7 ± 1,7 <sup>a</sup>	99,9 ± 2,6 <sup>a</sup>
90	99,8 ± 1.5 <sup>a</sup>	99,5 ± 1.7 <sup>a</sup>	99,9 ± 1.5 <sup>a</sup>	99,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	99,9 ± 2,6 <sup>a</sup>
180	98,9 ± 1.5 <sup>a</sup>	98,5 ± 2.4 <sup>a</sup>	98,9 ± 2.4 <sup>a</sup>	98,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	98,9 ± 1,2 <sup>a</sup>

Fonte: elaborado pelo autor.

Assim, as condições de armazenamento das membranas foram adequadas para preservar a sinvastatina na estrutura. Resultados semelhantes foram encontrados por Okur *et al.* (2019) que para uma membrana polimérica produzida por evaporação de solvente por convecção, não houve alterações na aparência e clareza visual obtidas após 6 meses, mantendo um teor inicial de mupirocina entre 93,8 e 98,4%.

### 5.2.13 Liberação *in vitro*

O perfil cinético de liberação de sinvastatina é apresentado na Figura 19. Após 6 h, a membrana em monocamada MMAD+S liberou  $23,8 \pm 4,1\%$  da sinvastatina inicial, enquanto as membranas em bicamada MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S liberaram  $18,2 \pm 2,4\%$ ,  $23,03 \pm 3\%$ ,  $21,31 \pm 3\%$ ,  $23,2 \pm 3\%$ , respectivamente. Os resultados nas primeiras 6 horas demonstram que as membranas em bicamadas porosas (MBAP+S e MBQP+S) possuem valores muito próximos ao MMAD+S, isso ocorre devido o maior inchamento da camada inferior liofilizada, pois o comportamento do inchamento influencia diretamente na liberação cinética do fármaco (DI MARTINO *et al.*, 2017).

Após as 96 h a membrana em monocamada MMAD+S obteve uma liberação de  $90,3 \pm 4,1\%$ , enquanto as membranas em bicamada MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S liberaram  $46,2 \pm 2,4\%$ ,  $50,6 \pm 6,5\%$ ,  $59,5 \pm 8,9\%$  e  $69,9 \pm 9,6\%$  respectivamente, demonstrando que membranas em bicamada pode sustentar a liberação do fármaco por mais tempo do que a membrana monocamada.

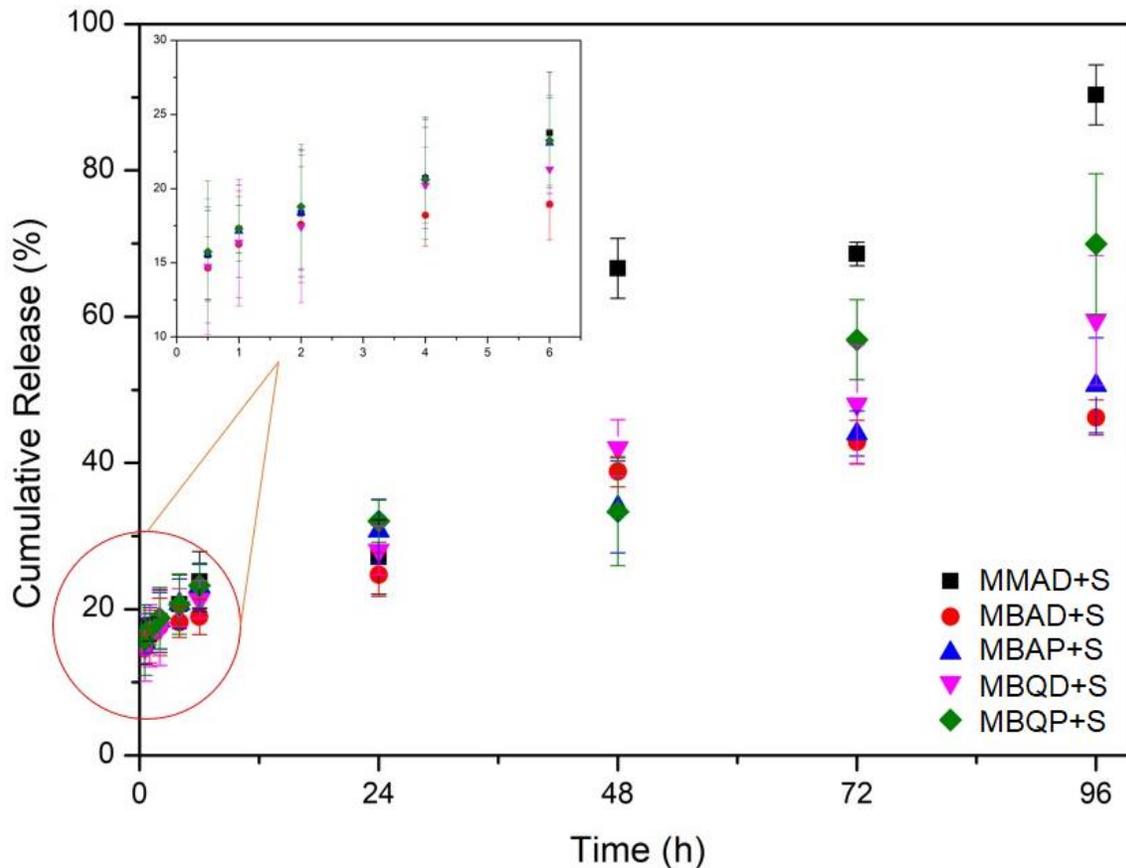
Observou-se também que a menor espessura da camada de quitosana, além de aumentar a TPVA, fez com que o ocorresse uma maior liberação do fármaco. A maior

liberação da MBQP+S também pode ser explicado pelo princípio de erosão da camada liofilizada de quitosana após 24 h, demonstrado no teste de estabilidade em solução.

Conforme relatado anteriormente para diferentes membranas, a liberação sustentada de um curativo medicamentoso é desejada, pois isso pode prolongar sua ação terapêutica. Além disso, ajuda a aumentar a adesão do paciente ao tratamento, pois a frequência de troca do curativo é reduzida, acelerando o processo de cicatrização (KURNIAWAN *et al.*, 2019).

Recentemente, Kiti e Suwantong (2020) investigaram o perfil de liberação do complexo de inclusão curcumina- $\beta$ -ciclodextrina em um curativo de duas camadas em que a camada superior era composta por quitosana e a camada inferior era composta por alginato de sódio incorporado com a curcumina- $\beta$ -ciclodextrina. Os resultados do estudo também demonstraram três estágios de liberação. O primeiro estágio com liberação rápida próximo nos primeiros 30 minutos, o segundo estágio com liberação gradual do fármaco e o terceiro estágio com liberação sustentada que é benéfico para aplicações de longo prazo, mantendo uma concentração terapêutica adequada do fármaco na ferida.

Figura 19 - Liberação in vitro da sinvastatina, apresentada como uma porcentagem da quantidade inicial de fármaco nas membranas versus tempo (h) para membranas. Os resultados são apresentados como porcentagem média e DP (n=3).



Fonte: elaborado pelo autor.

Os principais mecanismos que governam a liberação do fármaco são a degradação, o inchaço e a difusão do polímero (ĆETKOVIĆ et al., 2019; ZHANG et al., 2008). Os modelos cinéticos de liberação de fármacos são essenciais para prever a quantidade total de fármaco liberada em um determinado período sem a necessidade de novos experimentos. Além disso, os parâmetros empíricos podem indicar o mecanismo de liberação do fármaco da matriz polimérica.

Os parâmetros de liberação cinética e coeficientes de regressão dos modelos calculados (Higuchi e Korsmeyer-Peppas) estão listados na Tabela 9. O modelo que melhor se ajustou aos resultados obtidos foi o Korsmeyer-Peppas, apresentando os maiores valores de  $R^2$  para MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S de: 0,95, 0,94 e 0,96,

0,90 e 0,84, respectivamente, onde a taxa foi concentração-dependente, o que significa que quanto maior a concentração inicial, mais rápida a liberação (WOJCIK-PASTUSZKA *et al.*, 2019). Além disso, Korsmeyer-Peppas apresentou ótima modelagem do fenômeno de liberação, com  $n$  menor que 0,5 para todas as membranas, indicando um mecanismo de difusão quase-Fickiano, onde o fármaco foi parcialmente difundido através de uma matriz inchada e porosa cheia de água (SURATMAN *et al.*, 2020).

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos de modelos matemáticos de liberação de sinvastatina.

Membranas	Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$K_H$ ( $h^{-0.5}$ )	$R^2$	$K_P$ ( $\mu g/h^{-n}$ )	$n$	$R^2$
MMAD+S	0.084	0.93	0.148	0.36	0.95
MBAD+S	0.053	0.66	0.134	0.27	0.94
MBAP+S	0.058	0.30	0.159	0.23	0.96
MBQD+S	0.066	0.53	0.133	0.28	0.90
MBQP+S	0.072	0.47	0.150	0.27	0.84

Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação à eficiência no tratamento anti-inflamatório, é necessário avaliar se a quantidade de fármaco liberada (no estudo de liberação *in vitro*) é adequada para aplicações em feridas inflamadas. Uma maneira de determinar essa dosagem é comparando-a com dos medicamentos usados em pomadas comerciais. No entanto, como os estudos sobre o efeito anti-inflamatório da sinvastatina são recentes, ainda não foram produzidas comercialmente pomadas a base de sinvastatina para essa finalidade. Adami *et al.* (2012) produziram uma pomada anti-inflamatória à base de sinvastatina, e constataram que uma pomada contendo 10mg/g do fármaco tem ação anti-inflamatória segura e eficiente. Os produtos comerciais seguem esse mesmo potencial, a concentração dos anti-inflamatórios (diclofenaco, aceclofenaco, nimesulida) utilizados nas pomadas é em torno de 10mg do medicamento por grama de pomada.

A quantidade de pomada contida desde a articulação interfalângica distal até a ponta do dedo indicador de um adulto corresponde em média a 0,5 g de pomada. Essa quantidade de pomada no dedo, quando aplicada e espalhada na pele, cobre uma área de aproximadamente 286 cm<sup>2</sup> (LONG; FINLAY, 1991). Como 0,5 g de pomada contém 5 mg de sinvastatina (considerando uma pomada contendo 10mg/g de sinvastatina), dividindo-

se essa quantidade de fármaco pela área aproximada de pele que será coberta, determina-se a dose terapêutica de sinvastatina em  $17,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

O uso tópico é recomendado a cada 6 ou 8 horas (DERRY *et al.*, 2016), nas primeiras 6 horas, as membranas MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S, MBQP+S obtiveram uma liberação de  $88,37 \pm 15,01$ ,  $70,46 \pm 9,01$  e  $85,83 \pm 11,26$ ,  $86,85 \pm 9,54$  e  $86,45 \pm 11,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Observa-se que nas primeiras horas a dosagem obtida nas liberações foi superior ao recomendado, pois este é o momento em que há a inflamação mais significativa, com o passar do tempo a dosagem vai diminuindo enquanto ocorre a cicatrização, de modo que nas últimas 6 horas (ao final dos 4 dias de tratamento) as membranas MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S, MBQP+S obtiveram uma liberação média em torno de 21, 11, 12, 14 e 16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente.

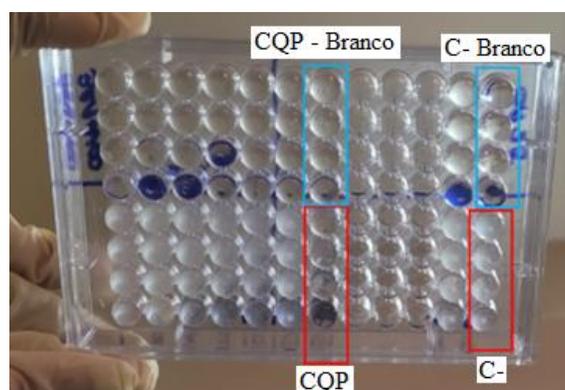
Assim, a dosagem utilizada pode ser considerada adequada para uso em feridas, demonstrando a não necessidade de troca de curativos. Para tratamentos de feridas crônicas as membranas em bicamada (MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S e MBQP+S) se mostraram mais adequadas (podem sustentar o tratamento por tempo um tempo maior), destacando as membranas porosas (MBAP+S e MBQP+S) em feridas que apresentem sinais de inflamação aguda.

#### **5.2.14 Ensaio de atividade antimicrobiana**

As membranas porosas (MBAP+S e MBQP+S) se destacaram no tratamento de feridas que apresentem sinais de inflamação aguda por possuírem uma liberação mais rápida do fármaco nas primeiras horas. Porém nessas feridas podem aparecer secreção amarelada, mau cheiro, agravamento da dor, vermelhidão ou inchaço. Esses são os principais sintomas de uma lesão infectada por bactéria, logo para estas feridas é essencial um curativo com atividade antibacteriana. A quitosana presente na camada inferior da MBQP+S (CQP) tem sido utilizada como agente antibacteriano por vários autores por causa da interação entre a quitosana (carregada positivamente) com as paredes celulares das bactérias (carregadas negativamente) que, por consequência, resulta na interrupção da atividade bacteriana (PASARIBU *et al.*, 2023). Assim, foi realizado o ensaio de atividade antimicrobiana na CQP.

A Figura 20 mostra a placa de poços usada no teste antibacteriano, visivelmente a fileira da amostra CQP apresenta inibição sem turvação do poço quando comparado ao controle de suspensão de bactéria somente em meio. Além disso, os poços de branco se apresentaram visualmente e pela absorbância similares. O resultado do ensaio de atividade antimicrobiana demonstrou para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia Coli* (ATCC 11303) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) uma inibição de crescimento de  $100,00 \pm 0,60$ ,  $100,00 \pm 0,44$  e  $99,99 \pm 0,25$  %, respectivamente.

Figura 20 - Placa de poços usada no teste antibacteriano



Fonte: elaborado pelo autor.

Resultados promissores de atividade antibacteriana também foram descritos por Kiti e Suwantong (2020) que estudaram separadamente a atividade da camada de quitosana de uma membrana em bicamada, os resultados mostraram uma redução percentual de 84,10 e 88,79% da atividade das bactérias *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Outra forma de estudar o efeito antibacteriano da quitosana foi relatado por Pasaribu *et al.* (2023), os autores colocaram em contato periódico o curativo contendo quitosana em feridas de ratos para exame microbiológico. A partir dos resultados concluíram que o conteúdo de quitosana na amostra tinha propriedades antibacterianas que desempenhavam um papel na prevenção do crescimento das bactérias, pois os ratos tratados com as amostras apresentaram menores quantidades de bactérias nas feridas. Dessa forma a MBQP+S demonstrou ser ideal para o tratamento de feridas infeccionadas.

### 5.2.15 Ensaio de citotoxicidade indireta

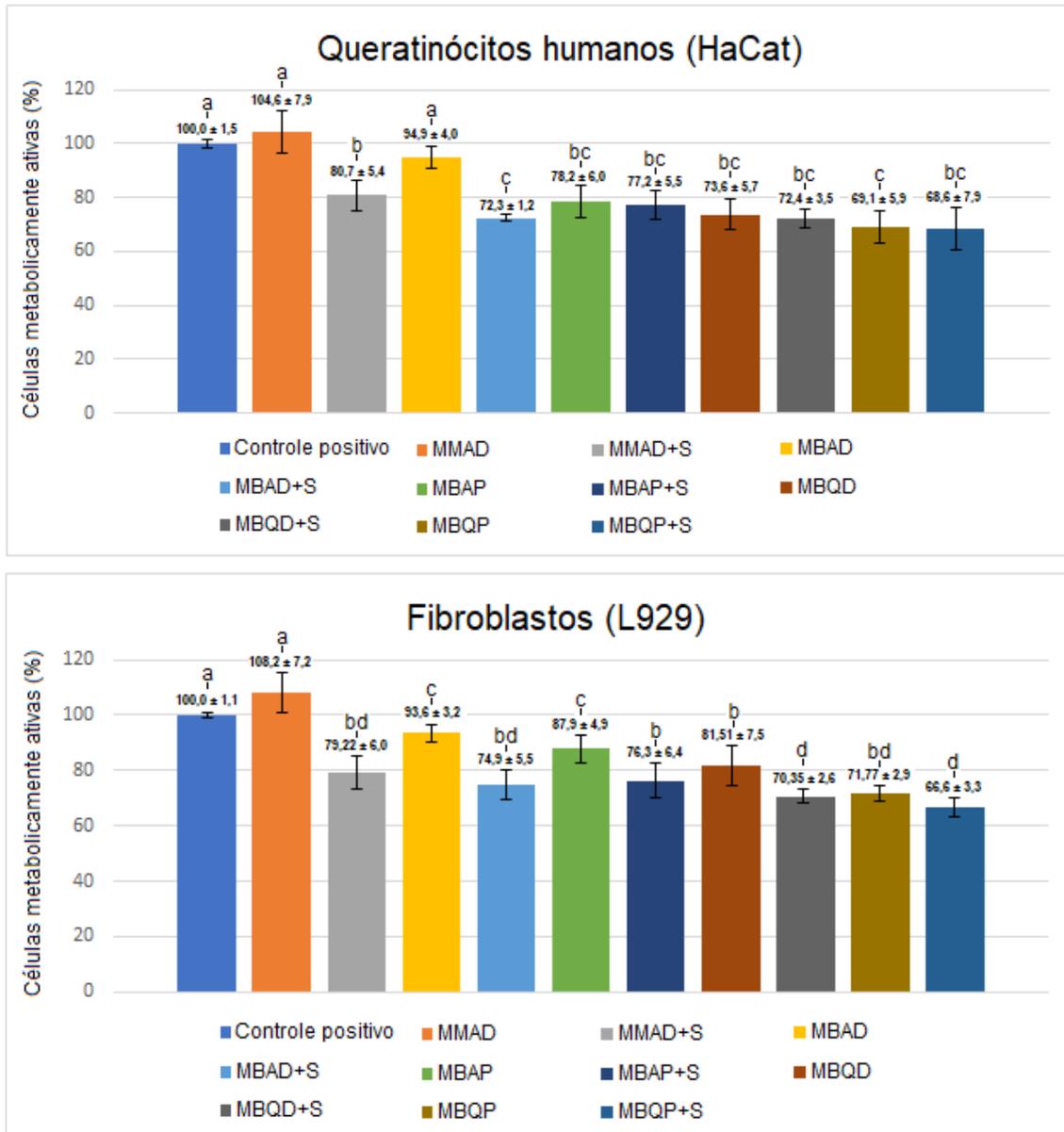
As membranas usadas como curativos não devem ser tóxicas para o tecido epidérmico (CUBAYACHI *et al.*, 2019). Portanto, as membranas incorporadas com sinvastatina foram avaliadas por meio de ensaios de viabilidade celular, utilizando células de queratinócitos (células predominantes na epiderme) e fibroblastos (principais células da derme). Os resultados dos testes de citotoxicidade indireta são mostrados na Figura 21 para 24 h de incubação das membranas em meio DMEM.

Os resultados obtidos para MMAD, MBAD e MBAP, indicam que a utilização de uma camada extra na membrana (membranas em bicamada) influenciou significativamente a viabilidade celular tanto dos queratinócitos quanto dos fibroblastos, possivelmente devido à maior quantidade de glicerol utilizada para produção das membranas em bicamada (camada extra). No entanto, o processo de secagem utilizado não alterou o perfil metabólico das células.

A incorporação da sinvastatina promoveu uma redução na viabilidade das células, devido à hidrofobicidade do fármaco que permite a penetração passiva da sinvastatina nas membranas celulares, afetando a bioquímica celular, causando assim a morte (KUPCSIK *et al.*, 2009). De acordo com os resultados da análise de liberação, nas 24 h de incubação, as membranas MMAD+S, MBAD+S, MBAP+S, MBQD+S, MBQP+S liberaram cerca de 336, 172, 188, 221 e 260 µg, respectivamente, de sinvastatina, resultando nesta diminuição da viabilidade celular.

A membrana MBQP apresentou uma maior citotoxicidade antes e após a incorporação de sinvastatina para as células HaCat e após a incorporação para os fibroblastos. Entretanto, mesmo com essa maior citotoxicidade, as membranas apresentaram valores muito próximos de 70%, valor este considerado adequado para aplicações biomédicas (LIN *et al.*, 2013).

Figura 21 - Citotoxicidade indireta das membranas antes e após a incorporação de sinvastatina para cultura de 24 horas com queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos (L929).



Fonte: elaborado pelo autor.

Pelos resultados das caracterizações foi possível inferir uma sugestão de tratamento adequado para cada tipo de membrana. A Tabela 10 mostra as principais características e tratamento adequado para cada tipo de membrana.

Tabela 10 - Principais características e tratamento adequado para cada tipo de membrana.

<b>Membranas</b>	<b>Principais características</b>	<b>Tratamento adequado (sugestão)</b>
MMAD+S	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Menor absorção de exsudato</li> <li>-Maior permeação de vapor</li> <li>-Maior flexibilidade e resistência à tração.</li> <li>-Liberação mais rápida de sinvastatina.</li> </ul>	Feridas superficiais, podendo ser utilizada em locais do corpo com maior movimento.
MBAD+S	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Maior absorção de exsudato</li> <li>-Menor permeação de vapor</li> <li>-Maior flexibilidade e resistência à tração.</li> <li>-Liberação mais lenta de sinvastatina.</li> </ul>	Feridas exsudativas que necessitem de uma maior hidratação, podendo ser utilizada em locais do corpo com maior movimento e em aplicações de longo prazo.
MBAP+S	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Maior absorção de exsudato</li> <li>-Maior permeação de vapor</li> <li>-Menor flexibilidade e resistência à tração.</li> <li>-Liberação mais lenta de sinvastatina.</li> </ul>	Feridas exsudativas, podendo ser utilizada em aplicações de longo prazo.
MBQD+S	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Menor absorção de exsudato</li> <li>-Maior permeação de vapor</li> <li>-Menor flexibilidade e resistência à tração.</li> <li>-Liberação mais lenta de sinvastatina.</li> </ul>	Feridas superficiais, podendo ser utilizada em locais do corpo com maior movimento e em aplicações de longo prazo.
MBQP+S	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Maior absorção de exsudato</li> <li>-Maior permeação de vapor</li> <li>-Menor flexibilidade e resistência à tração.</li> <li>-Liberação mais rápida de sinvastatina.</li> <li>-Efeito antibacteriano</li> </ul>	Feridas exsudativas infectadas por bactérias.

Fonte: elaborado pelo autor.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho produziu uma membrana em monocamada e quatro em bicamada, de modo que as em bicamadas não apresentaram separação das camadas. Com exceção da MBQP que possui, em sua superfície inferior, uma coloração branca, as membranas apresentaram coloração marrom claro. As membranas densas demonstraram uma aparência translúcida, enquanto as que possuem camada liofilizada se apresentaram opacas devido à presença de poros, que impedem a reflexão da luz. Não houve diferença visual na camada superior das membranas.

A utilização de maior concentração de íons cálcio na reticulação *in situ* resultou em uma maior rigidez, menor umidade e menor intumescimento na membrana. As camadas inferiores porosas das membranas aumentaram o grau de intumescimento e espessura devido aos poros em sua estrutura, mas apresentaram diminuição no peso e no teor de umidade quando comparado com as membranas densas. Já as membranas que possuíam camada inferior de quitosana demonstraram um menor peso, espessura, teor de umidade e grau de intumescimento que as produzidas apenas com alginato. Todas as membranas se mantiveram estáveis no período de 96 horas.

Na análise morfológica da superfície das camadas inferiores pode se observar nas camadas liofilizadas características de superfície porosa e nas secas na estufa uma superfície lisa sem porosidade superficial, característica de um material denso. Na morfologia transversal das membranas em bicamada foi possível observar o ponto de interseção entre as camadas. As membranas apresentaram TPVA e valores de resistência à tração ideais para aplicações como curativo.

Nas análises térmicas, observou-se que os resultados estão de acordo com o reportado na literatura, não foram observadas alterações relevantes entre as membranas densas e porosas e confirmou-se a presença do fármaco nas membranas. Pelos resultados do FTIR foi possível demonstrar a ausência de interação química entre a sinvastatina e a matriz.

Observou-se uma uniformidade no teor do fármaco, com pequena variação entre os pontos da superfície (aproximadamente  $0,5 \pm 0,25\%$ ), mantendo-se em torno de 98% do fármaco após 6 meses a 25°C. Ao final de 96 horas, a membrana em monocamada liberou

em torno de 90% do fármaco, enquanto as membranas em bicamada apresentaram uma liberação lenta entre 45 e 70%, essencial para a manutenção de um tratamento terapêutico adequado de longo prazo. Mostraram-se não citotóxicas com atividade antibacteriana na camada de quitosana porosa.

Por fim, a partir das principais características de cada membrana, foi possível recomendar uma sugestão de tratamento adequado para cada tipo de membrana, destacando-se dentre elas a MBAD+S, pois, mesmo utilizando um processo mais simples e barato de secagem, apresentou uma maior variedade de aplicações.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

-Adicionar nas camadas inferiores um outro princípio ativo para assim proporcionar novas propriedades as membranas, como efeito analgésico ou antifúngico;

-Realizar testes *in vivo*, monitorando a migração das células epiteliais nos tecidos lesionados;

- Avaliar clinicamente as membranas em pacientes que sofrem com feridas complexas;

-Realizar teste anti-inflamatório com a sinvastatina;

-Realizar testes hemolítico e de coagulação.

## REFERÊNCIA

ABRUZZO, A. *et al.* Chitosan/Alginate Complexes for Vaginal Delivery of Chlorhexidine Digluconate. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, 651–658, 2013.

ADAMI, M. *et al.* Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, n. 2, 127–135, 2012.

AHMAD, R.; NAWAWI, W. M. F.; NASARUDDIN R. R. Alginate and alginate composites for biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 280-306, 2021.

AHMED, A.; GETTI, G.; BOATENG, J. Medicated multi-targeted alginate-based dressings for the potential treatment of mixed bacterial-fungal infections in diabetic foot ulcers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 606, p.120903, 2021.

AL-GHOUL, W. M. *et al.* Evidence for simvastatin anti-inflammatory actions based on quantitative analyses of NETosis and other inflammation/oxidation markers. **Results in Immunology**, v. 4, p. 14, 2014.

ALAM, S. *et al.* Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, p. 22-29, 2008.

ALEMDAROĞLU, C. *et al.* Na investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v. 32, p. 319-327, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa) **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília, 2017.

ARMENTADO, I. *et al.* Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n.11, p. 2126-2146, 2010.

AVELLA, M. *et al.* Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: influence of microstructure on chemical-physical properties, **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 131-140, 2007.

BAPTISTA, J. G. C. *et al.* Does poly(vinyl alcohol) act as an amphiphilic polymer? An interaction study with simvastatin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 222, p. 287-294, 2016.

BAKSHI, P. S. *et al.* Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 150, p. 1072-1083, 2020.

BASTARDA, A. *et al.* Fast analysis of pravastatin in production media. **Journal of Chromatography**, v. 822, p. 311-315, 2005.

BAVARSAID, N. *et al.* Preparation and physicochemical characterization of topical chitosan-based film containing griseofulvin- loaded liposomes, **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 7, p. 91, 2016.

BHARATHI, R. *et al.* Chitosan-based scaffolds as drug delivery systems in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 132-153, 2022.

BIERHALZ, C. K. *et al.* Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 76, p. 74, 2013.

BIERHALZ, A. C. K.; WESTIN, C. B.; MORAES, A. M. comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 496, 2016.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653-3680, 2015.

BOATENG, J. S. *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2892, 2008.

BOATENG, J. S.; PAWAR, H. V.; TETTEH, J. Polyox and carrageenan based composite film dressing containing anti-microbial and anti-inflammatory drugs for effective wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, p. 181–191, 2013.

BOEKEMA, B. K. H. L. *et al.* Effect of pore size and cross-linking of a novel collagen-elastin dermal substitute on wound healing. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, p. 423–433, 2014.

BRITO, D.; CAMPANA FILHO, S. P.; Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica Acta**, n 465: p. 73-82, 2007.

BUTOLA, B. S. Recent advances in chitosan polysaccharide and its derivatives in antimicrobial modification of textile materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 905–912, 2018.

CACCAVO, D. An overview on the mathematical modeling of hydrogels' behavior for drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, p. 175 – 190, 2019.

CARVALHO, I.; CAMPO, L. V. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química nova**. v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

ĆETKOVIĆ, Z.; CVIJIC, S.; VASILJEVIĆ, D. Formulation and characterization of novel lipid-based drug delivery systems containing polymethacrylate polymers as solid carriers for sustained release of simvastatin, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, n. 53, p. 101222, 2019.

CHAROENTHAI, N.; KLEINEBUDDE, P.; PUTTIPIATKHACHORN, S. Use of chitosan-alginate as alternative pelletization aid to macrocrystalline cellulose in extrusion/spheronization, **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 96, p. 2469–2484, 2007.

CHEN, Y. *et al.* Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics, **Molecules**. v. 17, p. 5972, 2012.

CHOI, C.; NAM, J. P.; NAH, J. W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 33, p. 1-10, 2016.

CLASEN, C.; WILHELMS, T.; KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

CRUZ, J. B. *et al.* Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. **Revista Matéria**, v.21, n.1, p. 129 – 140, 2016

CRUZ, M. A. **Quitosana, alginato e antimicrobiano compõem curativo para queimaduras**. Jornal da Unicamp, Campinas, 2011. Disponível em: [https://www.unicamp.br/unicamp\\_hoje/ju/agosto2011/ju502pdf/Pag05.pdf](https://www.unicamp.br/unicamp_hoje/ju/agosto2011/ju502pdf/Pag05.pdf). Acesso em: 10 jan 2023.

CUBAYACHI, C. *et al.* Silk fibroin films stabilizes and releases bioactive insulin for the treatment of corneal wounds, **European Polymer Journal**, v. 118 , p. 502–513, 2019.

DASH, S. *et al.* Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DEVARAJ, S.; CHAN, E.; JIALAL, I. Direct demonstration of an anti-inflammatory effect of simvastatin in subjects with the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 11, p. 4489-4496, 2006.

DERRY, S. *et al.* Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, 2016.

DI MARTINO, A. *et al.* Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burstreduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 613–624, 2017.

DOLLY, P. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) by spray-freezedrying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsultaion**, v. 28. n. 6, p. 568-574, 2011

DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. Alginate/gelation blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science**, v. 280, p. 37-44, 2006.

ELDEEB, A. E. *et al.* 3D nanocomposite alginate hydrogel loaded with pitavastatin nanovesicles as a functional wound dressing with controlled drug release; preparation, in-vitro and in-vivo evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 71, p. 103292, 2022.

ELSNER, J. J.; ZILBERMAN, M. Novel antibiotic-eluting wound dressings: An in vitro study and engineering aspects in the dressing's design Author links open overlay panel, **Journal of Tissue Viability**, v. 19, p. 54-66, 2010.

EVANS, N. D. *et al.* Mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche, **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 28, p. 397-409, 2013.

EVRANOS, B.; AYCAN, D.; ALEMDAR, N. Production of ciprofloxacin loaded chitosan/gelatin/bone ash wound dressing with improved mechanical properties, **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 115007, 2019.

FAN, L. *et al.* Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 447- 452, 2006.

FERREIRA, M. C. *et al.* Complex wounds. **Clinics**, v.61, n. 6, p.571-8, 2006.

FOLLI, C. *et al.* Effect of statins on fibroblasts from human nasal polyps and turbinates. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, v. 40, n. 3, p. 84-89, 2008.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinetica das estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 9-14, 2005.

FUKUI, T. *et al.* Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 5, p. 1118-1131, 2012.

GANESAN, P. Natural and bio polymer curative films for wound dressing medical applications. **Wound Medicine**, v. 18, p. 33–40, 2017.

GAO, C.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Properties of glycerol-plasticized alginate films obtained by thermo-mechanical mixing. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 414-420, 2017.

GARIP, S. *et al.* Evaluation and discrimination of simvastatin-induced structural alterations in proteins of different rat tissues by FTIR spectroscopy and neural network analysis. **Analyst**, v.135, p. 3233-41, 2010.

GEORGE M.; ABRAHAM T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.

GHOSAL K. *et al.* Synthesis and characterization of interpenetrating polymeric networks based bio-composite alginate film: A well-designed drug delivery platform. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 645–654, 2019.

GOMES, F. V. L.; COSTA, M. R.; MARIANO, L. A. A. Avaliação e tratamento de feridas- Manual de Curativos. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar Serviço de Controle de Infecção Hospitalar- CCIH, 2005.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Physical and antimicrobial properties of sodium alginate/carboxymethyl cellulose films incorporated with cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 35–42, 2018.

HO, M. L. *et al.* Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 4, p. 296-303, 2009.

INFOMED. **Base de dados de medicamentos de uso humano**. 2020. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>. Acesso em: 13 set. 2020.

JIAN, H. *et al.* Galactomannan (from *Gleditsia sinensis* Lam.) and xanthan gum matrix tablets for controlled delivery of theophylline: In vitro drug release and swelling behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2176–2182, 2012.

KHALIQ, T. *et al.* Self-crosslinked chitosan/k-carrageenan-based biomimetic membranes to combat diabetic burn wound infections, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 197, p.157-168, 2022.

KITI, K.; SUWANTONG, O. Bilayer wound dressing based on sodium alginate incorporated with curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex/chitosan hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4113–4124, 2020.

KOUCHAK, M.; HANDALI, S.; BOROUJENI, B. N. Evaluation of the Mechanical Properties and Drug Permeability of Chitosan/Eudragit RL Composite Film, **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 6, p. 14-19, 2015.

KUILA, S. B.; RAY, S. K. Separation of benzene–cyclohexane mixtures by filled blend membranes of carboxymethyl cellulose and sodium alginate, **Separation and Purification Technology**, v. 123, p. 45, 2014.

KUPCSIK, L. *et al.* Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related, **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, p. 4465-4473, 2009.

KURNIAWAN, A. *et al.* transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drug by macroporous poly(vinyl alcohol)-graphene oxide nanocomposite films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p. 708-716, 2019.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**. v.32, n. 3. São Paulo, 2009.

LAO, L. L.; VENKATRAMAN, S. S.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v, 70, p. 796–803, 2008.

LEE, J. H. *et al.* Lack of neuroprotective effects of simvastatin and minocycline in a model of cervical spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 1, p. 219-230, 2010.

LEE, K.Y.; MOONEY, D. J.; Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106–126, 2012.

LEE, Y. *et al.* The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1940–1944, 2008.

LI, Y. *et al.* Enhanced anti-swelling property and dehumidification performance by sodium alginate–poly(vinyl alcohol)/polysulfone composite hollow fiber membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 211, p. 407–408, 2012.

LIN, W. C. *et al.* Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 603, 2013.

LONG, C. C.; FINLAY, A. Y. The finger-tip unit-a new practical measure. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 16, n. 6, p. 444–447, 1991.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrófilos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143 - 154, 2005.

MA, J. *et al.* A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, v. 22, n. 4, p. 331–336, 2001.

MASOOD, S. H. Application of fused deposition modelling in controlled drug delivery devices. **Assembly Automation**, v. 27, n. 3, p. 325-22, 2007.

MAVER, L. *et al.* Layering of different materials to achieve optimal conditions for treatment of painful wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, p. 576-588, 2017.

MAYET, N. *et al.* A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2211–2230, 2014.

MI, F. L. *et al.* Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, p. 165-173, 2001.

MISAL, R.; ATISH, W.; AQUEEL, S. Matrix tablets: a promising technique for controlled drug delivery. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 5, p. 3791-3805, 2013.

MOGOȘANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and Synthetic Polymers for Wounds and Burns Dressing. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 463 n. 2, p. 127–136. 2014.

MONTEIRO, R. T. *et al.* Production and characterization of alginate bilayer membranes for releasing simvastatin to treat wounds. **Biointerphases**, v. 15, p. 041002, 2020.

MORGADO, P. I.; AGUIAR-RICARDO, A.; CORREIA, I. J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship, **Journal of Membrane Science**, v. 490, p. 139-15, 2015.

MUKHOPADHYAY, P. *et al.* Formulation of pH-responsive carboxymethyl chitosan and alginate beads for the oral delivery of insulin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 32, p. 835, 2013.

MURTAZA, G. Solubility enhancement of simvastatin: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 4, p. 581-590, 2012.

MUSIAL, J. *et al.* Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. **International Journal of Cardiology**, v. 77, p. 247-253, 2001.

NASSAR, P. O. *et al.* Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 4, 2009.

NEMATPOURA, N. *et al.* The application of nanomaterial science in the formulation a novel antibiotic: Assessment of the antifungal properties of mucoadhesive clotrimazole loaded nanofiber versus vaginal films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, p. 110635, 2020.

NG, S. F.; TAN, S. L. Development and in vitro assessment of alginate bilayer films containing the olive compound hydroxytyrosol as an alternative for topical chemotherapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, p. 798–806, 2015.

OKUR, Ü. *et al.* An alternative approach to wound healing field; new composite films from natural polymers for mupirocin dermal delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p.738, 2019.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 32, n. 2, p. 194-201, 2019.

PASARIBU, K. M. *et al.* Bioactive bacterial cellulose wound dressings for burns with collagen in-situ and chitosan ex-situ impregnation. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 230, p. 123118, 2023.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications, **Biomaterials**, v. 33, p. 3279–3305, 2012.

PELLÁ, M.G. *et al.* Chitosan-based hydrogels: from preparation to biomedical applications, **Carbohydrate Polymers**. v. 196, p. 233–245, 2018.

PEPPAS, N. A; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

PEREIRA, R. *et al.* Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 221–230, 2013.

PIRES, A. L. R. *et al.* Towards wound dressings with improved properties: Effects of poly(dimethylsiloxane) on chitosan-alginate films loaded with thymol and beta-carotene. **Materials Science and Engineering: C**, v. 93, p. 595-605, 2018.

POURHAGHGOUY, M; ZAMANIAN, A. Physical and Mechanical Properties of the Fully Interconnected Chitosan Ice-Templated Scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 41476-41482, 2015.

PRADEEP, A. R. *et al.* Clinical efficacy of subgingivally delivered 1.2-mg simvastatin in the treatment of individuals with class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 12, p.1472-1479, 2012.

PRADEEP, A. R.; THORAT, M. S. Clinical effect of subgingivally delivered simvastatin in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 2, p. 214-222, 2010.

QIN, Y. The Characterization of Alginate Wound Dressings with Different Fiber and Textile Structures. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, p. 2516-2520, 2006.

RAHMANI DEL BAKHSHAYESH, A. *et al.* Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 691–705, 2018.

REN, H. *et al.* Efficient Pb(II) removal using sodium alginate-carboxymethyl cellulose gel beads: Preparation, characterization, and adsorption mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 402-409, 2016.

REZVANIAN, M. *et al.* Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 131-140, 2017.

REZVANIAN, M.; MOHDAMIN, M. C. I.; NG, S. F. Development and physicochemical characterization of alginate composite film loaded with simvastatin as a potential wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 295, 2016.

REZVANIAN, M.; NG, S.F.; ALAVI, T. Ahmad W. In-vivo evaluation of Alginate-Pectin hydrogel film loaded with Simvastatin for diabetic wound healing in Streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 308–319, 2021.

RODRIGUES, A. P. **Produção e caracterização de micropartículas de alginato incorporando Aeromonas Hydrophila inativada para imunização de tilápia do nilo por via oral.** 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

RUSSO, R.; MALINCONICO, M.; SANTAGATA, G. Effect of cross-Linking with calcium ions on the physical properties of alginate films, **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3193–3197, 2007.

SACCHETIN, P. S. C. *et al.* Properties of PLA/PCL particles as vehicles for oral delivery of the androgen hormone 17 $\alpha$ -methyltestosterone. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, n. 2016, p. 870–881, 2016.

SANKALIA, M. G. *et al.* Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 215-232, 2007.

SANTOS, C. A. N. S. **Propriedades de filmes de quitosano-influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero.** 2006. Dissertação (Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro – Portugal, 2006.

SMANIOTTO, P. H. S. *et al.* Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 4, p. 623, 2012.

STRACCIA, M. C. *et al.* Alginate Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2890, 2015.

SURATMAN, A. *et al.* Controlled Release Fertilizer Encapsulated by Glutaraldehyde-Crosslinked Chitosan Using Freeze-Drying Method, **Indonesian Journal of Chemistry**, n. 20, p. 1414-1421, 2020.

SUTAR, T. *et al.* Herbal hemostatic biopolymeric dressings of alginate/pectin coated with Croton oblongifolius extract, **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100025, 2021.

SUTHANTHIRAN, T. K. *et al.* Collagen with simvastatin promotes cell metabolism in osteoblast-like SaOS-2 cells. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, n. 4, p. 142, 2012.

THU, H. E.; ZULFAKAR, M. H.; NG, S. F. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, p. 4341–4342, 2012.

THU, H. E.; ZULFAKAR, M. H.; NG, S. F. Gelatine enhances drug dispersion in alginate bilayer film via the formation of crystalline microaggregates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 99-106, 2013.

VAKILIAN, S. *et al.* competitive nature-derived multilayered scaffold based on chitosan and alginate, for full-thickness wound healing, **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117921, 2021.

VARAPRASAD, K. *et al.* Alginate-based composite materials for wound dressing application: a mini review. **Carbohydrate Polymers**, v. 236 p. 116025, 2020.

VARGAS, P. O. **Secagem de partículas de alginato de cálcio**. 2017. 75f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

VASCONCELOS, N. F. *et al.* Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. **Cellulose**, v. 27, p. 3055-3083, 2020.

WANG, L. *et al.* Novel bilayer wound dressing composed of SIS membrane with SIS cryogel enhanced wound healing process, **Materials Science and Engineering: C**, v. 85, p. 162, 2017.

WOJCIK-PASTUSZKA, D. *et al.* Evaluation of the Release Kinetics of a Pharmacologically Active Substance from Model Intra-Articular Implants Replacing the Cruciate Ligaments of the Knee, **Materials**, v. 12, p. 1202, 2019.

WU, Z. *et al.* The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 37, n. 2, p. 170-176, 2008.

WUA, J. *et al.* Mechanism of a long-term controlled drug release system based on simple blended electrospun fibers. **Journal of Controlled Release**, v. 320, p. 337, 2020.

YAMAURA, M. A química das quitosanas. Disponível em: [https://www.crq4.org.br/quimica\\_viva\\_a\\_quimica\\_das\\_quitosanas](https://www.crq4.org.br/quimica_viva_a_quimica_das_quitosanas). Acesso em: 10 jan 2023.

YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L. Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 7, p. 941-946, 2000.

YANG, J. S.; XIE, Y. J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 33–39, 2011.

YASASVINI, S. *et al.* Topical hydrogel matrix loaded with Simvastatin microparticles for enhanced wound healing activity. **Materials Science and Engineering**, v. 72, p. 160, 2017.

ZHANG, X.; YANG, D.; NIE, J. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 43, p. 456-462, 2008.

ZHOU, M. *et al.* Development of nano silver doped carboxymethyl chitosan-polyamideamine alginate composite dressing for wound treatment, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1335–1351, 2021.