



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

VANDIARA MARTINS MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA/CICATRIZANTE DE FILMES POLIMÉRICOS DE
QUITOSANA CONTENDO SINVASTATINA**

CAMPINA GRANDE

2016

VANDIARA MARTINS MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA/CICATRIZANTE DE FILMES POLIMÉRICOS DE
QUITOSANA CONTENDO SINVASTATINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como exigência para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia Generalista.

Orientador: Prof. Dr. BOLIVAR PONCIANO GOULART DE LIMA DAMASCENO.

CAMPINA GRANDE

2016

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.

M838a Moreira, Vandiarra Martins.

Avaliação da atividade anti-inflamatória/cicatrizante de filmes poliméricos de quitosana contendo sinvastatina [manuscrito] / Vandiarra Martins Moreira. - 2016.

38 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia".

1. Atividade anti-inflamatória. 2. Inflamação. 3. Sinvastatina. 4. Quitosana. 5. Filmes poliméricos. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

VANDIARA MARTINS MOREIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE DE FILME DE
QUITOSANA CONTENDO SINVASTATINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Graduação de Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, como
exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia Generalista.

Aprovada em: 11/4/16

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Me. Airlla Laana de Medeiros Cavalcanti (Avaliadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Esp. Leticia Rangel Mayer Chaves (Avaliadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, por terem acreditado em mim e feito os maiores esforços para a realização deste sonho, pois sem eles não estaria aqui. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me confiar a vida e permitir a realização deste sonho, por estar sempre me guiando e iluminando-me em todas as escolhas.

Aos meus pais Maria Socorro M. Moreira e José Vanísio Moreira, por terem acreditado e sem mensurar esforços fizeram os maiores sacrifícios para alcançarmos esta conquista, pois esta vitória é nossa. Pela vida que me deste, pelo amor que nunca me faltou e por todo o ensinamento que me foi passado, que me fez a pessoa que sou hoje. Amo vocês infinitamente!

Aos meus irmãos Vindinara Martins e Vanísio Júnior por todo o apoio e carinho durante toda minha vida.

Ao meu namorado Érick Tássio, por toda a paciência, torcida e incentivo a cada passo dado por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bolivar P. G. de L. Damasceno por todos esses anos de trabalho em equipe, pelo conhecimento transmitido e oportunidades disponibilizadas.

A Natan Emanuell de S. e Silva, Pedro Gomes e Amáro César por toda dedicação e parceria durante a realização deste estudo.

Aos meus amigos Keylla Malba, Pedro Gomes, Suênia Franklin, Emanuelle Pinheiro, Camila Oliveira, Vanessa Pereira, Katiane Vieira, Moisés Guilhermino, Layla Neves e Hervesson Pereira por todo o aprendizado em conjunto, bem como os momentos inesquecíveis durante esta etapa de minha vida. Tenho certeza que nossa relação vai além das portas da universidade.

A Rayanne Lima e Lucile Martins por toda irmandade, solidariedade, e amizade.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), e todos que fazem parte do mesmo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

Deus nos deu a capacidade de sonhar alto para que possamos crescer junto com os nossos sonhos. Dentro de você está tudo o que você precisa para ser quem você quiser ser. Ouse crescer junto com os seus sonhos!

(Mary Kay Ash)

RESUMO

A quitosana (QTS) é um biopolímero derivado da desacetilação da quitina, que nos últimos anos vem despertando grande interesse na indústria farmacêutica, devido suas propriedades antibacteriana, antifúngica, além de ser atóxica, biodegradável, bioadesiva e biocompatível. Estudos ainda relatam uma discreta atividade anti-inflamatória. A sinvastatina (SINV) é uma estatina bastante utilizada para redução do colesterol, em decorrência de sua ação hipolipêmica e também tem demonstrado efeitos pleiotrópicos como atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, antitrombogênicas, antioxidante. Este estudo teve como objetivo a avaliar a atividade anti-inflamatória/cicatrizante de filmes poliméricos de quitosana contendo sinvastatina de uso tópico em lesões cutâneas. Neste estudo foram testados 3 filmes: filme branco (FB-sem sinvastatina), filme com 10mg de sinvastatina, filme com 20mg de sinvastatina e o grupo controle (solução salina 0,9%). Para o método da lesão cutânea, foi feita uma ferida com punch de 1cm de diâmetro na pele do dorso de camundongos deixando-se exposto o *panniculus carnosus*. Os filmes foram aplicados imediatamente após a lesão e trocados a cada 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 após a eutanásia foi feita contagem leucocitária no sangue dos animais. Os resultados mostraram significativo efeito anti-inflamatório/cicatrizante do filme de quitosana com 20 mg de sinvastatina 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. O filme de quitosana com 10 mg de sinvastatina apresentou um menor efeito anti-inflamatório/cicatrizante quando comparado com o filme de quitosana com 20 mg de sinvastatina, o mesmo apresentou um satisfatório efeito anti-inflamatório/cicatrizante quando equiparado com o grupo salina ou o filme branco, avaliados através da redução no tamanho da lesão. Também observou-se aumento no número de leucócitos totais no sangue destes camundongos em dias próximos a realização da lesão. A aplicação local sobre as feridas do filme contendo 20 mg de sinvastatina foi eficiente na redução deste número em todos os momentos da lesão avaliados. Em conjunto, os resultados deste estudo apontaram importantes atividades anti-inflamatória/cicatrizante de filmes de quitosana contendo sinvastatina.

Palavras-chave: Inflamação; Sinvastatina; Quitosana; Filme Polimérico.

ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer derived from the deacetylation of chitin. It has recently received a great attention from pharmaceutical industry because of its antifungal and antibacterial properties, and because some other characteristics as its biodegradability, no toxicity, bioadhesiveness and biocompatibility. Studies also report a slight anti-inflammatory action. Simvastatin is a statin widely used for lowering cholesterol due to its hypolipemic action and it has also demonstrated pleiotropic effects as anti-inflammatory, immunomodulatory, antithrombogenic and antioxidant activity. This study aimed to evaluate anti-inflammatory/healing activities of Polymeric Chitosan films containing simvastatin of topic use in skin lesions. This study tested three films: white film (FB without simvastatin), a film with 20mg of simvastatin, a film with 10mg of simvastatin and a control group (saline solution). A wound was made in the mouse's dorsal skin with a 1cm diameter punch to produce the panniculuscarnosus exposure. Biofilms were applied immediately after the injury and changed every two days until to sacrifice the mice. Sacrifices were conducted at 4, 8 and 12 days after the wound. The wounds were evaluated by measuring their area, and after mice's euthanasia, a count of their white blood cell was performed. The results of this study show a significant anti-inflammatory and healing effect of chitosan biofilm of 20mg with simvastatin over the first 8 days after skin lesions. A more expressive reduction of wound size was observed than that for mice treated with saline or white biofilm. Chitosan film with 10mg of simvastatin demonstrated a lower anti-inflammatory/healing effect when compared to chitosan film with 20 mg of simvastatin. It also presented a satisfactory anti-inflammatory/healing effect when compared with saline group or white film, evaluated through lesion size reduction. An increase in the number of total leukocytes in blood's mice treated with chitosan biofilm of 20mg with simvastatin was also perceived. Local application of biofilms containing simvastatin on wounds was efficient in reducing the number of leukocytes on all times of this injury tested in this study. In conclusion, these results show a significant anti-inflammatory and healing activity of chitosan films containing simvastatin.

Keywords: Inflammation; Simvastatin; Chitosan; Polymer film.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Área residual das feridas cutâneas (área atual da ferida/ área inicial ferida x 100)..24
- 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.24
- Figura 3 – Número de leucócitos totais 4 dias após a lesão.25
- Figura 4 – Número de leucócitos totais 8 dias após a lesão.. 26
- Figura 5–Número de leucócitos totais 12 dias após a lesão..27
- Figura 6 – Número de leucócitos totais 4, 8 e 12 dias após a lesão.. 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos grupos de animais	23
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Cicatrização de feridas	14
2.2	Novas formas farmacêuticas	15
2.3	Filmes Poliméricos de Quitosana	15
2.4	Estatinas	16
2.5	Sinvastatina	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Materiais	20
4.2	Animais	20
4.3	Métodos	20
4.3.1	Modelo de feridas cutâneas	20
4.3.2	Tratamentos	21
4.3.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória/cicatrizante	21
4.3.3.1	Fotodocumentação	21
4.3.3.2	Medida da área das feridas cutâneas	21
4.3.3.3	Área residual da ferida cutânea	22
4.3.3.4	Contagem Leucocitária	22
4.3.3.5	Análise estatística	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Área residual das feridas cutâneas	24
5.2	Contagem leucocitária	25
6	CONCLUSÃO	30
7	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	31
8	ANEXO 1	

1 INTRODUÇÃO

A pele desempenha função principal de barreira aos ataques externos de diversos microrganismos, além de ser o principal responsável pela regulação da temperatura corporal, excretar impurezas e sintetizar a vitamina D (essencial para o crescimento) (DALLAN, 2005). Quando lesionada, a mesma encontra-se suscetível ao contato de corpos estranhos. Estes quando em contato com a lesão provocam a inflamação, desencadeando respostas inflamatórias, ocasionando um retardo na cicatrização e as vezes a formação de abscessos (BOATENG et al., 2008).

Os eventos que desencadeiam a cicatrização são intercedidos por mediadores bioquímicos, descritos em diferentes fases, que correspondem aos principais episódios observados em determinado período de tempo (LIMA et al., 2012). Para toda e qualquer cicatrização de lesão, torna-se necessário desencadear o processo de reparação tecidual, onde este é composto por diversas fases como a hemostasia, fase inflamatória, formação do tecido de granulação e remodelação (SHIMIZU, 2005).

A importância na pesquisa por medicamentos curativos que apresentem uma cicatrização mais rápida, através de sua interação com a lesão, só tem aumentado em virtude dos custos nos tratamentos relacionados à deficiência cicatricial.

Sinvastatina (SINV) é uma das estatinas de maior uso da população. É bastante utilizada para reduzir o nível de colesterol no plasma, através da inibição competitiva da hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Porém, vários estudos já relataram possuir efeitos pleiotrópicos como atividade anti-inflamatória, ações imunomoduladoras, antitrombogênica, antioxidante, incluindo uma redução nos mediadores inflamatórios como interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), monócitos preteína-1 (MCP-1). (DOBRIC, 2009). Alguns autores já relataram que o uso tópico ou sistêmico de estatinas é eficaz no tratamento de doenças dermatológicas inflamatórias como psoríase, vitiligo, eritema multiforme e necrólise epidêmica tóxica (NMAZI, 2004).

Este fármaco está disponibilizado no mercado apenas na sua forma sólida (cápsulas e comprimidos) o que restringe seu uso local para atividade anti-inflamatória, já relatada 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 avaliar a atividade anti-inflamatória/cicatrizante da sinvastatina através de filmes poliméricos de quitosana contendo este fármaco, em lesões cutâneas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cicatrização de Feridas

O corpo humano é coberto por aproximadamente dois metros quadrados de pele, esta é tida como a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos e por isso está sujeita a constantes agressões, o que torna sua capacidade de reparação importante para a sobrevivência (NOGUEIRA et al., 2005).

A inflamação é caracterizada como uma resposta de defesa do organismo diante de uma lesão, queimadura ou um agente agressor. Quando corpos estranhos adentram na ferida, levam a respostas inflamatórias podendo acarretar na formação de abscessos e atrasando o processo de cura (BOATENG et al., 2008).

Mesmo a nível sistêmico o processo cicatricial de lesões é o mesmo independente do agente que o acarrete, sendo composto por três fases: a fase inflamatória, proliferativa e de remodelagem. A fase inflamatória é onde o plasma e outros elementos celulares são extravasados, ocupando o local da injúria. A fase proliferativa é onde ocorre a produção do tecido granuloso, que leva ao fechamento da lesão, esta fase é a responsável pelos eventos de reepitelização, fibroplasia e angiogênese. Na fase de remodelagem, o tecido normal tenta retornar ao local da lesão (MENDONÇA et al., 2009; LADEIRA et al., 2011; MARTIN et al., 2005).

Os tratamentos existentes para interagir com o tecido lesado, auxiliando na cicatrização de lesões apresentam um alto custo, o que impossibilita o uso destes por boa parte da população. Por isso os estudos em busca de novos medicamentos que acelerem o processo cicatricial tem aumentado.

No passado, os curativos disponíveis apresentavam como função primária a evaporação de exudatos e preveniam que bactérias adentrassem nas lesões. Os curativos atuais procuram criar um ambiente com circulação de oxigênio e úmido ao redor da ferida, para auxiliar na motilidade e regeneração das células do tecido, reduzindo a quantidade de bactérias e promovendo o fechamento da ferida (BOATENG et al., 2008).

Algumas propriedades são fundamentais na escolha dos curativos como as dimensões do curativo e a macroestrutura, a aderência a ferida, a porosidade, sua taxa de biodegradação e a ausência de antígenos (RATNER et al., 2004).

Dentre os polímeros naturais mais estudados para a regeneração da pele está a quitosana, em decorrência de suas inúmeras e vantajosas propriedades, onde a mesma tem se revelado como um excelente material no tratamento de feridas, podendo ser usada na formação de géis, membrana ou em sistema de liberação transdérmica (SILVA et al., 2008).

2.2 Novas Formas Farmacêuticas

A cada dia tem aumentado o interesse e as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas tecnologias com a finalidade de otimizar a liberação de fármacos em uma determinada taxa e sítio específico. Nesta perspectiva, as pesquisas tem sido intensas afim de novos métodos para a liberação de fármacos em escalas nano e micrométrica. Além de envolver o sistema de liberação na produção destas formulações, uma forma correta de administração também está envolvida na mesma, afim de evitar erros de administração que ainda hoje é bastante comum (SILVA et al., 2010).

O controle de liberação do fármaco, bem como seu direcionamento são fatores indispensáveis para um sistema de liberação de fármaco, a fim de reduzir efeitos colaterais e garantir seu efeito farmacológico durante o tempo determinado. O desenvolvimento de novas tecnologias como filmes, microemulsões, lipossomas e sistemas transdérmicos, deu-se a partir de avanços nesta área de pesquisa. O sistema de liberação transdérmico tem como finalidade regular a quantidade de fármaco que permeia a pele e a que atinge a corrente sanguínea (THASSU et al., 2007; ANSEL et al., 2007).

2.3 Filmes Poliméricos de Quitosana (FPQ)

Filmes de QTS tem sido avaliados há algum tempo, onde características como suas dimensões e a presença ou não de poros se tornam fatores indispensáveis na determinação de sua aplicação. Os micro e macroporos exercem uma relação “tamanho-exclusão”, onde esta fundamental para a determinação de seu uso (ASSIS et al., 2002; SPENCER, WANG, 1998). Estes filmes apresentam nanoporos em sua estrutura, que permite sua aplicação em diversos processos, dentre eles o de liberação de fármacos por meio do controle de troca gasosa (ALVES, MACH, 2002).

Ainda nos dias atuais é difícil estabelecer um processamento padrão para a obtenção dos filmes de QTS, devido à ausência de um procedimento comum de desacetilação industrial, bem como as inúmeras procedências de QTS disponíveis atualmente, o que fornece produtos industrializados distintos entre si, pois os mesmos apresentam densidade molar e graus de pureza diferentes (ALVES, MACH, 2002).

2.4 Estatinas

Estatinas são fármacos bastante conhecidos por exercerem sua atividade hipolipêmica, através da inibição da hidróxi-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). As primeiras estatinas foram desenvolvidas em 1971, com a obtenção da lovastatina e mevastatina (MACH; VEILLARD, 2002). Outros 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).

Apesar de compor a mesma classe farmacológica, as estatinas diferem entre si quanto à sua solubilidade. Por exemplo, a sinvastatina difunde passivamente a membrana plasmática, em decorrência de sua propriedade lipofílica, já a pravastatina por ser hidrofílica não consegue permear a membrana facilmente (MACH; VEILLARD, 2002). Quando utilizadas por via tópica ou sistêmica, as estatinas se mostraram eficientes no tratamento de diversas doenças dermatológicas, dentre elas a psoríase, vitiligo e eritema multiforme (NAMAZI, 2004).

Quando ingeridas, as estatinas promovem duas respostas no organismo, sendo uma a redução de forma direta no colesterol plasmático através da inibição da enzima hidróxi-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), como também acarreta um aumento no número de receptores hepáticos para LDL, que por sua vez levam a uma drástica redução nos níveis de colesterol, visto que através dos receptores o fígado é responsável pela remoção de LDL plasmático, e em decorrência do aumento destes receptores, se justifica esta discrepante redução nos níveis de colesterol (MACH; VEILLARD, 2002).

Também apresentam efeitos pleiotrópicos, como a atividade anti-inflamatória que tem sido uma das mais relatadas nos últimos anos, porém ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo de ação que lhe confere esta atividade. Sabe-se que a inibição da HMG-CoA

redutase impede a formação dos isoprenóides que estimulam a inflamação via segundos mensageiros intracelulares (NAMAZI, 2004).

Foi relatado em diversos estudos a inibição da migração leucocitária ocasionada por estatinas. Estas se ligam diretamente ao antígeno acoplado ao linfócito-1 (LFA-1), levando a um impedimento na adesão da célula T, bem como sua ativação (EGESI et al., 2010; KWAK et al., 2000).

A Proteína C-Reativa (PCR) que é produzida no fígado através da estimulação das citocinas (interleucinas 1 e 6 - IL-1 e IL-6) é um dos diversos reagentes produzidos que apresentam alterações com o uso das estatinas em ratos transgênicos não escleróticos, pois os níveis basais de IL-1 diminuem quando é feito uso de estatinas, independente de redução no nível de colesterol. (DAMASCENO et al., 2007).

2.5 Sinvastatina (SINV)

Dentre os diversos fármacos pertencentes à classe das estatinas, destaca-se a SINV, por ser uma das estatinas mais usadas pela população, sendo esta a droga de escolha para a realização deste estudo. Como os demais fármacos pertencentes a esta classe, ela é bastante usada para reduzir o nível de colesterol no plasma, através da inibição competitiva da hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Porém, diversos estudos relataram seus efeitos pleiotrópicos, dentre eles sua atividade anti-inflamatória, acarretando uma redução nos mediadores inflamatórios como interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa, fator de necrose tumoral- α e a interação leucócito-endotélio (TNF- α) (NEZIC et al 2009).

A SINV é a segunda estatina mais potente, é muito prescrita em nosso país, é caracterizada como um pó branco, cristalino, não higroscópico, apresenta 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_{máx}, em acetonitrila) em comprimento de onda (λ) 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).

Possui pouca solubilidade em meio aquoso e, em virtude desta característica, sua absorção é limitada a velocidade de dissolução. Apresenta extenso metabolismo de primeira passagem (quando administrada por via oral) e sua dissolução no trato gastro-intestinal é

muito lenta, além de ser bastante excretada nas fezes, cerca de 95% de sua dose oral (TIWARI, PATHAK, 2011), ainda apresenta tempo de meia vida curto (2 horas por via oral), o que torna este fármaco bastante promissor para uso tópico.

Foi demonstrado em estudo que a aplicação tópica de microemulsão à base de sinvastatina, quando utilizada em lesões de tecido infectados, minimizou a reação inflamatória, acelerando o processo de cicatrização (DAMASCENO et al., 2007).

Este resultado pôde ser explicado através das fortes evidências apresentadas em diversos estudos como no estudo de PRUEFFER et al., 2002 que mostrou um efeito protetor da sinvastatina através de uma interação maior entre o endotélio e os leucócitos quando administrado a microemulsão contendo exotoxina de *Staphylococcus Aureus*, que acarretou em uma inflamação aguda. (PRUEFFER et al., 2002). Sua ação anti-inflamatória através de uso tópico também foi mostrada em um estudo realizado em uma inflamação aguda de pele induzida por óleo de cróton, onde ocorreu inibição do edema (CABRINI, et al., 2006).

As estatinas se ligam diretamente ao antígeno associado ao linfócito-1 (LFA-1) e previne a ligação na molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), impedindo a adesão e ativação da célula T (EGESI et al., 2010; KWAK et al., 2000). Outra forma de inibir a migração é através da redução na atividade da enzima de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), enzima secretada para ativar as células mononucleares que facilitam a transmigração leucocitária pela barreira hematoencefálica (EGESI et al., 2010; TURNER et al., 2005).

Foi demonstrado em estudo por Leung et al. (2003) que o tratamento de camundongos com sinvastatina foi capaz de reverter a artrite inflamatória nos animais e kanda et al. (2007) fizeram um estudo com um grupo de pacientes diagnosticados com artrite reumatóide, os quais foram tratados durante 12 semanas com sinvastatina e apresentaram melhora nos sintomas clínicos, com redução de proteína C reativa (PCR), sedimentação eritrocitária, e as razões Th1/Th2 e CD4/CD8. Esses resultados sugerem que outras condições inflamatórias com aumento na razão Th1/Th2 podem ser tratadas com baixas doses de estatinas (KANDA et al., 2003; LEUNG et al. 2003).

As estatinas inibem também a captação, processamento e apresentação dos antígenos em linfócitos B e células dendríticas. Isso porque as proteínas G requerem mevalonato para fazer a prenilação na membrana plasmática, e com a inibição do mevalonato pelas estatinas, esse processo não ocorre (EGESI et al., 2010; GHITTONI et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* a atividade anti-inflamatória/cicatrizante de FPQ contendo sinvastatina de uso tópico em inflamações cutâneas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vivo* a atividade anti-inflamatória/cicatrizante dos FPQ através da mensuração residual da lesão após o tratamento nos camundongos.
- Avaliação da ação anti-inflamatória/cicatrizante dos FPQ por meio de contagem leucocitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Quitosana (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA), contendo sinvastatina (Viafarma®, Santa Catarina, Brasil), álcool etílico absoluto, ácido acético e hidróxido de sódio com grau analítico, anestésicos: xilazina (Dopaser - e Hertape S.A, Minas Gerais, Brasil) e ketamina (Dopalen®, São Paulo, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Animais

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) do sexo masculino, 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°C, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a ração Purina® 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 animais (Lei número 11.794, de outubro de 2008), em anexo 1.

4.2.2 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*.

4.2.3 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 através de deslocamento cervical, em cada um destes tempos.

Os FPQ foram cortados utilizando-se o mesmo punch de 1 cm de diâmetro usado para fazer as lesões, resultando em uma dose de 3,63 mg de sinvastatina por filme de 20 mg e 1,82 mg para filme de 10 mg. Os FPQ foram aplicados sobre a ferida imediatamente após a realização destas e nas trocas dos FPQ que ocorreram de 2 em 2 dias (pois a liberação do fármaco foi avaliado durante 48 horas) 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.

4.2.4 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória/Cicatrizante

4.2.4.1 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.

4.2.4.2 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;

4.2.4.3 Área Residual da Ferida Cutânea (ARFC)

Após a obtenção das áreas, o valor residual de cada ferida foi obtido usando-se a seguinte Equação:

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

4.2.4.4 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;

4.2.4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos estão expressos como a média \pm EPM (Erro Padrão Médio) 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 $p \leq 0,05$.

Tabela 1 – Divisão dos grupos de animais

GRUPO DE ANIMAIS (N=9)	TRATAMENTO
Grupo (1) controle negativo	Salina
Grupo teste 1	FB
Grupo teste 2	F10
Grupo teste 3	F20

Legenda: FB – Filme Branco

F10 – Filme com 10 mg de sinvastatina

F20 – Filme com 20 mg de sinvastatina

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 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 (grupo F20).

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 da ferida x 100).
* $p < 0,05$, grupo F20 diferente dos grupos SALINA e FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman – Keuls).

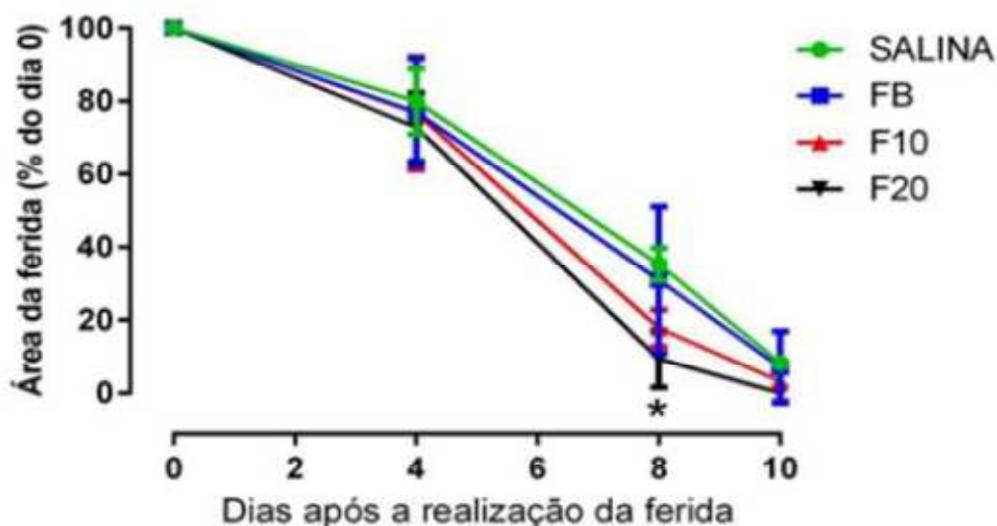
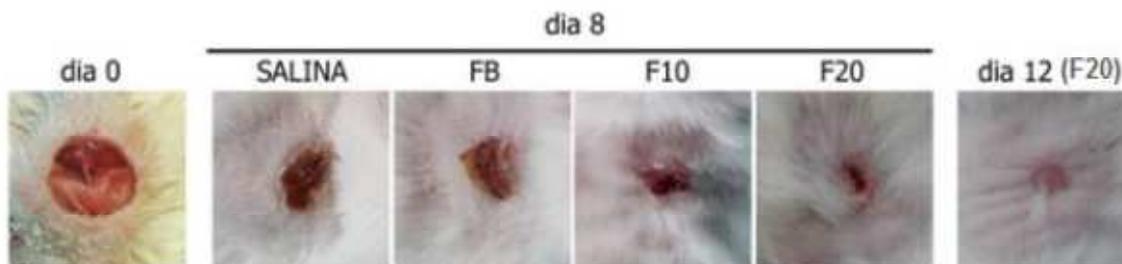


Figura 2 – Imagens representativas das lesões no dia 0, no 8º dia (grupos SALINA, FB, F10, F20), e no 12º dia (F20) após a lesão.



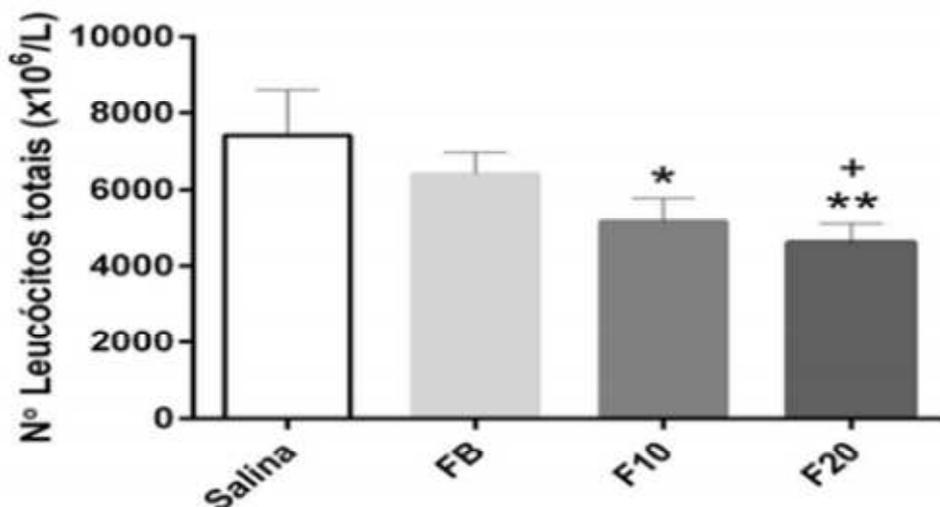
5.2 Contagem Leucocitária

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).

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

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).**

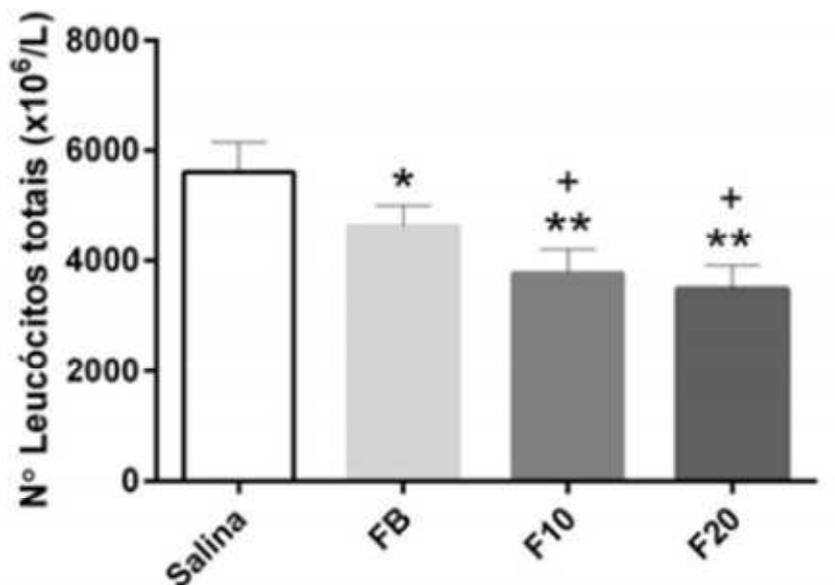


Oito dias após a lesão cutânea, a contagem de leucócitos totais dos grupos F10 e F20 foi significativamente menor que aquela do grupo SALINA ($p < 0,01$) e do grupo FB ($p < 0,05$). Da mesma forma, o grupo FB apresentou contagem leucocitária significativamente inferior que a do grupo SALINA ($p < 0,05$)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

Os resultados aqui apresentados mostram significativo efeito anti-inflamatório/cicatrizante do filme de quitosana de 20mg (3,63mg/cm²) 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.

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).**

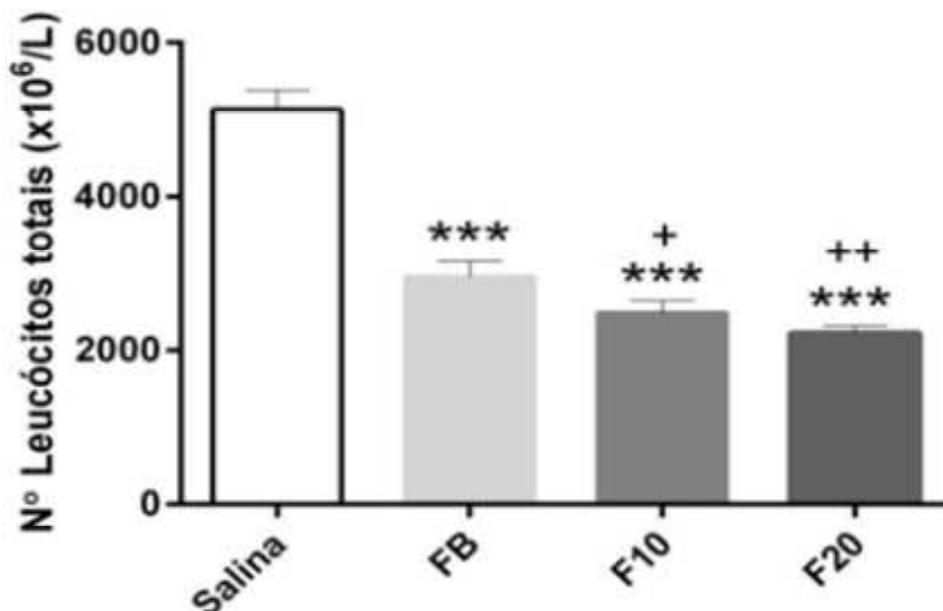


Doze dias após a lesão cutânea, os grupos F10, F20 e FB apresentaram significativa redução no número de leucócitos totais comparado com o grupo SALINA ($p < 0,001$). Da mesma forma, as contagens leucocitárias dos grupos F10 e F20 apresentaram significativa redução ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente)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

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.

Figura 5 – Número de leucócitos totais 12 dias após a lesão.

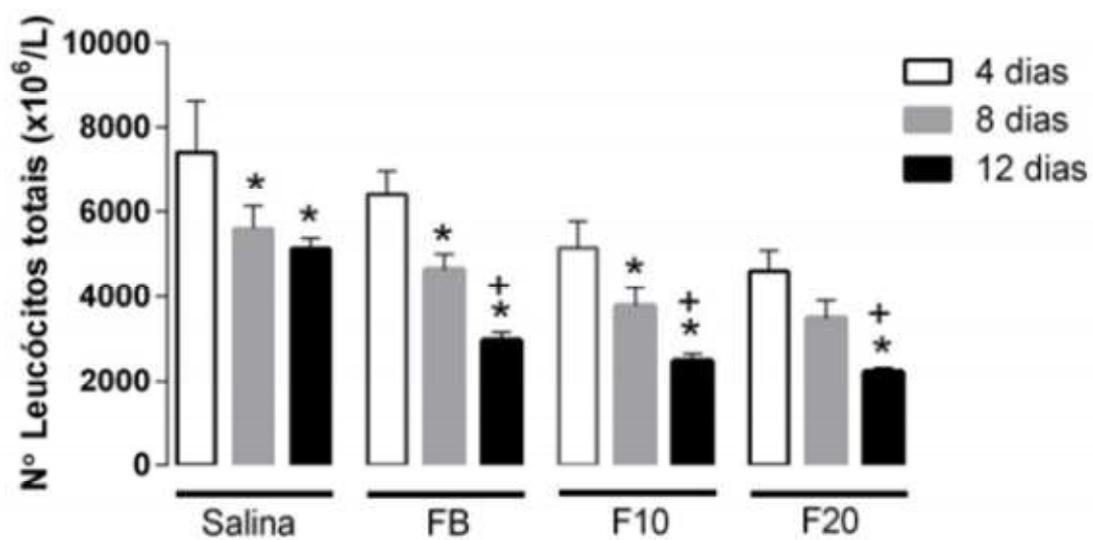
*** $p < 0,001$ diferente do grupo SALINA; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ diferente do grupo FB (Anova de uma via seguida pelo teste de Neuman – Keuls).



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).



6 CONCLUSÃO

Desta forma, os resultados aqui apresentados mostraram-se satisfatórios, visto que os mesmos apontam uma importante atividade anti-inflamatória nos filmes de quitosana com sinvastatina por meio de contagem leucocitária, bem como a redução no tamanho das feridas. 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.

ALLEN JR., L.V.; ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., et al. **Formas farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8º Edição: Editora Artmed., p.775, 2007.

ASSIS, O. B. G.; VIEIRA, D. C.; VASQUES, R. A.; CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Formed-in-place chitosan-carboxymethylcellulose supported microfiltration membranes for water purification. In: International Symposium on Natural Polymers and Composites, 2001, S. Pedro, SP. Anais, 2002.

ASSIS, O. B. G., ALVES, H. C. Metodologia mínima para produção de filmes comestíveis de quitosanas e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. Comunicado Técnico – Embrapa instrumentação Agropecuária., p. 5, 2002.

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, ECCLESTON, G.M. “Wound healing dressings and drug delivery systems: A review”, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

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

CÁRDENAS, G., ANAYA, P., J. SEPULVEDA, J. OJEDA, PLESSING C. V., KLASSEN R., ROJAS, C. Polymeric films based on chitosan composites; As skin substitutes: Animal and human Applications. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍ- MEROS, 2005, São Paulo, **Anais**, p.1387-1388, 2005.

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.

DALAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Tese de D.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

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

DAMASCENO, B.P.G.L., SILVA, J.A., APOLINÁRIO, A.C., SOUZA, M.S.R., MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

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

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. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 100, n. 1, p. 125-129, 2011.

GHITTONI, R., NAPOLITANI, G., BENATI, D., ULIVIERI, C., PATRUSSI, L., FRANCO, L. P., LANZAVECCHIA, A., BALDARI, C. T. Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. **European Journal of Immunology**. v. 36, n. 11, p. 2885-93, 2006.

GRINGAS, M. et al. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. **Biomaterials**, v. 24, n. 9, p. 1653-1661, 2003.

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.

KANDA H, YOKOTA K, KOHNO C, SAWADA T, SATO K, YAMAGUCHI M, KOMAGATA Y, SHIMADA K, YAMAMOTO K, MIMURA T. Effects of low dosages on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. **Modern Rheumatology**. v. 17, n. 5, p. 364-368, 2007.

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.

KWAK, B., MULHAUPT, F., MYIT, S., MACH, F. Statins as a newly recognized type of imunomodulator. **Nature Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1399-1402, 2000.

LADEIRA, P. S. R., ISAAC, C., PAGGIARO, A. O., HOSAKA, E. M., FERREIRA, M. C. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares. **Revista Médica**, São Paulo, v. 90, n. 3, p. 122-127, 2011.

LEUNG, B. P., NAVEED, S., CRILLY, A., PRACH, M., MCCAREY, D. W., PAYNE, H., MADHOK, R., CAMPBELL, C., GRACIE, J. A., LIEW, F. Y., MCINNES, I. B. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1524-1530, 2003.

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.

MARTIN, P., LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**. v. 15, p. 599-607, 2005.

MENDONÇA, R. J., COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiro de 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.

NAMAZI, M. R. Statins: novel additions to the dermatologic arsenal. **Experimental Dermatology Journal**. v. 13, n. 6, p. 337-339, 2004.

NEZIC, L., SKRBIC, R., DOBRIC, S., STOJILJKOVIC, M. P., SATARA, S. S., MILOVANOVIC, Z. A., et al. Effect of simvastatin on proinflammatory cytokines production during lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **General Physiology and Biophysics**. v. 28, p. 119-126, 2009.

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.

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.

OLIVEIRA, M.; SANTOS, S.M; OLIVEIRA, M.J; TORRES, A.L; BARBOSA, M.A. Cytosin 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.

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.

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.

SILVA, S. S., LUNA, S. M., GOMES, M. E., BENESCH, J., PASHKULEVA, I., MANO, J. F., REIS, R. L. "Plasma surface modification of chitosan membranes:

characterization and preliminary cell response studies". **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p. 568-576, 2008.

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.

SITUM, K., BOKULIC, A., C-TKAL, I., CEVI, C., V; PARNHAM, M. J., CUZI, C. S., KORALJKA D., GLOJNARIC, I., BRAJSA, K. Comparison of systemic inflammatory and hematology parameters in normal C57Bl/6 and genetically diabetic db/db mice during local wound repair. **Biochemia Médica**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

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

THASSU, D., DELEERS, M., PATHAK, Y. **Nanoparticulate drug delivery systems**: Informa Healthcare, v. 166, 2007.

TIWARI, K., PATHAK, et al., Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1-2, p. 232–243, 2011.

TURNER, N.A.; O'REGAN, D.J.; BALL, S.G.; PORTER, K.E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels. **The FASEB Journal**. v. 19, n. 7, p. 804-806, 2005.

VEILLARD, N. R.; MACH, F. Statins: the new aspirin? **Cell Mol. Life Sciences**, v. 59, p. 1771- 1786, 2002.

WANG, X.; SPENCER, H. G. Formation and characterization of chitosan formed in-place ultrafiltration membranes. **Journal of Applied Polymers Science**, v. 67, n. 3, p. 513-519, 1998.

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

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.

8. ANEXO 1

**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
Thárcia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED

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

