



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1004841-3 B1



(22) Data do Depósito: 19/10/2010

(45) Data de Concessão: 03/09/2019

(54) Título: MEMBRANA DE QUITOSANA E ALGINATO INCORPORANDO FÁRMACOS

(51) Int.Cl.: A61K 9/00; A61K 47/36; A61K 31/28; A61P 31/04.

(73) Titular(es): LM FARMA INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP.

(72) Inventor(es): ÂNGELA MARIA MORAES; ANA KELLY GIRATA; ANA PAULA RODRIGUES; CECILIA ZORZI BUENO; NESSER CRISTIANO DE PAULA OLIVEIRA.

(57) Resumo: Membrana de quitosana e alginato incorporando fármacos. A presente invenção descreve uma membrana composta de quitosana, alginato e excipientes adequados, contendo ou não um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada. Os polissacarídeos empregados são biocompatíveis, atóxicos e facilitam a cicatrização de feridas, já o composto contendo prata em sua estrutura atua sobre infecções bacterianas. Diante disso as membranas de quitosana-alginato descritas apresentam potencial para serem utilizadas na terapia de lesões de pele.

"MEMBRANA DE QUITOSANA E ALGINATO INCORPORANDO FÁRMACOS"

Campo da Invenção

A presente invenção descreve uma membrana constituída de polissacarídeos e excipientes aceitáveis contendo ou não um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada. A membrana corresponde a um dispositivo de filme maleável, na forma de um gel reticulado estruturado podendo apresentar liberação controlada de agente antimicrobiano. Mais especificamente a dita membrana inclui quitosana, alginato, agentes reticulantes e um agente antimicrobiano como o fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata.

A aplicação da dita membrana com atividade antimicrobiana é focada na área de terapia de lesões de pele. A composição da dita membrana confere propriedades anti-trombogênicas e hemostáticas, estimula a cicatrização e a reorganização da histoarquitetura celular, promove redução da dor pelo bloqueio dos terminais nervosos e acelera o processo de cicatrização dos sítios doadores de pele para enxerto. Além disso, a membrana proposta tem função de barreira, pois previne a infecção pelo impedimento da entrada de microrganismos na região da lesão em contato com o meio externo. Devido à sua adequada capacidade de absorção de fluidos e também à sua atividade microbida, possui aplicação em feridas exsudativas, em lesões infectadas por microrganismos sensíveis à prata, em lesões crônicas e como cobertura em cirurgias estéticas.

Fundamentos da Invenção

Diversos tipos de curativos comerciais contendo prata já foram desenvolvidos para aplicação em queimaduras e feridas infectadas, entretanto, existem limitações quanto à forma de atuação de muitos deles. Neste sentido, 5 destacam-se a falta de controle na cinética de liberação da prata do curativo, a possibilidade de ocorrência de eventuais reações inflamatórias originadas dos compostos à base de prata ou da matriz que os incorpora e que possam prejudicar a cicatrização da ferida e o nível de penetração do agente antimicrobiano na ferida. Diversas fontes debatem tais limitações, como o 10 pedido de patente US20050037058-A1 depositado em 14/08/2003 que discute a aplicabilidade de curativos como o Aquacel[®]-Ag (Convatec, Skillman) e fibras com carvão ativado com prata. Mishra e colaboradores (Mishra, A.; Whitaker, I. S.; Potokar, T. S.; Dickson, W. A.; The use of Aquacel-Ag[®] in the treatment of partial thickness burns: a national study. *Burns*, v.33, p.679-680, 2007) 15 descrevem que esses curativos devem ser hidratados quando aplicados na lesão e assim o íon prata pode ser deslocado da matriz (resultando em uma lenta liberação do agente antimicrobiano) e Atiyeh e colaboradores (Atiyeh, B. S.; Costagliola, M.; Hayek, S. N.; Dibo, S.A; Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature; *Burns* 33; p. 139-148, 20 2007) relatam que alguns curativos revestidos com prata disponíveis comercialmente resultam em baixa concentração do íon no leito da lesão.

No pedido de patente US20070275043-A1 depositado em 30/04/2007 é mencionado que outros produtos desenvolvidos que contêm sais de prata hidrossolúveis se solubilizam muito rapidamente em contato com o exsudato,

liberando grande parte da prata incorporada logo no início do tratamento, o que faz com que trocas frequentes do curativo sejam necessárias. Da mesma forma, têm-se curativos com partículas nanocristalinas de prata que normalmente lançam inicialmente uma grande quantidade de prata no leito da lesão, muitas vezes sob a forma de flocos, que podem levar à irritação da ferida. Ainda neste sentido, de acordo com Biello (Biello, D. Nanoparticles in Food Pose a Health Risk? *Scientific American News*, 2008, disponível em [HTTP://scientificamerican.com/article.cfm?id=do-nanoparticles-in-food-pose-health-risk](http://scientificamerican.com/article.cfm?id=do-nanoparticles-in-food-pose-health-risk)) o governo americano aponta a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre nanopartículas para uso clínico.

Distintos compostos à base de prata e de diversos outros tipos de agentes com atividade antimicrobiana têm sido empregados no desenvolvimento de dispositivos para aplicação em queimaduras e outros tipos de lesões, conforme sucintamente apresentado a seguir.

De acordo com Ferreira e colaboradores (Ferreira, E; Lucas, R.; Rossi, L. A.; Andrade, D.; Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura; *Rev. Esc. Enfer. USP*, 2003) a sulfadiazina de prata a 1% é um dos agentes tópicos mais utilizados no tratamento de queimaduras, tendo a finalidade tanto de desbridar a lesão quanto de combater a infecção local. Seu uso é recomendado em queimaduras de segundo e terceiro grau. A sulfadiazina de prata a 1% é efetiva contra uma ampla microbiota de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* sp e *Pseudomonas aeruginosa*. Sua atividade inclui também bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A solução é facilmente aplicada e removida e não

provoca dor. É absorvida pela pele, onde forma reservatórios de íons prata que são liberados nos tecidos. Segundo Lansdown (Lansdown, A.; Silver 2: toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *Journal of wound care*. p.173-177, 2002) e Ferreira e colaboradores, citado anteriormente, como consequência disso, tal composto pode causar diminuição de glóbulos brancos do sangue (leucopenia), descoloração da pele devido à deposição da prata (argiria), peroxidação lipídica no fígado e rins, perda de identificação celular, redução da capacidade de proliferação e alterações degenerativas nas organelas citoplasmáticas e do núcleo.

10 Ferreira e colaboradores, citado acima, recomendam a utilização de sulfadiazina de prata a 1% nos primeiros dias de tratamento de queimaduras, enquanto há presença de tecido desvitalizado. Esse agente tópico deve ser aplicado duas vezes ao dia em razão da redução da prata. No entanto, há dificuldades para se atender a essa recomendação quando este composto é
15 utilizado em curativos oclusivos, em função do trauma físico e emocional que cada aplicação provoca no paciente e do alto custo dos recursos utilizados.

Yu e colaboradores (Yu, S.; Mi, F.; Wu, Y.; Peng, C.; Shyu, S.; Huang, R.; Antibacterial Activity of Chitosan–Alginate Sponges Incorporating Silver Sulfadiazine: Effect of Ladder-Loop Transition of Interpolyelectrolyte Complex
20 and Ionic Crosslinking on the Antibiotic Release, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 98, 538–549, 2005) desenvolveram esponjas de quitosana e alginato contendo sulfadiazina de prata. As esponjas contêm macroporos em sua matriz que incorporam a droga, tornando o material desenvolvido, desvantajosamente, permeável a microrganismos. Dessa forma o mesmo não

protege eficientemente a lesão de uma nova contaminação caso o efeito do fármaco cesse ao longo do tratamento, além do fármaco, sulfadiazina de prata, causar reações citotóxicas.

Outro tipo de curativo, constituído de alginato e carboximetilcelulose, está descrito no pedido de patente WO02/36866A1 depositado em 03/11/2000. As fibras são formadas por extrusão ou fiação do material polissacarídico obtido a partir da solução do mesmo, apresentando a capacidade de absorver água. Desvantajosamente, a invenção descrita anteriormente não é constituída de fibras coesas, o que implica em baixa resistência mecânica e em difícil manipulação.

Campos (Campos, M. G. N; Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Quitosana para Recobrimento de Feridas e Liberação Controlada de Fármacos; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2007) produziu membranas de quitosana incorporando agentes ativos, mas desvantajosamente estas apresentam baixa capacidade de absorção de fluidos. Adicionalmente, a droga contida na membrana era gentamicina ou sulfadiazina de prata. A gentamicina é um antibiótico solúvel em água, fato que pode causar uma alta perda de massa do agente ativo logo após a colocação do curativo na lesão, que não poderia então atuar como dispositivo de liberação controlada do fármaco. Em adição, em função do uso da sulfadiazina de prata, o curativo deve ser trocado duas vezes ao dia, devido à desativação do composto por redução da prata, o que pode gerar significativo trauma físico no paciente.

No pedido de patente US20070275043-A1 citado anteriormente são descritos métodos de produção de hidrocolóides compostos por pectina, carboximetilcelulose, óleo mineral, poli-isobutileno, celulose purificada, copolímero de estireno-butadieno e carbonato de prata, assim como de fibras de alginato e carboximetilcelulose incorporando carbonato de prata, de espumas de poliuretano com carbonato de prata e de géis à base de carbonato de prata. Embora os autores afirmem que o carbonato de prata é um sal inorgânico insolúvel em água, consta na literatura que esse sal apresenta maior solubilidade em água do que o sal utilizado na invenção aqui descrita. Isso pode acarretar em altas perdas de liberação do sal de prata já no início do tratamento. Outra desvantagem é que o material produzido consiste fundamentalmente de fibras não coesas que têm baixa resistência mecânica e são de difícil manipulação. Alternativamente, são obtidos géis e espumas, mas não filmes maleáveis. Apesar da grande gama de aplicações do carbonato de prata, não foram localizados relatos de seu uso em feridas.

No pedido de patente WO2009/141633-A2 depositado em 22/05/2009 é relatada a obtenção de fibras de alginato e polietileno glicol contendo um agente antimicrobiano constituído por nanopartículas cristalinas de prata incorporadas ao alginato durante a formação das fibras pela técnica de *eletrospinning*. A patente citada faz uso do solvente dimetilsulfóxido (DMSO), incompatível com uma grande variedade de materiais, e gera um biomaterial não consistente, composto por fibras que dificultariam a aplicação e troca do curativo em lesões de pele. Além disso, tal método envolve desvantajosamente o uso de uma tecnologia relativamente complexa (*eletrospinning*). A presente

invenção vantajosamente compreende uma membrana com incorporação do agente antimicrobiano durante o processo de preparação de sua matriz.

Rodrigues (Rodrigues, A. P; Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, julho de 2008) incorporou o antibiótico bacitracina por impregnação em membranas lamelares de quitosana e alginato. No entanto, a bacitracina atua fundamentalmente em bactérias gram-positivas de comum ocorrência no período imediato após a ocorrência da queimadura, de forma que o curativo provavelmente apresentaria limitada eficácia contra microrganismos gram-negativos. Além disso, existe o problema das cepas se tornarem resistentes ao fármaco, ao contrário de agentes antimicrobianos contendo prata, para os quais são raros os casos de resistência bacteriana, visto que existem múltiplos sítios de ligação dos íons prata com as bactérias. Como alternativa para solucionar o problema detectado no trabalho de Rodrigues, citado acima, a presente invenção contempla um aperfeiçoamento da dita membrana constituída de polissacarídeos compreendendo vantajosamente um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada e excipientes, que possuem efeito sinérgico, potencializando a ação do ativo com os constituintes da membrana.

O documento WO2010/031995A2 depositado em 17/09/2008 trata de um dispositivo para o tratamento de feridas composto de dois ou mais materiais que, isolados, não gelificam, mas que formam um gel quando colocados em contato um com o outro e expostos a um fluido. Apesar da patente englobar

quitosana e alginato, como a presente invenção, o diferencial está na formação de uma membrana destes compostos e não de um gel que se forma apenas quando os dois compostos entram em contato com um fluido, sendo ele água, sangue ou exsudato da ferida. O material descrito é constituído por fibras aglomeradas e compactadas de difícil manipulação, apresentando baixa resistência mecânica e alta adesão no leito da lesão, dificultando sua troca. Já a membrana da presente invenção forma uma película coesa, muito fina, não adesiva e com uma finalidade de funcionar como segunda pele.

Meng e colaboradores (Meng, X.; Tian, F.; Yang, J.; He, C.; Xing, N.; Li, L.; Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J. Mater Sci: Mater Med.*, on line, 2010), também focando esforços no uso de membranas de alginato e quitosana, realizaram estudos de incorporação de sulfadiazina de prata, obtendo membranas com características consideradas bastante adequadas. Destaca-se que as membranas produzidas por Meng, citado anteriormente, não são reticuladas com cloreto de cálcio, o que reduz significativamente sua estabilidade química. Além disso, como já mencionado, a sulfadiazina de prata pode resultar em acentuadas reações citotóxicas, reduzindo o apelo comercial e clínico do material. Lansdown (Lansdown, A.; Silver 2: toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *Journal of wound care*. p.173-177, 2002) descreve que curativos que contenham fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata, um composto de prata inorgânico e insolúvel em água, não apresentam efeitos colaterais como os que apresentam sulfadiazina de prata em sua composição. Diante disso, como a membrana aqui proposta apresenta

esse composto em sua estrutura, tem atividade antimicrobiana sem a limitação da ocorrência de efeitos colaterais intensos como ocorre com a sulfadiazina de prata.

Nesta categoria de curativos contendo fosfato hidrogenado de zircônio, 5 sódio e prata podem ser citados os curativos MaxSorb[®] Extra Ag (Medline), Select Silver[®] (Milliken), a espuma de poliuretano Comfeel[®] (Coloplast) e as fibras de alginato com prata Invacare[®] (Invacare). Estes materiais, no entanto, são formulados na forma de fibras, muitas vezes requerendo o uso de curativos secundários (como é o caso das fibras compactadas dos absorventes 10 MaxSorb[®] Extra Ag e Invacare[®]) para possibilitar sua fixação na região lesada. Embora o uso de curativos secundários para a fixação da membrana aqui proposta possa não ser totalmente dispensável, sua aplicação seria bastante fácil visto que a mesma é fina e capaz de se moldar aos contornos do corpo.

Em queimaduras de segundo e terceiro graus, existe frequentemente a 15 necessidade de realização de desbridamento cirúrgico, o que, de acordo com Williams (Williams, W.; Pathophysiology of the burn wound. *Total Burn Care*. p. 514-521, 2002), deve ser realizado logo após o atendimento do paciente. Após o procedimento cirúrgico, é necessário o recobrimento da área danificada, visando manter a umidade da lesão e a temperatura corpórea do paciente 20 controladas, além de diminuir a ocorrência de contaminação do local afetado, o que pode ser realizado com sucesso pelo uso da membrana aqui proposta. A membrana de quitosana e alginato contendo prata é fina, permitindo permeabilidade adequada à troca gasosa e saída de exsudato, e ainda possui

atividade de barreira física e antimicrobiana, protegendo as lesões de contaminação microbiana.

Uma alternativa para substituição da pele quando um tecido autólogo não está disponível é a pele obtida de cadáveres. Porém, o transplante de pele de outro doador é tão ou mais complexo do que transplantes de órgãos internos. Como a pele representa a interface do organismo com o ambiente externo, células especializadas do sistema imunológico podem promover a rejeição de tecidos heterólogos. Assim, a pele alógena constitui-se em um substrato de recobrimento temporário, sendo frequentemente rejeitada após uma a duas semanas. Além disso, esse método traz riscos de infecção por vírus como os da hepatite e da AIDS para o indivíduo receptor. Diante desse problema, sugere-se o uso da membrana aqui proposta, constituída dos polímeros biocompatíveis, quitosana e alginato, que não são de origem humana, reduzindo significativamente o problema de infecções virais.

Outra alternativa de cobertura de tecidos lesados por queimaduras após o desbridamento cirúrgico é a substituição do tecido lesado por pele transplantada, preferencialmente do próprio paciente. Porém, esse método pode não ser o mais adequado em função da eventual falta de um ponto de coleta de pele ou de complicações clínicas de níveis variados, como a morbidade que a retirada desse tecido pode causar, o que poderia ser contornado, por exemplo, pelo uso de curativos apropriados também para a cobertura das áreas de doação de pele saudável do paciente. Neste sentido, como a membrana da presente invenção constitui-se de uma película coesa,

fina, não adesiva, também tem a finalidade de atuar como uma segunda pele no tratamento de lesões dérmicas.

A presente invenção se mostra uma alternativa vantajosa, uma vez que a membrana desenvolvida é biocompatível, bioabsorvível e quando umedecida é anatômica, adaptando-se aos contornos do corpo. A dita membrana possui adequada capacidade de absorção de exsudatos e apresenta baixa perda de massa quando em contato com fluidos similares aos corpóreos, fato que indica que não precisa ser trocada com frequência, diminuindo o trauma ocasionado pela troca da membrana. Além disso, é capaz de formar uma película coesa, muito fina, permitindo permeabilidade adequada à troca gasosa e saída de exsudato, com adequada resistência mecânica e com a finalidade de funcionar como segunda pele. É estruturada, estável e não adesiva facilitando sua fixação na ferida e garantindo praticidade na aplicação e, caso necessário, na remoção da membrana. A membrana de quitosana e alginato contendo um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada possibilita sua aplicação em lesões infectadas e, vantajosamente, para estes agentes contendo prata são raros os casos de resistência bacteriana, visto que existem múltiplos sítios de ligação dos íons prata com as bactérias.

Diante das informações disponíveis no estado da técnica, algumas das propriedades dos dispositivos formados por quitosana e alginato, quando em conjunto, são melhoradas em relação às dos polissacarídeos isolados, observando-se, por exemplo, maior estabilidade a variações de pH e maior eficiência no controle da liberação de princípios ativos neles incorporados. Vantajosamente, a associação de alginato a quitosana pode atuar de maneira

positiva na absorção dos fluidos das lesões e ainda, reduzir o custo final dos dispositivos e, além desta associação, a presente invenção confere melhor eficiência da membrana com uma composição preferencial contendo, entre os bioativos, compostos a base de prata, objeto da presente invenção.

5 Breve Descrição da Invenção

A presente invenção descreve uma membrana em forma de estruturas lamelares, compreendendo polissacarídeos naturais, como quitosana e alginato, incorporando um ou mais excipientes aceitáveis, contendo ou não um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada.

10 O complexo de polissacarídeos é constituído, preferencialmente, de quitosana e alginato, sendo possível a substituição do alginato por xantana, pectina ou carragena. A quitosana é empregada em solução de ácido acético glacial de 0,5 a 2% (m/v), preferencialmente 1% (m/v) e o alginato em solução aquosa de 0,25 a 1%(m/v), preferencialmente 0,5%. A dita membrana é
15 formada por uma mistura na proporção de 1:1 de solução de alginato e solução de quitosana misturada na proporção de 50% de acetona.

Os excipientes empregados são selecionados do grupo dos agentes reticulantes tais como os íons bivalentes cálcio e sulfato, ou outros agentes multifuncionais, como glutaraldeído, aglicona genipina, preferencialmente íons
20 cálcio, ou a mistura dos mesmos.

A membrana também pode apresentar em sua composição um agente antimicrobiano selecionado para a configuração preferencial da presente invenção um composto inorgânico praticamente insolúvel em água que contém prata. É possível realizar a incorporação do agente antimicrobiano em

proporções preferenciais variando de 0,05 a 2% de prata na mistura polissacarídica.

5 A membrana é empregada como barreira física impedindo a entrada de microrganismos na região lesada ou como suportes (*scaffolds*) para o crescimento de células animais, com aplicação em medicina regenerativa e em áreas correlatas. Adicionalmente a membrana contendo o agente antimicrobiano a base de prata pode ser empregado na terapia de lesões de pele provenientes principalmente de queimaduras, por sua atividade antimicrobiana e estímulo à cicatrização;

10 **Breve Descrição das Figuras**

A estrutura e operação da invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma poderão ser melhor entendidas mediante referência aos desenhos em anexo e às seguintes descrições:

15 A Figura 1 mostra cortes transversais da membrana compreendendo membranas de quitosana e alginato e, (a) 0%, (b) 0,05%, (c) 0,1%, (d) 2% (e) 0,6, (f) 1,1%, (g) 2% de agente antimicrobiano à base de prata.

Na Figura 2 são apresentados dados de eluição, em solução de tampão fosfato (PBS), da prata incorporada em membranas obtidas na presença de distintas proporções do agente antimicrobiano.

20 Na Figura 3 é mostrada a morfologia da superfície e cortes transversais de um exemplo de concretização da presente invenção, compreendendo membranas de quitosana e alginato e, o tensoativo biocompatível Pluronic F68®.

Na Figura 4 indica-se a morfologia da superfície e cortes transversais de um exemplo de concretização da presente invenção, compreendendo membranas de quitosana e alginato e, o tensoativo biocompatível Tween 80®.

Descrição Detalhada da Invenção

5 A presente invenção descreve uma membrana de estrutura lamelar porosa ou não, compreendendo polissacarídeos naturais, como quitosana e alginato, e um ou mais agentes reticulantes, podendo ou não conter o agente antimicrobiano à base de prata estabilizada, para aplicação no tratamento de lesões de pele proveniente principalmente de queimaduras.

10 Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina e apresenta propriedades antimicrobianas (como agente bactericida, bacteriostático, fungicida e fungistático) e cicatrizantes. É biocompatível e naturalmente degradada no organismo (o monômero e os oligômeros de
15 glucosamina são substâncias que participam de rotas do metabolismo animal), apresentando a propriedade de formar géis em soluções ácidas fracas, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões fúngicas ou bacterianas. A quitina e a quitosana vêm despertando grande interesse de
20 cientistas e tecnólogos como materiais poliméricos com aplicações na área biomédica. Estes polissacarídeos, além de apresentarem propriedades biológicas adequadas, ainda têm diversas outras características tecnológica e economicamente relevantes. A quitina, por exemplo, consiste em resíduos da

indústria da pesca produzidos a partir do processamento da carapaça dos crustáceos, tendo, portanto, alta disponibilidade e baixo custo.

No campo de aplicações biomédicas, a quitosana é amplamente estudada, e suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento têm levado ao aumento de sua utilização na área de engenharia de tecidos, como no reparo da pele, ossos e cartilagens. Testes clínicos mostram que biomateriais baseados em quitosana não resultam em reações alérgicas no corpo humano após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão (Khor, E.; Lim, L.Y. "Implantable applications of chitin and chitosan"; *Biomaterials*, v. 24, p. 2339–2349, 2003). Além de ser um polímero bioativo, a quitosana é um agente homeostático, que apresenta propriedades anti-trombogênicas. Também possui a capacidade de estimular o sistema imune do organismo contra infecções virais e bacterianas. Finalmente, favorece a regeneração de tecidos moles (como a pele) e duros (como por exemplo, os ossos).

Foi observado que oligossacarídeos resultantes do metabolismo da quitosana têm efeito estimulatório nos macrófagos e, tanto a quitina como a quitosana são quimiotáticos para neutrófilos, estimulando a formação de tecido granuloso e acelerando a reepitelização (Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A; "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films"; *Biomaterials*, v. 22, p. 261-268, 2001). Para a utilização da quitosana na cura de feridas, sua interação com as células presentes na pele é fundamental. A proliferação dos queratinócitos sobre membranas de quitosana está

relacionada com o grau de acetilação das mesmas, sendo que uma menor acetilação favorece o crescimento dos queratinócitos.

Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas, sendo utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia e também na preparação de matrizes poliméricas para a encapsulação de fármacos, macromoléculas e células. Esse material é relativamente inerte, biocompatível, biodegradável e resulta em géis de elevada porosidade com boas propriedades mucoadesivas, sendo relevante sua aplicação na produção de dispositivos biomédicos.

A capacidade de gelificação dos alginatos auxilia na remoção das coberturas preparadas a partir deste composto, uma vez que estas não provocam adesão no leito da lesão, o que diminui a dor e o trauma associados às trocas de curativo. A utilização de curativos contendo alginato em pacientes queimados pode promover redução da dor pelo bloqueio dos terminais nervosos, e acelerar o processo de cicatrização dos sítios doadores de pele para enxerto (Paul, W.; Sharma, C.P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v.18, p.18-23, 2004).

Agente Antimicrobiano

O uso de substâncias químicas tem sido fundamental na prevenção e terapia de infecções. Uma das estratégias que tem ganhado atenção é o uso de metais nobres, sendo a prata a mais utilizada. Atualmente, a prata tem sido aplicada no tratamento de infecções encontradas em queimaduras, feridas abertas e úlceras crônicas, sendo o composto fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata empregado para este fim.

Membrana de quitosana, alginato e prata

O complexo de polissacarídeos contendo um agente antimicrobiano tem apresentação na forma de membranas sem poros que atravessam sua espessura, sendo, portanto, capazes de proteger as lesões de contaminação microbiana. Esta membrana confere uma eficiência diferenciada frente aos disponíveis no mercado, pois reúne em constituição variados compostos bioativos, desde os próprios componentes polissacarídicos, assim como o composto contendo prata e um excipiente biocompatível.

Dentre os agentes antimicrobianos foi selecionado para a configuração preferencial da presente invenção um composto inorgânico praticamente insolúvel ou pouco solúvel em água que contém prata. O dito agente antimicrobiano é selecionado preferencialmente dentre um agente constituído de redes tridimensionais de fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata, com muitas cavidades equidistantes. Tal composto, quando associado à membrana da presente invenção, vantajosamente, implica em menor perda de massa precoce e em uma liberação do composto nas feridas de forma mais controlada do que simplesmente pela forma incorporada em gel, já que os íons prata ficam distribuídos na estrutura lamelar, permitindo maior controle de sua cinética de liberação. A prata é muito eficaz contra uma grande variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, garantindo amplo espectro de uso da membrana. É possível realizar a incorporação do agente antimicrobiano em proporções preferenciais variando de 0,05 a 2% de prata na mistura polissacarídica sem, no entanto, restringi-las a tais valores.

A presente invenção, vantajosamente, empregou em suas configurações da membrana tensoativos biocompatíveis em sua composição. Os tensoativos podem preferencialmente ser selecionados dentre os derivados sorbitano mono-9-octadecanoato poli(oxi-1,2-etanodilico) (Tween 80[®]) ou dentre 5 copolímeros não iônicos de polioxietileno-polioxipropileno (como o Pluronic F68[®]).

As membranas constituídas de polissacarídeos dispersos com o auxílio dos tensoativos descritos acima e livre do agente antimicrobiano, apresentam potencial de uso como suportes (*scaffolds*) para o crescimento de células 10 animais, com aplicação em medicina regenerativa e em áreas correlatas. A associação dos tensoativos além de contribuir vantajosamente para uma melhor dispersão dos polissacarídeos, também auxilia a dispersão do agente antimicrobiano na mistura, dando origem a membranas mais homogêneas, tal característica promove maior controle da taxa de liberação do princípio ativo.

15 Os excipientes empregados na composição da membrana são agentes reticulantes dos polissacarídeos formadores das membranas, que podem ser selecionados dentre cátions e ânions bivalentes, preferencialmente cálcio, sulfato, aglicona genipina e a misturas dos mesmos.

Exemplo 1: Obtenção da membrana.

20 Os seguintes compostos são necessários para o processo de produção da membrana: quitosana; alginato de sódio; ácido acético glacial; acetona; fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata; cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); e hidróxido de sódio (NaOH). Podem também ser empregados

outros polissacarídeos, como xantana, pectina, carragena, dentre outros, além de outros tipos de polieletrólitos biocompatíveis.

Neste exemplo de concretização para obtenção da dita membrana, objeto da presente invenção, são preparadas inicialmente as seguintes
5 soluções: alginato de sódio a 0,5% (m/v) em água deionizada, quitosana a 1% (m/v) em ácido acético glacial a 2% (v/v), hidróxido de sódio a 1M e cloreto de cálcio a 2% (m/v).

O procedimento utilizado para a preparação dos complexos polissacarídicos é baseado na metodologia descrita por Rodrigues (Rodrigues,
10 A. P; Preparação e caracterização de membranas de quitosana e Alginato para aplicação na terapia de lesões; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, julho de 2008) e adaptada por Bueno (Bueno, C. Z; Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e
15 alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, maio de 2010). Com o auxílio de uma bomba de infusão, a uma dada vazão, uma solução de quitosana e acetona (na proporção 1:1 em volume de solução de quitosana/acetona) é adicionada lentamente à solução
20 de alginato colocada em um reator encamisado de aço inoxidável, na mesma proporção em volume. Durante a adição, o sistema é mantido sob agitação constante a 500 rpm (por exemplo, através de agitador tipo hélice do tipo pás inclinadas) e temperatura de 25°C.

Ao término da adição da solução de quitosana, aumenta-se a taxa de agitação para 1000 rpm e a mistura é agitada por aproximadamente 10 minutos. A seguir, adiciona-se solução de NaOH a 1 M em uma razão de aproximadamente 0,1:1 em volume de solução de NaOH para solução de 5 alginato inicial, mantendo-se a agitação do sistema por mais de 10 minutos. Por fim, adiciona-se uma solução de CaCl_2 a 2% (m/v) em uma razão de 0,02:1 em volume de solução de CaCl_2 para solução inicial de alginato, a qual permanece sob agitação por 10 minutos.

Por este procedimento são obtidas membranas lamelares. Caso sejam 10 desejáveis membranas porosas, pode-se adicionar ao alginato tensoativos biocompatíveis como Pluronic F-68[®] e Tween 80[®]. Outros agentes reticulantes podem ser empregados, como a aglicona genipina, íons fosfato, cátions bivalentes e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para a incorporação do fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata o 15 mesmo é adicionado na forma de pó à mistura contendo os coacervados em proporções diversas até 2,0% de prata em relação à massa total de polímeros presente na mistura. Após a etapa de incorporação do fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata, a suspensão obtida é desaerada, caso desejável, por 120 minutos.

20 Em seguida, a mistura é dividida igualmente em termos mássicos e submetida a uma etapa de secagem à temperatura de 37°C por um tempo preferencial de 24 horas, sob fluxo constante de ar. Ao término da secagem, cada membrana é imersa em 150 ml de solução de CaCl_2 a 2% por uma hora. Para a retirada do CaCl_2 em excesso são feitas mais duas imersões de uma

hora em 200 ml de água deionizada. A secagem final é realizada a temperatura ambiente por 24 horas.

As membranas obtidas ao final do processo podem ser esterilizadas por óxido de etileno, radiação gama ou outros métodos que não alterem as propriedades do material obtido.

Exemplo 2: Incorporação do composto antimicrobiano nas membranas

O aspecto dos cortes transversais das membranas isenta de antimicrobiano e contendo o composto em variadas proporções é apresentado na Figura 1.

As membranas são compostas por múltiplas lamelas. À medida que se aumenta a concentração do fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata, observa-se um aumento no número das lamelas e isso reflete em um aumento na espessura das membranas. Ma e colaboradores (Ma, L.; Yu, W.; Ma, X. Preparation and characterization of novel sodium alginate/chitosan two by composite membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p. 394–399, 2007) sugerem que substitutos poliméricos da derme devem ser mais finos que a pele humana normal, cuja espessura varia entre 500 e 2000 μm , dependendo da idade, sexo e região do corpo. Dessa maneira, as membranas poliméricas apresentam potencial para o uso na terapia de lesões de pele, uma vez que possuem espessura variando de 87 a 520 μm no estado seco, e de 115,6 a 2199 μm no estado úmido.

As membranas preparadas apresentam eficiência mínima de incorporação do fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata de 87% em sua estrutura, conforme detecção por espectroscopia de absorção atômica.

Exemplo 3: Absorção de fluidos

Curativos devem ser capazes de, se necessário, absorver o fluido presente na lesão. Para a determinação do perfil de absorção, corpos de prova de dimensões 2 cm x 1 cm (em triplicata) podem ser expostos a água deionizada, solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, soro fetal bovino (SFB) e fluido corpóreo simulado (FCS). Cada corpo de prova deve ser pesado em balança analítica, para a determinação de sua massa inicial e posteriormente hidratado com 10 ml das referidas soluções por 24 horas em estufa a 37°C. A capacidade de absorção de fluidos é determinada por meio da equação 1:

$$C_w = \frac{(M_u - M_i)}{M_i} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde M_i refere-se à massa inicial da amostra em equilíbrio com o ambiente e M_u refere-se à massa da amostra úmida.

As membranas de quitosana e alginato com fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata mostram-se capazes de absorver até 42,3 g H₂O/g membrana, 23,4 g solução salina/g membrana, 15,0 g fluido corpóreo simulado/g membrana e 16,8 g soro fetal bovino/g membrana.

Exemplo 4: Estabilidade em soluções

Os curativos, mesmo que sejam do tipo reabsorvíveis, não devem sofrer degradação precoce, sob pena de não mais proteger eficientemente a lesão.

Ensaio de estabilidade podem ser feitos em água, solução a 0,9% de NaCl, SFB e FCS. Para esta avaliação, as membranas podem ser cortadas em corpos de prova de dimensões 6 cm x 1 cm, sendo os ensaios realizados em triplicata. Primeiramente, os corpos de prova são pesados em balança analítica para determinação da sua massa inicial. Os corpos de prova são então imersos

em 10 ml das referidas soluções por um período de uma semana a 37° C. Após este período, as amostras são retiradas, imersas em 20 mL de água Milli-Q durante 5 minutos, para remover sais ou proteínas em equilíbrio com as membranas (foram repetidas por cinco vezes essa lavagem) e secas em estufa a 37°C até atingirem massa constante. A perda de massa é determinada por meio da Equação 2:

$$M_p = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde M_i refere-se à massa inicial e M_f refere-se à massa final após o período de incubação nas soluções.

10 As membranas contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata apresentam tipicamente o comportamento de perda de massa descrito na Tabela 1.

As porcentagens mais altas de perda de massa são verificadas nas membranas imersas em água, sendo que para membranas preparadas na presença do agente antimicrobiano esse valor varia de 8,0 a 27,5% e para 15 membranas isentas de agente antimicrobiano, é de 10,9%. Por outro lado, quando expostas a fluidos similares ao corpo humano, apresentam baixa perda de massa, o que indica que as membranas são estáveis quando expostas a fluidos simulados ao do corpo humano. O fato das membranas serem estáveis 20 quando expostas a fluidos indica que ela não precisa ser trocada com frequência, diminuindo o trauma ocasionado pela troca.

Tabela 1: Dados de perda de massa em diferentes tipos de fluidos: fluido corpóreo simulado (FCS), solução 0,9% (m/v) de NaCl (SS), soro fetal bovino (SFB) após 7 dias.

Conc. prata (%)	Perda de Massa (%)			
	Água	SS	FCS	SFB
0,00	10,93 ± 0,28	7,24 ± 0,53	5,76 ± 0,29	2,92 ± 0,22
0,05	8,01 ± 0,20	7,50 ± 0,88	7,12 ± 0,23	6,85 ± 0,47
0,10	27,56 ± 3,98	8,01 ± 0,04	7,07 ± 0,02	6,21 ± 0,22
0,20	9,69 ± 0,50	5,78 ± 0,17	5,15 ± 0,58	0,95 ± 0,12 ^r
0,60	16,44 ± 1,20	5,13 ± 0,71	8,68 ± 0,76	0,82 ± 0,09
1,10	20,11 ± 1,52	6,53 ± 0,03	9,57 ± 0,78	0,40 ± 0,06
2,00	27,53 ± 1,44	7,22 ± 0,04	10,64 ± 0,49	0,42 ± 0,05

Exemplo 5: Atividade antimicrobiana

Estes testes podem ser realizados de acordo com a norma ASTM G21-09 em, pelo menos, duplicata, empregando cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

- 5 Na Tabela 2 observa-se a classificação da atividade antimicrobiana, onde NA é não aceitável; A é aceitável; S é satisfatório e AS é altamente satisfatório, para a membrana controle, constituída somente de quitosana e alginato, e para a membrana preparada na presença de 1,1% de prata. A membrana constituída de prata apresenta eficácia antimicrobiana satisfatória
- 10 contra as cepas testadas, com adequado potencial de uso na aplicação em feridas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* e principalmente, por *Staphylococcus aureus*.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana das membranas com e sem prata.

Cepas	Membrana sem prata		Membrana preparadas na presença de 1,1% de prata	
	Código	Halo (mm)	Código	Halo (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	NA	0	S	4

<i>S. aureus</i>	NA	0	AS	6
------------------	----	---	----	---

Exemplo 6: Citotoxicidade *in vitro*

Estes ensaios podem ser realizados de acordo com a norma ASTM F895-84. Uma das linhagens celulares comumente utilizadas para este fim é a NCTC Clone 929, que consiste de células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1).

Na Tabela 3 são apresentados os índices de zona, onde 0 é nenhuma zona sob e ao redor da amostra; 1 é alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra; 2 é zona limitada sob a amostra; 3 zona limitada entre 0,5 a 1 cm ao redor da amostra e 4 é zona superior a 1 cm ao redor da amostra, para as análises de citotoxicidade das membranas contendo 1,1% de prata.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana das membranas com e sem prata.

Amostra	Índice de Zona			
	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4
Membrana com 1,1% de prata	3	3	3	3
Controle negativo (filtro atóxico)	0	0	0	0
Controle positivo (látex tóxico)	4	4	4	4

Observa-se que a membrana preparada na presença de 1,1% de prata apresenta efeitos citotóxicos moderados, o que já era de certa forma, esperado. De acordo com Atiyeh e colaboradores (Atiyeh, B. S.; Costagliola, M.; Hayek, S. N.; Dibo, S.A; Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns* 33; p. 139-148, 2007) a prata apresenta efeitos tóxicos à queratinócitos e fibroblastos. Esse efeito também pode ser

observado em outros curativos já-comercializados como, por exemplo, o Aquacel® Ag da Convatec.

No entanto, pode-se ressaltar que os benefícios da utilização de membranas com prata superam a desvantagem de seu efeito citotóxico, pois a prata não apresenta efeitos colaterais sistêmicos e melhora de forma geral o processo de cicatrização. Além disso, são raros os casos de resistência bacteriana à prata, visto que existem múltiplos sítios de ligação dos íons prata com as bactérias.

Exemplo 7: Comportamento quanto à capacidade de drenagem de água

A taxa de drenagem de água é um importante fator a ser considerado no desenvolvimento de curativos, pois estes devem ser capazes de impedir o acúmulo de exsudatos e a desidratação excessiva da lesão. Na Tabela 4 são apresentados os valores de capacidade de drenagem das membranas preparadas na presença de diversas concentrações de prata.

Tabela 4: Capacidade de drenagem de água pelas membranas

Concentração de prata (%)	Capacidade de drenagem (g/m ² .dia)
0,00	12.109,15 ± 512,09
0,05	7.198,71 ± 129,09
0,10	5.349,12 ± 315,36
0,20	5.176,92 ± 214,19
0,60	4.916,71 ± 319,3
1,10	4.537,24 ± 347,3
2,00	4.458,11 ± 175,8

A taxa encontrada nesse estudo para membranas de quitosana e alginato sem o fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata foi de 12.109,15 g/m².dia, o que está de acordo com a literatura. Rodrigues (Rodrigues, A. P;

Preparação e caracterização de membranas de quitosana e Alginato para aplicação na terapia de lesões; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, julho de 2008) obteve taxas de drenagem entre 12.219 a 14.343 g/(m²dia) para membranas constituídas de quitosana e alginato sem incorporação de fármaco.

Observa-se que a capacidade de drenagem das membranas de quitosana e alginato incorporando fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata se reduz conforme se eleva a concentração do composto na mistura inicial. Isso se deve, possivelmente, ao aumento da espessura das membranas devido à presença das partículas do agente antimicrobiano localizadas entre as fibras de quitosana e alginato, dificultando a permeação da água.

De acordo com Behar e colaboradores (Behar, D.; Juszynski, M.; Hur, N. B.; Golan, J.; Eldad, A.; Tuchman, Y.; Sterenberg, N.; Rudensky, B. Omiderm, a new synthetic wound covering: Physical properties and drug permeability studies. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 20(6), p. 731-738, 1985) a pele saudável perde em média cerca de 240 g/(m²dia). Lamke e colaboradores (Lamke L.O.; Nilsson, G.E.; Reithner, H. L. The evaporative water loss from burns and the water permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns*. p.159–65, 1977) relatam que a perda de água para a pele lesada pode variar de 279 ± 26 g/(m²dia) para queimaduras de primeiro grau a 5138 ± 202 g/(m²dia) para uma ferida granular. Balakrishnan e colaboradores (Balakrishnan, B.; Mohanty, M.; Umashankar, P. R.; Jayakrishnan, A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*; p. 6335–6342, 2005)

afirmam que curativos com taxas de 2000 a 2500 g/(m²·dia) promoveriam um nível adequado de umidade para feridas, sem permitir que ocorresse desidratação excessiva. Por outro lado, Behar e colaboradores, citado inicialmente, consideram os valores de permeabilidade à água próximo a 5000 g/(m²·dia) como ideais para curativos utilizados em feridas com alto grau de exsudato. Diante disso, a membrana de quitosana e alginato preparada na presença de prata e apresentada na presente invenção pode ser utilizada em feridas exsudativas.

Exemplo 8: Comportamento quanto à liberação da prata incorporada

10 Membranas preparadas na presença de 0,05 a 2,0% de apresentam o perfil de eluição típico de prata mostrado na Figura 2. Observa-se que com o aumento da concentração da prata na membrana, ocorre um aumento na concentração da prata eluída. O valor máximo obtido foi de 60 ppm para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 2% de prata.

15 Valores equivalentes são relatados no pedido de patente US20070275043-A1, depositado em 30/04/2007 por Freeman e colaboradores, da ordem de 50ppm para curativos de alginato e CMC. Ainda, curativos comercialmente disponíveis como o Aquacel[®]-Ag e Silver Alginate[®] II apresentam valores de 70ppm e 55ppm, respectivamente.

20 Exemplo 9: Obtenção de membranas lamelares porosas

Para o preparo de membranas lamelares porosas adiciona-se 1,8ml de Tween 80[®] ou 1,8g de Pluronic F68[®] a 180 mL de solução de alginato a 0,5%, previamente à adição desta ao reator. As outras etapas seguem conforme já descrito, sem a etapa de incorporação do fosfato hidrogenado de zircônio,

sódio e prata. Membranas com as propriedades médias listadas na Tabela 5 são obtidas, apresentando morfologias de superfície e secção transversal conforme ilustrado nas Figuras 3 e 4.

5 Tabela 5. Comparação entre membranas com os surfatantes Pluronic F68[®] e Tween 80[®], não incorporando fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata.

Propriedade	Com Pluronic F68 [®]	Com Tween 80 [®]
Espessura (µm)	410,00 ± 60,0	380,00 ± 30,0
Espessura após exposição à água (µm)	1310,00 ± 80,0	1480,00 ± 170,0
Absorção de água em 24 h (g/g)	13,83 ± 0,42	13,67 ± 0,49
Perda de massa em água após 7 dias (%)	30,47 ± 2,16	31,38 ± 0,98

Exemplo 10: Obtenção de membranas lamelares porosas contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata

10 Para o preparo de membranas lamelares porosas adiciona-se 1,8mL de Tween 80[®] ou 1,8g de Pluronic F68[®] a 180 mL de solução de alginato a 0,5%, previamente à adição desta ao reator. As outras etapas seguem conforme já descrito. São obtidas membranas com as propriedades médias listadas na Tabela 6.

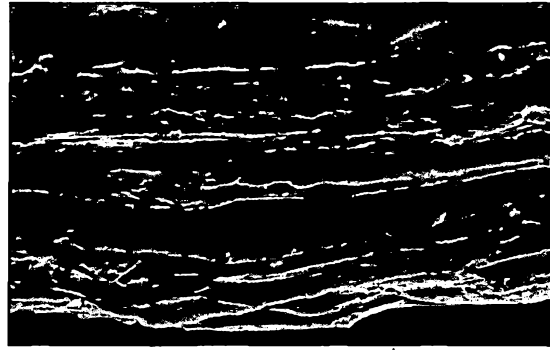
Tabela 6. Comparação entre membranas com os surfatantes Pluronic F68[®] e Tween 80[®], preparadas na presença de 1,1% de prata.

Propriedade	Com Pluronic F68 [®]	Com Tween 80 [®]
Espessura (µm)	720,00 ± 15,0	610,00 ± 21,00
Espessura após exposição à água (µm)	1480,00 ± 35,0	1210,00 ± 13,00
Absorção de água em 24h (g/g)	28,12 ± 0,10	25,09 ± 0,16
Perda de massa em água em 24h (%)	12,21 ± 0,89	10,13 ± 0,08

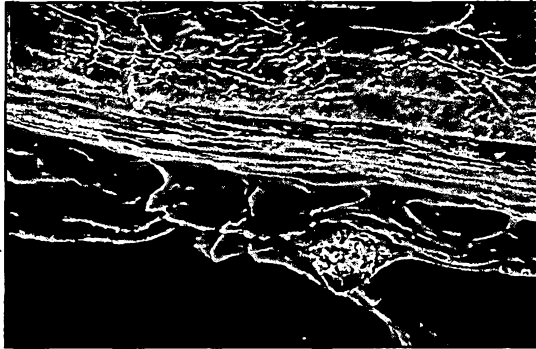
Reivindicações

1. Membrana **caracterizada por** conter polissacarídeos naturais, um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada e excipientes aceitáveis.
- 5 2. Membrana, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender, preferencialmente, os polissacarídeos naturais quitosana e alginato.
3. Membrana, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo** fato do alginato poder ser substituído por xantana, pectina ou carragena.
- 10 4. Membrana, de acordo com as reivindicações 2, **caracterizada por** compreender uma solução de alginato de sódio em água variando de 0,25 a 1% (m/v), preferencialmente 0,5% (m/v).
- 5 5. Membrana, de acordo com as reivindicações 2, **caracterizada por** compreender uma solução de quitosana em ácido acético glacial variando de 0,5 a 2% (m/v), preferencialmente 1% (m/v).
- 15 6. Membrana de acordo com as reivindicações de 4 e 5, **caracterizada por** compreender uma mistura na proporção 1:1 de solução de alginato e solução de quitosana misturada na proporção de 50% de acetona.
7. Membrana, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por**
20 compreender um ou mais excipientes selecionados do grupo dos agentes reticulantes, tais como os íons bivalentes cálcio e sulfato, ou outros agentes multifuncionais, como glutaraldeído, aglicona genipina, ou a mistura dos mesmos.

8. Membrana, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** compreender, preferencialmente, íons cálcio.
9. Membrana, de acordo com a reivindicação de 1, **caracterizada por** conter um agente antimicrobiano selecionado dentre o grupo dos
5 agentes à base de prata estabilizada.
10. Membrana, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** conter preferencialmente o agente antimicrobiano fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata.
11. Membrana, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por**
10 compreender um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada na concentração de 0,05% a 2%.
12. Uso da membrana descrita nas reivindicações de 1 a 8 **caracterizada por** ser empregada no preparo de uma barreira física impedindo a entrada de microrganismos na região lesada ou como suportes
15 (*scaffolds*) para o crescimento de células animais, com aplicação em medicina regenerativa e em áreas correlatas.
13. Uso da membrana descrita nas reivindicações de 1 a 11 **caracterizada por** ser empregada no preparo de um curativo para a terapia de lesões de pele provenientes principalmente de queimaduras, por sua atividade
20 antimicrobiana e estímulo à cicatrização.



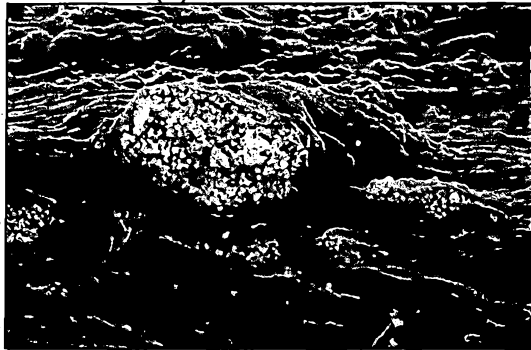
(a)



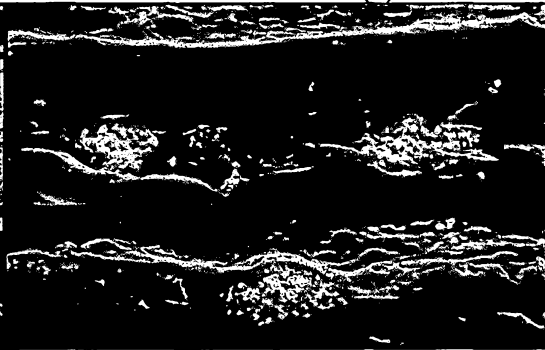
(b)



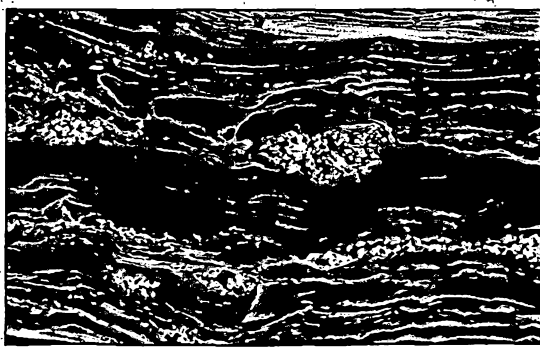
(c)



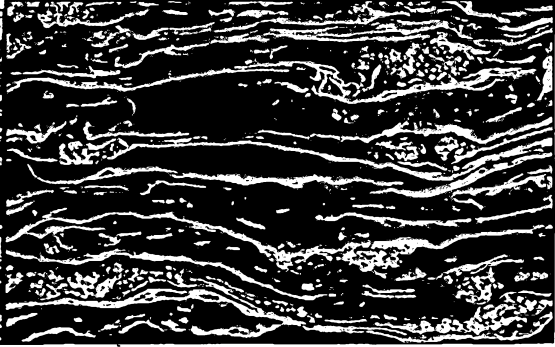
(d)



(e)



(f)



(g)

Figura.1

5

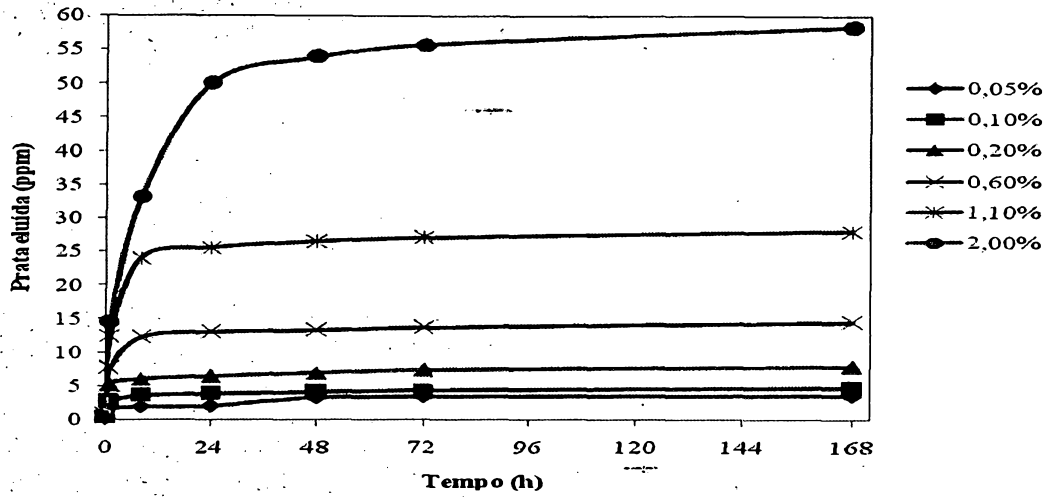


Figura 2

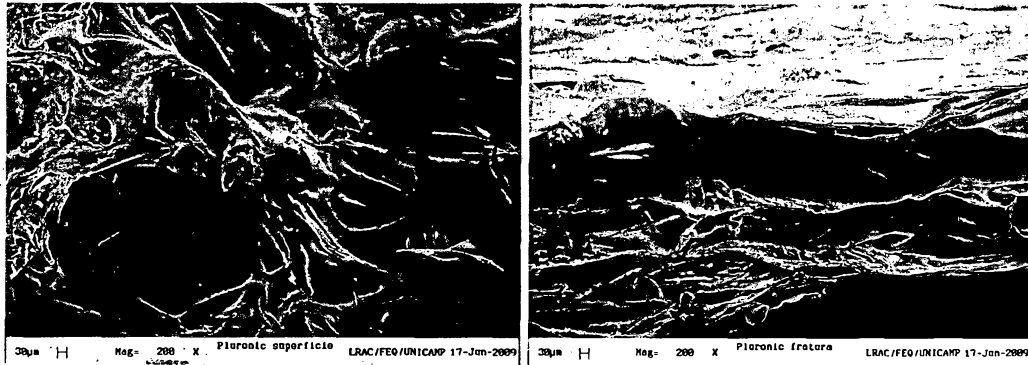


Figura 3

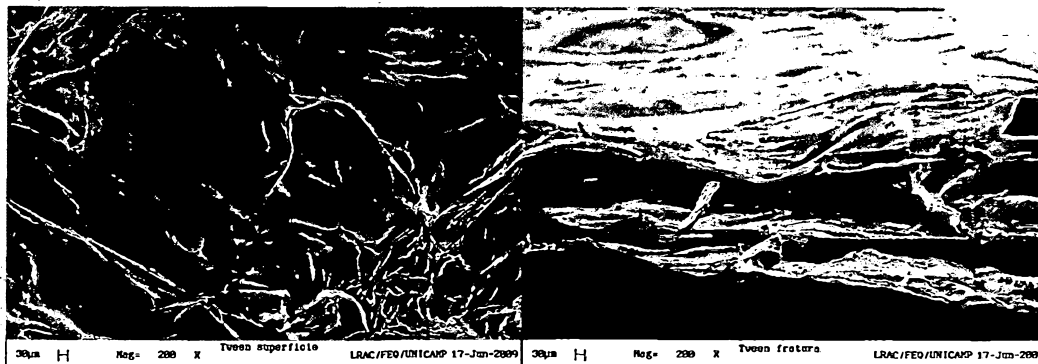


Figura 4

5