

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE BICAMADA DE ALGINATO PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SINVASTATINA

Rubens T. Monteiro¹, Rodrigo S. Vieira²

¹Departamento De Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil

²Departamento De Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil

E-mail: rubens.engenheiroquimico@gmail.com

Resumo. O objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar filmes de alginato em mono e bicamada, com diferentes graus de reticulação, para investigar seu potencial na absorção e liberação controlada de sinvastatina, a fim de ser utilizado como curativo. Os filmes foram caracterizados pelo peso, espessura, pH da superfície, teor de umidade, Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Pelos resultados obtidos foi possível observar que após o processo de reticulação os filmes ficaram mais rígidos e mais fortes, embora menos elásticos. Foi possível obter filmes com boa reprodutibilidade e com potencial para aplicação como curativos, em função na mudança da estrutura morfológica das camadas, causada pela reticulação.

Palavras-chave: Alginato, Sinvastatina, Curativos

1. INTRODUÇÃO

O alginato é um polissacarídeo produzido basicamente por duas fontes: síntese por bactérias ou extração de algas marinhas marrons, geralmente, das espécies *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. As diferentes fontes de extração podem divergir nas proporções dos ácidos manurônico (M) e gulurônico (G). Essa razão M/G influencia diretamente nas características físico-químicas de gelificação, propriedades anti-inflamatórias e na liberação e encapsulação de moléculas alvo. O alginato por ser biocompatível, inerte, facilmente disponível e possuir um baixo custo, tem sido utilizado na área de biomateriais (Ghosal, *et al.*, 2019) e já comercialmente para produção de curativos (Curatec, Algikura, Kaltostat, Biatain, Suprasorb entre outros).

Visando melhorar as propriedades desses curativos tem-se buscado a adição de fármacos de modo a produzir matrizes bioativas. A sinvastatina é uma estatina que atua inibindo a hidroximetilglutaril coenzima A redutase, sendo comumente utilizado como agentes hipocolesterolêmicos em doenças cardiovasculares. Recentemente, seus efeitos terapêuticos de atividade anti-inflamatória, anti-trombogênica, antioxidante e função restauradora, tem sido estudada, revelando-se assim um promissor fármaco para o tratamento dérmico (AL-GHOUL *et al.*, 2014; YASASVINI *et al.*, 2017).

Os curativos bioativos modernos (matrizes com propriedades biológicas e liberação controlada de fármacos) devem ser capazes de atuar na manutenção das condições desejadas para cicatrização (alta umidade e remoção do exsudato) sem a necessidade de trocas constantes (que causam dores e desconforto) (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Atualmente a maioria desses curativos são produtos em monocamadas (WANG *et al.*, 2017). Porém curativos na forma de filmes em multicamadas podem ser bastante interessantes, pela possibilidade de modulação da liberação do fármaco, devido às barreiras físicas formadas pelas cadeias poliméricas de cada camada, modificando sua estrutura morfológica e alterando a taxa de difusão dos fármacos através do curativo (THU; ZULFAKAR, 2012).

Dessa forma o objetivo do trabalho foi produzir e caracterizar filmes de alginato em monocamadas e bicamadas, investigando seu potencial na absorção e liberação controlada de sinvastatina, para ser utilizado como curativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para produção dos filmes foi utilizado alginato de sódio (1347, lote 90874, Dinâmica) e como agentes plastificante e reticulante foram utilizados, respectivamente, glicerol (V000123, lote DCBD2144V, Sigma-Aldrich) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C8103, lote DCBC6675V, Sigma-Aldrich).

2.2 Preparação dos filmes

Preparação do filme tipo monocamada

Para a produção do filme em monocamada misturou-se uma solução 5% (m/v) de alginato e 0,5% (v/v) de glicerol até a completa homogeneização, em seguida realizou-se uma prévia reticulação com adição gradativa de 20mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 30 min a 900 rpm. 25 g dessa solução foram transferidas para placa de Petri (9 cm de diâmetro) e colocada em uma estufa a 40 °C por 10 h (primeira secagem), formando o filme. Em seguida, o filme em monocamada foi reticulado por imersão durante 20 min em uma solução aquosa de 4 % (m/v) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, lavado para retirada dos íons cálcio não reticulado e seco por 24 h a temperatura ambiente (segunda secagem).

Preparação do filme tipo bicamada

Para a produção do filme tipo bicamada foi realizado inicialmente o mesmo procedimento do filme em monocamada. Em seguida adicionou-se sobre o filme seco 25 g de uma solução 5% (m/v) de alginato e 0,5% (v/v) de glicerol pré-reticulado pela adição gradativa de 40mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, formando uma camada superior. Após a adição, o filme com o gel sobreposto foi colocado novamente pra secar na estufa a 40 °C por 10 h, formando assim o filme em bicamada. O filme em bicamada foi então reticulado por imersão durante 20 min em uma solução aquosa de 4 % (m/v) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Em seguida, foi realizada a lavagem e seco por 24 h a temperatura ambiente.

2.3 Caracterização dos filmes

Peso

Para avaliar o peso dos filmes preparados, 3 Amostras de 2cmx2cm (recortados dos filmes) foram pesados em uma balança digital.

Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Os resultados foram obtidos por meio da média aritmética de 10 leituras em pontos aleatórios de cada filme.

PH da superfície

Para determinar o pH da superfície, 3 Amostras de 2cm x 2cm (recortados dos filmes) foram colocadas em 3 beakers diferentes com 15 mL de água destilada e agitadas a uma rotação de 200 rpm e o pH da solução foi medido, de modo a obter de forma indireta as características de cargas dos filmes.

Teor de umidade

O teor de umidade foi obtido por método gravimétrico. 3 Amostras de 2cm x 2cm (recortados dos filmes) foi acondicionada em uma estufa a 105 °C, sendo pesados a cada 10 minutos até massa constante. Determinando-os usando a seguinte equação:

Teor de umidade = [(Peso inicial do filme - Peso final do filme) / Peso inicial do filme] x 100

Grau de intumescimento

Para detectar a capacidade de dilatação, 3 Amostras de 2cm x 2cm (recortados dos filmes) foram colocados em tampão Tris pH 7,0 a 25°C. As amostras foram removidas do meio após 5 min, 15 min e 30 min e depois com intervalos de 30 minutos até o grau de intumescimento se manter constante. A água na superfície da amostra foi retirada com papel antes de cada pesagem. O Grau de intumescimento foi calculado pela seguinte equação:

Grau de intumescimento = [(peso do filme no tempo final - peso do filme no tempo zero) / peso do filme no tempo final] x 100

Estabilidade

Para detectar a estabilidade das formulações, 3 Amostras de 2cm x 2cm (recortados dos filmes) foram colocados em tampão Tris pH 7,0 a 25°C e agitadas com o auxílio de um agitador magnético. Os filmes foram removidos com intervalos de uma hora, retirando em cada medição a água da superfície.

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A fim de verificar as características estruturais dos filmes foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho por um espectrofotômetro (Agilent Technologies, Cary 630). Foram analisados espectros entre 650 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 8 cm⁻¹ e acúmulo de 32 varreduras.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes foram avaliados quanto à microestrutura de sua superfície. As amostras dos filmes de 0,5 cm x 0,25 cm foram afixadas em suportes cilíndricos de alumínio e, posteriormente, recobertas com uma fina camada de ouro por equipamento metalizador (Metalizadora QT150 ES - Quorum) para conferir condutividade. As ampliações das imagens dos filmes foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG - FEI) com resolução nominal de 1nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de 25 g de gel foi ideal para moldar o curativo na placa de Petri, produzindo filmes homogêneos, sem a presença de aglomerados ou partículas não dissolvidas. Além disso, apresentaram facilidade e desprendimento das placas.

3.1 Peso

A media do peso das amostras da camada superior, inferior e da bicamada estão dispostos na Tabela 1, na qual se pode observar uma pequena variação do peso entre a camada superior e inferior, essa diferença se deve ao processo de pré-reticulação (Ghosal, *et a.*, 2019), pois a maior concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (na Camada superior) aumentou a interligação entre as cadeias poliméricas tornando o filme um pouco mais rígido e pesado. Já o filme em bicamada apresentou maior peso por utilizar uma maior quantidade de alginato para sua produção.

Tabela1: Peso médio das amostras dos filmes.

Peso médio das amostras dos filmes (g)	
Camada superior	$0,123 \pm 0,006$
Camada inferior	$0,111 \pm 0,002$
Bicamada	$0,269 \pm 0,015$

3.2 Espessura

A espessura media dos filmes da camada superior, inferior e da bicamada estão dispostos na Tabela 2. Nele se observa que apesar da diferença na pré-reticulação, não houve variação significativa entre as espessuras dos filmes da camada superior e inferior. Já o filme em bicamada apresentou uma espessura maior e menos uniforme. Uma característica desejável em curativos é que estes não sejam maiores que a espessura da pele (BIERHALZ; WESTIN; MORAES, 2016), ela varia entre 0,5 e 2 mm dependendo da idade, sexo e do local em que está presente. Desse modo, os filmes se encontram na faixa de aplicabilidade para utilização como curativos em relação à sua espessura.

Tabela 2: Espessura média dos filmes

Espessura média dos filmes (mm)	
Camada superior	$0,436 \pm 0,02$
Camada inferior	$0,446 \pm 0,019$
Bicamada	$0,921 \pm 0,101$

3.3 pH

A media das medições de pH das amostras da camada superior, inferior e da bicamada estão dispostos na Tabela 3. Observa-se que todas apresentaram um pH entorno de 6,7 em água destilada. Esse valor de pH é positivo para aplicação como curativo, pois pelo fato do pH da pele ser levemente ácido (entre 4,7 e 5,75) não ocorrerá irritação após a administração dos filmes (Ghosal, *et a.*, 2019). Importante destacar que feridas crônicas possuem um pH mais alcalino (entre 7,15 e 8,9), esse pH mais elevado resulta em uma cicatrização mais demorada (MENOITA *et al.*, 2011), desse modo o contato com o pH mais baixo da superfície do filme irá ajudar na cicatrização.

Tabela 3: pH da superfície dos filmes

Grau de intumescimento%	
Camada superior	6,7 ± 0,01
Camada inferior	6,67 ± 0,011
Bicamada	6,66 ± 0,006

3.4 Teor de umidade:

O teor de umidade médio das amostras da camada superior, inferior e da bicamada está disposto na Tabela 4 e o seu comportamento em função do tempo na Figura 1. Pode-se observar que a maior concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na pré-reticulação da camada superior diminuiu um pouco o teor de umidade, isso ocorre por que a reticulação influencia na quantidade de água contida em um filme (GAO; POLLET; AVÉROUS, 2017), tornando-os menos solúveis em meio aquoso e consequentemente diminuindo seu teor de umidade. Já a bicamada apresentou maior teor de umidade, devido à maior quantidade de alginato que se associam as moléculas de água. O teor de umidade é uma importante medida, pois influencia as trocas gasosas, a absorção de exsudatos e a liberação de fármacos (BOATENG et al., 2008).

Tabela 4: Teor de umidade dos filmes

Teor de umidade %	
Camada superior	25,36 ± 0,01
Camada inferior	28,77 ± 0,024
Bicamada	37,16 ± 0,018

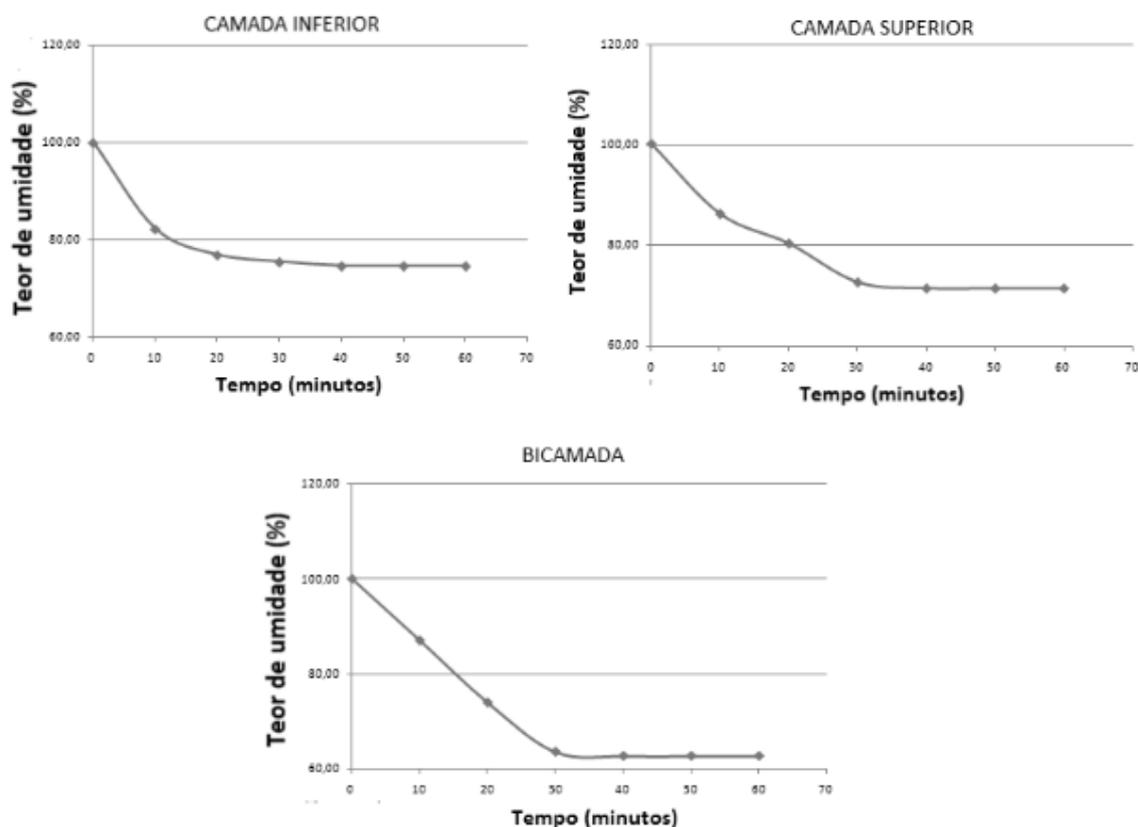


Fig 1: Teor de umidade dos filmes em função do tempo

3.5 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento médio das amostras está disposto na Tabela 5 e seu comportamento em função do tempo na Figura 2. Pode-se observar que os filmes tiveram um alto grau de intumescimento. Ressaltando que, apesar de possuírem espessuras semelhantes, a camada inferior obteve maior grau de intumescimento que a superior, pois, como observado nos resultados de teor de umidade, a maior concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ influencia negativamente na solubilidade em meio aquoso. Verifica-se também que, devido a sua maior espessura e quantidade de alginato, o filme em bicamada apresentou um maior grau de intumescimento.

O intumescimento no alginato é facilitado pelos grupos carboxilato que se associam fortemente às moléculas de água. Segundo Paşcalau *et al.*, (2012) é importante estudar o comportamento da hidratação em filmes, pois essa hidratação permite a liberação de moléculas de fármacos. Dessa forma, o comportamento do grau de intumescimento influencia na taxa de liberação de medicamentos em curativos bioativos.

Tabela 5: Grau de intumescimento dos filmes

Grau de intumescimento%	
Camada superior	$77,09 \pm 0,009$
Camada inferior	$77,32 \pm 0,018$
Bicamada	$85,41 \pm 0,015$

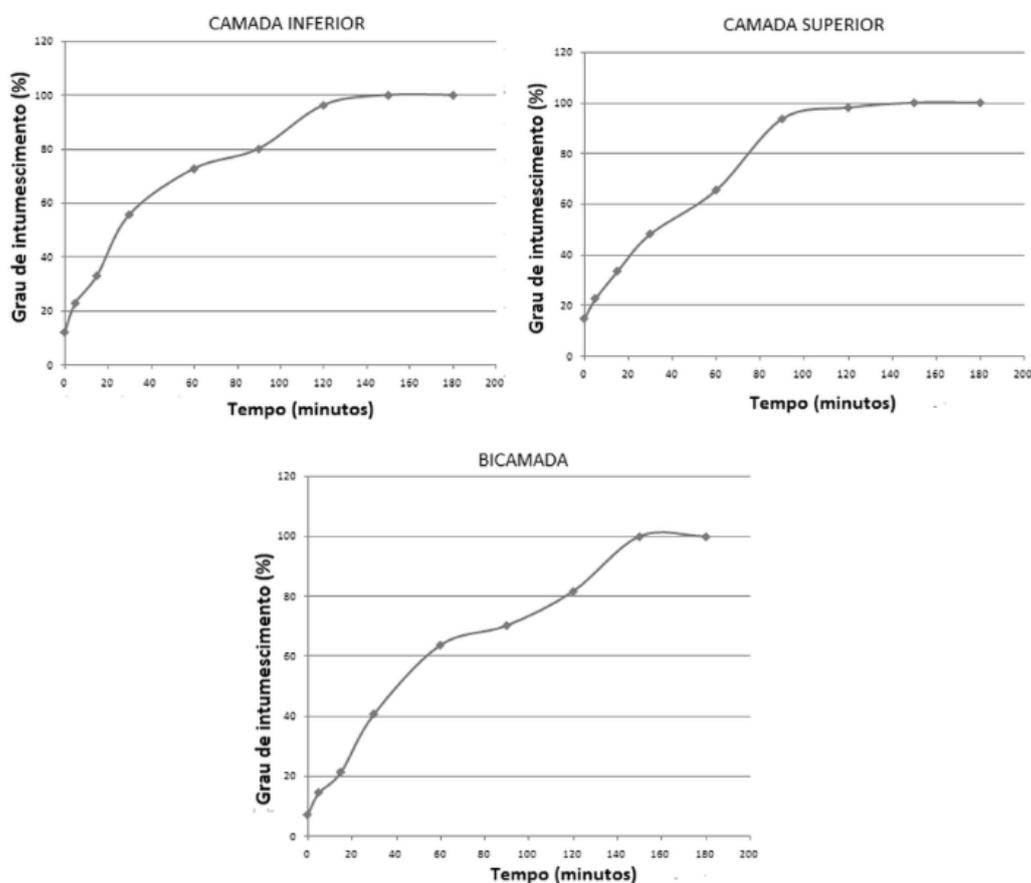


Fig 2: Grau de intumescimento dos filmes em função do tempo.

3.6 Estabilidade

Segundo Boateng *et al.* (2008) são características desejáveis em um curativo moderno a absorção do excesso de exsudatos, o auxílio na síntese dos tecidos conectivos, e a possibilidade de liberação de compostos bioativos. Dessa forma se faz necessário que o curativo permaneça estável durante o decorrer da cicatrização. A Figura 3 mostra a estabilidade da camada inferior, superior e bicamada por um período 72 h (3 dias), observando-se que os filmes se mantêm estáveis.

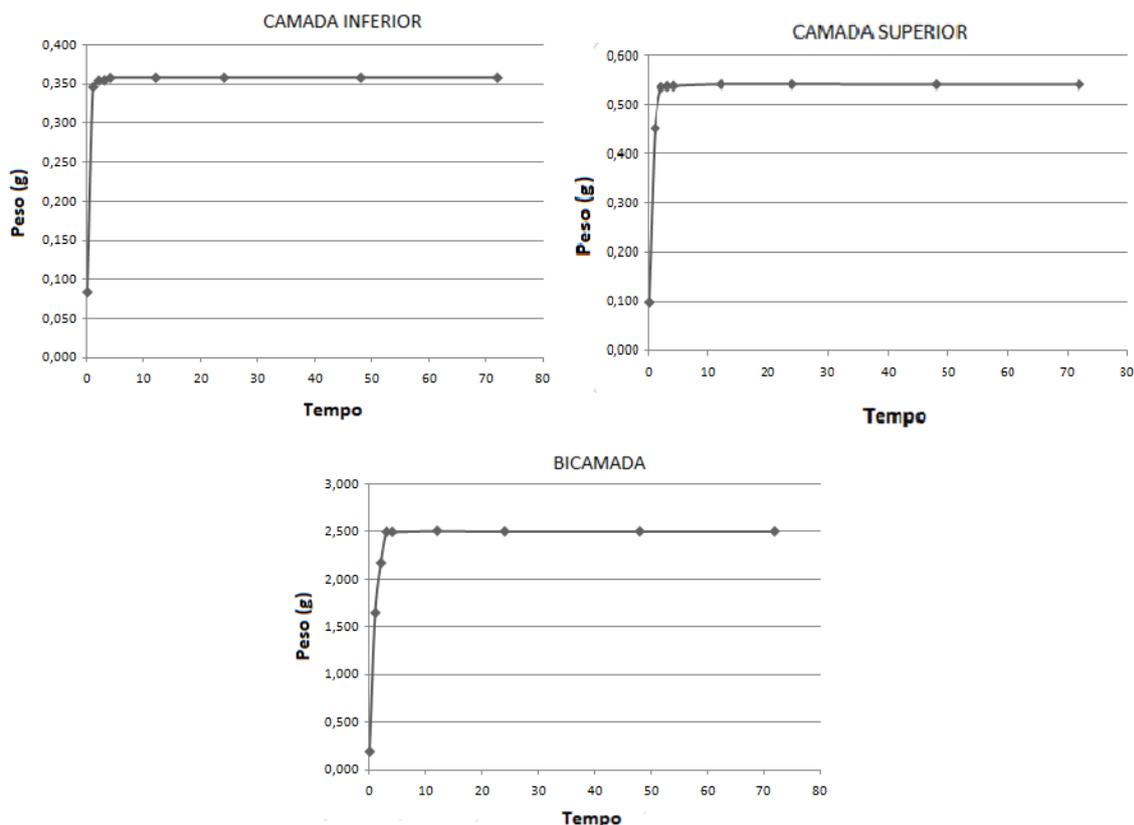


Fig 3: Estabilidade das amostras em função do tempo.

3.7 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A Figura 4 mostra os espectros de FTIR das camadas inferior, superior e bicamada, nela se pode verificar cinco picos distintos. As bandas entre $3200-3500\text{ cm}^{-1}$, relacionadas às vibrações de estiramento de grupos $-\text{OH}$ (LI *et al.*, 2012). Já as vibrações dos íons carboxílicos (COO^-) são observadas em dois picos distintos: estiramento assimétrico em torno de 1593 cm^{-1} e estiramento simétrico em 1418 cm^{-1} (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2013) Menores picos foram observados nas bandas próximas a 2930 e 1325 cm^{-1} . A primeira banda está relacionada à vibração por estiramento por grupos saturados de C-H (REN *et al.*, 2016) e a segunda à vibração por flexão dos grupos $-\text{OH}$ (KUILA; RAY, 2014). O último pico, em torno de 1032 cm^{-1} , é relacionado ao estiramento vibracional simétrico de grupos C-O-C (REN *et al.*, 2016). Os picos observados estão de acordo com os resultados de outros autores em materiais à base de alginato (KUILA; RAY, 2014; REN *et al.*, 2016).

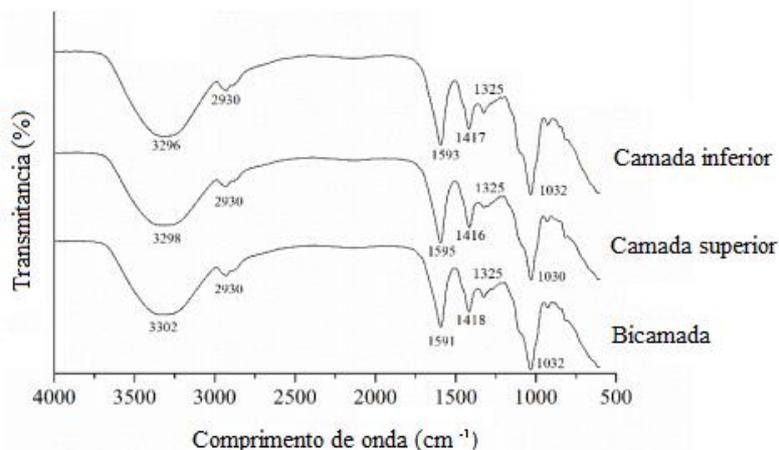


Fig 4: Espectros de FTIR dos filmes

3.8 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Na Figura 5 estão apresentadas as micrografias obtidas no MEV para a superfície dos filmes. Analisando as microscopias pode se observar que os filmes apresentaram uma superfície com ondulações, sendo positivo, pois essas ondulações são importantes, pois aumentam a superfície de contato do filme com a pele. Também é possível verificar cristais dispersos no filme, provavelmente formados pelo excesso de íons Ca²⁺ que não reticularam a matriz polimérica e, mesmo após a lavagem das amostras, não foram eliminados. Resultados similares foram encontrados por Bierhalz *et al.* (2014) em filmes de alginato reticulados com bário, neles cristais de íons Ba²⁺ permaneceram sob a superfície das amostras. Outra observação importante é a ausência de poros nas estruturas, essa ausência é favorável em curativos, pois assim se previnem penetrações diretas de micro-organismos nos ferimentos (BUENO *et al.*, 2014).

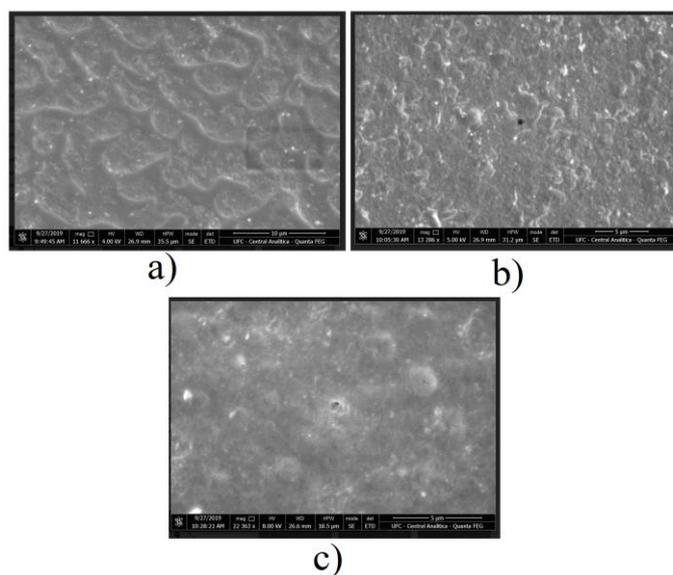


Fig 5: Micrografias das superfícies: a) camada inferior, b) camada superior e c) bicamada

4. CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível obter filmes homogêneos e de fácil manuseio para aplicação como curativos. Em que de modo geral, tanto os filmes em monocamada quanto o filme em bicamada, apresentaram grande parte das características desejadas para serem aplicados como dispositivos para liberação de fármacos, como a simvastatina, e com potencial para aplicação como curativos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes (NPL) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

REFERÊNCIAS

- Al-Ghoul, W. M.; Kim, M. S.; Fasal, N.; Azim, A. C.; Ali, A. (2014) Evidence for simvastatin anti-inflammatory actions based on quantitative analyses of NETosis and other inflammation/oxidation markers, 4, 14-22
- Bierhalz, A. C. K.; Moraes, A. M. (2016) Tuning the properties of alginate-chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 46, 1–11.
- Bierhalz, A. C. K., Westin, C. B., Moraes, A. M., (2016) Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 496–504.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., Eccleston, G. M., (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 8, 2892–2923.
- Bueno, C. Z., Dias, A. M. A., DE Sousa, H. J. C., Braga, M. E. M., Moraes, A. M., (2014) Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. *Materials Science and Engineering C*, 44, 117–125.
- Dhivya, S., Padma, V. V., Santhini, (2015) E., Wound dressings – a review. *BioMedicine*, 5, 4, 22.
- Gao, C., Pollet, E., Avérous, L., (2017) Properties of glycerol-plasticized alginate films obtained by thermomechanical mixing. *Food Hydrocolloids*, 63, 414–420.
- Ghosal, K., Das, A., Das, S. K., Mahmood, S., Ramadan, M. A. M., Thomas, S., (2019) Synthesis and characterization of interpenetrating polymeric networks based bio-composite alginate film: A well-designed drug delivery platform, 130, 645-654.
- Kuila, S. B., Ray, S. K. (2014) Separation of benzene-cyclohexane mixtures by filled blend membranes of carboxymethyl cellulose and sodium alginate. *Separation and Purification Technology*, 123, 45–52
- Li, Y., Jia, H.; Pan, F., Jiang, Z., Cheng, Q. (2012) Enhanced anti-swelling property and dehumidification performance by sodium alginate-poly(vinyl alcohol)/polysulfone composite hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, 407–408, 211–220.
- Menoita, E., Santos, V., Santos, A., Gomes C. (2011). pH no controle do microambiente das feridas crônicas. *Coimbra, Sinais Vitais*, 94, 54-61.
- Mukhopadhyay, P., Sarkar, K., Soam, S., Kundu, P. P., (2013) Formulation of pH-responsive carboxymethyl chitosan and alginate beads for the oral delivery of insulin. *Journal of Applied Polymer Science*, 129, 2, 835–845.
- Paşcalau, V., Popescu, V., Popescu, G.L., Dudescu, M.C., Borodi, G., Dinescu, A., PerhaiŪa, I., Paul, M., (2012). The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *J. Alloy Compd.* 536, S418–S423.
- Ren, H., Gao, Z., Wu, D., Jiang, J., Sun, Y., Luo, C., (2016) Efficient Pb(II) removal using sodium alginate-carboxymethyl cellulose gel beads: Preparation, characterization, and adsorption mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 137, 402–409.
- Thu, H. E., Zulfakar, M. H., NG, S. F., (2012) Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 434, 1–2, 375–383.
- Wang, L., Wang, W., Liao, J., Wang, F., Jiang, J., Cao, C., Li, S., (2017) Novel bilayer wound dressing composed of SIS membrane with SIS cryogel enhanced wound healing process. *Materials Science and Engineering: C*,
- Yasasvini, S., Anusa, R. S., VedhaHari, B. N., Prabhu, P. C., RamyaDevi, D., (2017) Topical hydrogel matrix loaded with Simvastatin microparticles for enhanced wound healing activity, 72, 160-167.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ALGINATE BILAYER MEMBRANES FOR SIMVASTATIN RELEASE

Rubens T. Monteiro¹, Rodrigo S. Vieira²

¹Departamento De Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil

²Departamento De Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil

E-mail: rubens.engenheiroquimico@gmail.com

Abstract. The objective of this work was to produce and characterize single and bilayer alginate films, with different degrees of crosslinking, to investigate their potential for absorption and controlled release of simvastatin in order to be used as a dressing. The films were characterized by weight, thickness, surface pH, moisture content, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). From the results obtained it was possible to observe that after the crosslinking process the films became stiffer and stronger, although less elastic. It was possible to obtain films with good reproducibility and potential for application as dressings, due to the change in the morphological structure of the layers, caused by the crosslinking.

Keywords: Alginate, Simvastatin, Dressings