



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I-CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NATAN EMANUELL DE SOBRAL E SILVA**

**FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM SINVASTATINA PARA  
INFLAMAÇÕES CUTÂNEAS**

**Campina Grande-PB  
2015**

**NATAN EMANUELL DE SOBRAL E SILVA**

**FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM SINVASTATINA PARA  
INFLAMAÇÕES CUTÂNEAS**

Documento de dissertação apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno**

**Coorientadora: Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima**

**Campina Grande–PB  
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586f Silva, Natan Emanuell de Sobral e.  
Filmes poliméricos de quitosana com sinvastatina para inflamações cutâneas [manuscrito] / Natan Emanuell de Sobral e Silva. - 2015.  
108 p. : il. color.

Digitado.  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.  
"Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia".  
"Co-Orientação: Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima, Departamento de Farmácia".  
1. Atividade anti-Inflamatória. 2. Biopolímero. 3. Filmes de quitosana 4. Estatina. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

**NATAN EMANUELL DE SOBRAL E SILVA**

**FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM SINVASTATINA PARA  
INFLAMAÇÕES CUTÂNEAS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**APROVADO EM 28/08/2015**

**BANACA EXAMINADORA**



Prof Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno  
Departamento de Farmácia/UEPB  
Orientador(a)



Prof Dr. Toshiyuki Nagashima Júnior  
Departamento de Farmácia/UFCG  
Examinador interno



Prof Dr. Adley Antonini Neves de Lima  
Departamento de Farmácia/UFRN  
Examinador externo

## DEDICATÓRIA

À minha avó (IN MEMORIAN) por ter sempre acreditado em mim e nos meus sonhos. À minha família, em especial, minha mãe por seus sábios conselhos e incentivos fundamentais para que este trabalho fosse realizado, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por toda proteção e discernimento que me fizeram crescer e, no tempo Dele, sempre ter atitude e fé para dar o próximo passo.

A minha mãe, Maria da Conceição de Sobral pelo amor incondicional, pela paciência e confiança, por todos os ensinamentos que me fizeram crescer com caráter, dignidade e fé.

Aos meus avós Maria Eronilda Souza de Sobral (vó Liu) e Manoel Cirilo de Sobral (vô Neco) por terem sempre acreditado em mim, me ensinado a sonhar alto e, principalmente, por terem me oferecido condições para realizar estes sonhos.

Ao meu pai, meus irmãos e toda minha família por todo carinho, torcida e por serem essenciais em minha vida. Amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bolívar P.G de L. Damasceno por todas as oportunidades concedidas e pelos ensinamentos na contribuição deste trabalho. Muito Obrigado!

A minha coorientadora Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima por todo apoio durante o a realização do trabalho.

A João Walter, por toda ajuda no estudo *in vivo*, análise estatística e por toda amizade cultivada nos últimos meses.

A minha namorada, Itavielly Layany, por todo incentivo nos momentos de fraqueza, por me fazer acreditar, pela paciência e principalmente por toda apoio ao longo desse trabalho.

A meus IC's, Amaro, Pedro e Vandiará pela cololaboração para execução do trabalho, às vezes de domingo a domingo, e por toda parceria da equipe durante esses dois anos.

Aos amigos Yuri, Jôffyli, George, Rayanne e Suellen por todos esses anos de amizade e pelos momentos de descontração, inesquecíveis para mim.

Ao casal, Geovani Pereira e Airla Laana pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório de desenvolvimento e caracterização de produtos farmacêuticos (LDCPF), e a todos que o compõe pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Certificação de Biomateriais da Universidade Federal de Campina Grande CERTBIO/ UFCG, em especial a Rossenberg, por toda colaboração na caracterização físico-química.

A Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas (FACISA), principalmente a Kiara, Pedro e Ayanne, pelo espaço para realização do estudo *in vivo* e por toda ajuda durante a execução do mesmo.

Ao Laboratório de patologia oral da UEPB, sobretudo a Denise e Bárbara, pela execução da análise histológica.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

## RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina que vem despertando grande interesse na área de regeneração tecidual, principalmente devido as suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana. Também vem sendo bastante utilizada em sistemas para liberação controlada de fármacos, sobretudo para os de baixa solubilidade aquosa. A sinvastatina, estatina redutora de colesterol, tem exibido em diversos estudos uma interessante atividade anti-inflamatória por uma via independente do seu mecanismo de ação principal. Contudo, as formas farmacêuticas nas quais esse fármaco está disponibilizado no mercado inviabilizam seu uso em casos de lesões cutâneas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar filmes poliméricos para a liberação controlada de sinvastatina para uso tópico em eventos inflamatórios. A quitosana, proveniente de dois fornecedores, foi utilizada para preparar filmes brancos e filmes contendo duas concentrações de sinvastatina (10 e 20 mg) pelo método sol-gel. Para caracterização físico-química, técnicas como infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) e análise térmica foram utilizadas. Além disso, foi realizado o estudo de liberação *in vitro* utilizando o aparato de Franz. Para o ensaio *in vivo*, foi realizada a determinação da área residual da ferida e contagem de leucócitos totais, analisando-se estatisticamente os dados obtidos. Nos resultados do FTIR pode-se inferir que ocorreram várias interações intermoleculares entre a quitosana e sinvastatina, enquanto a DRX e análise térmica indicaram a presença do fármaco na forma amorfa no retículo polimérico. Os filmes apresentaram perfis de liberação semelhantes, regidos por um transporte anômalo, descrito no modelo de Korsmeyer-Peppas e na avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória e cicatrizante, os grupos que receberam o tratamento com filmes com 20 mg de sinvastatina reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a reposta leucocitária e apresentaram uma cicatrização mais eficiente que os grupos com o filme branco e SALINA.

Evidenciando assim, que os filmes desenvolvidos são promissores para a administração controlada, via tópica de sinvastatina em inflamações cutâneas.

**Palavras-chave:** Atividade anti-inflamatória, Biopolímero, Caracterização Físico-Química, Estatina, Liberação *in vitro*

## ABSTRACT

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin has been arousing great interest in the tissue regeneration area, especially because of its biodegradability characteristics, biocompatibility and antimicrobial activity. It has also been frequently used in systems for controlled drug release, especially for the low aqueous solubility, such as simvastatin. Simvastatin, statin with hypolipidemic activity, in several studies have been show an interesting anti-inflammatory activity by an independent primary mechanism of action. However, those pharmaceutical forms in which this drug is available, unfeasible its use in cutaneous lesions. Therefore, the aim of this work was to develop and evaluate polymeric films for topical delivery of simvastatin. Chitosan, coming from two suppliers, was utilized to prepare films containing two concentrations of simvastatin (10 and 20 mg) for Sol-gel method. Fourier-transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction and Thermal analysis were used to structural characterization. Additionally, *in vitro* release study using the Franz apparatus was realized. To *in vivo* testing, determination of residual wound area and total leukocyte count was conducted by analyzing statistically the data collected. In the infrared spectrum can be inferred that there were several intermolecular interactions between chitosan and simvastatin, while the X-ray diffraction and Thermal analysis, indicated the presence of the drug in amorphous form in the polymeric film. The films displayed similar release profiles, with its release governed by an anomalous transport, described in the Korsmeyer-Peppas model and **in vivo** evaluation of anti-inflammatory and wound healing activity, the groups receiving treatment with films with simvastatin 20 mg significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the leukocyte response and had the most efficient cicatrization that groups with white film and SALINA. Evidencing, the developed films are promising for the controlled administration of simvastatin topically in skin inflammation.

**Keywords:** Anti-inflammatory activity; Biopolymer, Characterization, *in vitro* release, Statin.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da quitosana.....	18
<b>Figura 2:</b> Reação de desacetilação da quitina formando quitosana .....	18
<b>Figura 3:</b> Reação de síntese do mevalonato, precursor do colesterol, por ação da enzima HMG-CoA redutase.....	25
<b>Figura 4:</b> Estrutura geral de algumas estatinas destacando-se a similaridade dos fármacos com o mevalonato .....	26
<b>Figura 5:</b> Conversão da lactona inativa à ao $\beta$ -hidroxiácido ativo da SINV .....	28
<b>Figura 6:</b> Pontes de hidrogênio formadas pela SINV.....	29

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>RERERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
2.1	<b>Inflamação e cicatrização</b> .....	12
2.2	<b>Sistemas carreadores de fármacos</b> .....	15
2.3	<b>Quitosana</b> .....	17
2.3.1	<b><i>Características físico- químicas da quitosana</i></b> .....	19
2.3.2	<b><i>Obtenção da quitosana</i></b> .....	20
2.3.3	<b><i>Usos e atividades da quitosana</i></b> .....	20
2.3.4	<b><i>Filmes de quitosana</i></b> .....	22
2.4	<b>Estatinas</b> .....	24
2.4.1	<b><i>Sinvastatina</i></b> .....	27
2.5	<b>Modelos cinéticos de liberação de fármacos em sistemas poliméricos</b> .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	35
3.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	35
	<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SINVASTATINA EM FILMES DE QUITOSANA</b> .....	37
	<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO CINÉTICO DE FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM SINVASTATINA</b> .....	53
	<b>ATIVIDADE ANTI-INFLMATÓRIA/CICATRIZANTE DE FILMES DE QUITOSANA COM SINVASTATINA</b> .....	77
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	96
<b>5</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	97
	<b>ANEXO</b> .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

O corpo humano é recoberto por aproximadamente dois metros quadrados de pele, que, além de desempenhar o papel de barreira aos ataques externos, ainda é responsável pela regulação da temperatura corpórea e pela remoção de impurezas (DALLAN, 2005). Em casos de lesões cutâneas, os curativos são umas das tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas que remontam à Antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia à importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente (PANOBIANCO et al., 2012).

Curativos formam um importante segmento do mercado mundial de produtos médicos e farmacêuticos. No passado, sua função primária era a de permitir a evaporação dos exsudatos e prevenir a entrada de bactérias na ferida. Contudo, percebeu-se o ambiente anaeróbico causado por esses curativos propiciava infecção por diversos tipos de patógenos, além de introduzir corpos estranhos na ferida causando respostas inflamatórias, atrasando a cura e, algumas vezes, levando à formação de granulomas ou abscessos (BOATENG et al., 2008; LIMA et al., 2012).

Curativos modernos, por outro lado, baseiam-se no conceito de criar um ambiente ótimo para a movimentação das células epiteliais, para promover o fechamento da ferida. Tais condições ótimas incluem um ambiente úmido ao redor da lesão, circulação efetiva de oxigênio para ajudar na regeneração das células, dos tecidos e reduzir a quantidade de bactérias (BOATENG et al., 2008). Outras características importantes e que devem ser consideradas são a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura e as dimensões do curativo, suas propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a ausência de antigenicidade (RATNER et al., 2004; PANOBIANCO et al., 2012).

A quitosana (QTS) é um biopolímero conhecida por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, não apresentando efeitos alérgicos e irritantes em tecidos saudáveis ou infectados, permitindo seu uso em várias aplicações médicas, tais como aplicação tópica, implantes e injetáveis (FELT, 1999; ZHANG et al., 2010; LIMA, 2010; VAN DEN BROEK et al., 2015).

Muitos estudos já avaliaram a resposta de tecidos quando em contato com a QTS. Foi descoberto que ela provocava mínima reação de corpo estranho, com

pouco ou nenhum encapsulamento fibroso (Di MARTINO et al., 2005; UENO et al., 2001). Seu uso como biomaterial já foi explorado para a restauração de vários tipos de tecido, como pele, osso, cartilagem, de órgãos como fígado, vasos sanguíneos e até mesmo de componentes do sistema nervoso (KIM et al., 2008; ; CARVALHO et al., 2011).

Há algum tempo, filmes finos de QTS tem sido submetidos a avaliações práticas, sobretudo em decorrência de suas características físico-químicas, que resultam em propriedades como fácil formação de géis e capacidade de formação de filmes com boas propriedades mecânicas (VAN DEN BROEK et al., 2015).

Adicionalmente, apresenta capacidade de melhorar propriedades de dissolução e biodisponibilidade de fármacos fracamente solúveis em água, como a sinvastatina (SAKKINEN et al., 2004).

A sinvastatina (SINV), é uma estatina inibidora da hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA), que catalisa a reação de produção do colesterol endógeno, sendo amplamente utilizada na clínica como agentes hipocolesterolêmicos principalmente em pacientes cardíacos. Entretanto, recentes estudos têm demonstrado propriedades farmacológicas pleiotrópicas desses agentes, incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante, anti-trombogênica e função restauradora (BONETTI et.al., 2003; OTUKI; PIETROVSKI; CABRINI, 2006; (McGOWN; BROOKES, 2007; MIRANDA et al., 2011). De modo que suas atividades, em sinergismos com as propriedades da QTS, convergem à um sistema promissor, na forma de filme, para tratamento de inflamações cutâneas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar filmes poliméricos de quitosana para a liberação controlada de sinvastatina para uso tópico em eventos inflamatórios.

## **2 RERERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Inflamação e cicatrização**

A pele é tida como a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos e por isso está sujeita a constantes agressões, tornando sua capacidade de reparação muito importante para a sobrevivência (NOGUEIRA et al., 2005). A cura de uma lesão cutânea é bastante complicada, incluindo uma vasta gama de processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos (KIM et al., 2008).

O conhecimento a respeito de tal processo é relevante para que se possa intervir no mesmo para auxiliar e acelerar a cicatrização além de promover homeostasia do organismo e bem-estar ao paciente.

Com o rompimento tecidual, logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma sequência de eventos moleculares, objetivando a restauração do tecido lesado (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, na lesão traumática ou na necrótica (PANOBIANCO et al., 2012). Desta forma, o processo de cicatrização tem como finalidade restabelecer a homeostasia tecidual (CAVALCANTE et al., 2012).

Após uma lesão, um conjunto de eventos bioquímicos se estabelece para reparar o dano e promover a cicatrização (PAGANELA et al., 2009). Os eventos que desencadeiam a cicatrização são intercedidos e sustentados por mediadores bioquímicos, descritos em diferentes fases, que correspondem aos principais episódios observados em determinado período de tempo (LIMA et al., 2012). O processo de reparação tecidual é dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: hemostasia, fase inflamatória, formação do tecido de granulação e remodelação (SHIMIZU, 2005).

A fase inflamatória é a etapa crucial da cicatrização, sendo caracterizada basicamente pela presença de células inflamatórias no tecido cicatricial. A inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM et al., 2003).

A resposta inflamatória, que perdura cerca de três dias, e na qual ocorre a migração sequencial das células para a ferida é facilitada por mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular, favorecendo a exsudação plasmática e a passagem de elementos celulares para a área da ferida. Os mediadores bioquímicos de ação curta são a histamina e serotonina e as mais duradouras são a leucotaxina, bradicinina e prostaglandina. A prostaglandina é um dos mediadores mais importantes no processo de cicatrização, pois além de favorecer a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia de leucócitos (LIMA et al., 2012).

O processo inflamatório caracteriza-se por migração celular intensificada e extravasamento de moléculas séricas, anticorpos, complemento e proteínas pelos capilares. Estes eventos são controlados pelo aumento do suprimento sanguíneo e da permeabilidade capilar além de vasodilatação (CARVALHO, 2002). Os principais componentes celulares de uma ferida são os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos que aparecem proporcionalmente à sua quantidade presente na circulação.

Inicialmente, o tipo de célula predominante, o PMN, tem vida breve e atua principalmente com função fagocítica, surge durante a injúria tissular e permanece por período que varia de três a cinco dias, sendo responsáveis pela fagocitose de bactérias. O pico de atividade dos PMN ocorre nas primeiras 48 horas após o trauma, seguindo-se de um maior aporte de macrófagos durante os dois a três dias seguintes. O macrófago, também ativa os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização tais como fibroblastos e células endoteliais (MANDELBAUM et al., 2003).

No local da inflamação, os monócitos se diferenciam em macrófagos sob influência do fator estimulador de colônias de macrófagos, enquanto o interferon induz a ativação das células T. Essa ativação dos linfócitos T gera amplificação significativa da resposta imunológica, de modo que numerosas citocinas são produzidas. Essas citocinas podem ter efeito pró-inflamatório, como no caso da interleucina 1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) que servem para induzir maior adesão dos monócitos e linfócitos T ao endotélio. Podem funcionar ainda como mensageiros, caso da interleucina 6 (IL-6), capaz de induzir a expressão de genes hepáticos que codificam elementos de fase aguda que podem ser

detectados no sangue, entre estes, a proteína C reativa (PCR), considerada marcador de inflamação (PLANA, 2001).

Além do efeito na redução do colesterol plasmático, a SINV pode apresentar melhora no estado inflamatório da parede do vaso, diminuindo os valores da PCR. Também inibe a ativação das células T induzida pelo interferon gama por moléculas de complexo principal de histocompatibilidade de classe II44. Com o bloqueio da célula T, aumenta-se a síntese de colágeno pelas células do músculo liso e ocorre diminuição da produção de collagenases pelos macrófagos fortalecendo o revestimento fibroso das placas, estabilizando-as, facilitando assim a cicatrização (KWAK et al., 2000).

Associada a SINV, a quitosana também possui propriedades cicatrizantes, tornando ideal para a confecção de curativos de lesões de pele, devido à capacidade de acelerar a coagulação sanguínea, promovendo a agregação plaquetária e formação de trombo. Com isso, vem sendo utilizada na produção de curativos e agentes hemostáticos (COSTA SILVA et al., 2006).

Esse fato se deve à capacidade da QTS em agregar tanto as plaquetas, como os eritrócitos pela interação entre as cargas positivas dos grupos amínicos livres com as cargas negativas dos receptores das hemácias. A ação da QTS sobre as plaquetas produz mais um efeito benéfico, que é a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas AB e fator de transformação do crescimento  $\beta 1$ , que desempenham papel importante na cicatrização (COSTA SILVA et al., 2006). Além disso, é impermeável a bactérias, previne infecções, devido às propriedades antimicrobianas da QTS, e a superfície externa permanece seca, ao contrário de muitas ataduras saturáveis (VALENTA; AUNER, 2004).

Também possui propriedade imunomoduladora, que é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos. Isso explica não só seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a degradação desse polímero no organismo (MARTÍNEZ CAMACHO, 2010).

Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de QTS, liberam interleucina 1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a QTS a monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese de ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular dos fibroblastos. Eles

promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que este polímero pode prevenir infecções, quando aplicado diretamente no local da lesão (COSTA SILVA et al., 2006).

As lesões de pele representam um grande desafio para os profissionais da saúde, sendo que os curativos mais modernos disponíveis atualmente são, em sua maioria, importados e de alto custo. Desta forma, existe a necessidade de criar recursos mais acessíveis à população, os quais utilizem matérias-primas renováveis e que sejam produzidos através de tecnologias simples e de baixo custo (LIMA et al., 2012).

## **2.2 Sistemas carreadores de fármacos**

A ação biológica produzida por um medicamento não é simplesmente função da atividade intrínseca do fármaco que ele veicula. Inúmeros fenômenos, mais ou menos complexos, se manifestam a partir do momento da administração, os quais dependem não só dos princípios ativos e do organismo ao qual eles são administrados, mas ainda, em larga escala, da forma e formulação farmacêutica utilizadas (PANDIT, 2008).

Para que um fármaco seja eficaz, é necessário que uma quantidade satisfatória dele chegue ao sítio ou sítios de ação e ali permaneça por um tempo suficiente para exercer o seu efeito farmacológico. Isso depende da via e da forma pelas quais o fármaco é administrado e da velocidade com que é liberado (PANDIT, 2008).

A matriz ideal para liberação de fármacos deve ser inerte, biocompatível, confortável para o paciente, capaz de carregar altas cargas de fármacos, simples para administração e remoção, fácil de fabricar e esterilizar e de baixo custo. O modelo e material adequado para a seleção da matriz em cada aplicação específica dependem de diversas variáveis, incluindo propriedades físicas (mecânica, degradação, formação do gel), propriedades do transporte (difusão) e propriedades biológicas (adesão celular e sinalização) (DRURY; MOONEY, 2003).

Polímeros biorreabsorvíveis têm sido muito usados na área médica em decorrência das inúmeras vantagens apresentadas por essa classe (ESPOSITO et

al., 2011), sendo a principal delas o fato de degradarem por hidrólise de suas ligações ésteres, em contato com os fluidos corpóreos, originando produtos na forma de oligômeros solúveis e não tóxicos que, após sofrerem a ação metabólica do organismo são transformados em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (AMBROSE; CLANTON, 2004).

Neste sentido, matrizes poliméricas têm-se mostrado ideais, pois apresentam as características adequadas para a aplicação em questão, oferecendo flexibilidade na dosagem, cinética de liberação e marcação de receptores para liberação de fármacos ou genes (YUN et al., 2004)

Os polímeros constituem a classe de materiais mais versátil e têm mudado o nosso dia-a-dia no decorrer de várias décadas. Há muitos anos os farmacêuticos têm utilizado polímeros em vários campos de seu trabalho. Inicialmente seu uso ficou restrito aos materiais de embalagem e excipientes de formas farmacêuticas, servindo como suporte mecânico para liberação de fármacos. Nessas últimas décadas, a união entre ciências de polímeros e ciências farmacêuticas levou a uma inovação no propósito e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (LIU, 2009). Estes sistemas poliméricos são destinados, principalmente, a alcançar a liberação modificada de fármacos.

Dentre as principais características que o polímero a ser utilizado nesses sistemas deve apresentar é ser biocompatível, isto é, não produzir reação adversa e ter habilidade de desencadear em um organismo a resposta apropriada para uma aplicação específica, e ser, de preferência, biodegradável (FOURNIER, 2003).

Os materiais biodegradáveis degradam dentro do organismo como resultado de processos biológicos naturais, eliminando a necessidade de remoção do sistema de liberação de fármaco após a completa eliminação do princípio ativo (JONES, 2004).

Os sistemas poliméricos de liberação modificada de fármacos podem ser agrupados, de acordo com a sua estrutura, em sistemas matriciais e em sistemas com uma barreira, também chamados de reservatórios (DUMITRIU, 1993). Nos sistemas matriciais o fármaco é adsorvido ou solubilizado no interior de uma matriz polimérica. Enquanto que nos sistemas reservatórios, a substância ativa se encontra envolvida por uma membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo, retardando a liberação do fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003)

Vários polímeros têm sido usados nessa área de pesquisa, sendo que os biodegradáveis têm atraído um maior interesse. Dentre estes, a QTS, um polímero obtido através de recursos naturais renováveis, tem sido destacado, devido às suas interessantes propriedades.

### 2.3 Quitosana

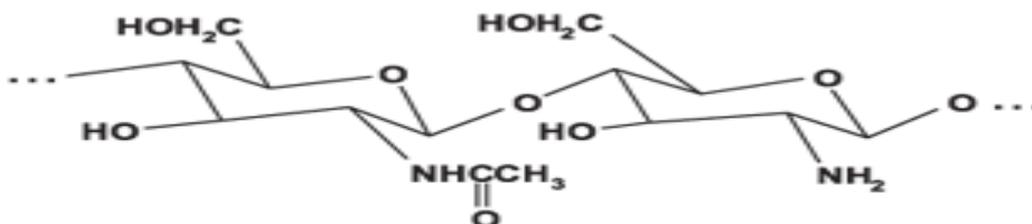
A QTS é um polissacarídeo derivado da quitina (copolímero de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina), encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos. Devido ao caráter básico, atribuído à presença do grupamento amina nas unidades repetidas e à sua biodegradabilidade, esses dois polímeros vem despertando bastante interesse de cientistas e tecnólogos, que têm descoberto diversas aplicações, especialmente na área farmacêutica (CARVALHO et al., 2011).

O polímero é registrado no Ministério da Saúde como alimento, sendo comercializado como redutor de peso e de colesterol (SANTOS, 2004). Todavia, a QTS atualmente está sendo utilizada em diversas áreas, como na tecnologia farmacêutica, agricultura, biotecnologia, indústria de cosméticos, produtos alimentícios e, como adsorvente na remoção de corantes e espécies metálicas (JANEGITZ et al., 2007).

Historicamente, em 1811, o professor Henri Braconnot, isolou substâncias fibrosas de cogumelo e achou insolúvel em solução aquosa ácida. Uma década depois, em 1823, Ojer chamou de quitina do grego khiton (envelope) presentes em determinados insetos. Em 1894, Seyle Esperança nomeou-o como “quitosana”. Entre 1930 a 1940, este biopolímero de glucosamina adquiriu muito interesse no campo da medicina (SHAJI, 2010).

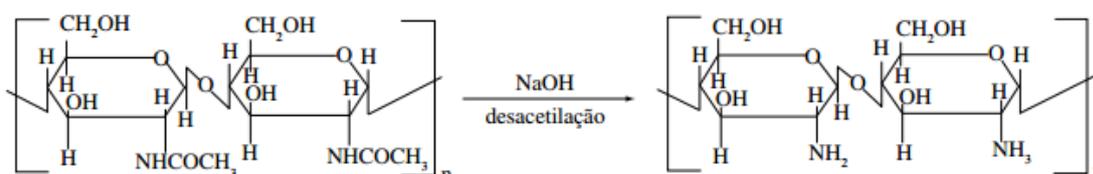
O termo quitosana (Figura 1) refere-se a uma família de copolímeros com várias frações de unidades acetiladas. É constituída por dois tipos de monómeros; monômeros de quitina e monômeros de QTS. A quitina é um polissacarídeo linear constituído por ligações (1-4) 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ D-glicopiranoose. A QTS é um polissacarídeo linear constituído por ligações (1-4) 2-amino-2-desoxi- $\beta$ D-glicopiranoose, sendo composta também por  $\beta$ -(1-4)-D-glucosamina (unidade

desacetilada), as quais são distribuídas aleatoriamente e ligadas a N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada) (SHAJI, 2010).



**Figura 1:** Estrutura química da quitosana  
**Fonte:** Shaji, 2010.

A execução da reação química de N-desacetilação da quitina (Figura 2), através do emprego de soluções concentradas de hidróxido de sódio e de temperaturas elevadas, para a produção de QTS, é considerada um aspecto importante na utilização comercial deste polímero. Esse processamento deve ser realizado de maneira adequada, a fim de garantir que, ao final do processo, a obtenção de QTS com alto grau de pureza, sobretudo isenta de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos. As condições utilizadas, como concentração de hidróxido de sódio, temperatura e tempo de reação, determinam a massa molar média e o grau de desacetilação médio na QTS obtida (WU, 2008).



**Figura 2:** Reação de desacetilação da quitina formando quitosana  
**Fonte:** Wu, 2008.

De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glicosamina de quitina e QTS, podem-se obter diversas QTS variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade. Geralmente, é difícil de obter QTS

com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (SILVA et al., 2006).

### **2.3.1 Características físico- químicas da quitosana**

A molécula de QTS apresenta três tipos de grupos funcionais reativos: um grupo amino e dois grupos hidroxila, um primário e um secundário, nas posições C(2), C(3) e C(6), respectivamente (KIM et al., 2008).

É uma base fraca com valor de pKa do resíduo D-glicosamina em torno de 6,5, sendo, portanto, insolúvel em meios neutro e alcalino. Vale ressaltar que, por ser um polieletrólito catiônico, o seu valor de pKa dependerá da massa molar e da densidade de carga do polímero e, portanto, dependerá da extensão de neutralização dos grupos carregados e do grau de desacetilação médio da amostra (JIANG, 2003; VAN DEN BROEK et al., 2015).

Em meio neutro e alcalino, a QTS se apresenta estável devido ao fato de seus grupamentos reativos hidroxilas e amino poderem formar fortes ligações de hidrogênio intra e intermoleculares levando à cristalização e, com isso, à precipitação desse polímero. Já em meio ácido, a estrutura cristalina é destruída, devido à protonação dos grupamentos amino e, conseqüentemente, uma repulsão entre esses grupos tornando a macromolécula solúvel (KIM et al., 2008; VAN DEN BROEK et al., 2015).

Neste caso, a conformação da cadeia polimérica dependerá do grau de desacetilação médio. Quanto maior for este valor, a cadeia polimérica se apresentará mais estendida e flexível, devido a uma maior repulsão entre as cargas. Entretanto, quanto menor for o valor, a cadeia polimérica apresentará uma conformação quase esférica, devido a uma menor densidade de cargas, e será estabilizada por vastas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (GUPTA; JABRAIL, 2006).

Esse biopolímero é insolúvel em água, bases, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de alguns ácidos orgânicos, como, ácido acético em pH menor que 6,0 (JANEGITZ et al., 2007).

No estado sólido, a QTS é um polímero semicristalino. Através de experimentos de difração de raios-X, foram encontradas quatro polimorfos do

polímero, sendo três formas hidratadas e uma anidra (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008). Os primeiros dados de difração de raios-X da QTS, preparada a partir de tendões de lagosta por desacetilação no estado sólido, foram obtidos por Clark e Smith em 1937.

### **2.3.2 Obtenção da quitosana**

A QTS é obtida a partir de desacetilação parcial da quitina, que é um polissacarídeo compreendendo copolímeros de glucosamina e N-acetilglucosamina. A QTS está comercialmente disponível em vários tipos e graus que variam em peso molecular entre 10.000 e 1.000.000 e variam em grau de desacetilação e viscosidade. Tecnicamente, QTS é uma substância que ocorre naturalmente, sendo quimicamente semelhante à celulose (SHAJI, 2010).

O processo de desacetilação consiste na remoção da maioria dos radicais acetilas da estrutura e substituição dos mesmos por um átomo de hidrogênio, resultando em um radical amino. Então, os polímeros desacetilados, com grau de desacetilação acima de 50%, podem ser considerados QTS. As quitosanas obtidas pela reação de estado sólido tem uma distribuição heterogênea de grupos acetil ao longo de suas cadeias, provavelmente devido à morfologia semicristalina da quitina. (LIMA, 2006).

Usualmente, a QTS é preparada utilizando-se soluções extremamente concentradas de hidróxido de sódio de 40 a 50%, o que costuma promover reações de degradação do polímero. Esta reação de hidrólise pode remover alguns ou todos os grupos acetila da quitina, liberando grupos amino que impõem a natureza catiônica da QTS resultante, que consiste de uma mistura de polímeros de diferentes tamanhos (CANELA; GARCIA, 2001).

### **2.3.3 Usos e atividades da quitosana**

Na literatura, pode-se encontrar uma ampla variedade de propriedades biológicas da QTS, as quais são relatadas em vários estudos de diversos autores. Como exemplo as propriedades citadas por Silva, Santos e Ferreira, (2006) e Cleasen, Whilhelms e Kulicke, (2006), relatam a atividade antimicrobiana, efeito

coagulante, efeito analgésico, aceleração da cicatrização, tratamento da osteoartrite, efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico e redução de peso.

A atividade da QTS sobre as biomoléculas é facilitada pela diferença de cargas elétricas que ocorre na superfície das duas estruturas. Enquanto que proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucléicos e ácidos graxos, dentre outros, apresentam cargas negativas em suas superfícies, se comportando como um polieletrólito, ou seja, apresenta uma alta densidade de carga - uma carga positiva por unidade de glicosamina (DALLAN, 2005).

A QTS é um biopolímero que apresenta importantes propriedades biológicas tais como baixa toxicidade, não causa alergia, pode ser empregado como anticoagulante, é biodegradável, biocompatível e possui propriedades antibacterianas (JANEGITZ et al., 2007; CARVALHO et al., 2011). Fraga et al. (2006) atribui sua biodegradabilidade ao fato de ser metabolizada por enzimas humanas, principalmente a lisozima.

Além dos estudos de biodegradação, estudos de biodistribuição e de toxicidade celular, ambos *in vivo* e *in vitro* tem sido publicados (KEAN; THANOU, 2010). Desta maneira, a QTS é apontada como um GRAS (Generally Regard As Safed), ou seja, uma substância cujo uso é geralmente considerado seguro (BANGYEKAN et al., 2006; KEAN; THANOU, 2010).

É promissora para a indústria farmacêutica por sua diversificada aplicação, por exemplo, pasta de dente, lágrimas artificiais e filmes para curativo (CARVALHO et al., 2011; TAN et al., 2011). Além das propriedades filmogênicas, também possui atividade antimicrobiana (MARTÍNEZ CAMACHO, 2010; CARVALHO et al., 2011).

A atividade antimicrobiana está relacionada à presença de grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (CLEASEN; WHILHELMS; KULICKE, 2006).

Três mecanismos têm sido propostos como uma explicação para essas propriedades antimicrobianas. No primeiro, as cargas positivas presentes na cadeia polimérica de QTS, devido à seu grupo amino, interagem com as cargas negativas dos resíduos de macromoléculas (lipopolissacarídeos e proteínas) nas membranas de células microbianas, interferindo com a troca de nutrientes entre o exterior e o

interior da célula. O segundo mecanismo propõe que a QTS atua como um agente quelante, criando compostos com vestígios de metais essenciais para a célula, enquanto que o terceiro mecanismo estabelece que a QTS de baixo peso molecular é capaz de entrar o núcleo da célula em si, interagindo com o DNA, interferindo com a síntese de RNA mensageiro, afetando a síntese de proteínas e inibir a ação de várias enzimas (MARTÍNEZ CAMACHO, 2010).

O biopolímero QTS pode ser modificado fisicamente, sendo uma das vantagens mais interessantes a sua grande versatilidade em ser preparado em diferentes formas, tais como pós, flocos, microesferas, nanopartículas, membranas ou filmes. Devido as características citadas e outras tantas, a QTS é amplamente utilizado como excipiente farmacêutico, principalmente em sistemas de liberação de fármacos e foi incluída na quarta edição da European Pharmacopoeia em 2002, sob a forma de sal cloridrato de quitosana.

#### **2.3.4 Filmes de quitosana**

Polissacarídeos e seus derivados representam um grupo de polímeros naturais largamente utilizados em formas farmacêuticas, sendo preferidos, em detrimento de polímeros sintéticos, devido à baixa toxicidade, baixo custo e disponibilidade. Aliado a isto, a biodegradabilidade, características filmogênicas e sua versatilidade têm constituído um elemento de elevado interesse e destaque no grupo de excipientes farmacêuticos (GOY, 2004; MATET et al., 2015; VAN DEN BROEK et al., 2015).

De uma maneira geral, pode-se definir uma membrana como uma barreira fina, com propriedade seletiva ao transporte de matéria e energia entre duas fases. Uma técnica simples para o preparo de membrana de QTS é a simples evaporação do solvente de uma solução desse polímero sobre uma placa de vidro, produzindo, geralmente, filmes flexíveis e resistentes. A presença de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pelas propriedades de formação dos filmes (TRINDADE NETO, 2008; LIMA, 2010; VAN DEN BROEK et al., 2015).

Filmes de QTS com potencial para utilização em técnicas de regeneração tecidual guiada e a possibilidade de associação de outras substâncias à QTS nos filmes, têm sido estudadas (ZHANG et al., 2010).

Além disso, a resposta tecidual inflamatória ante a implantação desses filmes em tecido subcutâneo de ratos foi muito satisfatória. Sua própria estrutura química, similar à estrutura do ácido hialurônico, reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador, pois a QTS é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos, promovendo organização celular e atuando no reparo de diversas feridas (UENO et al., 2001; CARVALHO et al., 2011).

Além dessas propriedades, uma tem atraído a atenção de cientistas farmacêuticos, a bio/mucoadesividade. Devido a sua protonação em certos pH fisiológicos, a QTS pode interagir eletrostaticamente com as cargas negativas de superfícies celulares, abrindo junções, resultando em uma reorganização estrutural das proteínas associadas às junções oclusivas (HE, et al., 1998), caracterizando o mecanismo de bioadesividade. Mais especificamente, quando a interação é restrita à camada mucosa, o termo mucoadesividade é empregado.

O muco contém mucina, que apresenta uma variedade de constituintes químicos, dentre eles o ácido siálico. Em pH fisiológico, o ácido siálico apresenta carga negativa e, como consequência, mucina e QTS podem apresentar fortes interações eletrostáticas. Quando a QTS está exercendo a função de sistema carreador de algum fármaco, essas interações podem resultar em um tempo de permanência prolongada desse sistema no sítio de absorção do fármaco, liberando-o sustentadamente, e melhorando a sua biodisponibilidade (LEHR et al., 1992).

Este potencial para a aplicação bio/mucoadesiva tem sido adicionalmente reforçado por sua capacidade de abrir transitoriamente as junções oclusivas entre as células epiteliais, permitindo o transporte intercelular de fármacos, peptídeos, proteínas, vacinas e DNA, sendo, portanto, considerada um promotor de absorção (MARTÍNEZ CAMACHO, 2010).

Adicionalmente, caracteriza-se por ativar a proliferação celular e estimular o processo de cicatrização de feridas e queimaduras. Nesse caso, são utilizadas ataduras de QTS, principalmente na forma de filme, também chamados de peles artificiais, uma vez que mantém umidade alta na interface da atadura, remove o excesso de exsudato, permite trocas gasosas e fornece isolamento. Seu uso como biomaterial tem sido amplamente elucidado, associado à restauração de vários tipos

de tecido, como pele, osso, cartilagem, de órgãos como fígado, vasos sanguíneos e até mesmo de componentes do sistema nervoso (KIM et al., 2008).

Ao associarmos as características que fazem da QTS um potencial agente liberador de fármacos e aquelas relacionadas às suas propriedades reparadoras teciduais, vislumbra-se os biomateriais dela obtidos para reparação tecidual. Sistemas formados com fármacos que ajam em sinergismo com a QTS e se mostrem compatíveis, surgem como oportunidades de pesquisas nessa área (ISSA et al., 2006).

## 2.4 Estatinas

As estatinas têm sua origem em culturas de fungos, tendo sido realizado, no ano de 1976, o primeiro isolamento de uma substância desta classe, a compactina. Isolada a partir de uma cultura de *Penicillium citrinum* e apresentou excelente inibição na síntese do colesterol, porém sua elevada toxicidade impediu seu uso clínico. A partir de então, produziram-se diversas substâncias com estruturas semelhantes à compactina que também possuíam a capacidade de inibir a síntese do colesterol, surgindo então as estatinas modernas (ENDO, 2010; BHALLA et al., 2014; SIRTORI, 2014).

Quimicamente, as estatinas possuem um anel hexaidronaftilênico ligado a um éster metilbutirato e um hidroxiácido que forma um anel lactônico. As diferenças estruturais existentes entre as estatinas determinam sua lipofilicidade, meia-vida e potência (RODRIGUEZ YANEZ et al., 2008).

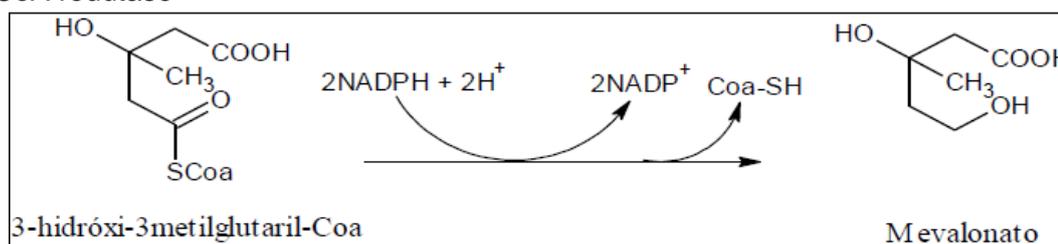
Podem ser consideradas produtos naturais, como as estatinas isoladas a partir do metabolismo de fungos, a mevastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (derivado semi-sintético), ou as estatinas completamente sintéticas como a atorvastatina e a fluvastatina (BASTARDA et al., 2005). Os cinco agentes hipolipêmicos mais importantes, clinicamente, dentro desse grupo são a atorvastatina, a fluvastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (CARVALHO; CAMPO, 2007).

Existem várias estatinas sendo utilizadas clinicamente, algumas naturais como a lovastatina (Mevacor) e a pravastatina (Pravachol), a sinvastatina (Zocor). A

fluvastatina (Lescol) é uma forma racêmica sintética, cujos enantiômeros puros são atorvastatina (Lipitor) e rosuvastatina (Crestor) (KATZUNG, 2013).

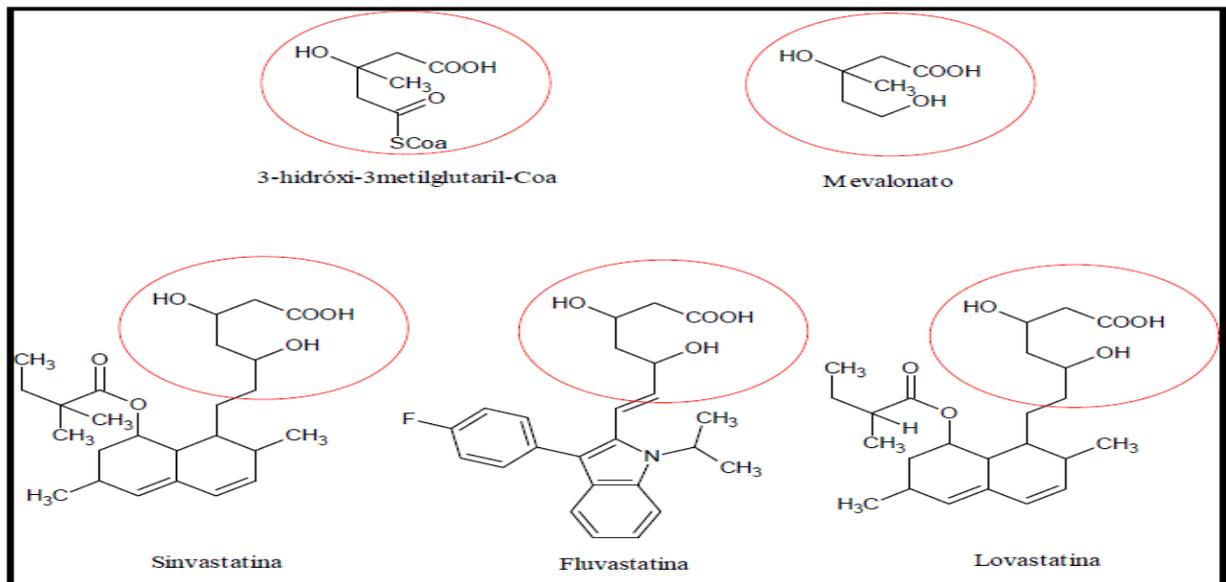
Agem Inibindo competitivamente, de forma potente, a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima responsável pela síntese do ácido mevalônico, um importante precursor na síntese de colesterol, por meio de redução do substrato HMG-CoA (Figura 3). A afinidade das estatinas pela enzima está na faixa nanomolar, enquanto que a afinidade do substrato natural, o HMG-CoA, está na faixa micromolar, ou seja, 3 ordens de magnitude menor (CARVALHO; CAMPO, 2007). As estatinas inibem a síntese do colesterol endógeno e aumentam a expressão dos receptores para LDL nos hepatócitos, promovendo uma maior captação das lipoproteínas circulantes (RANG et al., 2012).

**Figura 3:** Reação de síntese do mevalonato, precursor do colesterol, por ação da enzima HMG-CoA redutase



**Fonte:** Lehninger; Nelson; Cox, 2006

Acredita-se que o mecanismo de ação destes fármacos esteja relacionado à sua similaridade com o mevalonato (Figura 4), fato que justifica a estrutura geral das estatinas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; BHALLA et al., 2014). Da mesma maneira, a atividade destes compostos é sensível à estereoquímica do anel lactona, à habilidade deste anel ser hidrolisado e ao comprimento da ponte conectando o sistema anel lactônico e o sistema anel bicíclico. Substituições no anel bicíclico com grupos lipofílicos promovem um incremento na atividade da molécula (MOFFAT et al., 2004).



**Figura 4:** Estrutura geral de algumas estatinas destacando-se a similaridade dos fármacos com o mevalonato

**Fonte:** Lehninger, Nelson; Cox, 2006.

Além disso, elas apresentaram uma série de outros efeitos, como vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (NO), estímulo de formação óssea, proteção contra eventos oxidativos nas lipoproteínas de baixa densidade, modificação da resposta imune em diversos níveis e o estímulo da reendotelialização, bem como efeito anti-inflamatório e redução nos níveis da proteína C reativa (FUKUDA et al., 2009). Diversos estudos em animais mostraram efeitos independentes da redução do colesterol, que são conhecidos como efeitos pleiotrópicos deste fármaco, entre eles uma potente ação anti-inflamatória (REGO et al. 2007; CHEN et al., 2013).

Mesmo possuindo o mesmo mecanismo de ação, as estatinas diferem entre si pelas suas estruturas químicas e, farmacocinética. Em recentes resumos e meta-análises já se determinou que as propriedades anti-inflamatórias ocorrem independentemente de sua atividade hipocolesterolêmica (KONES, 2010).

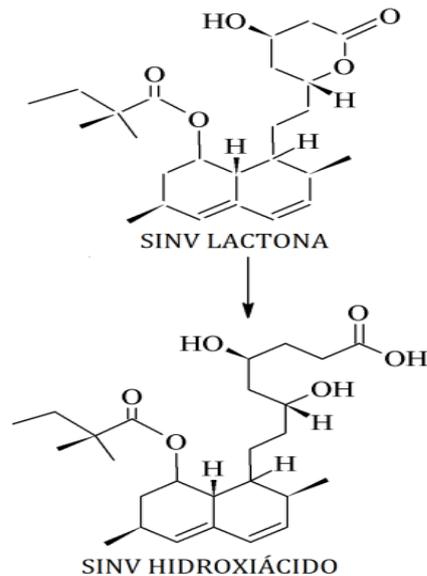
A lovastatina e a SINV são administradas na forma inativa, lactona, e no fígado são hidrolisadas para a forma ativa, o  $\alpha$ -hidroxiácido correspondente. As demais estatinas são administradas na forma ativa. A lipofilicidade dos pró-fármacos, lovastatina e sinvastatina, conferindo maior seletividade pelo fígado, o maior sítio de síntese de colesterol, em comparação com as demais estatinas administradas na forma ativa (MOGHADASIAN, 1999).

Esses fármacos estão sujeitos a extenso metabolismo de primeira passagem pelo fígado. Mais de 95% das estatinas (formas lactonas e ativas) estão ligadas às proteínas plasmáticas, com exceção da pravastatina que apresenta taxa de ligação mais baixa, cerca de 50%. São excretadas nas fezes por meio da bile e uma pequena proporção é excretada na urina (GOODMAN; GILMAN, 2012; SIRTORI, 2014).

#### **2.4.1 Sinvastatina**

Na classe das estatinas inclui-se a SINV, foco desse trabalho, sendo classificada como hipolipemiante para o tratamento de cardiopatia isquêmica e de hipercolesterolemia estabelecida pela política nacional de medicamentos do governo brasileiro na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME, distribuído na forma de comprimido nas dosagens de 10, 20 e 40 mg (BRASIL, 2013). A RENAME contempla a lista de medicamentos e insumos distribuídos pelo SUS a toda a rede pública no país.

Após a ingestão oral, SINV, que é uma lactona inativa (Figura 5), é hidrolisada no trato gastrointestinal ao seu correspondente  $\beta$ -hidroxiácido. Essa hidrólise ocorre em valores de pH entre 4,5 e 6,8 sendo um processo reversível onde normalmente coexistem em equilíbrio no organismo as formas lactona e hidroxiácido (UNGARO et al, 2011).



**Figura 5:** Conversão da lactona inativa à ao  $\beta$ -hidroxiácido ativo da SINV  
**Fonte:** Cejka et. al., 2003

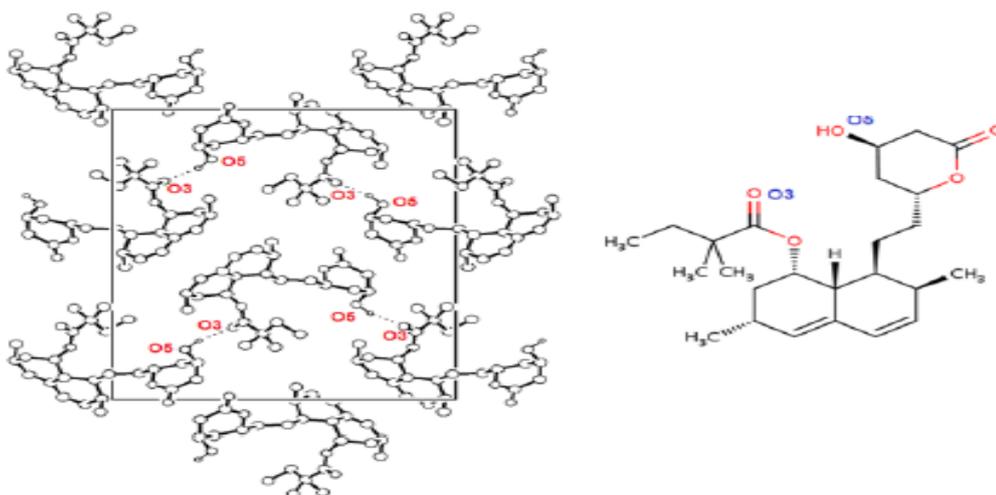
A forma hidrolisada de SINV (hidroxiácido) é o metabólito inibidor da HMG-CoA, que age por um processo de mimetismo, o qual bloqueia a conversão do substrato HMGCoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol. Sua biodisponibilidade é baixa, ou seja, apenas 5% da dose oral possui exposição sistêmica, sendo que 95% do fármaco se ligam às proteínas plasmáticas (RANG et al, 2012). O mecanismo de transporte de membrana de SINV ocorre por difusão passiva, estando então diretamente relacionada à concentração (SANTIAGO, 2011).

A SINV apresenta fórmula molecular  $C_{25}H_{38}O_5$ ; na nomenclatura IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é o 1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydro naphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoate. É um composto sintético derivado da lovastatina, a qual é o produto da fermentação do fungo *Aspergillus terreus* (PEREIRA et al., 2003).

É a segunda estatina mais potente e a mais prescrita no Brasil, caracterizando-se com um pó branco, cristalino, não higroscópico, com ponto de fusão na faixa de 135 a 138 °C, insolúvel em água (0,03 g/L) e ácido clorídrico 0,1 M (0,06 g/L) e solúvel em clorofórmio (610 g/L), metanol (200 g/L), etanol (160 g/L), polietilenoglicol (70 g/L) e hidróxido de sódio 0,1 M (70 g/L). Possui poder rotatório,  $[\alpha]_D^{25}$ , igual a + 292 (0,51% em acetonitrila), coeficiente de partição (octanol/água),

log P, igual a 4,68 e máximos de absorção na região do ultravioleta (UV<sub>máx</sub>, em acetoneitrila) em  $\lambda$  231, 238 e 247 nm (BUDAVARI, 2006) e pKa=4,18, estando a molécula quase completamente dissociada em pH 6,8 (YOSHINARI et al, 2007).

Em solução aquosa forma pontes de hidrogênio intermoleculares entre a hidroxila do oxigênio 3 de uma molécula com o oxigênio 5 do éster de outra molécula, tornando a hidroxila comprometida e com isso o fármaco apresenta-se insolúvel em água (Figura 6) (CEJKA et al, 2003).



**Figura 6:** Pontes de hidrogênio formadas pela SINV

**Fonte:** Adaptado de Cejka et al., 2003.

Possui monografias em alguns compêndios estrangeiros, por exemplo as Farmacopéia Americana, Britânica e Européia, com diferentes doseamentos por espectrofotometria utilizando detecção na região do ultravioleta (UV) em  $\lambda$  238 nm (BRITISH, 2007; USP, 2008; EUROPEAN, 2009;).

Devido a essas propriedades físico-químicas, faz parte da classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), ou seja, é um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade (AMIDON, 1995; GRAESER et al., 2008). Assim, pelo aumento da velocidade de dissolução desse fármaco é possível aumentar sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica (PATEL; PATEL, 2008). Para essa classe de fármacos a dissolução é o passo limitante da velocidade de absorção e uma correlação in vivo-in vitro pode ser esperada. (KASIM et al., 2004).

Existem vários recursos técnicos que podem ser utilizados na tentativa de melhorar a solubilidade e, portanto, aumentar a biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade aquosa como a SINV, como exemplo, tem-se a utilização de

excipientes que ajudam na solubilização, a inclusão em sistemas poliméricos, como filmes de QTS e/ou modificações nas características de cristalinidade e, por conseguinte, melhorar a dissolução desse fármaco e assim facilitar sua liberação (CHEN et al., 2009).

#### 2.4.1.1 Atividade anti-inflamatória

Vários estudos relatam benefícios clínicos associados à terapia com a SINV que são independentes da redução de colesterol, são os chamados efeitos pleiotrópicos. Esses efeitos incluem promoção de síntese de óxido nítrico endotelial, redução na produção de espécies reativas de oxigênio, estabilização das placas ateroscleróticas, redução no crescimento de células musculares lisas que ocorre no processo aterosclerótico. Há ainda efeitos relacionados com atividade anti-inflamatória local, como redução na liberação de citocinas inflamatórias, redução na adesão leucocitária e redução na proliferação de macrófagos (CHOPRA et al., 2007; CHU et al., 2012; XAVIER et al., 2012; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014).

Estudos clínicos mostram que a SINV apresenta propriedades anti-inflamatórias, pela redução dos níveis de alguns mediadores inflamatórios como a proteína C-reativa, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e a interação leucócito-endotélio (ADAMI et al., 2012; JAISWAL; SONTAKKE, 2012; ZHAO et al., 2014). Embora a ação anti-inflamatória ainda não seja completamente entendida, pode ocorrer uma inibição de uma variedade de substâncias inflamatórias chamadas isoprenóides, os quais são formados durante a biossíntese endógena do colesterol (KIM et al., 2007; CHU et al., 2012).

Nessa mesma linha, foi estudado o efeito local da SINV em um modelo de inflamação de pele de camundongo. A aplicação tópica resultou em uma inibição da resposta inflamatória, podendo ser explicada pela resposta negativa da expressão de moléculas de adesão ou pela inibição da secreção de citocinas pro-inflamatórias que ocorre durante um evento inflamatório (OTUKI; PIETROVSKI; CABRINI, 2006).

Associados a esses efeitos, também foi avaliada a ação antinociceptiva das estatinas. Alguns trabalhos sugerem que a ação antinociceptiva possa estar relacionada com a atividade direta anti-inflamatória através da inibição de citocinas

pro-inflamatórias e quimiocinas (SANTODOMINGO GARZON et al., 2006; CHU et al., 2012; XAVIER et al., 2012; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014). Recentes estudos relataram o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da sinvastatina em modelos de dor. Foi encontrada uma correlação positiva entre os efeitos e a atividade da SINV, possivelmente relacionada a inibição da liberação de citocinas e prostanoídes com possível estimulação da modulação de óxido nítrico (MIRANDA et al., 2011; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014).

Um grande problema com relação à SINV é que este fármaco está disponibilizado no mercado apenas na sua forma sólida (cápsulas e comprimidos) dificultando o seu uso local com efeito anti-inflamatório. Nos últimos anos a procura por novos sistemas carreadores de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados, como os sistemas de liberação controlada (OTUKI; PIETROVSKI; CABRINI, 2006; CHOPRA et al., 2007; KIM, et al., 2007; MIRANDA et al., 2011; ADAMI et al., 2012).

## **2.5 Modelos cinéticos de liberação de fármacos em sistemas poliméricos**

A etapa de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos resulta da influência entre mecanismos de dissolução, difusão e erosão do polímero. Esse complexo mecanismo de liberação resulta, em parte, do fato das moléculas de QTS, quando em contato com a água, devido ao processo de transição do estado seco para o estado maleável, adquirindo micro e macroestrutura, cujas conformações, dependem do tempo desta exposição. Consequentemente, o tratamento matemático, envolvendo estes fatores, torna-se muito capcioso (COSTA; LOBO, 2001).

Na literatura, encontram-se diversos trabalhos experimentais com o intuito de elucidar modelos de transporte do fármaco, identificando quais os mecanismos de liberação do fármaco a partir de sistemas matriciais (COLOMBO et al., 2000; FERRERO et al., 2000; KIIL; DAM; JOHANSEN, 2003). Em 2001, Siepmann e Peppas publicaram uma compilação de vários tipos de modelos matemáticos desenvolvidos para os sistemas poliméricos. Abrangendo desde correlações

empíricas e semi-empíricas simples, até formulas complexas que analisam fatores como tamanho e a geometria das matrizes poliméricas.

Características físicas do fármaco em uma matriz de QTS (como a solubilidade aquosa, diferença de densidade e a porosidade da matriz) comumente são desvalidas nos modelos desenvolvidos e, propriedades de dissolução (solubilidade e velocidade de dissolução) devem ser tomadas em atenção no caso de fármacos fracamente solúveis em água, como a SINV (SIEPMANN; PEPPAS, 2000). Pois, caso a concentração de fármaco exceda sua solubilidade, coexistindo na matriz o fármaco dissolvido e não dissolvido, estando apenas a forma dissolvida disponível para a difusão. De modo que, os modelos devem satisfazer as condições experimentais ideais e serem aplicados em situações específicas.

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, determinados modelos são bastante utilizados na análise da liberação de fármacos a partir destas matrizes (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo cinético de ordem zero fundamenta-se na liberação lenta do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam. Expresso pela Equação 1:

$$Q_t = Q_0 + k_0t \text{ (Equação 1)}$$

Onde,  $Q_t$  é a quantidade de fármaco dissolvido ao tempo  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco dissolvido na solução ( $Q_0 = 0$ , geralmente) e  $k_0$  é a constante de liberação de ordem zero.

Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada, como é o caso dos comprimidos matriciais, dos sistemas osmóticos e das formas revestidas (VARELAS et al., 1995).

Formulações destinadas a carrear ativos para liberação prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, verificando-se que a velocidade de difusão do fármaco, do interior para o exterior da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, causando a cedência constante do fármaco. Essa forma de liberação é muito difícil de obter na prática e o emprego deste modelo apresenta muitas limitações devido aos poucos fatores de ajuste ao modelo.

Outro modelo, o de primeira ordem, teve sua aplicação nos estudos de dissolução proposta pela primeira vez por Gibaldi e Feldman (1967) e mais tarde por Wagner (1969) ao aplicar a seguinte sentença:

$$\text{Log}Q_t = \text{Log}Q_0 + k_1 t \text{ (Equação 2)}$$

Em que,  $Q_t$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco na solução e  $k_1$  é a constante de liberação de primeira ordem. Desta forma, o gráfico do logaritmo decimal da quantidade liberada do fármaco versus tempo será linear. As formas farmacêuticas que seguem este perfil de dissolução, comumente contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas que agem liberando o fármaco de forma proporcional à quantidade restante no seu interior, de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo tende a decrescer (MULYE; TURCO, 1995).

Higuchi em 1961 desenvolveu um modelo cinético frequentemente utilizado para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial. A Equação 3 representa a Equação de Higuchi expressa como fração de massa liberada:

$$Q_t = k_H t^{1/2} \text{ (Equação 3)}$$

Onde,  $k_H$  é a constante de dissolução de Higuchi, que descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick. Este modelo pode ser usado para descrever a dissolução de fármacos a partir de várias formas farmacêuticas, tais como alguns sistemas transdérmicos, e comprimidos matriciais com fármacos hidrossolúveis (COSTA; LOBO, 2001).

Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Todavia, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode ser insuficiente, visto que, esses sistemas podem sofrer processo de erosão, devendo-se atender a propriedade de relaxamento de cadeias poliméricas, uma vez que esse fenômeno interfere no transporte do fármaco. De tal modo, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada para

essas condições. No entanto, apresenta-se mais realista para mecanismos que ocorrem nos sistemas matriciais que o modelo de ordem zero. O modelo de Higuchi pode ser aplicado com maior confiabilidade em matrizes unidimensionais pouco solúveis, que não apresentem capacidade de intumescimento, como o acetato de celulose, com fármacos muito solúveis (TAHARA et al., 1996).

O modelo de Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER; PEPPAS, 1981; KORSMEYER et al., 1983), geralmente é usado para análise de mecanismos de liberação não muito bem estabelecidos ou quando há mais de um fenômeno envolvido, leva em consideração mecanismos de liberação de fármacos que não seguem a lei de Fick, seguindo um comportamento anômalo (DE MELO et al., 2010), descrito pela Equação 4:

$$Q_t/Q_0=kt^n \text{ (Equação 4)}$$

Em que,  $Q_t$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco na solução,  $k$  é a constante cinética e  $n$  é a exponencial de liberação.

Os valores de  $n$  são empregados para interpretar e caracterizar o mecanismo de liberação. Quando  $n$  é igual a 0,45, o mecanismo principal, que controla a liberação do fármaco no sistema é a difusão pura (difusão Fickiana clássica). Valores de  $n$  igual a 0,89 obedecem ao modelo de ordem zero, com a liberação regida por um mecanismo de transporte denominado Caso II, de modo que, pelo intumescimento da matriz polimérica (relaxamento do retículo polimérico ou liberação mediante erosão). Quando  $n$  assume valores entre 0,45 e 0,89 o transporte anômalo é observado na cinética, havendo assim combinação dos dois mecanismos de difusão Fickiana e de transporte de Caso II (HAYASHI et al., 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Produzir filmes de quitosana com sinvastatina para uso tópico em inflamações cutâneas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver filmes poliméricos de QTS;
- Incorporar a SINV nos filmes poliméricos de QTS (FPQ);
- Caracterizar físico-quimicamente os filmes produzidos;
- Validar uma metodologia espectrofotométrica de quantificação de SINV;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* da SINV em células tipo Franz;
- Avaliar *in vivo* a ação anti-inflamatória e cicatrizante dos FPQ utilizando camundongos.

**Capítulo I – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM  
MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SINVASTATINA EM  
FILMES DE QUITOSANA**

(Artigo a ser submetido ao periódico Boletim Informativo GEUM)

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SINVASTATINA EM FILMES DE QUITOSANA

Natan Emanuell S. Silva\*; Bolívar Ponciano Goulart L. Damasceno; Rosemary Sousa Cunha Lima; José Alexandro Silva; Yuri Basílio G. Patriota; Vandiarra Martins Moreira; Pedro Gomes S. Neto; Amaro César L. Assis.

*Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - Paraíba, Brasil.*

\*Autor para correspondência:  
Rua das Baraúnas, Bairro  
Universitário, Campina Grande-PB,  
CEP: 58429-500.  
Tel: (81) 99874- 2741  
E-mail: natan.farmacia@gmail.com

## RESUMO

O ensaio de validação tem por objetivo demonstrar que o método analítico está apto para quantificar a substância em análise o mais próximo possível do real. Neste trabalho, objetivou-se desenvolver e validar um método de quantificação para a sinvastatina em tampão fosfato por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) para o doseamento da sinvastatina (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydro naphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoate) em filmes poliméricos de quitosana. O método proposto foi validado conforme a Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para tanto, parâmetros como linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e especificidade foram avaliados. Os resultados demonstraram que o método de quantificação está em apto para o doseamento da sinvastatina, satisfazendo todos os parâmetros de órgãos reguladores. Portanto, a metodologia proposta pode ser seguramente aplicada para quantificação da sinvastatina em filmes de quitosana.

**Palavras chave:** Doseamento; Espectrofotometria; Exatidão; Linearidade; Precisão.

## 1. INTRODUÇÃO

A sinvastatina (SINV) apresenta fórmula molecular  $C_{25}H_{38}O_5$ ; na nomenclatura IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é o 1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydro naphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoate. É um composto sintético derivado da lovastatina, a qual é o produto da fermentação do fungo *Aspergillus terreus* (PEREIRA et al., 2003).

É a segunda estatina mais potente e a mais prescrita no Brasil, caracterizando-se com um pó branco, cristalino, não higroscópico, com ponto de fusão na faixa de 135 a 138 °C, insolúvel em água (0,03 g/L) e solúvel em clorofórmio (610 g/L), metanol (200 g/L) e etanol (160 g/L). Possui coeficiente de partição (octanol/água), log P, igual a 4,68, máximos de absorção na região do ultravioleta (UV<sub>máx</sub>, em acetonitrila) em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 231, 238 e 247 nm (BUDAVARI, 2006 USP, 2008; EUROPEAN, 2009) e pKa de 4,18, estando a molécula quase completamente dissociada em pH 6,8 (YOSHINARI et al, 2007).

O ensaio de validação tem por objetivo demonstrar que o método analítico está apto para quantificar o teor, ou seja, que ele é capaz de quantificar a substância em análise o mais próximo possível do real. Desta forma, a uniformização dos procedimentos e das condições dos ensaios são atualmente uma das principais preocupações com as entidades reguladoras, pretendendo-se, assim, aumentar a credibilidade e a validade dos resultados obtidos nos ensaios de quantificação corretamente delineados e executados. (BRASIL, 2003).

Nesse sentido, pode-se afirmar que o desenvolvimento de metodologias analíticas é fundamental na avaliação quantitativa de um fármaco em uma formulação. Para que os resultados obtidos por um método possam ser considerados confiáveis e reprodutíveis, faz-se necessária a determinação experimental de alguns parâmetros, sendo este processo conhecido como validação (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2013). Esses parâmetros devem comprovar, por exemplo, que o método demonstre especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas para a análise proposta (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica para a SINV por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível

(UV/VIS) para quantificação desta molécula em um filme polimérico de quitosana para aplicação tópica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Quitosana Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Baixa densidade e Grau de desacetilação-GD de 85%), Missouri, EUA; Quitosana Phytomare<sup>®</sup> (Alta densidade e GD de 75%), Santa Catarina, Brasil; Álcool etílico absoluto, ácido acético e hidróxido de sódio com grau analítico; O fármaco utilizado, sinvastatina Viafarma<sup>®</sup>, Santa Catarina, Brasil.

### 2.2 Métodos

#### ***2.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico espectrofotométrico para doseamento da SINV***

O método foi validado de acordo com a RE n. 899, de 29 de maio de 2003, que dispõe sobre o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003). Contemplando parâmetros como: especificidade, linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Utilizou-se neste estudo um espectrofotômetro com detector UV-VIS, modelo UV MINI - 1240 (Shimadzu, Quioto, Kansai, Japão). Inicialmente realizou-se uma varredura espectrofotométrica de soluções da SINV na faixa de comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 200 a 300 nm. Em seguida, determinou-se o valor de  $\lambda$  onde a solução apresentou maior absorvância, sendo então considerado como comprimento de onda adequado para quantificação da SINV.

Para isso, foi realizada a dissolução da SINV em tampão fosfato 0,01M e pH 7,0 formando a solução padrão (SP) com concentração de 1 mg/mL. Partindo-se dessa solução, foi realizada uma diluição, no mesmo tampão, formando a solução 1 (S1) na concentração de 100  $\mu$ g/mL. Diluiu-se a S1 até 16  $\mu$ g/mL formando a solução 2 (S2) e, a partir desta solução, foi determinada o valor máximo nas bandas de absorvância da SINV. Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da precisão que foi feita em sextuplicata.

#### 2.2.1.1 Especificidade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Enquanto um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da resposta de outros, é chamado seletivo. (BRASIL, 2003).

Para avaliar a especificidade do método foram utilizados os FPQ sem e com SINV de modo a avaliar a influência do filme no pico de absorvância característico do fármaco.

#### 2.2.1.2 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em uma determinada faixa de concentração. (BRASIL, 2003). A partir da S1, foram preparadas três curvas de calibração com 10 níveis de concentrações: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 µg/mL diluídas em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 (USP, 2008). Os resultados foram tratados estatisticamente para determinação do coeficiente de correlação (r) e obtenção da equação da reta.

#### 2.2.1.3 Limite de detecção

O limite de detecção de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005), sendo seu valor obtido através da Equação 1:

$$LD = DP_a \times 3/IC \text{ (Equação 1)}$$

Onde, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

#### 2.2.1.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito, em uma amostra, que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas. O limite de quantificação é um parâmetro de ensaios quantitativos para os baixos níveis de compostos em matrizes de amostras e é usado principalmente para a determinação de impurezas e/ou produtos de degradação (ICH, 2005). Seu valor pode ser obtido através da seguinte Equação 2:

$$LQ=DPa \times 10/IC \text{ (Equação 2)}$$

Onde, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

#### 2.2.1.5 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito com o valor encontrado. (ICH, 2005). A exatidão do método foi determinada a partir das absorbâncias de soluções da SINV em três níveis de concentração: 6 µg/mL (Nível baixo), 12 µg/mL (Nível médio) e 18 µg/mL (Nível alto).

#### 2.2.1.6 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea nas condições previstas (BRASIL, 2003). Para a precisão, foi realizada a leitura em sextuplicata de soluções da SINV na concentração equivalente ao ponto médio da curva de calibração (12 µg/mL). As análises foram realizadas por operadores diferentes e em dias distintos.

#### 2.2.1.7 Robustez

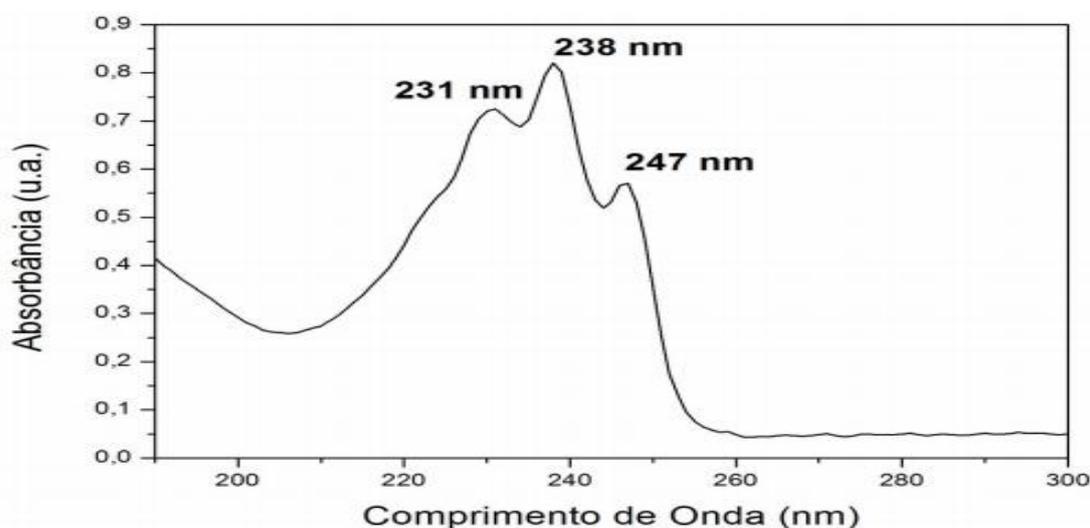
A robustez de um procedimento analítico é uma medida de sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações em parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (ICH, 2005). Na robustez foi realizada a análise do ponto médio, efetuando-se pequenas modificações metodológicas, sendo elas:

- Diferentes solventes (Tampão fosfato 0,01M pH 7,0 e acetonitrila)
- Equipamentos distintos: Espectrofotômetro UV mini 1240 (Shimadzu, Quioto, Japão) e SP2000 (Nova instruments, Londres, Inglaterra).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desenvolvimento e Validação do método analítico espectrofotométrico para doseamento da SINV

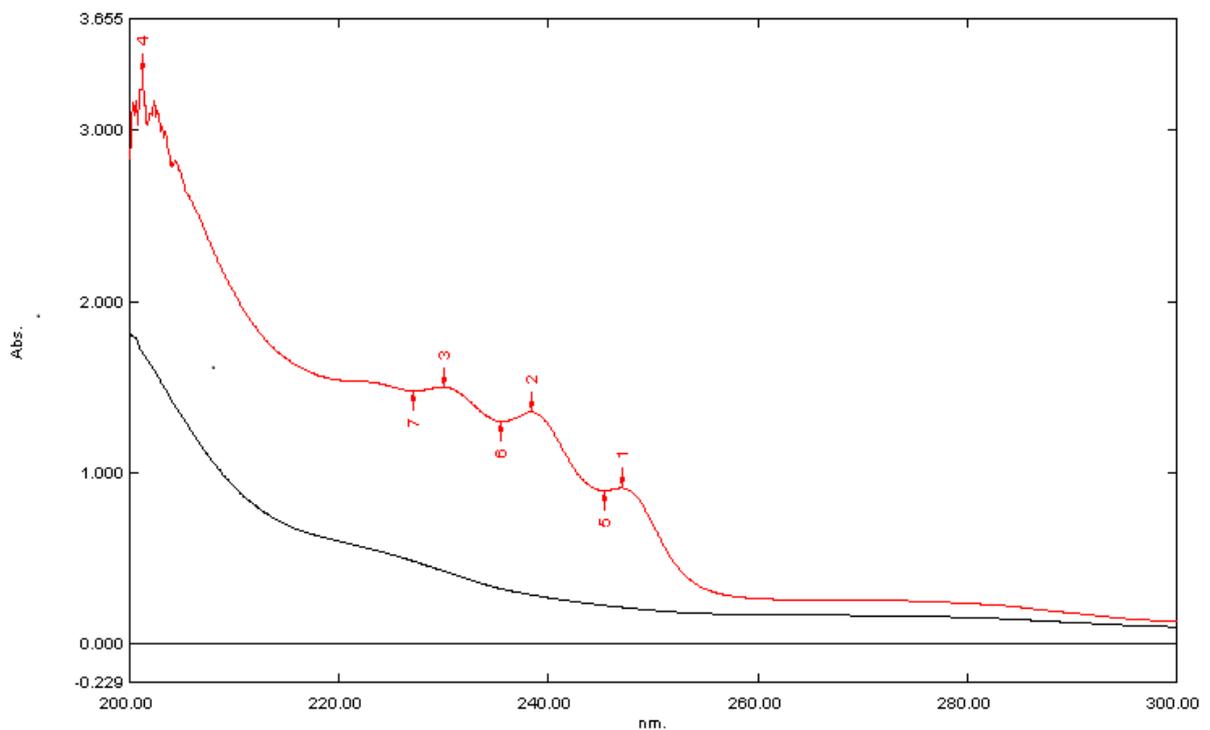
A varredura espectrofotométrica (200-300 nm), realizada para a verificação do comprimento de onda adequado, demonstrou que a SINV apresentou uma banda de absorbância em 238 nm, valor idêntico àqueles relatados na literatura (BUDAVARI, 2006; USP, 2008; EUROPEAN, 2009).



**Figura 1:** Varredura espectral dos FPQ evidenciando os picos característicos da SINV em UV

##### 3.1.1 Especificidade

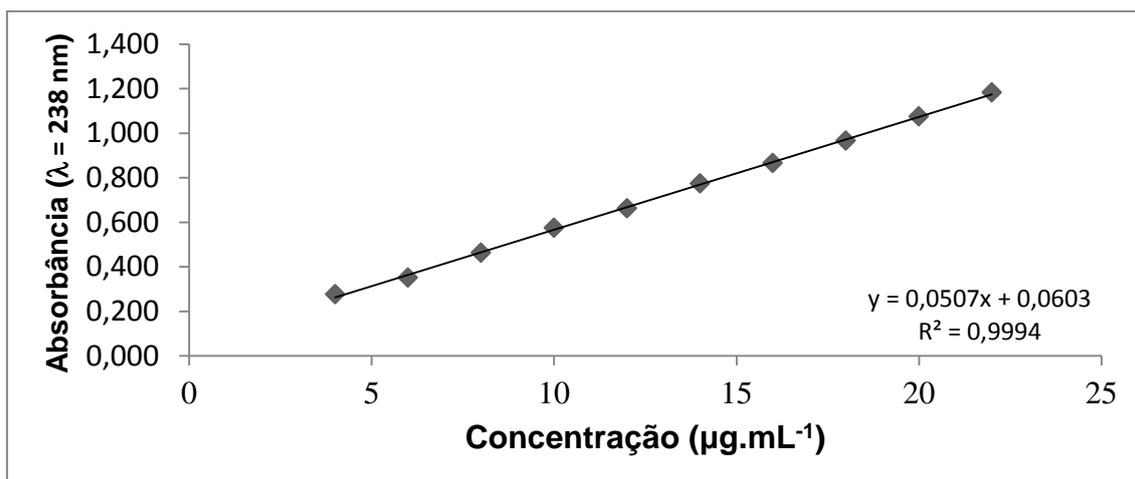
Após ficarem 2h em 5 mL de tampão fosfato 0,01M pH 7,0, o resíduo líquido dos FPQ foi posto em varredura na faixa de  $\lambda$  variando de 200 a 300 nm, sendo assim avaliada a presença de possíveis interferentes na área espectral de absorbância da SINV. Observa-se, na Figura 2, a formação dos 3 picos característicos da SINV de acordo com a literatura (USP, 2008). Desta forma, pode-se notar que o método mostra-se específico para a SINV.



**Figura 2:** Varredura espectrofotométrica de filmes com e sem SINV evidenciando a formação dos picos característicos do fármaco  
**Legenda:** --- Filme com SINV; ---- Filme branco.

### 3.1.2 Linearidade

A Figura 3 mostra que o método proposto apresentou faixa de linearidade de 2 a 22  $\mu\text{g/mL}$  e a curva analítica pode ser descrita através da equação  $y=0,0507x - 0,0603$  obtidas pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997. Segundo a RDC 899/2003 da ANVISA, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva de calibração é de 0,99, atestando a linearidade do método.



**Figura 3:** Curva de calibração da SINV em tampão fosfato

### 3.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

As determinações de LQ e LD são essenciais para garantir a quantificação e a detecção do fármaco desde os pontos iniciais de amostragem. Os valores estimados de LD e LQ foram de 0,02 µg/mL e 0,04 µg/mL, respectivamente.

### 3.1.4 Exatidão

A partir dos valores de absorbância encontradas (n=3) nos níveis baixo (6 µg/mL), médio (12 µg/mL) e alto (18 µg/mL), pode-se observar a correlação entre resultados (Tabela 1), obtendo-se um coeficiente de variação menor que o aceitável pela legislação vigente (5%), assegurando a exatidão do método.

Concentração (µg/mL)	L1	L2	L3	Média	DP	CV (%)
6 (50%)	0,160	0,159	0,161	0,160	0,001	0,625
12 (100%)	0,662	0,664	0,662	0,663	0,001	0,174
18 (150%)	0,967	0,966	0,965	0,966	0,001	0,104

**Tabela 1:** Resultado analítico e tratamento estatístico da exatidão

### 3.1.5 Precisão

Através da sextuplicata do ponto médio, determinou-se a precisão para o método (Tabela 2).

Dia 1	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Média	DP	CV (%)
<b>Analista 1</b>	0,662	0,667	0,662	0,664	0,663	0,665	0,664	0,002	0,292
<b>Analista 2</b>	0,661	0,665	0,663	0,664	0,668	0,666	0,665	0,002	0,366
Dia 2	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Média	DP	CV (%)
<b>Analista 1</b>	0,665	0,666	0,664	0,664	0,663	0,664	0,664	0,001	0,155
<b>Analista 2</b>	0,667	0,662	0,663	0,668	0,664	0,661	0,664	0,003	0,420

**Tabela 2:** Resultado analítico e tratamento estatístico da precisão

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que o método apresenta uma boa repetitividade, visto que o coeficiente de variação nas duas corridas se mostra inferior ao critério de aceitação, tornando o resultado adequado, já que a legislação (RDC 899/2003 da ANVISA) não admite valores superiores a 5 % de variação.

A precisão e a exatidão juntas determinam o erro de uma medida analítica. O método desenvolvido foi considerado exato e preciso.

### 3.1.6 Robustez

Os testes de robustez são de fundamental importância para que os analistas possam conhecer quais os fatores devem ser estritamente controlados durante a execução de um método. Se as alterações das condições de análise produzirem resultados dentro dos limites aceitáveis de seletividade, exatidão e precisão, o método pode ser considerado robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento, afirmando assim que seu método pode reproduzir um resultado semelhante mesmo com algumas mudanças na execução (CASSIANO et al., 2009; SILVA et al., 2013). Dessa forma, a mudança do solvente ou do equipamento utilizados não acarretaram alterações significativas, atestado pelos baixos valores

dos coeficientes de variação (Tabela 3). A Tabela 4 corrobora com esses resultados evidenciando a precisão e exatidão no ensaio de robustez.

<b>Solvente</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
Tampão fosfato	0,662	0,664	0,662	0,63	0,001	0,174
*Acetonitrila	0,689	0,701	0,693	0,694	0,006	0,880
<b>Equipamento</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
UV mini 1240	0,654	0,659	0,667	0,660	0,007	0,994
SP 2000	0,642	0,652	0,649	0,648	0,005	0,792

**Tabela 3:** Resultado analítico e tratamento estatístico da robustez

<b>Modificação</b>	<b>Concentração real (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração Obtida</b>	<b>Precisão (CV, %)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
S1	12	11,88	0,174	99,01
S2	12	12,51	0,880	104,21
E1	12	11,83	0,994	98,57
E2	12	11,59	0,792	96,54

**Tabela 4:** Precisão e exatidão no ensaio de robustez

**Legenda:** E - Equipamento; S - Solvente

Portanto, os resultados da validação demonstraram que a metodologia de quantificação por espectrofotometria UV desenvolvida é adequada visto que foi comprovada sua especificidade, linearidade, precisão e exatidão na análise qualitativa da SINV nos filmes.

#### **4. AGRADECIMENTOS**

A CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Laboratório de desenvolvimento de medicamentos (LabDem) e ao Laboratório de química analítica (LQA).

## **5. CONCLUSÃO**

O método por espectroscopia UV desenvolvido e validado no presente trabalho foi simples, específico, exato, preciso, robusto, rápido e econômico para a quantificação da SINV. Além disso, o solvente utilizado (tampão fosfato) é menos oneroso do que a acetonitrila utilizada na maioria dos trabalhos. Este método desenvolvido será de grande valia para o doseamento da SINV nos FPQ, além de ser específico para a quantificação do fármaco sem a necessidade de técnicas adicionais.

## 6. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BRASIL, Resolução RE Nº 899 de 29 de maio de 2003. O adjunto da diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece o **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2 jun. 2003.

BUDAVARI, S (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14a ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Physical Biology Science**. v. 86, n. 5, p. 484-493, 2010.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Supplement 6.4 to the 6a ed. France: **Directorate of Quality of Medicines of the Council of Europe**. p. 4686, 2009.

ICH EXPERT WORKING GROUP. **Internacional Conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**. 2005.

SILVA J. A, BEDOR D. C. G, SOUSA C.E.M, SANTANA D. P, EGITO E. S. T OLIVEIRA. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31: p. 41-46, 2010

SILVA, J.A; GUIMARAES, G.P; PATRIOTA, Y.B.G; SILVA; N.E.S; SOUSA, C.E.M.; MENDONÇA JR., F.J.B; SANTANA, D.P; DAMASCENO, B.P.G.L. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, *No prelo*, 2013.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. National Formulary. USP 31. **Rockville: United States Pharmacopeial Convention**. p. 2815, 3359, 3557, 2008.

YOSHINARI, M. Controlled release of simvastatin acid using ciclodextrin inclusion sistem. **Dental Materials Journal**, v. 26, n. 3, p. 451-456, 2007.

## **Capítulo II – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO CINÉTICO DE FILMES DE QUITOSANA COM SINVASTATINA**

(Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Controlled Release)

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO CINÉTICO DE FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA COM SINVASTATINA

Natan Emanuell S. Silva\*; Bolívar Ponciano G.L Damasceno; Rosemary Sousa Cunha Lima; José Alexsandro Silva; Geovani Pereira Guimarães; Airlla Laana Medeiros; Yuri Basílio G. Patriota; Vandiarra Martins Moreira; Pedro Gomes S. Neto; Amaro César L. Assis.

*Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - Paraíba, Brasil.*

\*Autor para correspondência:

Rua das Baraúnas, Bairro  
Universitário, Campina Grande-PB,  
CEP: 58429-500.  
Tel: (81) 99874- 2741  
E-mail: natan.farmacia@gmail.com

## RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, amplamente distribuído na natureza que vem sendo bastante utilizado para liberação controlada de fármacos, sobretudo para os de baixa solubilidade aquosa, como a sinvastatina. A sinvastatina é uma estatina hipolipemiante que vem exibido uma interessante atividade anti-inflamatória local. No entanto, as formas farmacêuticas nas quais esse fármaco está disponibilizado no mercado inviabilizam seu uso tópico. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema na forma de filme polimérico de quitosana contendo a sinvastatina, além de avaliar a cinética de liberação *in vitro* deste fármaco. Para o desenvolvimento dos filmes, utilizou-se do método sol-gel e a caracterização físico-química contemplou os ensaios de espectroscopia de infravermelho, difração e raios-X, e técnicas termoanalíticas (termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória). Para o estudo de cinética de liberação *in vitro*, utilizou-se um aparato de liberação tipo célula de Franz, empregando como membrana seletiva e o meio doador o próprio filme polimérico. A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que provavelmente diversas interações intermoleculares ocorreram entre o fármaco e a quitosana, levando a sinvastatina a sua forma amorfa incorporada no retículo polimérico, vindo a promover o transporte anômalo do fármaco relatado através do modelo cinético de

Korsmeyer-Peppas. Apresentando liberação controlada de sinvastatina durante 24h. Concluindo-se, que os filmes desenvolvidos são promissores para a liberação controlada de sinvastatina.

**Palavras-chave:** Análise térmica; Difração de raios-X; Espectroscopia de infravermelho; liberação *in vitro*.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a procura por novos sistemas carreadores de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes que possibilitem administrar fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados.

Neste sentido, há um grande interesse por parte das indústrias farmacêuticas em desenvolver formulações capazes de liberar fármacos em sítios específicos no organismo, mantendo-os no local por longos períodos de tempo, com velocidade de liberação controlada, visando prolongar a ação terapêutica e reduzir os efeitos indesejáveis, aumentando a efetividade e vetorizando a terapêutica para otimizar o tratamento de algumas doenças, como as lesões cutâneas, melhorando a adesão do paciente à terapia (COLLETT; MORETON, 2005).

Portanto, os sistemas poliméricos têm sido estudados com potencial para a liberação controlada de fármacos e o emprego de polímeros biodegradáveis, como a quitosana (QTS), tem sido foco de atenção na área farmacêutica, devido sua segurança (KEAN; THANOU, 2010).

Este polissacarídeo e seus derivados representam um grupo de polímeros naturais largamente utilizados em formas farmacêuticas devido à baixa toxicidade, baixo custo e disponibilidade. Aliado a isto, a biodegradabilidade, características filmogênicas e sua versatilidade têm constituído um elemento de elevado interesse e destaque no grupo de excipientes farmacêuticos (GOY, 2004; MATET et al., 2015; VAN DEN BROEK et al., 2015). Ela apresenta-se como um polissacarídeo derivado da quitina (copolímero de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina), encontrada principalmente em carapaça de crustáceos, e apresentam bastante interesse de cientistas e tecnólogos, devido a diversas aplicações na área farmacêutica (CARVALHO et al., 2011). A QTS apresenta propriedades

mucoadesivas que otimizam a penetração de macromoléculas pelas barreiras cutâneas (AHN et al., 2002), como também a capacidade de melhorar a dissolução e biodisponibilidade de fármacos fracamente solúveis em água, como a sinvastatina (SAKKINEN et al., 2004).

A sinvastatina (SINV), estatina hipolipêmica de fórmula molecular  $C_{25}H_{38}O_5$ , apresenta-se como um pó branco, cristalino, não higroscópico, com ponto de fusão na faixa de 135 a 138 °C, insolúvel em água (0,03 g/L) e solúvel em etanol (160 g/L). Possui coeficiente de partição (octanol/água), log P, igual a 4,68, devido a essas propriedades físico-químicas, faz parte da classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, é uma substância de baixa solubilidade e alta permeabilidade (AMIDON, 1995; GRAESER et al., 2008), e apresenta pKa de 4,18, estando a molécula quase completamente dissociada em pH 6,8 (YOSHINARI et al., 2007).

Além disso, estudar a sua liberação de estruturas poliméricas é de fundamental importância para determinação do comportamento deste fármaco em relação ao sistema no qual se encontra incorporado, permitindo verificar possíveis interações entre o fármaco e os componentes da formulação. Os ensaios de liberação *in vitro*, utilizando o aparato de células de Franz, quando comparados com outras técnicas, são bastante utilizados devido ao seu baixo custo, boa reprodutibilidade de resultados, realização do experimento em pequeno espaço de tempo, além de ser um método simples e facilmente controlado em condições experimentais (LEVEQUE et al., 2003; BARRY, 2004; LEONARDI et al., 2004; DE ANTONIO, 2007).

Por fim, caracterizar físico-quimicamente estes sistemas poliméricos é essencial para a análise da sua microestrutura, pois se pode determinar possíveis incompatibilidades até formular prazos de validade para produtos farmacêuticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e realizar uma caracterização físico-química de um filme polimérico de QTS (FPQ) contendo a SINV incorporada e avaliar o perfil de liberação desse fármaco dos FPQ e estabelecer o seu modelo cinético de liberação.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Quitosana Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Baixa densidade e Grau de desacetilação-GD de 85%), Missouri, EUA; Quitosana Phytomare<sup>®</sup> (Alta densidade e GD de 75%), Santa Catarina, Brasil; Álcool etílico absoluto, ácido acético e hidróxido de sódio com grau analítico; O fármaco utilizado, sinvastatina Viafarma<sup>®</sup>, Santa Catarina, Brasil.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Desenvolvimento dos filmes de quitosana (FPQ)

Iniciou-se com a dissolução das quitosanas Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e Phytomare<sup>®</sup> em ácido acético 1%, colocadas sob agitação magnética por 24h. As soluções resultantes foram filtradas a vácuo e 5 mL dessas soluções foram colocados em placa de Petri para formação dos filmes brancos (denominados FB1 para quitosana Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e FB2 para quitosana Phytomare<sup>®</sup>). Para a incorporação da SINV nos filmes, esta foi previamente dissolvida em álcool etílico P.A nas concentrações de 10 e 20 mg, formando assim soluções etanólicas de 10 mg/mL e 20 mg/mL de SINV. Com isso, 1 mL de cada solução foi adicionado à 5 mL da solução de ambas quitosanas, prosseguindo-se com a secagem no *shaker* sob 40 rpm de rotação à 50°C. Sobre os filmes formados, foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4% para neutralização do ácido residual. Lavados posteriormente com água destilada até atingir o pH= 7,0 e secos em temperatura ambiente por 48h, formando assim os filmes da quitosana Sigma-Aldrich<sup>®</sup> nas concentrações de 10 mg e 20 mg (F110 e F120, respectivamente) e os filmes da quitosana Phytomare<sup>®</sup> nas mesmas concentrações, denominados F210 e F220 (Método Sol-gel, adaptado de LIMA, 2010; EPURE, 2011).

## **2.2.2 Caracterização físico-química dos filmes formados**

### **2.2.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de espectroscopia de infravermelho da SINV e dos FPQ foi realizada utilizando um espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR *Spectrometer* (*Perkin Elmer*<sup>®</sup>, Boston, Massachusetts, EUA). Bandas de absorção características foram utilizadas para analisar o fármaco e os filmes. As amostras de pó de SINV (cerca de 1 mg) foram adicionadas a 100 mg de KBr, sob uma pressão de  $1 \times 10^7$  Pa. Já os filmes foram colocadas sobre a placa de aço e analisados diretamente na varredura de 4000 a  $650 \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.2.2.2 Difração de raios X (DRX)**

As amostras foram submetidas à análise por DRX, através de um difratômetro de raios X modelo XRD 6000 (*Shimadzu*<sup>®</sup>, Kansai, Quioto, Japão) com varredura angular  $5^\circ < 2\theta < 60^\circ$ , na montagem de Bragg-Brentano, sistema  $\theta$ - $2\theta$ , utilizando-se radiação de Cu ( $K\alpha_1$ ) com varredura no passo de 0,02 ( $2\theta$ ), com intervalo de 0,6 segundo para cada amostra.

### **2.2.2.3 Análise Térmica**

#### **2.2.2.3.1 Termogravimetria (TG)**

As curvas termogravimétricas (TG) da SINV e dos FPQ foram obtidas em um módulo termogravimétrico TGA 4000 (*Perkin Elmer*<sup>®</sup>, Boston, Massachusetts, EUA), na razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $900^\circ\text{C}$ . Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, com fluxo de  $20 \text{ mL min}^{-1}$ . Foi utilizado massa de  $5,00 \pm 0,05 \text{ mg}$  acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração do equipamento foi realizada com padrão de oxalato de cálcio.

#### 2.2.2.3.2 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As curvas de DSC do material foram obtidas em um módulo Calorimétrico Exploratório Diferencial DSC modelo 8500 (*Perkin Elmer*<sup>®</sup>, Boston, Massachusetts, EUA). Analisadas na razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> até a temperatura de 400°C. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. O DSC Q20 foi calibrado para a temperatura utilizando como padrões os pontos de fusão do índio (PF= 156,6°C) e zinco metálico (PF= 419,5°C) com pureza de 99,99°C. A calibração para energia foi feita com base na entalpia de fusão do índio metálico ( $\Delta H_{\text{Fusão}} = 28,54 \text{ Jg}^{-1}$ ).

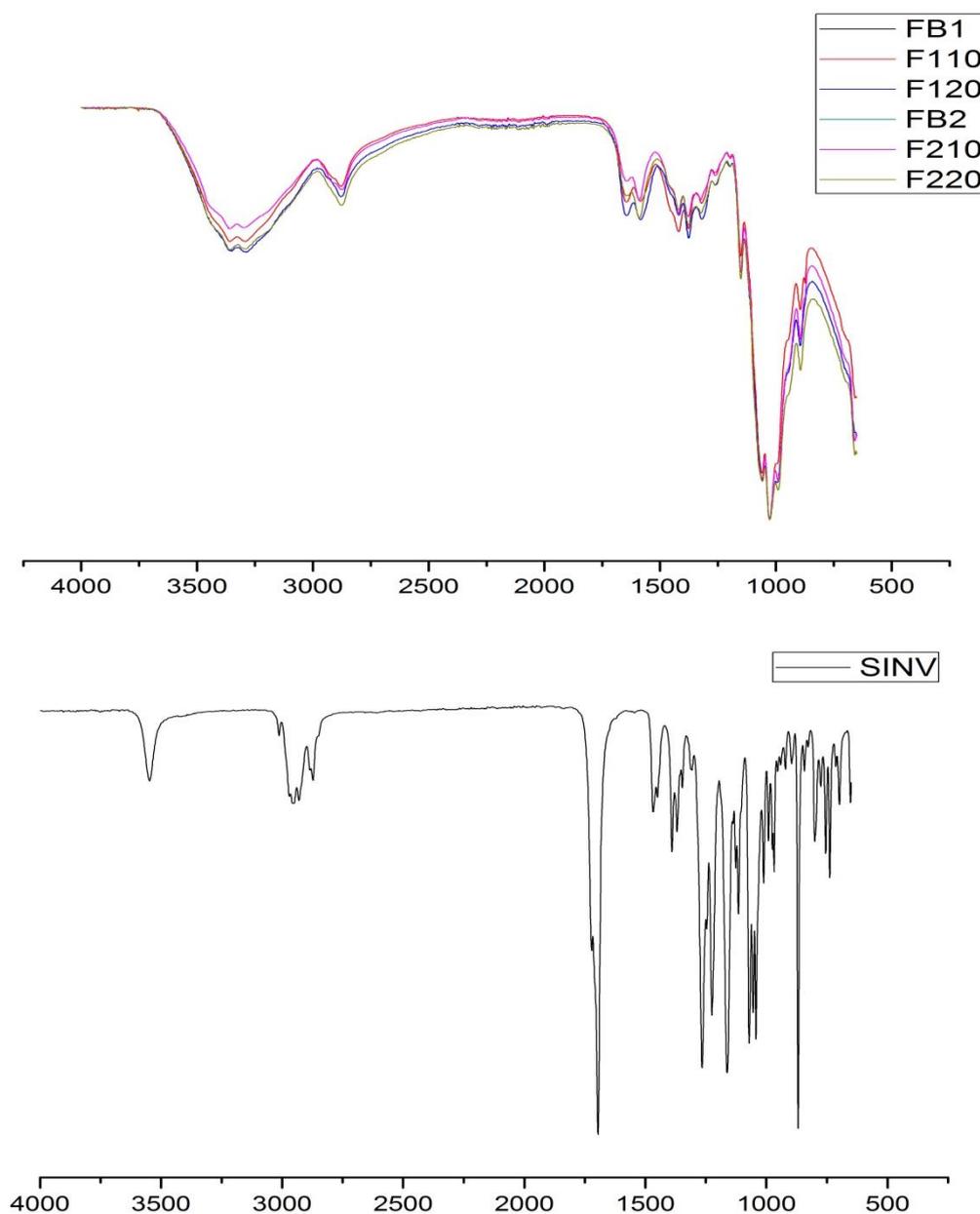
#### 2.2.3 Ensaio de liberação

O estudo de liberação *in vitro* da SINV a partir dos filmes foi realizado com células de difusão do tipo FRANZ com área difusional de 0,7539 cm<sup>2</sup> e volume em torno de 6 mL. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato USP 0,01M e pH 7,0 em um sistema composto de seis células individuais conectados a um banho termostatizado à 37°C ± 0,5°C sob agitação constante de 100 rpm por um período de 48 horas. As membranas foram colocadas entre o compartimento doador e receptor de forma que ficassem em contato com a solução receptora. Todas as membranas foram previamente umedecidas (1 hora antes do experimento) com a solução receptora. Os FPQ agiram de duas formas, a primeira como meio seletivo (membrana) e a segunda como compartimento doador de SINV, para isso foram ajustados ao tamanho da área difusional, resultando-se numa dose de 2741,45 µg de SINV para F120 e F220 e 1370,72 µg de SINV para F110 e F210. Em períodos de tempos pré-determinados (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 12; 18; 24 e 48h) todo o líquido do compartimento receptor foi coletado e imediatamente repostado, satisfazendo a condição *sink*. A SINV liberada foi quantificada em espectrofotometria UV e o índice de correlação de Pearson (r) foi utilizado para identificar qual modelo cinético se mostrava mais adequado para descrever a liberação da SINV.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização físico- química

Os espectros de infravermelho relativos aos FPQ são mostrados na Figura 1, e os principais valores de absorbância de FTIR, que caracterizam estrutura dos FPQ estão resumidos na Tabela 1.



**Figura 1:** Espectros de infravermelho dos FPQ e da SINV

FAIXA DE ABSORBÂNCIA	ATRIBUIÇÃO	ABSORÇÕES IDENTIFICADAS (CM <sup>-1</sup> )
3500-3300	- Estiramento simétrico NH <sub>2</sub>	3363, 3354
3500-3200	- Estiramento O-H	3363, 3354, 3292
2900- 2800	- Estiramento metila e metileno	2876, 2866
1670-1640	- Estiramento C=O de Amidas	1656, 1646
1640-1560	- Deformação NH <sub>2</sub>	1575
1400	- Estiramento simétrico de Ác. Carboxílico	1412
1380-1370	- Deformação simétrica C-H	1372
1159	- Vibrações C-O-C	1159
1250-1000	- Estiramento C-O de álcoois e fenóis	1159, 1026,1077
1000-650	- Deformações C-H	995,894,884

**Tabela 1:** Principais valores de absorbância detectados nos dos FPQ

**Fonte:** Adaptado de Fraga (2006), Cui et al. (2008) e Lima (2010).

Caracterizada por grupos amino livres, a estrutura química da quitosana (Figura 1) apresentou absorções médias e largas verificadas entre 3500 cm<sup>-1</sup> e 3300 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas a estiramentos N-H assimétricos e simétricos respectivamente de amins primárias em líquidos puros, com contribuição de estiramento –OH praticamente sobreposto, presente na estrutura da quitosana na faixa de 3500-3200 cm<sup>-1</sup>. Os radicais não desacetilados podem ser identificados em cerca de 2800 cm<sup>-1</sup>, pico que pode ser atribuído aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila relacionados ao carbono 6. O estiramento ,C=O de amidas pode ser observado na região de 1670 cm<sup>-1</sup> e 1640 cm<sup>-1</sup> e em suas proximidades ocorre absorção média/forte e larga atribuída a estiramento nas amins primárias. Na faixa de 1380cm<sup>-1</sup> a 1370cm<sup>-1</sup> ocorre uma absorção que pode ser atribuída a deformação simétrica de C-H. As vibrações C-O-C podem ser detectadas em 1159cm<sup>-1</sup>. Ente 1250cm<sup>-1</sup> e 1000cm<sup>-1</sup> pode ocorrer uma absorção atribuída ao estiramento C-O de alcoóis e fenóis (VIEIRA et al., 2014).

Costa e Mansur (2008) atribuem a presença de absorções em 1154cm<sup>-1</sup> e 896cm<sup>-1</sup> como indicativos da presença da estrutura sacarídea característica da quitosana, e as bandas 3500cm<sup>-1</sup>, 1300cm<sup>-1</sup> e 1200cm<sup>-1</sup> como correspondentes aos estiramentos OH-fenol e C-N-amina primária, caracterizando os grupos funcionais

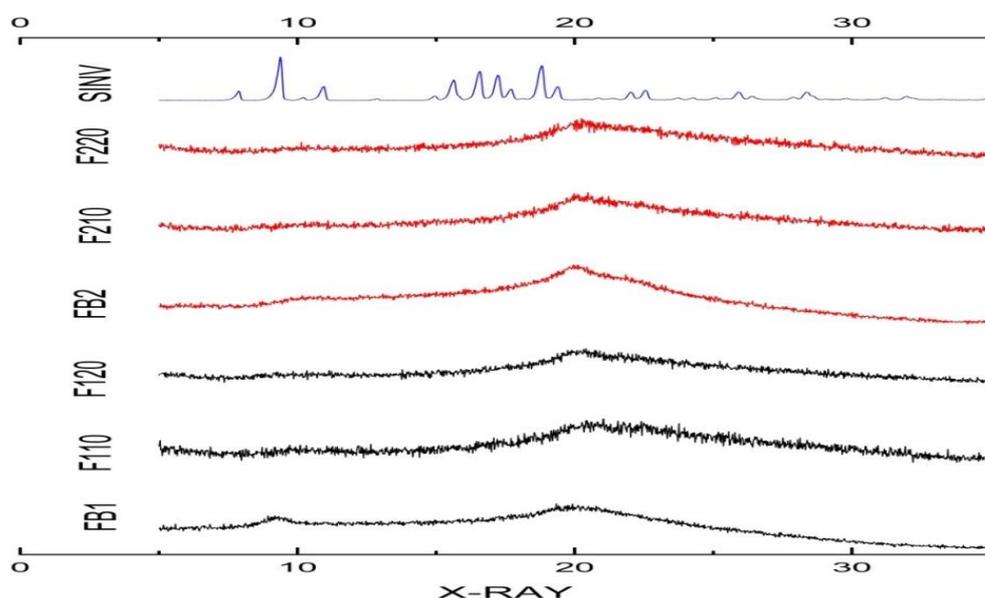
da quitosana. A banda localizada próximo a  $1500\text{ cm}^{-1}$  caracteriza o estiramento C-O que caracteriza a ligação N-glicosídica responsável pela estruturação do polímero (FRAGA et al., 2006). Darder, Colilla e Hitzky (2003) atribuem bandas vibracionais em  $1075\text{ cm}^{-1}$  característica do anel de piranose.

As principais bandas na região do infravermelho descritas para SINV estão localizadas nos seguintes números de ondas:  $1718$ ,  $1459$ ,  $1389$  e  $1267\text{ cm}^{-1}$  (TANDALE; JOSHI; GAUD, 2011). No espectro FTIR da SINV (Figura 1) os picos característicos são observados em  $3548\text{ cm}^{-1}$  do estiramento de OH de álcool,  $3011\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C-H olefínico,  $2952$  e  $2872\text{ cm}^{-1}$  do estiramento simétrico e assimétrico de C-H de metila e metileno, associado com estiramento C=O de lactona e C=O de éster em  $1712$  e  $1698\text{ cm}^{-1}$ , em  $1465$  e  $1390\text{ cm}^{-1}$  nota-se o balanço vibracional de grupos metila e metileno, os grupos lactona e éster em  $1269$ ,  $1228$  e  $1073\text{ cm}^{-1}$  (relacionado com a vibração C-O-C), o estiramento C-O de álcool secundário em  $1055\text{ cm}^{-1}$  e, por fim, em  $870\text{ cm}^{-1}$  a vibração C-H de olefina trissubstituída (PATEL; PATEL, 2008) (RAO et al., 2014).

Como se pode notar na Figura 1, ocorreu a supressão das bandas da SINV no FTIR, havendo indícios de uma possível formação de complexo entre QTS e SINV. A formação deste tipo de complexo, em que moléculas maiores envolvem menores pode ocorrer através da formação de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, entre outras (FREEMAN, 1984; YANG et al., 2008; WOJNAROWSKA et al., 2010). Existem relatos na literatura sobre a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares na SINV (CEJKA et al., 2003). Havendo assim, a possibilidade da SINV formar pontes de hidrogênio intermoleculares com a QTS, deixando hidroxilas da SINV livres e capazes de formar também pontes de hidrogênio com a água, podendo levar ao aumento de solubilidade aquosa.

A supressão das bandas de SINV também foi relatada por no estudo de Carvalho (2013) quando analisava *scaffolds* de sinvastatina, relacionando-se o fato à baixa concentração do fármaco em relação a forma farmacêutica. Abdelzaher e El-Maghraby (2015) trabalhando com filmes bucais de carboximetilcelulose com SINV relatam a mesma dificuldade de visualização das bandas do fármaco, inferindo-se que este fato decorra a inclusão da SINV no sistema polimérico e/ou a sua menor concentração no sistema.

Na análise de DRX a SINV apresentou um padrão de raios-X característico de um composto cristalino em  $9.3^\circ$  (reflexão primária),  $17.2^\circ$ ,  $18.8^\circ$  e  $22.6^\circ$ , já para os FPQ apresentaram halos de difração, característicos de estruturas amorfas. Os difratogramas dos FPQ e da SINV são mostrados na Figura 2:



**Figura 2:** Difratogramas dos FPQ e da SINV

Os FPQ apresentaram reflexões cristalinas iniciadas entre  $9$  e  $10^\circ$  e entre  $19$  e  $20^\circ$  características dos difratogramas de QTS apresentados por autores como Baskar e Kumar (2009) e Uygun et al. (2010).

Os halos de difração indicam que a base polimérica da QTS seguida pelas ligações N-glicosídicas que ligam os monômeros faz com que esta estrutura não tenha um ordenamento cristalino a longas distâncias interatômicas, gerando uma estrutura aleatória (FRAGA et al., 2006), comprovada pelo difratograma condizente com a ficha 39-1894 JCPDS (2003), correspondente a QTS.

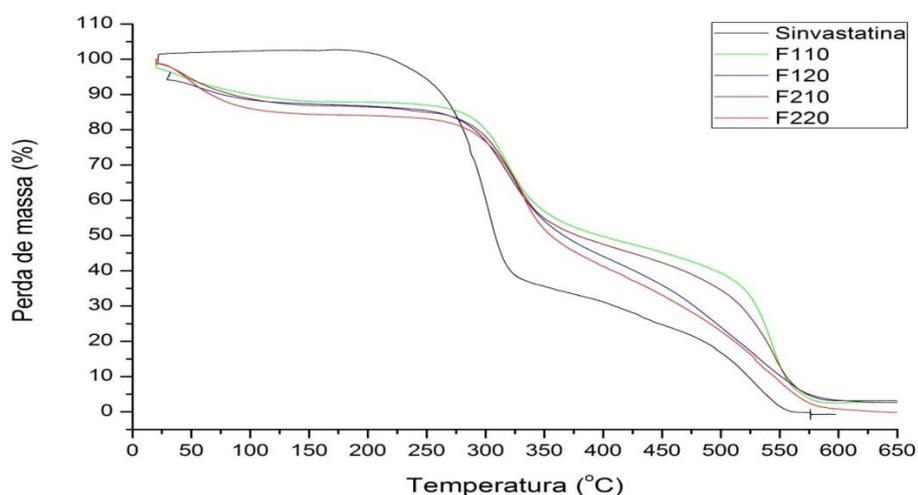
Na mistura fármaco-polímero ocorrem interações físico-químicas que resultam normalmente na perda de cristalinidade do fármaco e consequente aumento na solubilidade (LEUNER; DRESSMAN, 2000). Algumas explicações para o aumento de solubilidade envolvem o aumento da área de superfície, maior molhabilidade pela presença de suportes hidrófilos, elevada porosidade das partículas, redução ou ausência de aglomeração e agregação e a possível presença do fármaco na sua

forma amorfa (PATEL; PATEL, 2008) (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

O caráter amorfo da estrutura também pode ser atribuído às pontes de hidrogênio, que atuam como ligações secundárias, e também contribuem para a mudança do ângulo de ligação entre as moléculas de QTS e SINV, como ocorreu na interação entre a QTS e hidroxiapatita (FOOK, 2005).

Margulis, Goshen e Magdassi (2009), relataram que a incorporação de SINV em nanopartículas liofilizadas ocasionou uma diminuição da cristalinidade, refletindo no aumento da solubilidade aquosa. Outros estudos também comprovam essa mesma situação, como é o caso do estudo de Bazzo et al., (2009), que propõem que micropartículas poliméricas de SINV apresentaram um padrão de difração confirmando que o fármaco encontrava-se na forma amorfa, uma vez que não se observaram os picos característicos do composto quando no estado cristalino, sugerindo-se a incorporação da SINV no sistema.

No estudo térmico dos FPQ e da SINV, observou-se uma degradação para a SINV, que se iniciou em, aproximadamente, 218°C, terminou em cerca de 405°C (OLIVEIRA, et al., 2010). A Figura 3 exibe um comparativo entre os termogramas das amostras, evidenciando as diferentes perdas de massa. Através da Tabela 2, pode-se notar uma maior estabilidade térmica para o fármaco. Isso pode ser evidenciado pelo incremento da temperatura de perda de massa (deslocamento do evento de degradação para a direita) apresentada pela SINV nos filmes, o que pode indicar a incorporação no retículo polimérico, precisando de maior energia (temperatura) para que a degradação ocorra.

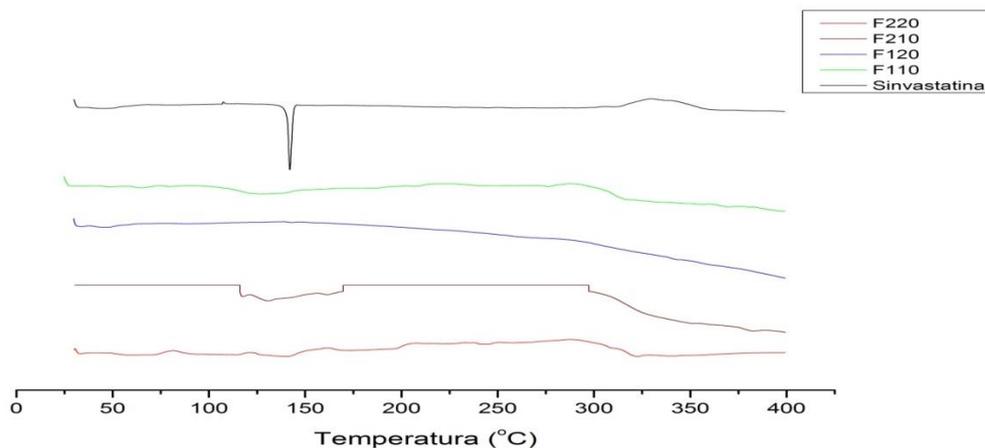


**Figura 3:** Termogramas dos FPQ e da SINV

	Amostra					
		SINV	F110	F120	F210	F220
<b>Perda de umidade (%) 50 - 100 °C</b>	-	-	10,32	11,54	11,54	14,01
<b>Etapa 1</b>	Ti °C	218,70	275,4	269,24	272,94	282,28
	Tf °C	317,48	351,55	349,64	351,59	351,60
	Perda (%)	58,88	29,10	29,75	29,72	30,01
<b>Etapa 2</b>	Ti °C	317,48	351,55	349,64	351,59	351,60
	Tf °C	405,00	499,92	463,97	503,24	493,90
	Perda (%)	10,23	19,35	20,41	20,21	25,61
<b>Etapa 3</b>	Ti °C	405,00	499,92	463,97	503,24	493,90
	Tf °C	551,29	570,71	578,00	576,25	565,65
	Perda (%)	30,01	34,06	29,71	29,16	21,57

**Tabela 2:** Eventos de degradação observados na análise termogravimétrica

A curva de DSC da SINV (Figura 4) mostra o seu pico de fusão em torno de 138,9°C, em conformidade com o encontrado na literatura (YOSHINARI et al., 2007; OLIVEIRA, et al., 2010). Já para os FPQ sucedeu-se a supressão do pico de fusão da SINV, sugerindo a possibilidade de formação de complexo polímero-fármaco, reforçada pela supressão das bandas relatada no espectro de FTIR (Figura 1) (JUN et al., 2007; PATEL; PATEL, 2008; TAKAHASHI, 2009; DIXIT; NAGARSENKER, 2010). Outra possibilidade é a solubilização do fármaco no sistema e/ou à amorfização observada no DRX (Figura 2) havendo o desaparecimento do pico do fármaco durante a análise por DSC (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).



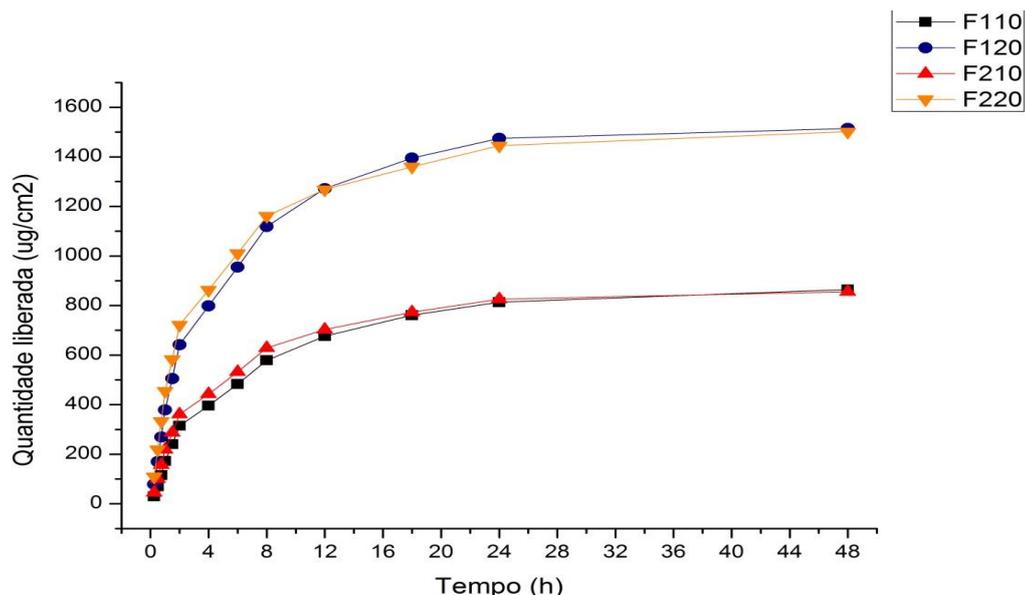
**Figura 4:** Curvas de DSC dos FPQ e da SINV

Neste tipo de conformação, o polímero está frequentemente presente como uma rede amorfa, no qual o fármaco é aprisionado. As moléculas do soluto podem também plastificar o polímero, resultando numa redução da sua temperatura de transição vítrea (LEUNER; DRESSMAN, 2000). De modo que a cristalização do fármaco pode ser inibida, resultando em formas amorfas menos estáveis termodinamicamente e assim, liberam o fármaco mais rapidamente. A inibição pode ser devido à ligação de hidrogênio entre a QTS e a SINV ou pela incorporação das moléculas de fármaco dentro da matriz de polímero (FORD, 1986; MATSUMOTO; ZOGRAFI, 1999).

No caso de polímeros hidrofílicos, como a QTS, quando em contato com a água podem atuar como um plastificante, causando uma mudança no estado vítreo (configuração do polímero altamente reticulada) para um estado maleável, associado a um processo de expansão/relaxamento, causando assim mudanças nos padrões de DSC do sistema (COLOMBO et al., 2000; LOPES; COSTA LOBO, 2005).

### 3.2 Perfil de liberação e modelagem cinética

O perfil de liberação da SINV nos FPQ é apresentado na Figura 5, que mostra a quantidade do fármaco liberada em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  em função do tempo em horas. O doseamento do fármaco foi realizado em 238 nm em conformidade com a metodologia de quantificação validada e em com a literatura (USP, 2008).



**Figura 5:** Perfil de liberação da SINV nos FPQ

Os filmes das duas fabricantes de QTS mostraram perfis de liberação similares nas duas concentrações propostas, atestando que a metodologia proposta de fabricação dos filmes resultou em filmes homogêneos para ambas as fabricantes. Todos os filmes apresentaram um notável controle da liberação do fármaco ao longo de 24h.

Os filmes F110 e F120 liberaram (47,54% e 41,65%, respectivamente) uma quantidade final de fármaco levemente maior que os F210 e F220 (47,05% e 41,29%, respectivamente). Padrão de liberação semelhante ao encontrado no estudo de Chou et al. (2013) ao desenvolver um sistema de liberação controlada de SINV constituído de beta-tricálcio-fosfato (B-TCP), resultando numa liberação de 48% do fármaco. Abdelzaher e El-Maghraby (2015) também relatam um valor similar de liberação em filmes bucais de carboximetilcelulose com SINV.

A partir dos resultados dos perfis de liberação da SINV nos FPQ, quatro modelos cinéticos foram aplicados para o sistema, como mostra a Tabela 3:

Modelos/ Correlação (r)	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi	Korsmeyer- Peppas	N
F110	0,823	0,685	0,946	0,951	0,613
F120	0,790	0,672	0,926	0,947	0,541
F210	0,797	0,608	0,930	0,947	0,532
F220	0,775	0,665	0,915	0,950	0,479

**Tabela 3:** Modelos cinéticos aplicados e índice de correlação de Pearson (r)

Os valores de coeficiente de correlação dos filmes foram maiores para os modelos cinéticos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas. A proximidade desses valores demonstra que a liberação da SINV a partir das matrizes poliméricas, com diferentes concentrações, não ocorre baseada apenas na difusão segundo a primeira Lei de Fick, conforme modelo de Higuchi. Segundo esse modelo, em matrizes poliméricas, a entrada do meio de dissolução no sistema causaria seu intumescimento, aumentando o caminho a ser percorrido pelo fármaco o que levaria a um decréscimo da difusão, ocorrendo segundo a raiz quadrada do tempo (COSTA; LOBO, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

No entanto, quando se trata da difusão de fármacos através de polímeros que sofrem intumescimento como a QTS, o estudo cinético deve considerar o fato do aumento da distância a ser percorrida pelo fármaco para ser liberado do sistema e a transição das macromoléculas de um estado vítreo para um estado mais maleável, fato observado nas curvas de DSC (Figura 4). Essa transição vítrea que ocorre provoca aumento na mobilidade do fármaco, facilitando a sua liberação (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

O modelo cinético de Korsmeyer-Peppas é uma teoria matemática que correlaciona à difusão do fármaco e o intumescimento da matriz (que causa relaxamento na rede polimérica), além da transferência de massa de acordo com as características geométricas da forma farmacêutica, sendo um modelo mais condizente no estudo de matrizes poliméricas (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

Segundo Costa e Lobo (2001), o modelo de Korsmeyer-Peppas deve ser utilizado para analisar a liberação de fármacos de sistemas onde o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando mais de um fenômeno está envolvido. Dessa forma, o referido modelo foi considerado como o mais adequado para explicar o mecanismo de liberação da SINV nos filmes produzidos.

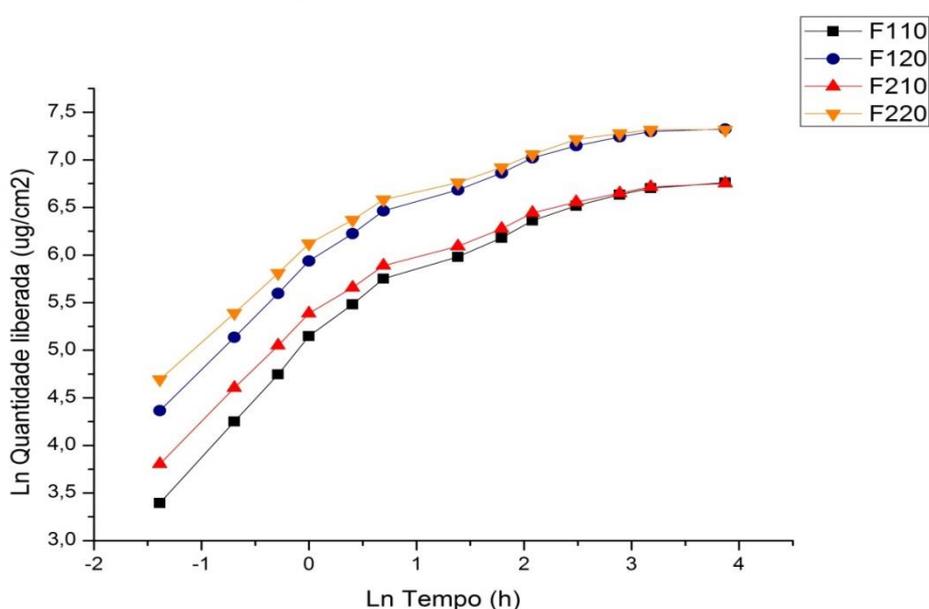
Os valores do coeficiente de liberação de Korsmeyer-Peppas ( $n$ ) calculados para os FPQ estão abrangidos entre 0,479 e 0,613, ficando compreendidos no intervalo  $0,45 > n > 0,89$  representando um mecanismo de liberação do fármaco por transporte anômalo, como mostra a Tabela 4. Nesse tipo de transporte de massa ocorre, ao mesmo tempo, a difusão do fármaco pela matriz (difusão Fickiana) e relaxamento dos polímeros (transição das macromoléculas de um estado vítreo para um mais maleável) (KORSMEYER, PEPPAS, 1981).

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de transporte do fármaco	Taxa em função do tempo
0,45	Difusão Fickiana	$T^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	Transporte anômalo	$T^{n-1}$
0,89	Transporte caso II	Ordem zero
$>0,89$	Transporte super caso II	$T^{n-1}$

**Tabela 4:** Interpretação dos mecanismos de liberação por difusão a partir de filmes poliméricos

**Fonte:** adaptado de Korsmeyer, et al., 1983.

Conhecendo-se a característica de matrizes de QTS em meio aquoso, pode-se sugerir que o mecanismo anômalo de liberação ocorre como resultado da ação conjunta dos processos de difusão e erosão da matriz polimérica, resultando nos gráficos da cinética de liberação da SINV nos FPQ para o modelo de Korsmeyer-Peppas mostrados na Figura 6.



**Figura 6:** Cinética de liberação da SINV pelo modelo de Korsmeyer-Peppas

#### **4 AGRADECIMENTOS**

A CAPES, ao CNPq e ao CertBio/UFCG.

## 5 CONCLUSÃO

Através da caracterização físico-química foi possível compreender as interações físico-químicas, bem como propor teorias para o sistema FPQ contendo SINV. Analisando-se o conjunto de técnicas utilizadas, observa-se a modificação das características de cristalinidade do fármaco no sistema. Fato que pode vir a melhorar sua solubilidade aquosa, facilitando a incorporação da SINV no filme polimérico (hidrofílico) além de favorecer a liberação do fármaco a partir do retículo polimérico.

Na avaliação FPQ, os perfis de liberação mostraram-se semelhantes, além de apresentarem os mesmos mecanismos cinéticos descritos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas, liberando a SINV de forma controlada por 24h, constituindo assim um sistema com potencial para veiculação desse fármaco e testagem *in vivo*.

## 6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABDELZAHER, M. M.; EL-MAGHRABY, G.M. Formulation and evaluation of simvastatin buccal film. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.5, n.4, p. 70-77, 2015.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

BARRY, B. W. Breaching the skins barrier to drugs. **Nature Biotechnology**, v. 22, p.165-167, 2004.

BASKAR, D.; KUMAR, T. S. S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers** v.78, p. 767-772, 2009.

CARVALHO, E. V., **Desenvolvimento de nanobiocompósitos para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos**, 80p (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais, Universidade Federal do Ceará, 2013.

CARVALHO, M. M. S. G.; STAMFORD, T. C. M.; SANTOS, E. P.; TENÓRIO, P.; SAMPAIO, F. Chitosan as an oral antimicrobial agent. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. **Microbiology Series**, n. 3 , v. 1, p. 542-550, 2011.

CEJKA, J. **Simvastatin. Acta Crystallographica Section C – Crystal Structure Communications**, v.59, n.8, p. 428-430, 2003.

CHOU J.; ITO T.; BISHOP D.; OTSUKA M.; BEN-NISSAN B.; MILTHORPE B. Controlled release of simvastatin from biomimetic  $\beta$ -TCP drug delivery system. **PLOSone**, v. 8, n. 1, 2013.

COLLETT, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Artmed, 2005. cap.20, p. 298-313, 2005..

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 6, p.198-204, 2000.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COSTA, J. E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/Poli (Álcool Vinílico) reticuladas quimicamente com Glutaraldeído para aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

CUI, Z., Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 111–116, 2008.

DARDE, M.; COLILLA, M.; HITZKY, E. R. Biopolymer-clay Nanocomposites based on Chitosan intercalated in Montmorillonite. **Chem. Mater**, v. 15, p. 3774-3780, 2003.

DE ANTONIO, M. E. C. O. **Permeação cutânea in vitro, como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas.** 2007. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Paraná, 2007.

DIXIT, R. P.; NAGARSENKER, M. S. Optimized Microemulsions and Solid microemulsion Systems of Simvastatin: Characterization and In Vivo Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4892-4902, 2010.

EPURE V.; GRIFFON M.; POLLET E.; AVÉROUS L. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading, **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 947-952, 2011.

FRAGA, A. F. Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, **Anais**, p. 2715-2725, 2006.

FORD, J. L. The current status of solid dispersions. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 61, n. 3, p.69- 88, 1986.

FREEMAN, Wade A. Structures of the p-Xylylenediammonium Chloride and Calcium Hydrogensulfate Adducts of the Cavitand 'Cucurbituril', C<sub>36</sub>H<sub>36</sub>N<sub>24</sub>O<sub>12</sub>. **Acta Crystallographica Section B**, v. 40, n. 4, p. 382-387, 1984.

FOOK, M. V. L. **Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial.** Tese (Doutorado em Química), 128 f. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

GOY, R. C., ASSIS, O. B. G., CAMPANA-FILHO, S. P. Produções de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, 2004.

GRAESER, K. A.; STRACHAN, C. J; PATTERSON, J. E.; GORDON, K. C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 128-135, 2008.

JANEGITZ, B. C.; LAURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FILHO, O. F. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.. 4, 879-884, 2007.

JCDPS, **Diffraction Data Base**, Newton Square: International Centre for diffraction data, PCPDFWIN v. 24, 2003.

JUN, S. W.; KIM, M. S.; KIM, J. S.; PARK, H. J.; LEE, S.; WOO, J. S.; HWANG, S. J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66 , n. 3, p. 413-421, 2007.

KEAN, T.; THANOU, N. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 62, p. 3-11, 2010.

KORSMEYER, R.W.; PEPPAS, N.A. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z., **Controlled release delivery systems**. p. 77-90, 1981.

LEONARDI, G. R.; MARTINS, L. G.; KUREBAYASHI, M. Permeação cutânea. **Cosmetologia aplicada**. Cap. 2, São Paulo: Med Farma, 2004.

LEUNER, C., DRESSMAN, J., Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions (Review Article). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n.1, p. 47-60, 2000.

LEVEQUE, N.; MAKKI, S.; HUMBERT, P.; HADGRAFT, J. Comparidon of Franz cells and midrodialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. **Interantional Journal of Pharmaceutics**. v. 269, n. 2, p. 323-328, 2003.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: Quitosana / insulina**. 112 p. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MATET, M.; HEUZEY, M. C.; AJJI, A.; SARAZIN, P. Plasticized chitosan/polyolefin films produced by extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 177-184, 2015.

MATSUMOTO, T.; ZOGRAFI, G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly-(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl lactate) in relation to indomethacin crystallization. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n.11, p.1722-1728, 1999.

MARGULIS-GOSHEN, K., MAGDASSI, S., Formation of simvastatin nanoparticles from microemulsion. **Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 274 – 281, 2009.

MARTÍNEZ CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S. E PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305-315. 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSELL W. N.; SOARES, C. D. V.; PIANETT, G. A. Análise Térmica aplicada à Caracterização da Sinvastatina em Formulações Farmacêuticas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p.1653-1657, 2010.

OLIVEIRA, M. A., YOSHIDA, M. I., GOMES, E. C. L., Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

PATEL, R.; PATEL, M. Preparation, characterization, and dissolution behavior of a solid dispersion of simvastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, p.193-204, 2008.

RAO, M.; YOGESH M.; KAUSHIK T.; SUCHETA B. Dissolution improvement of simvastatin by surface solid dispersion technology. **Dissolution Technologies**., p. 27-34, 2010. Disponível em: <[http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201005Articles/DT201005\\_A04.pdf](http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201005Articles/DT201005_A04.pdf)> Acesso em 15 dez 2014.

SAKKINEN, M. MARVOLA J.; KANERVA H.; LINDEVALL K.; AHONEN A.; MARVOLA M. Source. Scintigraphic verification of adherence of a chitosan formulation to the human esophagus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 145-147, 2004.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-343, 2008.

TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e Caracterização de Complexos Binários e Ternários de Sinvastatina e Ciclodextrinas**. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2009.

TANDALE, P.; JOSHI, D.; GAUD, R. S. Formulation and evaluation of extended release solid dispersions containing simvastatin. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 3, p. 13-19, 2011.

UYGUN, B.E.; THERESE B. A.; MOHAMMAD A.; AND HOWARD W. T. M. Membrane thickness is an important variable in membrane scaffolds: Influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2126-2131, 2010.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B; COSTA, P., Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23-24, p.1068-1075, 2007.

VIEIRA, E. F. S.; CESTARI, A. R.; CHAGAS, R. A.; CORTES, G. K. R. Obtenção e caracterização de matriz apropriada para sistemas de liberação prolongada – estudo

de liberação de herbicidas atrazina e diuron. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 398 a 403, 2014.

YANG, X., Detecting and Identifying the Complexation of Nimodipine with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Present in Tablets by Raman Spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2702-2719, 2008.

YOSHINARI, M. Controlled release of simvastatin acid using ciclodextrin inclusion sistem. **Dental Materials Journal**, v. 26, n. 3, p. 451-456, 2007.

WOJNAROWSKA, Z.; GRZYBOWSKA, K.; ADRJANOWICZ, K.; KAMINSKI , K.; PALUCH, M.; HAWELEK, L.; WRZALIK, R.; DULSKI, M. Study of the Amorphous Glibenclamide Drug: Analysis of the Molecular Dynamics of Quenched and Cryomilled Material. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p.1692–1707, 2010.

**Capítulo III – ATIVIDADE ANTI-INFLMATÓRIA/  
CICATRIZANTE DE FILMES DE QUITOSANA COM  
SINVASTATINA**

(Artigo a ser submetido ao periódico Biomaterials)

## ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA/CICATRIZANTE DE FILMES DE QUITOSANA COM SINVASTATINA

Natan Emanuell S. Silva<sup>\*a</sup>; Bolívar Ponciano G.L Damasceno<sup>a</sup>; Rosemary Sousa Cunha Lima<sup>a</sup>; José Alexsandro Silva<sup>a</sup>; Vandiarra Martins Moreira<sup>a</sup>; Pedro Gomes S. Neto<sup>a</sup>; Amaro César L. Assis<sup>a</sup>; Tharcia Kiara Beserra Oliveira<sup>b</sup>. Ayanne Alves de Oliveira<sup>b</sup>; Pedro Bruno Estevam Teófilo<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - Paraíba, Brasil.

<sup>b</sup>Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento – Cesed, Faculdade de Ciências Médicas.

\*Autor para correspondência:  
Rua das Baraúnas, Bairro  
Universitário, Campina Grande-PB,  
CEP: 58429-500.  
Tel: (81) 99874- 2741  
E-mail: natan.farmacia@gmail.com

### RESUMO

A quitosana (QTS) é um polissacarídeo derivado da quitina que vem despertando grande interesse especialmente na indústria farmacêutica pelas suas importantes atividades biológica, como: antimicrobiana, anticoagulante, filmogênica, biocompatível, não alergênica, baixa toxicidade, seu uso como biomaterial tem sido amplamente estudado, inclusive para liberação controlada de fármacos. A sinvastatina (SINV) é uma estatina utilizada na clínica como agente hipocolesterolêmico. Estudos recentes têm reportado importante ação anti-inflamatória deste fármaco. Assim, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema carreador para a SINV, baseado na produção de um filme de quitosana para uso tópico com atividade anti-inflamatória/cicatrizante. Para tanto, foram testados 3 filmes: filme branco (FB - sem sinvastatina), filme com 20mg de sinvastatina (F-20 com 3,63mg/cm<sup>2</sup>), filme com 10mg de sinvastatina (F-10 com 1,82mg/cm<sup>2</sup>), mais o grupo controle (salina). Foi feita uma ferida com punch de 1cm de diâmetro na pele do dorso de camundongos deixando-se exposto o *panniculus carnosus*, onde foram aplicados os filmes imediatamente após a lesão e trocados de 2 em 2 dias até o sacrifício dos animais, que ocorreram aos 4, 8 e 12 dias após a realização da ferida. As feridas foram avaliadas através da mensuração da sua área, e foi

feita contagem de leucócitos totais no sangue dos animais após a eutanásia. Nossos resultados mostram significativo efeito anti-inflamatório/cicatrizante do filme de quitosana de 20mg aos 8 dias do início da lesão cutânea, observado através da redução do tamanho da ferida quando comparado aos animais tratados com salina ou o filme branco. Também observamos aumento no número de leucócitos totais no sangue de camundongos com ferida cutânea, tanto maior quanto a proximidade do início da lesão. A aplicação local sobre as feridas dos filmes contendo sinvastatina foram eficientes em reduzir este número em todos os momentos da lesão avaliados. Em conjunto, nossos resultados apontam importantes atividades anti-inflamatória/cicatrizante de filmes de quitosana contendo sinvastatina. Este sistema aqui apresentado de forma inédita pode representar importante avanço no que diz respeito à utilização das propriedades anti-inflamatórias da sinvastatina e da quitosana para aplicação tópica na terapêutica das feridas cutâneas.

**Palavras- chave:** Cicatrização; Estatinas Inflamação; Polissacarídeos.

## 1. INTRODUÇÃO

A quitosana (QTS) é um polissacarídeo derivado da quitina, presente nos resíduos de crustáceos da indústria pesqueira e na parede celular de diversos fungos. É um biopolímero que vem despertando grande interesse em várias áreas, como na agricultura, indústria de alimentos, medicina, cosméticos e principalmente como excipiente farmacêutico (VAN DEN BROEK et al., 2015). Isso se deve a propriedades, como bioatividade, biodegradabilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrônica, atividade antimicrobiana, habilidade de quelação e capacidade para formar gel e filmes, (CARVALHO et al., 2011).

Seu uso como biomaterial tem sido amplamente elucidado, associado à restauração de vários tipos de tecido, como pele, osso, cartilagem, de órgãos como fígado, vasos sanguíneos e até mesmo de componentes do sistema nervoso (KIM et al., 2008; TAN et al., 2011). Apresentando importantes propriedades biológicas tais como: baixa toxicidade, não ser alergênico e possuir atividade anticoagulante (JANEGITZ et al., 2007). Também apresenta

atividade antimicrobiana e propriedades filmogênicas, além de ser biocompatível (MARTÍNEZ CAMACHO, 2010; CARVALHO et al., 2011).

Filmes poliméricos de quitosana (FPQ) com potencial para utilização em técnicas de regeneração tecidual guiada e a possibilidade de associação de outras substâncias à QTS nos filmes, têm sido estudadas (ZHANG et al., 2010; TAN et al., 2011) e a resposta tecidual inflamatória ante a implantação desses filmes em tecido subcutâneo de ratos foi muito satisfatória (UENO et al., 2001; CARVALHO et al., 2011). Adicionalmente, apresenta capacidade de melhorar propriedades de dissolução e biodisponibilidade de fármacos fracamente solúveis em água, como a sinvastatina (SAKKINEN, et al., 2004).

A sinvastatina (SINV), é uma estatina inibidora da hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA), que catalisa a reação de produção do colesterol endógeno, sendo amplamente utilizada na clínica como agentes hipocolesterolêmicos principalmente em pacientes cardíacos (CARVALHO; CAMPO, 2007; RANG et al., 2012). Todavia, vários estudos relatam benefícios clínicos associados à terapia com as estatinas que são independentes da redução de colesterol, denominados efeitos pleiotrópicos (CHOPRA et al., 2007; CHEN et al., 2013).

Estudos clínicos mostram que as estatinas apresentam propriedades anti-inflamatórias, pela redução dos níveis de alguns mediadores inflamatórios como a proteína C-reativa, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e a interação leucócito-endotélio (ADAMI et al., 2012; CHU et al., 2012; XAVIER et al., 2012; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014). Embora a ação anti-inflamatória ainda não seja completamente entendida, pode ocorrer uma inibição de uma variedade de substâncias inflamatórias chamadas isoprenóides, os quais são formados durante a biossíntese endógena do colesterol (KIM, et al., 2007).

Este fármaco está disponibilizado no mercado apenas na sua forma sólida (cápsulas e comprimidos) dificultando o seu uso local com efeito anti-inflamatório relatado na literatura (OTUKI; PIETROVSKI; CABRINI, 2006; CHOPRA et al., 2007; KIM, et al., 2007; MIRANDA et al., 2011; ADAMI et al., 2012).

Portanto, neste estudo objetivou-se o desenvolvimento de um carreador para a SINV, baseado na produção de um filme de quitosana para uso tópico com atividade anti-inflamatória.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Quitosana Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Baixa densidade e Grau de desacetilação-GD de 85%), Missouri, EUA; Álcool etílico absoluto, ácido acético e hidróxido de sódio com grau analítico; Anestésicos: Xilazina (Dopaser<sup>®</sup> - e Hertape S.A, Minas Gerais, Brasil) e Ketamina (Dopalen<sup>®</sup>- São Paulo, Brasil). O fármaco utilizado, sinvastatina Viafarma<sup>®</sup>, Santa Catarina, Brasil.

### **2.2 Animais**

Camundongos Swiss (*Mus musculus* – 45 animais) com 7-8 semanas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) nos experimentos. Os animais foram mantidos a temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a ração Purina<sup>®</sup> tipo *pellets* e à água. O referido estudo foi realizado mediante aprovação prévia, por escrito, da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB (Protocolo: 5002042015) seguindo as normas da Lei Arouca, que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animas (Lei número 11.794, de outubro de 2008).

### **2.3 Métodos**

#### **2.3.1 Desenvolvimento dos filmes de quitosana (FPQ)**

Iniciou-se com a dissolução da QTS em ácido acético 1%, sob agitação magnética por 24h. A solução resultante foi filtrada a vácuo e 5 mL dessa solução foram colocados em placa de Petri para formação do filme branco (FB). Para a incorporação da SINV nos FPQ, esta foi previamente dissolvida em álcool etílico P.A nas concentrações de 10 e 20 mg, formando assim soluções etanólicas de 10 e 20 mg/mL de SINV. Com isso, 1 mL de cada solução foi adicionado à 5 mL da solução de QTS, prosseguindo-se com a

secagem no *shaker* sob 40 rpm de rotação à 50°C. Sobre os filmes formados, foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4% para neutralização do ácido residual. Lavados posteriormente com água destilada até atingir o pH= 7,0 e secos em temperatura ambiente por 48h, formando assim os FPQ com dosagens de 10 e 20 mg de SINV, denominados F10 e F20, respectivamente (Método Sol-gel, adaptado de LIMA, 2010; EPURE, 2011).

### **2.3.2 Modelo de feridas cutâneas**

Os animais foram anestesiados por meio da injeção intraperitoneal de ketamina 100 mg/kg e xilazina 0.05 mg/kg. Efetuou-se a tricotomia da região dorsal e após antissepsia local com clorexidina 4% foi feita uma excisão circular de pele com punch para biopsia de 1,0 cm de diâmetro, deixando-se exposto o *panniculus carnosus*.

### **2.3.3 Tratamentos**

Os camundongos foram divididos de modo aleatório em quatro grupos experimentais correspondentes aos tratamentos (Tabela 1). Cada grupo era composto por 9 animais e nos dias 4, 8 e 12 após a realização das feridas 3 animais foram sacrificados em cada um destes tempos.

<b>GRUPO DE ANIMAIS (n=9)</b>	<b>TRATAMENTO</b>
<b>Grupo (1) controle negativo</b>	<b>Salina</b>
<b>Grupo teste 1</b>	<b>FB</b>
<b>Grupo teste 2</b>	<b>F10</b>
<b>Grupo teste 3</b>	<b>F20</b>

**Tabela 1-** Divisão dos grupos de animais.

**Legenda:** FB: Filme BRANCO;

F10: Filme com 10mg de sinvastatina;

F20: Filme com 20mg de sinvastatina.

Os FPQ foram cortados utilizando-se o mesmo punch de 1 cm de diâmetro usado para fazer as lesões, resultando em uma dose de 3,63mg de

sinvastatina por filme de 20mg e 1,82mg por filme de 10mg. Os FPQ foram aplicados sobre a ferida imediatamente após a realização destas e nas trocas dos FPQ que ocorreram de 2 em 2 dias até o sacrifício dos animais. Nestas trocas, os FPQ tiveram seus tamanhos ajustados à área das feridas. Diariamente, as feridas dos animais de todos os grupos foram hidratadas com 2 gotas de solução salina 0,9% e limpas de possíveis fragmentos de sujidades.

Os animais foram eutanasiados nos dias 4, 8 ou 12 após a lesão segundo metodologia proposta para roedores e outros pequenos mamíferos, contida no Anexo I da Resolução N° 1000, de 11 de Maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e tiveram o sangue e um fragmento de pele da região da lesão coletados.

#### **2.3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória/cicatrizante**

- Fotodocumentação: com o auxílio de uma câmera fotográfica SONY® modelo DSC-HX100V foi feita a aquisição de fotos das feridas nos dias 0, 4, 8 e 12 após a realização da ferida cutânea. As fotos das feridas foram obtidas juntamente com a imagem de uma escala graduada colocadas ao lado do animal, mantendo-se uma distância constante entre este e a câmera;

- Medida da área das feridas cutâneas: para tanto, a imagem da ferida juntamente com a escala graduada foi importada usando-se o software ImajeJ® 1.49 (disponível gratuitamente em: <http://imagej.nih.gov/ij/>) e as bordas da ferida contornada para ter sua área determinada;

- Área residual da ferida cutânea: após a obtenção das áreas, o valor residual de cada ferida foi obtido usando-se a seguinte Equação:

$$\text{Área atual da ferida} / \text{área inicial ferida} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

- Contagem Leucocitária: ao final do tempo de cada grupo (4, 8 ou 12 dias) os animais foram sacrificados e aproximadamente 0,8 ml de sangue foram coletados por punção cardíaca e mantido em tubos à vácuo com anticoagulante (EDTA). Após centrifugação (3000 rpm por 5 minutos) o plasma

foi obtido e efetuou-se a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer;

### **2.3.5 *Análise estatística***

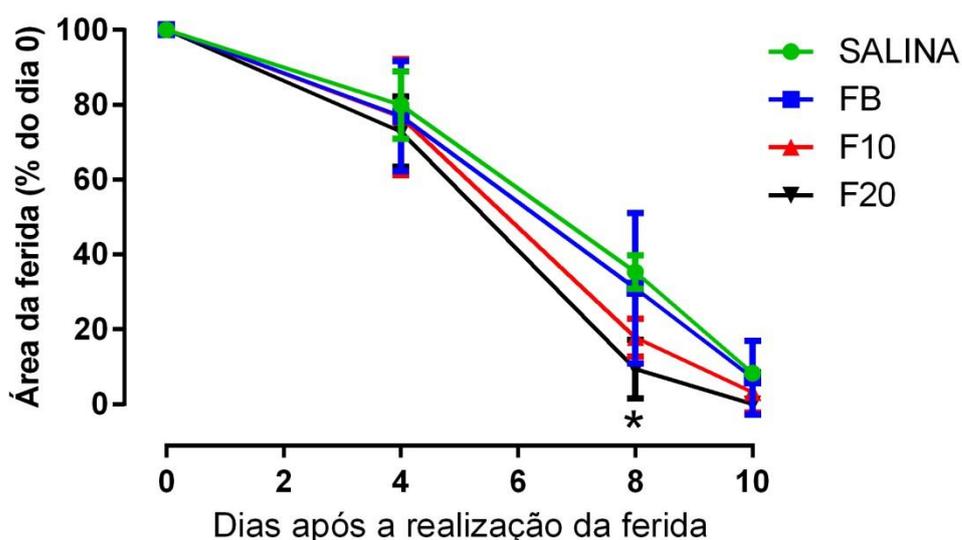
Os dados obtidos estão expressos como a média  $\pm$  EPM e as diferenças entre os grupos foram averiguadas através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Área residual das feridas cutâneas

Oito dias após a lesão, a área residual das feridas dos animais do grupo F20 apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Neuman-Keuls) daquela dos animais do grupo SALINA e do grupo FB (Figura 1). A Figura 2 contém imagens ilustrativas das feridas no tempo 0, 8 dias (grupos SALINA, FB, F10 e F20) e 12 dias.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diversos tratamentos nos demais tempos avaliados (Figura 1).



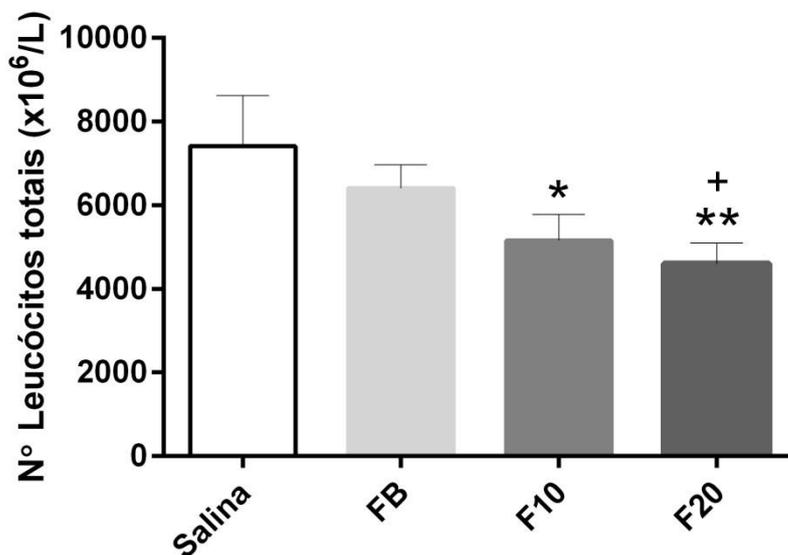
**Figura 1:** Área residual das feridas cutâneas (área atual da ferida / área inicial ferida x 100). \* $p < 0,05$ , grupo F20 diferente dos grupos SALINA e FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls)



**Figura 2:** Imagens representativas das lesões no dia 0, no 8º dia (grupos SALINA, FB, F10 e F20), e no 12º dia após a lesão.

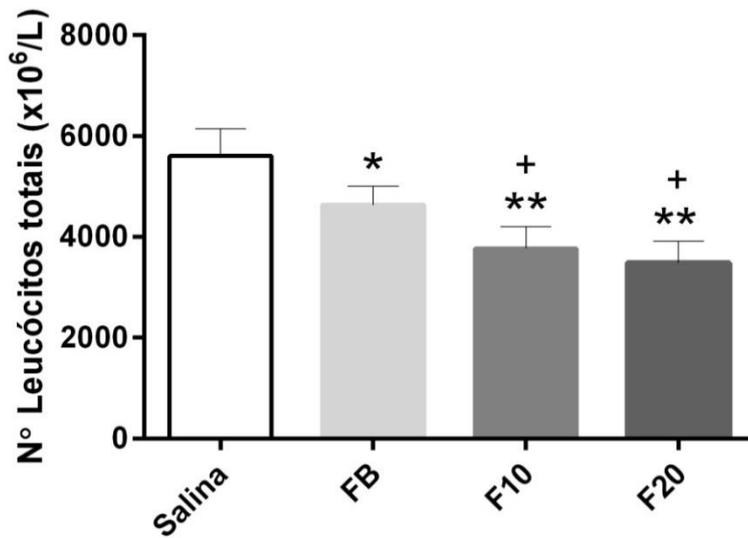
### 3.2 Contagem leucocitária

Quatro dias após a lesão cutânea, a contagem de leucócitos totais foi significativamente menor nos grupos F10 ( $p < 0,05$ ) e F20 ( $p < 0,01$ ) que aquela do grupo SALINA. Da mesma forma, a contagem leucocitária do grupo F20 também apresentou redução significativa comparado com o grupo FB ( $p < 0,05$ ). O grupo FB apresentou discreta diminuição no número de leucócitos totais, sem diferença estatística significativa, comparado ao grupo SALINA (Figura 3).



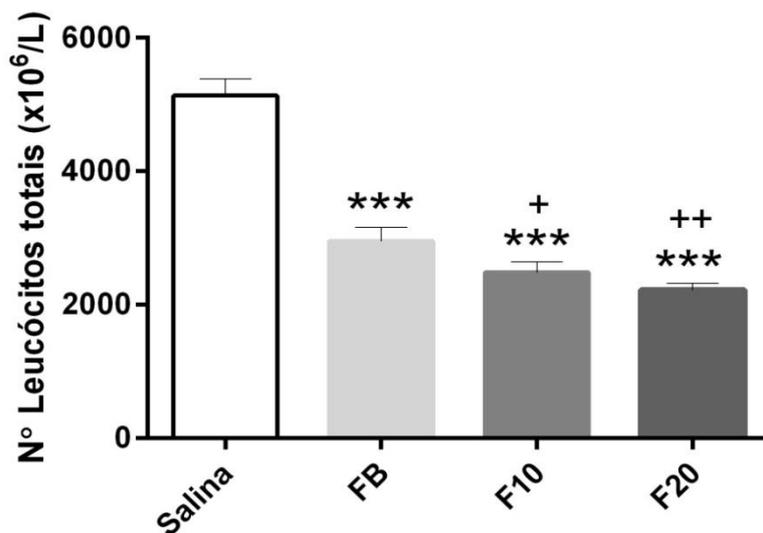
**Figura 3:** Número de leucócitos totais 4 dias após a lesão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , diferente do grupo SALINA; + $p < 0,05$  diferente do grupo FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls).

Oito dias após a lesão cutânea, a contagem de leucócitos totais dos grupos F10 e F20 foi significativamente menor que aquela do grupo SALINA ( $p < 0,01$ ) e do grupo FB ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, o grupo FB apresentou contagem leucocitária significativamente inferior que a do grupo SALINA ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).



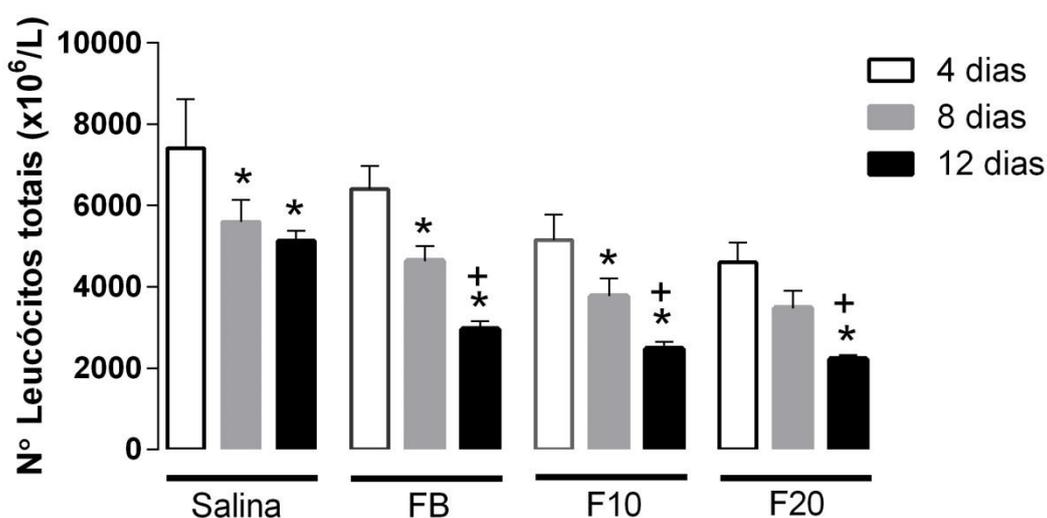
**Figura 4:** Número de leucócitos totais 8 dias após a lesão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , diferente do grupo SALINA; + $p < 0,05$  diferente do grupo FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls)

Doze dias após a lesão cutânea, os grupos F10, F20 e FB apresentaram significativa redução no número de leucócitos totais comparado com o grupo SALINA ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, as contagens leucocitárias dos grupos F10 e F20 apresentaram significativa redução ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) comparadas com aquela do grupo FB (Figura 5).



**Figura 5:** Número de leucócitos totais 12 dias após a lesão. \*\*\* $p < 0,001$  diferente do grupo SALINA; + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  diferente do grupo FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls) .

Avaliados em conjunto, a contagem de leucócitos totais mostra redução contínua em todos os grupos conforme se aumenta o tempo após a lesão. Os dados mostram que 12 dias após a lesão há redução significativa na contagem leucocitária em todos os tratamentos, comparado com os animais sacrificados 4 dias após a lesão ( $p < 0,05$ ), e nos grupos FB, F10 e F20 quando comparado com os animais sacrificados 8 dias após a lesão ( $p < 0,05$ ). Estes animais que foram sacrificados 8 dias após a lesão também apresentam redução significativa no número de leucócitos totais comparados com aqueles sacrificados aos 4 dias, para os grupos SALINA, FB e F10 ( $p < 0,05$ ). (Figura 6)



**Figura 6:** Número de leucócitos totais 4, 8 e 12 dias após a lesão. \* $p < 0,05$  diferente do grupo SALINA; + $p < 0,05$  diferente do grupo FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls).

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram significativo efeito anti-inflamatório/cicatrizante do filme de quitosana de 20mg ( $3,63\text{mg}/\text{cm}^2$ ) aos 8 dias do início da lesão cutânea (trocados de 2 em 2 dias), observado através da redução do tamanho da ferida quando comparado aos animais tratados com salina ou o filme branco. O tratamento com o filme de quitosana de 10mg apresentou discreta redução também aos 8 dias após a lesão mas sem diferença estatística significativa.

Nossos dados estão de acordo com outros estudos da literatura, que também demonstraram que a sinvastatina (1 – 300 mg/kg, via oral - v.o) foi capaz de reduzir a fase inflamatória induzida por formalina (GARCIA et al., 2011; MIRANDA et al., 2011), e a sinvastatina administrada pelas vias intraperitoneal (20 e 40 mg/kg) ou intratecal (5 e 50 nmol) em camundongo, também inibiu a segunda fase no teste da formalina (OHSAWA et al., 2008; OHSAWA et al., 2012). A formalina é uma substância química clássica utilizada como modelo de dor, e que possibilita o estudo de edema associado à resposta inflamatória. Ainda nos parâmetros inflamatórios, foi demonstrado que o tratamento agudo oral com sinvastatina (40 mg/kg) inibiu o edema de pata induzido pela carragenina (JAISWAL; SONTAKKE, 2012).

As estatinas são amplamente reconhecidas por inibirem a síntese do colesterol endógeno e aumentarem a expressão dos receptores para LDL nos hepatócitos, o que leva a uma maior captação das lipoproteínas circulantes (RANG et al., 2012). Além disso, muitos estudos têm relatado interessante efeito anti-inflamatório dessa classe de fármacos que parecem não depender deste mecanismo primário relacionado ao metabolismo do colesterol. Por exemplo, importante ação anti-inflamatória local como redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias, redução na adesão leucocitária e na proliferação de macrófagos tem sido relatada (CHOPRA et al., 2007; CHU et al., 2012; XAVIER et al., 2012; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014). Da mesma forma, outros estudos relatam efeito redutor da sinvastatina sobre os níveis da proteína C-reativa, da interleucina-6 (IL-6), do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e da interação leucócito-endotélio (ADAMI et al., 2012; JAISWAL; SONTAKKE, 2012; ZHAO et al., 2014).

Corroborando nossos resultados, estudo anterior também mostra redução da resposta inflamatória cutânea em camundongos após tratamento tópico com sinvastatina (OTUKI; PIETROVSKI; CABRINI, 2006).

As estatinas também tem mostrado importante atividade antinociceptiva. Alguns autores têm relatado que esta atividade está diretamente relacionada com a atividade anti-inflamatória através da inibição de mediadores pro-inflamatórios (SANTODOMINGO GARZON et al., 2006; CHU et al., 2012; XAVIER et al., 2012; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014). Também,

efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da sinvastatina têm sido relatados e atribuídos à inibição da liberação de citocinas e prostanóides e a interferência na ação do óxido nítrico (MIRANDA et al., 2011; CHEN et al., 2013; BHALLA et al., 2014).

Há de se ressaltar, que o metabolismo dos isoprenóides, que da origem a importantes mediadores inflamatórios, está diretamente relacionado ao metabolismo endógeno do colesterol (KIM et al., 2007; CHU et al., 2012), o que pode representar uma ponte entre as atividades hipolipemiantes e anti-inflamatória das estatinas.

Nosso estudo também mostra que o número de leucócitos totais está aumentado no sangue de camundongos com ferida cutânea, corroborando achados anteriores (SITUM et al., 2007), sendo este aumento tanto maior quanto a proximidade do início da lesão. Além disso, a aplicação local sobre as feridas dos filmes contendo sinvastatina foram eficientes em reduzir este número em todos os momentos da lesão cutânea estudados. Esta mudança hematológica sistêmica que observamos parece refletir a intensa infiltração celular que ocorre no local da ferida (KIM et al., 2007; CHU et al., 2012), o que vai diminuindo conforme a lesão vai se resolvendo com o decorrer do tempo

Há de se notar, que o filme branco, composto apenas por quitosana, também apresentou significativo efeito redutor do número de leucócitos totais nos tempos 8 e 12 dias após a lesão. Pensamos que tal atividade reflita uma ação anti-inflamatória da quitosana já relatada em trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., 2012; FRIEDMAN et al., 2013), e que, neste caso, pode representar importante ação anti-inflamatória complementar àquela da sinvastatina.

## **5. AGRADECIMENTOS**

A CAPES, ao CNPq e ao CESED/FCM.

## **6. CONCLUSÃO**

Assim, tomados em conjunto, os resultados apontam uma importante atividades anti-inflamatória/cicatrizante de filmes de quitosana com sinvastatina. Este sistema, apresentado neste estudo de forma inédita, pode representar importante avanço no que diz respeito à utilização das propriedades anti-inflamatórias da sinvastatina e da quitosana para aplicação tópica na terapêutica das feridas cutâneas.

## 7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADAMI, M.; PRUDENTE, A. S.; MENDES, D. A. G. B.; HORINOUCI, C. D. S.; CABRINI, D. A. e OTUKI, M. F. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v.66, n.2, p.127-135. 2012.

BHALLA, S.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Statins: Do They Aggravate or Ameliorate Neuropathic Pain? **The Journal of Pain**. v. 15, n. 11, p. 1069-1080, 2014.

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

CARVALHO, M. M. S. G.; STAMFORD, T. C. M.; SANTOS, E. P.; TENÓRIO, P.; SAMPAIO, F. Chitosan as an oral antimicrobial agent. **Microbiology Series**, n. 3, v. 1, p. 542-550, 2011.

CHEN, X. Y.; LI, K.; LIGHT, A. R.; FU, K. Y. Simvastatin attenuates formalin-induced nociceptive behaviors by inhibiting microglial RhoA and p38 MAPK activation. **The Journal of Pain**. v. 14, n. 11, p. 1310-1319, 2013.

CHOPRA, V.; CHOSKI, P. V.; CAVUSOGLU, E. Beyond lipid lowering: The antihypertensive role of statins. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 21, p. 161-169, 2007.

CHU, L. W.; CHEN, J. Y.; YU, K. L.; CHENG, K. I.; WU, P. C.; WU, B. N. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of atorvastatin in a rat chronic constriction injury model. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. v. 25, n. 1, p. 219- 230, 2012.

EPURE V.; GRIFFON M.; POLLET E.; AVÉROUS L.; Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading, **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 947-952, 2011.

FRIEDMAN, A.J; PHAN, J; SCHAIRER, D; CHAMPER, J; QIN, MIN; PIROUZ, A; BLECHER, K-PAZ, LIU, T; KIM, J. Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity of Chitosan–Alginate Nanoparticles: A Targeted Therapy for Cutaneous Pathogens. **Journal of Investigative Dermatology** V. 133, p. 1231–1239, 2013.

GARCIA, G. G.; MIRANDA, H. F.; NORIEGA, V.; SIERRALTA, F.; OLAVARRIA, L.; ZEPEDA, R. J.; PRIETO, J. C. Antinociception induced by atorvastatin in different pain models. **Pharmacol. Biochem. Behavior**. v. 100, n. 1, p. 125-129, 2011.

JANEGITZ, B. C.; LAURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FILHO, O. F. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons

metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, São Paulo, vol. 30, n. 4, 879-884, 2007.

JAISWAL, S. R.; SONTAKKE, S. D. Experimental evaluation of analgesic and antiinflammatory activity of simvastatin and atorvastatin. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 475-479, 2012.

KIM, D. Y.; RYU, S. Y.; LIM, J. E.; LEE, Y. S.; RO, J. Y. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model. **European Journal of Pharmacology**, v.557, n.1, p.76-86. 2007.

KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 1-21, 2008.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: Quitosana / insulina**. 112 p. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

MARTÍNEZ CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S. E PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.2, p.305-315. 2010.

MIRANDA, H. F; NORIEGA, V.; OLAVARRIA L.; ZEPEDA R. J.; SIERRALTA F.; PRIETO J. C. Antinociception and Anti-Inflammation Induced by Simvastatin in Algesiometric Assays in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 746, p. 1-5, 2011.

OLIVEIRA , M; SANTOS, S.M; OLIVEIRA, M.J; TORRES, A.L; BARBOSA, M.A. Citosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. **European Cells and Materials**. v. 24 p. 136-153, 2012.

OTUKI, M. F.; PIETROVSKI, E. V.; CABRINI, D. A. Topical simvastatin: Preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v.44, p. 45-47, 2006.

OHSAWA, M.; MUTOH, J.; HISA, H. Mevalonate sensitizes the nociceptive transmission in the mouse spinal cord. **Pain**. v. 134, n. 3, p. 285-292, 2008.

OHSAWA, M.; MUTOH, J.; YAMAMOTO, S.; ONO, H.; HISA, H. Effect of spinally administered simvastatin on the formalin-induced nociceptive response in mice. **Journal Pharmacology Science**, v. 119, n. 1, p. 102-106, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 7ª.ed. São Paulo: Elsevier, p.321-330, 2012.

SAKKINEN, M. MARVOLA J.; KANERVA H.; LINDEVALL K.; AHONEN A.; MARVOLA M. Source. Scintigraphic verification of adherence of a chitosan formulation to the human esophagus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 145-147, 2004.

SANTODOMINGO-GARZON, T.; CUNHA, T. M.; VERRI W. A.; VALÉRIO D. A. R.; PARADA C. A. S.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F.Q. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 149, p. 14-22, 2006.

SITUM, K; BOKULIĆ, A; IVETIĆ-TKALČEVIĆ, V; PARNHAM, M.J; ČUŽIĆ, S; KORALJKA D.; GLOJNARIĆ, I; BRAJŠA, K. Comparison of systemic inflammatory and hematology parameters in normal C57Bl/6 and genetically diabetic db/db mice during local wound repair. **Biochemia Medica**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

TAN, Y.; HAN, F.; MA, S.; YU, W. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n.4, p.1365-1370. 2011.

XAVIER, A. M.; SERAFIM, K. G.; HIGASHI, D. T.; VANAT, N.; FLAIBAN, K. K.; SIQUEIRA, C. P.; VENANCIO, E. J.; RAMOS, P. Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in Wistar rats. **Injury**. v. 43, n. 3, p. 284-289, 2012.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015.

ZHANG, Y. XUE, C.; XUE, Y.; Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1914-1917, 2010.

ZHAO, Y.; FENG, Q.; HUANG, Z.; LI, W.; CHEN, B.; JIANG, L.; WU, B.; DING, W.; XU, G.; PAN, H.; WEI, W.; LUO, W., & LUO, Q. Simvastatin inhibits inflammation in ischemia-reperfusion injury. **Inflammation**. v. 37, n. 5, p. 1865-1875, 2014.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- Os FPQ produzidos apresentaram características físico-químicas semelhantes indicando que a metodologia proposta foi adequada para o desenvolvimento desses sistemas a partir de dois fornecedores de QTS contendo 10 e 20 mg de SINV;
- Também apresentaram homogeneidade com relação ao perfil de liberação do fármaco, pois a quantidade total de fármaco liberada foi semelhante e ainda apresentaram o mesmo tipo de transporte, descritos pelo modelo cinético de Korsmeyer – Peppas, controlando a liberação de SINV por 24h;
- Na avaliação da atividade anti-inflamatória e cicatrizante o filme com 20mg de SINV destacou-se pela efetividade da cicatrização e pela atividade anti-inflamatória refletida na menor migração leucocitária.

## 5 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADAMI, M.; PRUDENTE, A. S.; MENDES, D. A. G. B.; HORINOUCI, C. D. S.; CABRINI, D. A. e OTUKI, M. F. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, n. 2, p.127-135. 2012.

AMBROSE, C. G.; CLANTON, T. O. Bioabsorbable implants: Review of clinical experience in orthopedic surgery. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n.1, p. 171-177, 2004.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

BASTARDA, A.; GRAHEK, R.; KOCIJAN, A.; KRALJ, Z. L. Fast analysis of pravastatin in production media. **Journal of Chromatography**, v. 822, p. 311-315, 2005.

BHALLA, S.; SINGH, N., & JAGGI, A. S. Statins: Do They Aggravate or Ameliorate Neuropathic Pain? **The Journal of Pain**. v. 15, n. 11, p. 1069-1080, 2014.

BOATENG J. S.; MATTHEWS K. H.; STEVENS H. N. E. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BONETTI P.O.; LERMAN L.O.; NAPOLI C.; LERMAN A. Statin effects beyond lipid lowering: are they clinically relevant? **European Heart Journal**; v. 24, p. 225–248, 2003

BUDAVARI, S (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14 ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Bristish Pharmacopoeia Comission Office, p. 1269, 1709, 1858, 2007.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

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

CARVALHO, M. M. S. G.; STAMFORD, T. C. M.; SANTOS, E. P.; TENÓRIO, P.; SAMPAIO, F. Chitosan as an oral antimicrobial agent. **Microbiology Series**, n. 3, v. 1, p. 542-550, 2011.

CARVALHO P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** 72p. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CAVALCANTE L. C., MOREIRA M. C., MOTA O. M. L., TURATTI E., VIANA F. A. C.; PEREIRA S. L. S. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Brazil Journal Periodontology**. v. 22, n. 1, p. 69-73, 2012.

CEJKA, J. Simvastatin. **Acta Crystallographica Section C – Crystal Structure Communications**, v. 59, n. 8, p. 428-430, 2003.

CLARK, G.; SMITH, A. F., 1937, X-ray diffraction of chitin, chitosan, and derivatives, **Journal of Physical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 863–879.

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

CHEN, Y.; LU, Y.; CHEN, J.; LAI, J.; SUN, J.; HU, F. WU, W. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 376, p. 153-160, 2009.

CHEN, X. Y.; LI, K.; LIGHT, A. R., & FU, K. Y. Simvastatin attenuates formalin-induced nociceptive behaviors by inhibiting microglial RhoA and p38 MAPK activation. **The Journal of Pain**. v. 14, n. 11, p. 1310-1319, 2013

CHOPRA, V.; CHOSKI, P. V.; CAVUSOGLU, E. Beyond lipid lowering: The antihypertensive role of statins. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 21, p. 161-169, 2007.

CHU, L. W.; CHEN, J. Y.; YU, K. L.; CHENG, K. I.; WU, P. C., & WU, B. N. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of atorvastatin in a rat chronic constriction injury model. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. v. 25, n. 1, p. 219- 230, 2012.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Biomaterials**, v. 3, n. 6, p. 198-204, 2000.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; DE ASCENTIS, A.; PEPPAS, N.A. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. **Journal Controlled Release**, v. 39, n. 2-3, p. 231-237, 1996.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COSTA SILVA H. S. R.; SANTOS K. S. C. R.; FERREIRA E. I., "Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços", **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele**. 194f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, 2005.

DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; DIAS-FILHO, N. L.; DE PAULA, E.; ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína, vol. 33, n.1, **Química Nova**, p. 33-65, 2010.

DUMITRIU, S. **Polymeric Biomaterials**. New York: Marcel Dekker, 1993.

Di MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, **Biomaterials**, v. 26, p. 5983-5990, 2005.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337-4354, 2003.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Physical Biology Science**. v. 86, n. 5, p. 484-493, 2010

ESPOSITO, A. R.; DUEK, E. A. R.; CARDOSO, T. P.; BARBO, M. L. P.; SANTANA, G.; MODA, M.; CATTANI, S. M. M.; BARBIERI, J. A.; MUNHOZ, M. M. Prótese meniscal de polímero biorreabsorvível pré-cultivada com fibrocondrócitos. In: 43º **Congresso Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia**, 2011.

EPURE V.; GRIFFON M.; POLLET E.; AVÉROUS L.; Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading, **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 947-952, 2011.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Supplement 6.4 to the 6a ed. France: Directorate of Quality of Medicines of the Council of Europe,. p. 4686, 2009.

FELT, O.; FURRER P.; MAYER J. M.; PLAZONNET B.; BURI P.; GURNY R. Topical use of chitosan in ophtalmology: tolerance assesment and evaluation of precorneal retention. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 180, n. 2, p. 185-193, 1999.

FERRERO, C.; MUÑOZ-RUIZ, A.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M.R. Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. **International Journal of Pharmaceutics**., Amsterdam, v. 202, n. 1-2, p. 21-28, 2000.

FOURNIER, E.; PASSIRANI, C.; MONTERO-MENEI, C.N.; BENOIT, J.P. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3311- 3331, 2003.

FRAGA, A. F. Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, **Anais**, p. 2715-2725, 2006.

FUKUDA, D.; ENOMOTO, S.; SHIRAKAWA, I.; NAGAI, R.; SATA, M. Fluvastatin accelerates re-endothelialization impaired by local sirolimus treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 612, p. 87-92, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 739-744, 2012.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produções de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. n<sup>o</sup> 33 julho/dezembro, 2004.

GRAESER, K. A.; STRACHAN, C. J.; PATTERSON, J. E.; GORDON, K. C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 128-135, 2008.

GUPTA, K.C.; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and crosslinking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 43-54, 2006.

HAYASHI, T.; KANBE, H.; OKADA, M.; SUZUKI, M.; IKEDA, Y.; ONUKI, Y.; KANEKO, T.; SONOBE, T. Formulation study and drug release mechanism of a new theophylline sustained-release preparation, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1-2, p. 91-101, 2005.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 50, p. 874-875, 1961.

JANEGITZ, B. C.; LAURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FILHO, O. F. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, 879-884, 2007.

JAIWAL, S. R.; SONTAKKE, S. D. Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of simvastatin and atorvastatin. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 475-479, 2012

JCDPS, **Diffraction Data Base**, Newton Square: International Centre for diffraction data, PCPDFWIN v.24, 2003

JIANG X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 457-463, 2003.

JONES, D. **Pharmaceutical applications of polymers for drug delivery**. Shrewsbury: iSmithers Rapra, v. 15, 2004.

KASIM, N. A. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v.1, n.1, p.85-96, 2004.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**, 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 991 p, 2013.

KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: Model-based analysis of observed radial front movements. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 90, n.1, p. 1-21, 2003.

KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 1-21, 2008.

KONES, R. Rosuvastatin, inflammation, C-reactive protein and primary prevention of cardiovascular disease – a perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 383-413, 2010.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KORSMEYER, R.W.; PEPPAS, N.A. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z., **Controlled release delivery systems**. p. 77-90, 1981.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a Newly Recognized Type of Immunomodulator. **Nature Medicine**, v. 6, p. 1399-1402, 2000.

LEHR, C.L. JOKE A. B., ETIENNE H. S.; HANS E. J. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, n. 1-3, p. 43-48, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4ªed. São Paulo: Sarvier, 1202p., 2006.

LIMA, I. S.; RIBEIRO, E. S.; AIROLDI, C. O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 501-506, 2006.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: Quitosana / insulina**. 112 p. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

LIMA R. O. L.; RABELO E. R.; MOURA V. M. B. D.; SILVA L. A. F. Tresvenzol L.M.F. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. Revisão de literatura. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 56, p. 53-59, 2012.

LIU, S.; MAHESHWARI R.; KRISTI L. K. Polymer-based therapeutics. **Macromolecules**, v. 29, n. 1, p. 3- 13, 2009.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 75-88, 1998.

KEAN, T.; THANOU, N. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Review**, v.62, p.3-11, 2010.

KIM, D. Y.; RYU, S. Y.; LIM, J. E.; LEE, Y. S.; RO, J. Y. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, n. 1, p.76-86. 2007.

MANDELBAUM S. H.; DI SANTIS E. P.; MANDELBAUM M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte 1. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. Jul./ago., Rio de Janeiro, RJ. v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MATET, M.; HEUZEY, M. C.; AJJI, A.; SARAZIN, P. Plasticized chitosan/polyolefin films produced by extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 177-184, 2015.

MARTÍNEZ CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S. E PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p.305-315. 2010.

McGOWN, C. C; BROOKES, Z. L. S. Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. **British Journal of Anaesthesia**, v. 98, n. 2, p. 163-175, 2007.

MENDONÇA R. J.; COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MIRANDA, H. F; NORIEGA, V.; OLAVARRIA L.; ZEPEDA R. J.; SIERRALTA F.; PRIETO J. C. Antinociception and Anti-Inflammation Induced by Simvastatin in Algesiometric Assays in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 746, p. 1-5, 2011.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; CLARKE, E.G.C. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3° Ed. **Ed. Pharmaceutical Press** v. 1, 2004..

MOGHADASIAN, M. H. Minireview. Clinical pharmacology of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sciences**, v. 65, n. 13, p. 1329-1337, 1999.

MULYE, N. V.; TURCO, S. J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, n. 8, p. 943-953, 1995.

NOGUEIRA, R. M. B.; KITAMURA E. A.; AGUIAR O. M. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e collagenase. **Nos Clín.** v. 8, n. 43, p. 25-28, 2005.

OTUKI, M. F.; PIETROVSKI, E. V.; CABRINI, D. A. Topical simvastatin: Preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v. 44, p. 45-47, 2006.

PAGANELA J. C.; RIBAS L. M.; SANTOS C. A.; FEIJÓ L.S.; NOGUEIRA C. E. W.; FERNANDES C.G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**. v. 104, p. 13-18, 2009.

PANDIT, N.K. **Introdução às Ciências Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

PANOBIANCO M. S.; SAMPAIO B. A. L; CAETANO E. A.; INOCENTI A.; GOZZO T.O. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**. v. 11, p.15-22, 2012.

PATEL, R.; PATEL, M. Preparation, characterization, and dissolution behavior of a solid dispersion of simvastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, p.193-204, 2008.

PLANA J. C; JONES P.H. Uso de estatinas em síndromes coronarianas agudas: mecanismos responsáveis pelos resultados finais. **Current Atheros Reports Brasil**. n. 3, v.1: 270-280. 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 7ª.ed. São Paulo: Elsevier, p. 321-330, 2012.

RATNER, B. D., "Surface properties and surface characterization of materials", In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J.E. **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. 2 ed., San Diego, Elsevier, 2004.

REGO, A. C. M.; ARAÚJO FILHO, I.; DAMASCENO, B. P. G. L.; EGITO, E. S. T.; SILVEIRA, I. A.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, A. C. Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 1, p.57-63. 2007.

RENAME. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

RODRIGUEZ-YANEZ, M.; AGULLA J.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, R.; SOBRINO, T.; CASTILLO J. Statins and stroke. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 2, p. 157-166, 2008.

SAKKINEN, M. MARVOLA J.; KANERVA H.; LINDEVALL K.; AHONEN A.; MARVOLA M. Source. Scintigraphic verification of adherence of a chitosan formulation to the human esophagus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 145-147, 2004.

SANTIAGO, M. A. M. C. **Estatinas - Efeitos Tóxicos e Novas Aplicações**. 86p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2011.

SANTODOMINGO-GARZON, T.; CUNHA, T. M.; VERRI W. A.; VALÉRIO D. A. R.; PARADA C. A. S.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F.Q. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 149, p. 14-22, 2006.

SANTOS, J. E. **Preparação, Caracterização e Estudos termo-analíticos de Bases de Schiff Biopolimérica e seus complexos de Cobre**. Tese, 124f. (Doutorado em Ciências). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRESI, S. S.; FREITASII, L. L.; POHLMANNII, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAJI, J.; JAIN, V.; LODHA, S. Chitosan: A Novel Pharmaceutical Excipient. **Chitosan: A Novel Pharmaceutical Excipient**, v.1, 2010.

SHIMIZU T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 37, p. 65-73, 2005.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêutica e avanços. **Química nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

SILVA, K. E. R. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p.129-135, 2009.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug delivery kinetics (the "sequential layer" model). **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, p. 1290-1298, 2000.

TAHARA, K.; YAMAMOTO, K.; NISHIHATA, T. Application of model-independent and model analysis for the investigation of effect of drug solubility on its release rate from hydroxypropyl methylcellulose sustained release tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 133, n. 1, p. 17-27, 1996.

TAN, Y.; HAN, F.; MA, S.; YU, W. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n.4, p.1365-1370, 2011.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. National Formulary. USP 31. 31 rev. **Rockville: United States Pharmacopeial Convention**, p. 2815, 3359, 3557, 2008.

TRINDADE NETO, C.G. **Membranas de quitosana micro e macroporosas: Preparo, caracterização e estudos de permeabilidade**. 2008. 145 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

UNGARO, F. Use of cyclodextrins as solubilizing agents for simvastatin: Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on lactone/hydroxyacid aqueous equilibrium. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p.49 - 56, 2011.

VALENTA, C.; AUNER, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 279-289, 2004.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015.

VARELAS, C. G., DIXON, D. G., STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal Controlled Release**, Amsterdam, v. 34, p. 185-192, 1995.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E, "Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan", **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 1311-1326, 2008.

XAVIER, A. M.; SERAFIM, K. G.; HIGASHI, D. T.; VANAT, N.; FLAIBAN, K. K.; SIQUEIRA, C. P.; VENANCIO, E. J.; RAMOS, P. Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in Wistar rats. **Injury**. v. 43, n. 3, p. 284-289, 2012.

YOSHINARI, M. Controlled release of simvastatin acid using ciclodextrin inclusion sistem. **Dental Materials Journal**, v. 26, n.3, p. 451-456, 2007.

YUN, Y. H.; GOETZ, D. J.; YELLEN, P.; CHEN, W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. **Biomaterials**, v. 25, n. 1, p. 147-157, 2004.

WAGNER, J. G. Interpretation of percent dissolved-time plots derived from In vitro testing of conventional tablets and capsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 1253-1257, 1969.

WU, T., ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers.**, v. 73, n. 2, p. 248-253, 2008.

ZHANG, Y. XUE, C.; XUE, Y.; Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1914-1917, 2010.

ZHAO, Y.; FENG, Q.; HUANG, Z.; LI, W.; CHEN, B.; JIANG, L.; WU, B.; DING, W.; XU, G.; PAN, H.; WEI, W.; LUO, W., & LUO, Q. Simvastatin inhibits inflammation in ischemia-reperfusion injury. **Inflammation**. v. 37, n. 5, p. 1865-1875, 2014.

## ANEXO



### PARECER

NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 5002042015

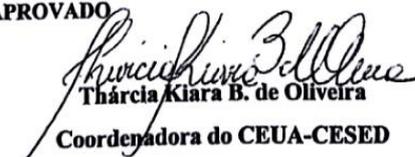
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012

DATA DO PARECER: 02/04/2015

1. Pesquisador Responsável: **Bolivar Ponciano Goulard de Lima Damasceno**  
Título do Projeto: **FILME DE SINVASTATINA A BASE DE QUITOSANA PARA USO TÓPICO.**
2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 02 / 04 / 2015.

Vigência do Projeto	06/04/2015 à 20/04/2015
Espécie / linhagem	Mus musculus / Swiss
Nº de animais	45
Peso / idade	35 g / 8 a 12 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério FCM

### 3. Parecer Final: APROVADO

  
Thárcia Kiara B. de Oliveira  
Coordenadora do CEUA-CESED

  
Thárcia Kiara B. de Oliveira  
Coordenadora do CEUA/CESED  
Em: 21/08/15

