

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**GEISA NASCIMENTO BARBALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO INOVADORA  
CONTENDO EXTRATO DE CUPUAÇU NANOENCAPSULADO  
PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS CUTÂNEAS**

**BRASÍLIA**

**2019**

**GEISA NASCIMENTO BARBALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO INOVADORA  
CONTENDO EXTRATO DE CUPUAÇU NANOENCAPSULADO  
PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS CUTÂNEAS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da  
Saúde, Universidade de Brasília, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador(a): Profa. Dra. Tais Gratieri  
Co-orientador(a): Joyce Kelly do Rosário  
da Silva**

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL**

**2019**

**GEISA NASCIMENTO BARBALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO INOVADORA  
CONTENDO EXTRATO DE CUPUAÇU NANOENCAPSULADO  
PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS CUTÂNEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08/08/2019

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Tais Gratieri (presidente)

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dra. Maria de Fátima Borin

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto

Universidade de Brasília – Campus Ceilândia (UnB)

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília** pela oportunidade de aperfeiçoamento e continuidade nos estudos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade de Brasília pela oportunidade.

Aos meus pais, **Gildson Silva Barbalho** e **Selimar da Cunha Nascimento** pelo apoio nos meus estudos, por acreditar nos meus sonhos e ajudar a realiza-los.

À minha orientadora **Profa. Dra. Tais Gratieri** por ser inspiração de mulher e pesquisadora, acreditar em mim desde a época de estágio e dar todo apoio para desenvolver esse projeto.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso** por todo apoio durante o mestrado.

À minha coorientadora **Profa. Dra. Joyce Kelly do Rosário** por fornecer a matéria prima essencial deste trabalho.

À toda família do **LTMAC** que acaba se tornando nossa família e compartilhando muitos momentos dentro e fora do laboratório.

Aos **Técnicos do Laboratório de Ensino da Faculdade de Ciências da Saúde e Microscopia Eletrônica e Genética e Morfologia do Instituto de Biologia**, pelo apoio durante a realização dos experimentos que não puderam ser realizados em nosso laboratório.

À **Avifran** por ceder os ovos de galinha e proporcionar o a realização dos experimentos de irritabilidade.

À **Nippobras** por ceder as peles de porco utilizadas nos experimentos de penetração e modelos de pele.

As minhas amigas, **Maira Nunes Pereira** e **Seila Tolentino**, que sempre esperavam os resultados com esperança e choravam junto quando tudo dava errado.

Ao professor **Sasha Braun** por ceder seu laboratório no instituto de biologia; e a aluna de doutorado **Maria de Sousa Brito** por toda sua força de vontade em ajudar todos em sua volta, pela sua dedicação com seus estagiários.

Ao **Gabriel Brito** doutorando do Instituto de Química que iluminou meu mestrado e quando eu menos acreditava ele aparecia com a solução.

À **Leidimara Caetano de Souza**, pelo apoio, amizade e companheirismo em todas trilhas, que juntas sempre aumentamos as metas.

Agradeço ao meu grande amigo **Janailton Mick**, por ser uma grande inspiração de pesquisador e um amigo que sempre se preocupou comigo.

À minha amiga, **Alessandra Campos** que sempre acompanhou meu passos desde a graduação, que sempre esteve junto nos momentos felizes e tristes.

Ao meu amigo químico **Manuel Mera**, que sempre teve paciência em discutir os resultados mesmo não concordando um com o outro, mas que no final a conclusão era igual.

À minha querida prima **Haihani Passos** que sempre foi minha inspiração para seguir a carreira acadêmica.

## RESUMO

BARBALHO, G. Desenvolvimento de uma formulação inovadora contendo extrato de cupuaçu nanoencapsulado para o tratamento de queimaduras cutâneas. Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação inovadora contendo extrato hexânico de cupuaçu, segura, eficaz e conveniente para o tratamento de queimaduras cutâneas. Um método analítico para doseamento de ácido oleico em solução ou extraído da pele de suíno utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massa foi validada. As NC-EXT C/QS e NC-EXT S/QS foram obtidas utilizando o método de deposição interfacial de polímeros pré-formado e caracterizadas pelo tamanho, índice de polidispersividade (IPD), potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação. As NC-EXT S/QS, tamanho de  $278,3 \pm 5,05$  nm, IPD de  $0,178 \pm 0,02$  e potencial zeta de  $-26,2 \pm 0,08$  mV, e as NC-EXT C/QS, tamanho de  $337,2 \pm 2,15$  nm, IPD de  $0,269 \pm 0,01$  e potencial zeta de  $+38,5 \pm 0,89$  mV, ambas apresentaram forma esférica e encapsularam aproximadamente 94% de ácido oleico. As NC apresentaram estabilidade física durante 120 dias. A incubação das NC-EXT C/QS com NP de mucina e posterior análise de tamanho de partículas, foi associado com propriedades mucoadesivas, diferentemente das NC-EXT S/QS. Nos estudos de penetração *in vitro*, utilizando pele de suínos queimada em modelo de *Saarbrücken* modificado, as NC não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quanto ao revestimento. Foi avaliada então, a citotoxicidade das formulações sobre fibroblastos (Fibs) e a viabilidade não foi afetada pelo extrato e pelas NC. Os resultados obtidos mostram que as formulações podem promover proliferação celular. O comportamento migratório das células tratadas demonstram que o extrato e as NC podem promover migração. A análise do gene Ki67 foi mais expressivo quando as células foram tratadas com as NC-EXT S/QS. O FGF2 e HAS2 foram pouco expressos quando tratados com as NC. A elastina teve expressão 4 vezes maior pela NC-EXT S/QS do que pelo controle positivo e o extrato. Portanto, esses resultados podem indicar que a formulação desenvolvida é promissora para o tratamento de queimaduras e apresenta potencial de atuar também como uma formulação cosmética, melhorando a reconstrução da fibra elástica e diminuindo a aparência das cicatrizes.

**Palavras-chave:** Nanocápsulas, extrato hexânico de cupuaçu, queimaduras cutâneas.

## ABSTRACT

BARBALHO, G. Development of an innovative formulation containing nanoencapsulated cupuaçu extract for the treatment of skin burns. Brasília, 2019. Dissertation (Master's Degree in Pharmaceutical Sciences). Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2019.

The objective of this work was to develop an innovative formulation containing cupuaçu hexane extract, safe, effective and convenient for the treatment of skin burns. An analytical method for assaying oleic acid in solution or extracted from swine skin using gas chromatography coupled to a mass spectrometer was validated. NC-EXT C / QS and NC-EXT S / QS were obtained using the interfacial deposition method of preformed polymers and characterized by size, polydispersity index (IPD), zeta potential, morphology and encapsulation efficiency. The NC-EXT S / QS, size of  $278.3 \pm 5.05$  nm, IPD of  $0.178 \pm 0.02$  and zeta potential of  $-26.2 \pm 0.08$  mV, and NC-EXT C / QS, size of  $337.2 \pm 2.15$  nm, IPD of  $0.296 \pm 0.01$  and zeta potential of  $+38.5 \pm 0.89$  mV, both presented spherical shape and encapsulated approximately 94% of oleic acid. NC showed physical stability for 120 days. The incubation of NC-EXT C / QS with mucin NP and subsequent particle size analysis was associated with mucoadhesive properties, unlike NC-EXT S / QS. In the in vitro penetration studies, using porcine skin burned for 7 s with hot plate at  $85^\circ\text{C}$  defined by histology, in the modified *Saarbrücken* model, the NC did not present significant differences ( $p < 0.05$ ) in the coating. The cytotoxicity of the formulations on fibroblasts (Fibs) was then evaluated and the extract and NC did not affect viability. The results obtained show that the formulations can promote cell proliferation. The migratory behavior of the treated cells demonstrates that the extract and NCs can promote migration. Ki67 gene analysis was expressed largely when the cells were treated with NC-EXT S / QS. FGF2 and HAS2 were poorly expressed when treated with NC. NP-EXT S / QS than by positive control and extract expressed elastin 4 times higher. Therefore, these results may indicate that the formulation developed is promising for the treatment of burns and has the potential to also act as a cosmetic formulation, improving elastic fiber reconstruction and decreasing the appearance of scars.

**Key words:** Nanocapsules, hexane cupuaçu extract, skin burns.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Camadas da pele (adaptado de Khavkin, 2011).....	23
<b>Figura 2.</b> Camadas da epiderme (colocação de hematoxilina e Eosina, aumento de 40x). .....	24
<b>Figura 3.</b> Ilustração dos níveis de queimaduras comparadas a pele intacta. ....	25
<b>Figura 4.</b> Fruto de cupuaçu.....	28
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da quitosana. ....	29
<b>Figura 6.</b> Representação ilustrativa do desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas com fase orgânica composta de Policaprolactona, span 60, triglicerídeo caprílico e acetona, fase etanólica composta por lecitina e etanol, e fase aquosa contendo polissorbato 80 e água Milli-Q. A Fase 2 foi adicionada na fase 1 e a mistura dessas foram adicionada a fase 3.....	35
<b>Figura 7.</b> Obtenção das nanocápsulas poliméricas com núcleo lipídico. ....	36
<b>Figura 8.</b> Análise de TWEL antes e após queimadura com chapa aquecida a 85°C.....	41
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica dos padrões de fragmentação dos íons do Oleato.....	46
<b>Figura 10.</b> Curva analítica obtida pela análise do ácido oleico por GC/MS, utilizando como solvente hexano, comprovando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 0,0041x + 0,0287$ e $R^2 = 0,9978$ . ....	47
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de Transmissão (MET), A) NP VAZIA S QS ( 15 K) , B) NP VAZIA C QS (20 K), confirmando o tamanho aproximado de 100 a 200 nm. Artefatos brancos na imagem são adquiridos durante o processamento da amostra por precipitação do contrastante acetato de uranila.....	50
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de Transmissão (MET), A) NP EXT C QS (15 K) , B) NP EXT S QS (15 K). Artefatos brancos na imagem são adquiridos durante o processamento da amostra por precipitação do contrastante acetato de uranila. ....	51
<b>Figura 13.</b> Estabilidade física das nanocápsulas vazias com e sem revestimento de quitosana, mostrando os resultados de tamanho de partícula (nm), PDI, potencial zeta e pH, com duração de 120 dias em temperatura ambiente e geladeira. ....	52
<b>Figura 14.</b> Estabilidade física das nanocápsulas contendo extrato hexânico de cupuaçu com e sem revestimento de quitosana, mostrando os resultados de tamanho de partícula (nm), PDI, potencial zeta e pH, com duração de 120 dias em temperatura ambiente e geladeira.....	54

- Figura 15.** Determinação *in vitro* da mucoadesividades das NP-EXT e NP-EXT-QS (A) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico referente às amostras de NP-EXT, NP-MCN de incubadas com mucina. (B) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico referente às amostras de NP-EXT-QS, NP-MCN e de NP-EXT-QS incubadas com mucina. ....56
- Figura 16.** Determinação *in vitro* da mucoadesividades das NP-EXT e NP-EXT-QS (A) Potencial zeta das NP-EXT em função do tempo de incubação com soluções de mucina e (B) Potencial zeta das NP-EXT-QS em função do tempo de incubação com soluções de mucina. ....57
- Figura 17.** Viabilidade dos fibroblastos na presença de tratamento com o extrato e o veículo, após 24h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two -way ANOVA e pós teste de turkey. ....58
- Figura 18.** Viabilidade dos fibroblastos na presença de tratamento com NP-EXT S/QS, após 24h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 00% de viabilidade. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two -way ANOVA e pós teste de turkey. ....58
- Figura 19.** Proliferação dos fibroblastos na presença de tratamento com o extrato e as NP-EXT S/QS, após 7 de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two -way ANOVA e pós teste de turkey. ....59
- Figura 20.** Migração dos fibroblastos na presença de tratamento com o extrato e as NP-EXT S/QS, após 48h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two -way ANOVA e pós teste de turkey. ....60
- Figura 21.** Ensaio de migração celular com os fibroblastos. Por meio do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório dos Fibs tratados com os controles e ambas formulações. Os pontos amarelos denotam a presença de célula naquele ponto. 61
- Figura 22.** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes Ki67, MMP1, dos fibroblastos tratados com os controles e as formulações. ....62
- Figura 23.** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes, Elastina (ELN) e Bcl2, dos fibroblastos tratados com os controles e as formulações. O controle são células tratadas com SFB. ....63

- Figura 24.** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes, FGF2 (Fator de crescimento de fibroblasto 2) e Ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), dos fibroblasto tratados com o controle e as formulações. O controle positivo são células de fibroblastos humanos tratadas com SFB. ....64
- Figura 25.** Taxa de evaporação de água da superfície da pele (TWEL) verificada em pele intacta e após danificação com 10, 20 e 30 fitas de tape stripping. Diferenças estatísticas verificadas pelo t-test com dados não paramétricos.....65
- Figura 26.** Taxa de evaporação de água da superfície da pele (TWEL) verificada em pele intacta e após queimadura com 4, 7 e 10 segundos realizados com chapa quente a 85°C. Diferenças estatísticas verificadas pelo t-test com dados não paramétricos.....65
- Figura 27.** Histologia dos modelos de pele danificados pelo método de tape stripping, fotos após 10 fitas, 20 fitas e 30 fitas. ....66
- Figura 28.** Histologia dos modelos de pele danificados com chapa quente a 85°C, após 4 segundos, 7 segundos, 10 segundos de contato. ....68
- Figura 29.** Quantidade penetrada em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ácido oleico em pele queimada após 24 horas com as NC EXT C/QS e NC EXT S/QS.....69
- Figura 30.** Penetração realizada com as NC EXT C/QS e NC EXT S/QS em pele queimada ( $p>0.05$ ) e intacta. ....69
- Figura 31.** HETCAN com a Formulação em Gel com nanopartículas de extrato hexânico de cupuaçu com revestimento de quitosana e sem revestimento de quitosana, as imagens são representadas no tempo de 20 segundos, 2 minutos e 5 minutos. No controle positivo (NaOH 1M) observa-se hemorragias e hiperemia, no controle negativo com soro fisiológico não se observa nenhum fenômeno que caracterize irritabilidade. Nas formulações NC EXT C/QS observa-se uma leve hiperemia e na formulação sem quitosana não observou nenhuma mudança. ....71

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Valores de referência para análises de TEWL em relação a condição da pele. .....	41
--	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Pontuação atribuída para o aparecimento de cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985). .....39
- Tabela 2.** Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) para os sinais de irritação segundo o teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985). .....40
- Tabela 3.** Composição Química do extrato hexânico das sementes de cupuaçu, apresentando como composto majoritário o ácido oleico (18:1). .....45
- Tabela 4.** Resultados de precisão e exatidão interdia em diferentes concentrações, VC% (coeficiente de variação). .....47
- Tabela 5.** Resultados de precisão e exatidão intradias realizados em 2 dias diferentes, VC% (coeficiente de variação). .....48
- Tabela 6.** Porcentagem de recuperação da pele de suínos utilizando Hexano como solvente extrator (n = 3). .....48
- Tabela 7.** Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP-EXT (n = 5). .....49
- Tabela 8.** Resultados de eficiência de encapsulação e rendimento das nanocápsulas com e sem revestimento de quitosana. ....50

**LISTA DE ABREVIATURA DE SIGLAS**

CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CV	Coefficiente de variação
DNA	�cido desoxirribonucleico
EC	Etrato córneo
EE%	Eficiência de encapsulação
EXT	Extrato Hexânico seco de Cupuaçu
Fibs	Fibroblastos
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NC-VAZIA S/QS	Nanocápsulas sem extrato e sem revestimento de quitosana
NC-VAZIA C/QS	Nanocápsulas sem extarto e com revestimento de quitosana
NC-EXT	Nanocápsulas cotendo extrato hexânico de cupuaçu
NC-EXT S/QS	Nanocápsulas cotendo extrato e sem revestimento de quitona
NC-EXT C/QS	Nanocápsulas contendo extarto e com revestimento de quitosana
NC	Nanocápsulas
NP	Nanopartículas
NP-MCN	Nanopartículas de mucina
IPD	�ndice de polidispersão
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	�cido ribonucleico
QS	Quitosana
R <sup>2</sup>	Ceficiente de correlação linear
SFB	Soro fetal bovino
SIM	Monitoramento seletivo de íons
TEWL	Taxa de evaporação de água da superfície da pele



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>211</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos específicos do trabalho:</b> .....	<b>23</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Pele</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Queimaduras</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Composição Lipídica da pele</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3.1 Tratamentos</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3.2 Nanocápsulas</b> .....	<b>29</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2 Processamento do material e obtenção do extrato hexânico das sementes de cupuaçu</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3 Esterificação para caracterização do extrato hexênico das sementes de cupuaçu</b> ..	<b>32</b>
<b>4.4 Composição química do extrato hexânico das sementes de cupuaçu realiada na UFPA</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4.5 Método analítico para quantificação do ácido oleico por CG-MS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5.1 Linearidade</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.2 Limite de detecção e quantificação</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.3 Seletividade</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5.4 Recuperação do fármaco</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5.5 Precisão</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5.6 Exatidão</b> .....	<b>35</b>
<b>4.6 Obtenção das nanopartículas poliméricas (NC) com extrato hexânico de cupuaçu</b>	<b>35</b>
<b>4.6.1 Caracterização das nanocápsulas poliméricas</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6.2 Diâmetro hidrodinâmico</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6.3 Potencial zeta</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6.4 Eficiência de encapsulação</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6.5 Morfologia das Nanocápsulas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.6.6 Estabilidade Física das NC</b> .....	<b>38</b>
<b>4.7 Avaliação in vitro do potencial mucoadesivo das nanocápsulas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.7.1 Preparo das nanocápsulas de mucina (NP-MCN)</b> .....	<b>38</b>

4.7.2 Capacidade mucoadesiva das NP-EXT frente às NP-MCN .....	38
4.8 Estudos de irritabilidade <i>in vitro</i> .....	39
4.9 Preparação das peles de suínos: modelo de pele danificada e modelo de pele queimada .....	40
4.10 Análise de TEWL (perda de água transepidérmica) para avaliação da função de barreira da pele para os modelos de pele danificadas e queimadas.....	40
4.11 Histologia dos modelos de pele danificada e queimada .....	41
4.12 Estudos de permeação <i>in vitro</i> em pele queimada e intacta .....	42
4.13 Estudos <i>in vitro</i> de atividade celular .....	42
4.13.1 Avaliação da viabilidade de células tratadas .....	43
4.13.2 Ensaio de proliferação celular .....	43
4.13.3 Ensaio de migração celular .....	43
4.13.4 PCR em tempo real.....	44
4.14 Análises estatísticas .....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 Composição química do extrato hexânico das sementes de cupuaçu realiza na UFPA .....	45
5.2 Validação de métodos analíticos para quantificação de ácido oleico por CG-MS ..	46
5.2.1 Separação e detecção dos analitos .....	46
5.2.2 Seletividade .....	46
5.2.3 Linearidade .....	47
5.2.4 Exatidão e Precisão .....	47
5.2.5 Limite de quantificação e detecção .....	48
5.2.6 Recuperação.....	48
5.3 Obtenção e caracterização das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS.....	48
5.3.1 Tamanho de partículas e Potencial Zeta .....	49
5.3.2 Eficiência de encapsulação .....	49
5.3.3 Morfologia das NC .....	50
5.3.4 Estabilidade das NC.....	51
5.4 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial mucoadesivo das NC-EXTS/QS e NC-EXT C/QS ..	55
5.5 Avaliação da viabilidade das células tratadas com extrato livre e nanoencapsulado	57
5.6 Ensaio de proliferação celular .....	59
5.7 Ensaio de migração celular .....	60
5.8 PCR em tempo real.....	61
5.9 Análise de TEWL (taxa de evaporação de água da superfície da pele) para avaliação da função de barreira da pele para os modelos de pele danificadas e queimadas....	64

<b>5.10 Histologia da pele danificada e queimada .....</b>	<b>66</b>
<b>5.11 Estudos <i>in vitro</i> de penetração das NC contendo extrato hexânico de cupuaçu através da pele de suínos.....</b>	<b>68</b>
<b>5.12 Estudos de irritabilidade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Queimaduras são lesões traumáticas que iniciam-se externamente, podendo causar destruição total ou parcial da pele e seus anexos, sendo na maioria das vezes causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos, tais como: vapor, luz solar ou luz ultravioleta, radiações e fricção. Aquelas causadas por ferimentos térmicos (queimaduras por chamas), líquidos quentes (escaldões), contato com objetos aquecidos como vidro e metal quente (queimaduras de contato) perfazem cerca de 86% dos casos, as queimaduras por corrente elétrica, 4% e por agentes químicos (ácidos, soda cáustica, diluente de tinta ou gasolina), 3% (SCHAEFER; SZYMANSKI, 2018).

Dentre todas as lesões dérmicas, as queimaduras representam o quarto tipo de trauma mais comum em todo o mundo (YÜCEL; CORUH; DENIZ, 2019). A maioria é acidental e ocorre no domicílio (ELSOUS et al., 2016; BMJ, 2017), tornando-se um importante fator de risco e um problema de saúde pública. No Brasil, as lesões por queimaduras em 2016 levaram à hospitalização de 22.719 pessoas, a região Nordeste com 7.071 pacientes internados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Nos EUA, fogo e queimaduras são responsáveis por 3.275 mortes por ano (ASSOCIATION, 2016).

O tratamento é complexo e doloroso e envolve o uso de vários fármacos administrados separadamente ou de forma combinada (WOLF et al., 2011). Destaca-se dentre dos agentes tópicos mais importantes o creme de sulfadiazina de prata a 1%. Esse medicamento apresenta forte atividade antibacteriana, entretanto, pode causar efeitos colaterais como neutropenia, eritema multiforme, cristalúria, metemoglobinemia (CHUNG; HERBERT, 2001; FONG; WOOD, 2006; BEHESHTI et al., 2013). Além disso, pode retardar a cicatrização de feridas, não sendo indicado o tratamento por tempo prolongado em feridas abertas (NASIRI et al., 2015).

Como alternativa terapêutica, diversos produtos de origem natural focados no uso tópico tem sido testados e, assim, tornaram-se promissores no processo de cicatrização de queimaduras cutâneas (DUTRA et al., 2009; NASIRI et al., 2015).

Nesse sentido, o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) uma planta arbórea, típica da região amazônica, filogeneticamente próxima ao cacau (*Theobroma cacao* L.) poderia ser considerada para esse fim. Sua incidência natural está em boa parte do estado do Pará, que representa o maior produtor e exportador da fruta. Grande parte das sementes do cupuaçu termina como rejeito industrial (CALVAZARA; MULLER; KAHWAGE, 1984), material que poderia ser usado como matéria-prima para a produção de novas formulações farmacêuticas relacionadas ao cuidado da pele. No entanto, não há estudos que evidenciem de forma inequívoca tal potencial. Ainda, para a aplicação em pele queimada é necessária a incorporação desse extrato em uma

formulação biocompatível que propicie a penetração e ação dos componentes ativos do extrato. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo a avaliação *in vitro* da atividade celular do extrato hexânico das sementes de cupuaçu bem como sua incorporação em nanocápsulas, de forma a proteger o extrato e favorecer a penetração dos componentes ativos através da pele.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral obter nanocápsulas com extrato de sementes de cupuaçu para o tratamento de queimaduras cutâneas.

### 2.2 Objetivos específicos do trabalho:

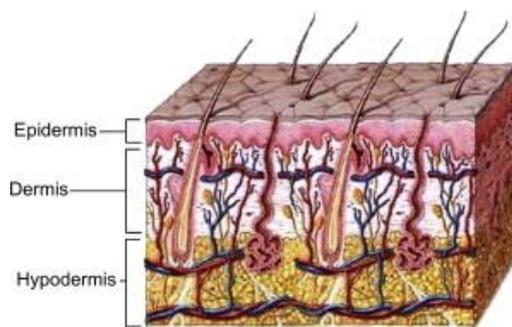
- Desenvolver um método analítico para o ácido oleico por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas;
- Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de policaprolactona contendo ou não extrato quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersividade, potencial zeta, eficiência de encapsulação, rendimento do processo e morfologia;
- Avaliar a estabilidade física das nanocápsulas em temperatura ambiente e em geladeira;
- Avaliar a segurança da formulação através do teste de HET CAM;
- Avaliar o potencial mucoadesivo das nanocápsulas;
- Obter um modelo de pele queimada para estudos de permeação *in vitro*;
- Realizar estudos de permeação passiva *in vitro* através da pele de suínos intacta e queimada;
- Avaliar *in vitro* a atividade proliferativa celular das formulações desenvolvidas em modelo de cultura de fibroblastos em monocamadas;

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Pele

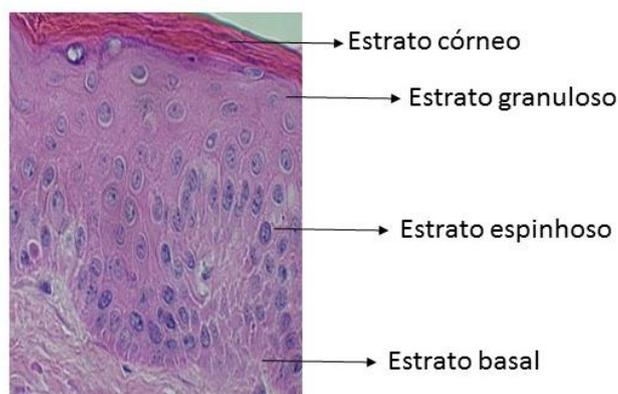
A pele forma uma barreira entre o organismo e o meio ambiente, impedindo a invasão de patógenos e de ataques químicos e físicos, bem como a perda não regulada de água e solutos, proteínas e componentes do plasma no organismo, fornecendo também proteção contra a radiação ultravioleta. Outras funções importantes desempenhadas pela pele são: homeostase térmica, suporte mecânico, secreção de substâncias pelas glândulas e atividade metabólica (PROKSCH E, BRANDNER JM, 2008; DARLENSKI et al., 2009; KENDALL et al., 2017).

A pele pode ser esquematicamente dividida em três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1). A camada mais interna é a hipoderme que consiste em tecido adiposo ou células de gordura com uma parte constituída de colágeno. A derme pode ser dividida em duas regiões distintas (derme papilar e a derme reticular), situa-se abaixo da epiderme e possui a função de fornecer apoio estrutural e nutricional à epiderme, composta por fibroblastos dérmicos, células imunes, fibras de colágeno e elásticas (KENDALL et al., 2017), vasos sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas, músculo eretor de pelo e glândulas sudoríparas (KHAVKIN; ELLIS, 2011).



**Figura 1.** Camadas da pele (adaptado de Khavkin, 2011).

A camada epidérmica é responsável pela cor da pele, textura e umidade, sendo composta pela junção dermo-epidérmica uma membrana basal sintetizada por queratinócitos basais e fibroblastos dérmicos que funciona como um suporte mecânico para a adesão da derme à epiderme e como uma barreira para produtos químicos (Figura 2). Esta é formada por 4 camadas (basal, espinhosa, granulosa e córnea).



**Figura 2.** Camadas da epiderme (colocação de hematoxilina e eosina, aumento de 40x).

A camada basal é composta de células-tronco epidérmicas e células transitoriamente amplificadoras delas derivadas. As células apresentam uma alta relação núcleo-citoplasmática e organelas celulares como mitocôndrias e filamentos de queratina (tonofilamentos) (MENON, 2002). Na camada espinhosa se encontra as células de Langerhans que são células apresentadoras de antígeno derivadas de medula óssea. Eles compõem 3% a 6% de todas as células da epiderme e seus dendrímeros captam antígenos depositados na pele (linfócitos T) para ativação da resposta imune (Figura 2) (KHAVKIN; ELLIS, 2011). As células dentro da camada granular perdem gradualmente organelas e torna-se mais compacta (LOSQUADRO, 2017); elas formam a camada epidérmica mais externa, o estrato córneo que é a camada mais externa da pele e que tem primeiro contato com o ambiente externo. É composto de queratinócitos achatados que perderam seus núcleos e organelas citoplasmáticas e são removidos gradualmente com a renovação epidérmica.

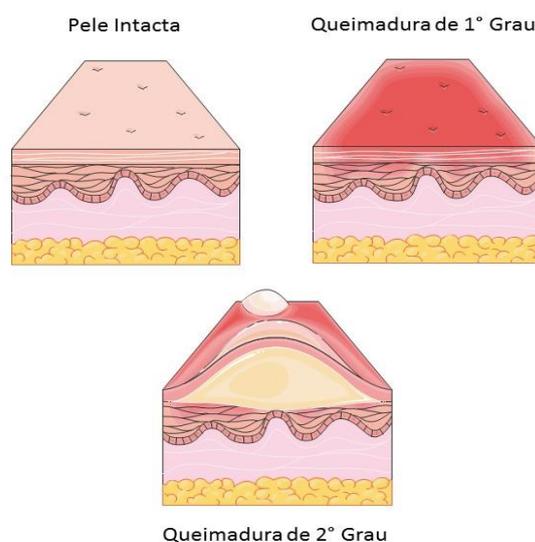
Quando o estrato córneo (EC) é removido de forma drástica por um agente externo aumenta-se a suscetibilidade a infecções e a captação percutânea de toxinas prejudiciais, e também, leva à incapacidade de manter a homeostase e a termorregulação do tecido (MICHELLE; SOUZA, 2019). Existem agentes xenobióticos capazes de provocar essa remoção parcial, quando provocados por um trauma com a temperatura. Esse trauma é chamado de queimadura.

### 3.2 Queimaduras

Uma queimadura é definida como uma lesão da pele ou outro tecido humano causado principalmente pelo calor. Ocorre quando algumas ou todas as células da pele ou de outros tecidos são destruídas por líquidos quentes (escaldões), sólidos quentes (queimaduras de contato), ou chamas. Também são consideradas como queimaduras as lesões por radiações, radioatividade e eletricidade, por fricção ou contato com produtos químicos. As mais comuns são acidentais, a maioria em domicílio, causadas por escaldões e incêndio (ELSOUS et al., 2016).

Com relação à causa, 43% dos casos ocorrem devido a incêndio ou chama aberta, 34% devido a escaldadura, 9% são resultantes do contato com objeto quente, 4% são relacionados à eletricidade, 3% a agentes químicos e 7% ocorrem devido a outras causas. O lugar mais comum de ocorrência foi o ambiente doméstico (73%), seguido pelo ambiente de trabalho (8%), rua ou estrada (5%), durante lazer (5%) e outros (9%) (BMJ, 2017).

As lesões por queimadura podem provocar respostas locais e sistêmicas dependendo do nível que elas atingem. Esses níveis podem ser classificados em queimaduras de 1 grau (quando se tem eritema envolvendo apenas a epiderme e são geralmente secas e dolorosas, normalmente causadas pelo sol), queimaduras de 2 grau (apresentando queimaduras superficiais de espessura parcial envolvendo a epiderme e a derme superior geralmente são úmidas e dolorosas, típicas de lesão por escaldadura e objetos quentes), queimaduras de 3 grau (envolve queimaduras de espessura total envolvendo a epiderme e a derme e lesões nos apêndices, sendo secas e insensíveis, normalmente causadas por fogo) e queimaduras de 4 grau (já envolvem o tecido subcutâneo subjacente, tendões ou ossos, na maioria das vezes causadas por lesão elétrica de alta voltagem) (Figura 3) (BMJ, 2017).



**Figura 3.** Ilustração dos níveis de queimaduras de 1 e 2 grau comparadas a pele intacta.

### 3.3 Composição lipídica da pele

As camadas da pele são caracterizadas pelo metabolismo lipídico ativo de sinalização e estruturais com um perfil muito distinto, sendo uma fonte de uma série de mediadores lipídicos bioativos, que são cruciais para a saúde da pele os quais mantêm a organização, a composição e barreira cutânea (SMEDEN et al., 2013; KENDALL et al., 2017).

Os queratinócitos epidérmicos diferenciam-se à medida que migram na direção do meio

externo, tornando-se eventualmente corneócitos. Estes são enriquecidos por diversas espécies de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, que compoem o estrato córneo (ELIAS et al., 2014) e podem ser classificados por 8 classes (*fatty acids, glycerolipids, glycerolphospholipid, shingolipids, sterol lipids, prenol lipids, saccharolipids e polyketides*). Lípideos derivados do sebo são encontrados na superfície da pele, essa mistura complexa de triacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos não esterificados, ésteres de cera, esqualeno e ésteres de colesterol oferecem fotoproteção e exercem atividades antimicrobianas, embora todo o seu papel ainda não seja totalmente compreendido eles podem influenciar drasticamente o estado da pele por diferentes mecanismos físico-químicos (formando um "elemento de sostem" para estabelecer a função de barreira da pele), bioquímicos (rede de sinalização) e uma função de microecologia (lipídios derivados da flora microbiana da pele) (JIA et al., 2018). Os lípidos de barreira representam cerca de 10% da massa do *estrato córneo* e consistem em cerca de 50% de ceramidas, 25% de colesterol e 15% de ácidos graxos não esterificados (WERTZ, 2000; FEINGOLD, 2007; SMEDEN et al., 2013).

Os ácidos graxos, tanto de cadeia curta como de cadeia longa de carbono, com diferentes graus de saturação tais como: saturados, monoinsaturados e polinsaturados (SMEDEN et al., 2013), são espécies importantes para manter a barreira da pele.

Na sua deficiência, há uma aparência anormal da membrana lipídica extracelular que é comparável com a característica de barreira prejudicada, que reflete a incapacidade de sintetizar essas famílias (KENDALL et al., 2017), promovendo assim o aumento da perda de água transepidermal (TWEL), alterando o equilíbrio homeostático da pele.

É importante ressaltar que foi demonstrado que queratinócitos epidérmicos têm ação do tipo desnaturase muito baixa, resultando em baixa capacidade de formar ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (CHAPKIN, 1988). Isso destaca a importância da incorporação de ácidos graxos de cadeia longa para a saúde da pele, além de contribuir para a integridade estrutural da pele, são conhecidos como metabolitos essenciais com funções celulares cruciais incluindo metabolismo energético, transdução de sinal, ativação enzimática, transporte transmembrana, migração e proliferação celular (por exemplo: fibroblastos) até a área danificada, desenvolvimento, diferenciação e apoptose (JIA et al., 2018) e também por mediar reações inflamatórias e imunológicas em tecidos como a pele, facilitando a regeneração e a cicatrização da região afetada.

A cicatrização das lesões epiteliais depende desse conjunto dinâmico de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, que envolve inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação, remodelação, síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como o colágeno, elastina e fibras reticulares (TAKEO; LEE;

ITO, 2015).

### 3.3.1 Tratamentos

As intervenções farmacológicas ao processo de cicatrização são, na maioria das vezes, concentradas em evitar a contaminação e desenvolvimento de uma infecção microbiana, evitar que o tecido apresente uma perda excessiva de água, utilizando materiais oclusivos e eliminar o excesso de exsudatos com materiais adsorventes. Os curativos são uma forma de tratamento de feridas cutâneas destinadas a favorecer e apoiar o processo de cicatrização. Contudo, algumas drogas naturais têm sido demonstradas benéficas em formulações para cicatrização de feridas (PEREIRA et al., 2014).

Na prática clínica, a dor é um dos principais sintomas de queimaduras e uma emergência que requer cuidados médicos (ZHANG et al., 2017). Os tratamentos ambulatoriais disponíveis estão relacionados com a limpeza da lesão e profilaxia antibiótica com sulfadiazina de prata de uso tópico 1%, mafenida tópica 11,2%, curativo impregnado de prata (BMJ, 2017) e também a pentoxifilina, derivado da metilxantina (anti-inflamatório e vasodilatador) usado via intraperitoneal, cuja aplicação aumenta mais ainda a dor do paciente (YÜCEL; CORUH; DENIZ, 2019).

Diversos fitoterápicos testados e usados no processo de cicatrização de queimaduras cutâneas mostram-se promissores (ANDREZA CANO; MARIA MÁRCIA; ÂNGELA LIMA, 2008). A *Aloe vera* (babosa) foi eficaz no tratamento de feridas cutâneas abertas em ratos diabéticos e normais (APARECIDA et al., 2009). O extrato alcoólico de flores de *Ixora coccinea* facilitou os fatores da cicatrização, como aumento da granulação, força de tensão e deposição de colágeno em feridas cutâneas abertas em ratos (GOTTRUP F, 1980). O uso tópico da solução de papaína a 2% também apresentou bons resultados em feridas cutâneas abertas em ratos (SANCHEZ NETO et al., 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que o uso tópico do extrato de *Passiflora edulis* promove aumento da proliferação fibroblástica e colagenização, melhor re-epitelização e diminuição da reação inflamatória em feridas cutâneas abertas em ratos (MARCHINI et al., 1988).

Uma das alternativas seria o uso do extrato hexânico obtido das sementes do cupuaçu, rico em ácidos graxos. O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) (Figura 4) é uma planta arbórea, típica da região amazônica brasileira, filogeneticamente próxima ao cacau (*Theobroma cacao* L.). Sua incidência natural está localizada em boa parte no estado do Pará, que representa o maior produtor e exportador da fruta (CALVAZARA; MULLER; KAHWAGE, 1984). O maior interesse industrial se concentra na polpa que envolve as sementes e é utilizada na fabricação de sucos, geleia e sorvete, sendo muito apreciado devido ao seu sabor característico. Cerca de 45%

da composição do fruto fresco é formada a partir da amêndoa das sementes, que podem ser utilizadas para produção de chocolate, enquanto a manteiga de cupuaçu tem sido usada como substituta da manteiga de cacau nos alimentos e também como ingrediente cosmético. A maioria das sementes são descartadas como rejeito industrial, sendo a minoria comercializada para indústria cosmética para utilização da porção lipídica em cosméticos de pele e cabelos.



**Figura 4.** Fruto de cupuaçu.

Dessa forma, seria interessante o desenvolvimento de um produto farmacêutico que proporcionasse maior segurança e exatidão na administração, permitindo que sua ação farmacológica seja direcionada a tecidos lesionados.

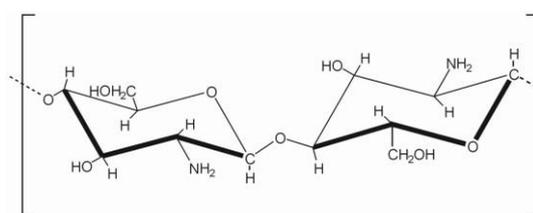
### *3.3.2 Nanocápsulas*

Nanocápsulas podem compor uma formulação inovadora incorporando extratos naturais solúveis em solventes orgânicos. São sistemas capazes de oferecer proteção aos extratos e retardar o aparecimento de reações de degradação, aumentando, assim, a estabilidade da formulação como um todo. Nanocápsulas formadas por deposição do polímero pré-formado são formulações já conhecidas e descritas na literatura. Sua obtenção é fácil e pode ser transposta a escala para produção industrial. Além disso, nanocápsulas podem adquirir características inovadoras e desejáveis pelo seu recobrimento por um outro polímero.

A quitosana (QS) é um polímero biodegradável, de origem natural, que tem demonstrado excelente compatibilidade biológica (BENDER et al., 2012). É facilmente obtida pela deacetilação da quitina, um polímero largamente encontrado na natureza (DODANE, V. & VILIVALAM, 1998). Em sua estrutura química possui grupamentos amina carregados positivamente (Figura 5) que podem interagir com os resíduos negativos da camada de muco, conferindo à QS propriedades mucoadesivas (MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, 2008).

A QS possui propriedade de atuar como promotor de absorção de fármacos. De fato,

encontram-se na literatura vários estudos a respeito da utilização da quitosana para este fim (ALONSO, M.J. & SANCHEZ, 2003; ZAMBITO, Y.; UCCELLO-BARRETTA, G.; ZAINO, C.; BALZANO, F.; DI COLO, 2006; FOGERT et al., 2007). Inicialmente, estas propriedades eram atribuídas à modulação das junções intercelulares do epitélio por possuir cargas positivas, acredita-se que a quitosana interaja com as membranas celulares, provocando reorganização estrutural das proteínas relacionadas às junções intercelulares, o que é seguido pela facilitação da permeação do fármaco pela rota intercelular (ARTURSSON et al., 1994; SCHIPPER; OLSSON, S. HOOGSTRAATE, J. A. DEBOER; VARUM, 1997). Dodane e colaboradores (DODANE; KHAN; MERWIN, 1999), utilizando céculas Caco-2, concluíram que a quitosana promove a permeação afetando ambas as rotas inter e intracelulares de maneira reversível, sem afetar a viabilidade celular.



**Figura 5.** Estrutura química da quitosana.

As propriedades mucoadesivas e de promoção da absorção de ativos farmacológicos seriam extremamente úteis no recobrimento de nanocápsulas, visto que as partículas ficariam aderidas ao local de ação liberando de forma sustentada os ativos farmacológicos presentes no extrato natural. Neste caso, o intervalo de administração poderia ser prolongado, o que, conseqüentemente, aumentaria a adesão do paciente à terapia (NANJAWADE; MANVI; MANJAPPA, 2007). Também tem-se sugerido o uso de quitosana em formulações empregadas para o tratamento de feridas e queimaduras devido ao seu caráter antimicrobiano. Este efeito tem sido atribuído a interação dos grupos amino catiônicos da quitosana com a superfície negativa de células de micro-organismos, resultando em alterações da permeabilidade celular (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010).

O desenvolvimento de um produto farmacêutico baseado em um extrato natural agrega valor aos produtos da biodiversidade do país e auxilia no encontro de um modelo de desenvolvimento econômico que favoreça o desenvolvimento regional e a conservação da sua biodiversidade, com influência direta na melhoria da qualidade de vida das populações e contribuindo ainda para o desenvolvimento científico e tecnológico.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O extrato hexânico das sementes de cupuaçu foi cedido e identificado pela professora Dra. Joyce Kelly do Rosário da Silva da Universidade Federal do Pará (UFPA). O ácido oleico (>95%), ácido margárico (>95%), metóxido de sódio (reagente grad, éter etílico) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes de grau HPLC metanol e n-hexano 95 % foram fornecidos pela J.T. Baker (Philisburg, Estados Unidos). Todas as análises foram realizadas com água ultrapurificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). Para o preparo das nanocápsulas poliméricas, a lecitina de soja e o polissorbato 80 foram adquiridos da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha) e Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. O Span 60 e o polímero policaprolactona foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Para o revestimento das nanocápsulas poliméricas foram utilizados o ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e quitosana de baixo peso molecular (PM 50-190 kDa, 75% de desacetilação, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Os solventes líquidos utilizados foram acetona e etanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Os estudos de mucoadesividade foram conduzidos com mucina tipo II (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil) e as correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda. São Paulo, Brasil). Para os estudos histológicos foram utilizados álcool absoluto (Honeywell, New Jersey, Estados Unidos), álcool 70% (Vetec, Rio de Janeiro), os corantes eosina e hematoxilina (Bio Express, São Paulo, Brasil), formaldeído (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil), parafina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e xilol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Os fibroblastos utilizados neste projeto derivam da derme e epiderme de pacientes saudáveis, foram produzidos como lotes-piloto e gentilmente cedidos pela empresa (CellSeq Solutions, Belo Horizonte/MG). O meio de cultura DMEM foi adquirido da Dulbecco's Modified Eagle's (Medium, Gibco, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, EUA), além de 1 % (v/v) de solução de penicilina/estreptomicina ( $1.000 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (Invitrogen, *Grand Island*, NY).

### 4.2 Processamento do material e obtenção do extrato hexânico das sementes de cupuaçu

As sementes do cupuaçu foram secas em estufa com ventilação a uma temperatura de 40°C por 24h. Posteriormente, foram moídas com o auxílio de um moinho de facas. Por fim, as

sementes foram submetidas á extração de metabolitos por equipamento *Sohxlet*, utilizando hexano como solvente extrator, por um periodo de 3h.

### **4.3 Esterificação para identificação e caracterização dos ácidos graxos presentes no extrato hexânico das sementes de cupuaçu**

Para a análise da composição química do extrato das sementes de cupuaçu em cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-MS), a amostra foi, primeiramente, submetida ao processo de esterificação. Para isso, foram pesados 100 mg do extrato de cupuaçu e adicionados 3 mL de uma solução de metóxido de sódio 3% em metanol. A mistura foi aquecida em banho-maria por 3 min e após o resfriamento foram adicionados 3 mL de uma solução de trifluoreto de boro a 10% em metanol. A reação foi aquecida novamente por mais 3 min e após o resfriamento foi transferida para um balão volumétrico contendo 1 mL de hexano e 2 mL de éter etílico. Após agitação o volume do balão de 50 mL foi aferido com água destilada (KINSELLA et al., 1977; KHAN; SCHEINMANN, 1978). Após 24h foi realizada a separação das fases, coletando a fração orgânica (rica em ésteres metílicos) para a análise por CG-MS. A composição química do extrato hexânico extraído das sementes de cupuaçu foi realizada por CG-MS após a esterificação. Assim, foi identificado o composto majoritário (ácido oleico), como demonstrado na Tabela 3.

### **4.5 Método analítico para quantificação do ácido oleico por CG-MS**

Para identificar e quantificar o componente majoritário do EXT (ácido oleico) foi necessário validar adequadamente o método de modo que apresentasse confiança. O instrumento utilizado foi o Shimadzu QP 2010 plus com auto-injetor AOC-20i (equipamento da central analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ - UnB)). A fase estacionária foi composta por uma coluna capilar de sílica Rtx 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). O método apresentou programação de temperatura de 60 a 240°C (variação de 3°C/min); gás de arraste: Hélio, velocidade do gás de arraste 32 cm/s (medida a 100°C); tipo de injeção *Splitless*, ionização por impacto eletrônico (70 eV), temperatura do injetor de 250°C, temperatura da fonte de íons e da linha de transferência de 200°C. Para a identificação dos compostos foi utilizada a comparação de seus espectros de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) e os respectivos índices de retenção com os espectros existentes nas bibliotecas do sistema (ADAMS, 2007; WILLEY, 2019). Os padrões de ácido margárico (padrão interno) e de ácido oleico passaram pelo mesmo processo de esterificação descrito no item 4.3.

O método analítico foi validado segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a resolução 166/2017 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). O método avaliou a linearidade, precisão e exatidão inter- e intra-dia, seletividade e limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).

#### 4.5.1 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de um método obter resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, em uma faixa específica (intervalo de trabalho baseado no nível do analito que se deseja estudar) (BRITO et al., 2003). Para isso, uma curva analítica foi construída a partir das diluições da solução estoque do padrão de ácido oleico em hexano na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Dessa solução estoque foram preparadas 3 soluções mães na concentração de 50 ppm e, posteriormente, realizadas as diluições da curva analítica nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 50 ppm. As amostras foram acondicionadas em *vials* de vidro de cor âmbar (com volume de 1,5 mL) com vedação de tampa. Além disso, para cada amostra foi adicionado o padrão interno em uma concentração conhecida para que a curva fosse plotada em relação a área do pico fornecida pelo equipamento, de forma que fosse calculado a razão da área do pico do analito pela área do pico do padrão interno, para redução do erro relativo do equipamento e da amostra (LIGIERO et al., 2009). A análise estatística dos dados foi realizada pelo método de regressão linear, obtendo-se uma reta no formato  $y = ax + b$ , onde (a) é o coeficiente angular e (b) é o coeficiente linear. As faixas de linearidade foram calculadas utilizando o coeficiente de correlação linear (r), seguindo os parâmetros aceitáveis sendo r<sup>2</sup> superior à 0,99 (BRASIL, 2003).

#### 4.5.2 Limite de detecção e quantificação

O Limite de Detecção (LD) representa a menor concentração que o analito pode ser detectado, mas nem sempre quantificado. Este pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$LD = (3 \times s) / S \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: s = desvio-padrão da resposta; S = coeficiente angular do gráfico de calibração da equação de primeiro grau.

O Limite de Quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra mas não necessariamente quantificado com um valor exato (BRITO et

al., 2003; FDA, 2015). O valor foi obtido através da concentração do analito que produziu um sinal dez vezes a razão sinal/ruído. Pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$LQ = (10 \times s) / S \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual: s = desvio-padrão da resposta; S = coeficiente angular do gráfico de calibração.

#### 4.5.3 Seletividade

A seletividade do método pode ser definida como a capacidade de determinação do analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias capazes de interferir na análise (BRASIL, 2003). Sua determinação foi realizada através do método de monitoramento seletivo de íons (método SIM) utilizando o padrão de fragmentação dos íons específicos do metil oleato (55,69,264 m/z) e do metil margarato (74,87,241 m/z), bem como o tempo de retenção de cada.

#### 4.5.4 Recuperação do fármaco

Inicialmente, foram extraídas áreas de aproximadamente 5,2 cm<sup>2</sup> da pele de suínos com auxílio de uma tesoura. Esses fragmentos foram colocados em frascos de vidro e foram acrescentadas 30 ppm da solução de ácido oleico em hexano.

Os resultados foram expressos em função da porcentagem do valor de concentração recuperado (Recuperação%), de acordo com a fórmula:

$$\text{Recuperação}\% = \left( \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde: *Concentração obtida* corresponde à concentração obtida na análise das mucosas e a *Concentração real* corresponde à concentração que foi determinada através da curva analítica.

#### 4.5.5 Precisão

O coeficiente de variação (CV%) foi utilizado para determinar a precisão do método que foi realizado com os analíticos da mesma amostra e com a mesma concentração com análises inter- e intra-dia. As triplicatas foram analisadas em relação aos resultados de recuperação nas concentrações de 10 , 30 e 50 pmm. Os resultados foram expressos através da formula:

$$CV\% = \left( \frac{\text{Desv.Padrão}}{\text{Conc.média}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde: *Desv.Padrão* representa a estimativa do desvio padrão da média dos resultados e *Conc.média* representa a média das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

As amostras de recuperação foram avaliadas em triplicatas quanto a sua precisão intra-dia em um mesmo dia considerando assim a sua repetibilidade. Para determinação da precisão inter-dia, foram realizados ensaios individuais de recuperação em três dias seguidos, ou seja, considerando-se a variação temporal sobre a precisão do método.

#### 4.5.6 Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados individuais das amostras analisadas em relação a um valor de referência. A exatidão foi verificada da mesma forma que a precisão para os resultados de recuperação, já descritas como análises inter- e intra-dia. Os resultados de exatidão foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Exatidão\%} = (\text{concentração mensurada} / \text{concentração teórica}) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

### 4.6 Obtenção das nanocápsulas poliméricas com extrato hexânico de cupuaçu

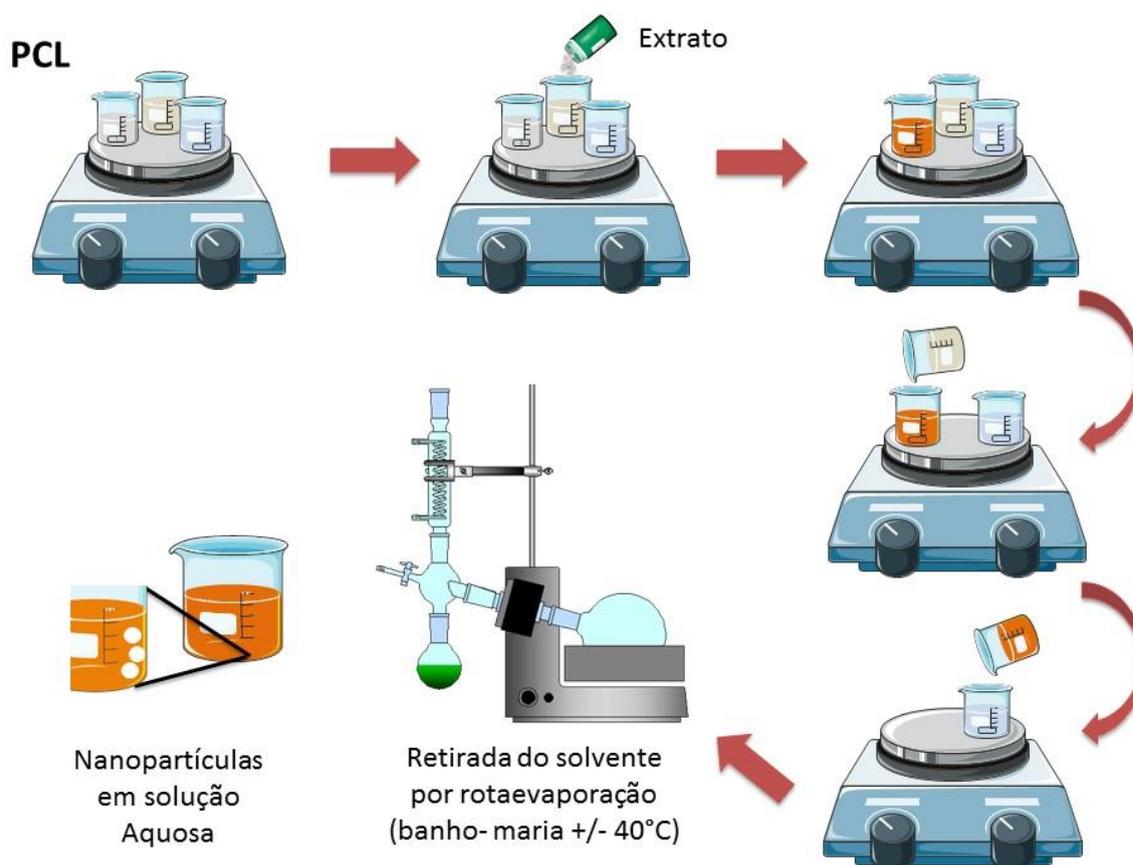
Para obtenção das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico com extrato hexânico de cupuaçu (NC-EXT) foi utilizado o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados segundo BENDER et al., 2012, com modificações. Primeiramente, preparou-se a fase acetônica (fase 1) composta de policaprolactona (0,1 g), span 60 (0,04 g), extrato hexânico de cupuaçu (100 mg), triglicerídeo caprílico (0,12 g) e acetona (25 mL). Logo depois, preparou-se a fase etanólica (fase 2) composta por lecitina (0,03 g) e 5 mL de etanol, e a fase aquosa (fase 3) contendo polissorbato 80 (0,08 g) e água ultrapurificada. O extrato hexânico de cupuaçu (100 mg) foi adicionado na Fase I (Figura 6).



**Figura 6.** Representação ilustrativa do desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas com fase orgânica composta de Policaprolactona, span 60, triglicerídeo caprílico, extrato e acetona, fase etanólica composta por lecitina e etanol,

e fase aquosa contendo polissorbato 80 e água Milli-Q. A Fase 2 foi adicionada na fase 1 e a mistura dessas foram adicionada a fase 3.

Para total solubilização da policaprolactona e do polissorbato 80, a fase 1 e a fase 3 foram levemente aquecidas e mantida sob agitação magnética. Separadamente, a fase 2 foi vertida na fase 1 e essa mistura foi adicionada a fase 3, formando então as nanocápsulas, como ilustrado na Figura 7. Para total remoção dos solventes orgânicos as nanocápsulas poliméricas passaram por rotaevaporação em banho maria a +/- 40°C por 20 minutos, restando ao final uma solução aquosa de 30 mL de nanocápsulas.



**Figura 7.** Obtenção das nanocápsulas poliméricas com núcleo lipídico.

As nanocápsulas poliméricas novamente foram preparadas, como descrito acima, entretanto, no final do processo foi gotejada uma solução de QS de baixo peso molecular a 3% para formação do revestimento, caracterizando assim as nanocápsulas com extrato de cupuaçu e com revestimento de quitosana (NC-EXT C/QS). As nanocápsulas poliméricas sem o extrato

hexânico (sem revestimento e com revestimento) foram produzidas para fins de comparação.

#### 4.6.1 Caracterização das nanocápsulas poliméricas

As nanocápsulas foram caracterizadas com a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, análise de distribuição de tamanho dos nanossistemas, IPD (índice de polidispersividade), potencial zeta, eficiência de encapsulação e morfologia, de acordo com as metodologias descritas à seguir.

#### 4.6.2 Diâmetro hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico dos nanocápsulas poliméricas contendo ou não o extrato, bem como o IPD foram analisados por espalhamento de luz dinâmica de 1 mL das amostras em um equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

#### 4.6.3 Potencial zeta

O potencial zeta das nanocápsulas poliméricas, contendo ou não o extrato, foi analisado por mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Antes da leitura, as amostras foram diluídas em solução aquosa de NaCl 10 mM para assegurar valores de condutividade de aproximadamente 2 mS cm<sup>-1</sup>.

#### 4.6.4 Eficiência de encapsulação

A Eficiência de Encapsulação (EE%) foi determinada analisando a quantidade de ácido oleico associada às nanocápsulas poliméricas. Para isso, utilizando viva-spin com tamanho de poro definido em 10 kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha).

A amostra foi centrifugada por 30 minutos a 2.700 G e posteriormente passou pelo processo de esterificação como já descrito no item 4.3. Para determinar o teor total, utilizou-se 100 µL de nanocápsulas que foram quebradas em metanol. Diante disso, para determinar a EE% foi utilizado o seguinte cálculo:

$$EE\% = \left( \frac{Teor\ total - Teor\ livre}{Teor\ total} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

onde: EE% representa a porcentagem de Acido Oleico retido às NP,  $Valor_{total}$  representa

#### 4.6.5 Morfologia das Nanocápsulas

A morfologia das nanocápsulas poliméricas, bem como a visualização da distribuição de tamanho, foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão (MET, modelo JEM 1011, do departamento de Biologia Celular – CEL do instituto de Biologia da Universidade de Brasília).

Para o preparo do experimento, as amostras foram diluídas (1:200) em grades de ouro recobertas de resina *formvar*, e deixadas secar em temperatura ambiente por 5 minutos. O excesso da formulação foi retirado com auxílio de papel filtro. Após essa etapa, adicionou-se 3 µL de contrastante acetato de uranila à 3% e deixou secar protegido da luz por mais 5 minutos em temperatura ambiente. Ao final, o excesso foi removido com papel filtro para análise no equipamento.

#### 4.6.6 Estabilidade Física das NC

A estabilidade física das NC-VAZIA S/QS, NC-VAZIA C/QS, NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS foi avaliada em temperatura ambiente e sob refrigeração. Através da avaliação quanto ao diâmetro da partícula, IPD, potencial zeta e pH.

### 4.7 Avaliação *in vitro* do potencial mucoadesivo das nanocápsulas

A mucoadesividade foi avaliada empregando a metodologia de avaliação da atração entre as nanopartículas de mucina e as nanocápsulas desenvolvidas, conforme descrito a seguir.

#### 4.7.1 Preparo das nanopartículas de mucina (NP-MCN)

Mucina suína do tipo III foi hidratada em água ultra pura, à temperatura de 4°C, *overnight*, na proporção de 1:10 (m/v) e, posteriormente, teve o pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1,0 M. A solução foi diluída em tampão HEPES, pH 7,4, a uma concentração final de mucina igual à 1% (m/v). A solução diluída foi sonicada em um sonicador de ponta (Sonics, EUA) até que as NP-MCN atingissem diâmetro hidrodinâmico menor que 500 nm. As análises referentes ao tamanho das partículas foram realizadas em triplicata no aparelho Zetasizer Nano Series.

#### 4.7.2 Capacidade mucoadesiva das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS frente às NP-MCN

Preparou-se uma mistura com proporção 1:1 (v/v) de NC-EXT S/QS ou NC-EXT C/QS e mucina (1%). As dispersões foram agitadas em vórtex (IKA, Alemanha) durante 1 minuto e

analisadas quanto ao tamanho e potencial zeta em tempos determinados (0, 3, 12, 15, 24 e 30 minutos) no aparelho Zetasizer Nano Series.

#### 4.8 Estudos de irritabilidade *in vitro*

O grau de irritabilidade das nanocápsulas foi avaliada *in vitro* utilizando a membrana corioalantoide (CAM) do ovo de galinha como modelo experimental. Os ovos de galinha embrionados foram cuidadosamente colocados na posição vertical sob um suporte, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima. Com o auxílio de uma tesoura foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca de modo a expor a CAM, a qual é caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos. Em seguida, 300 µL da formulação a ser testada foram aplicados diretamente sobre a CAM. Após 20 segundos da aplicação, as CAM foram lavadas com solução tampão fosfato isotônico, pH 7,4, para retirada da formulação, e foram analisadas visualmente durante 5 min.

Nesse tempo, foram analisados os sinais de irritação, como hiperemia, hemorragia e coagulação sanguínea, com base nos seguintes critérios:

- *Hiperemia*: relacionada com o aparecimento de capilares que não eram visíveis anteriormente, ou com o aumento da intensidade de cor daqueles que já eram visíveis;
- *Hemorragia*: relacionada com o claro extravasamento de sangue no meio;
- *Coagulação sanguínea*: é detectada pela agregação de plaquetas que formam uma espécie de mancha rosada sob a membrana, ou pela agregação de proteínas que confere à amostra um aspecto esbranquiçado.

Cada formulação foi testada em triplicata. Uma solução NaOH 1M utilizada como controle positivo de irritação e a própria solução tampão fosfato isotônica, pH 7,4, foi utilizada como controle negativo.

Uma pontuação em função do tempo de aparecimento de cada um dos sinais de irritação foi estabelecida (Tabela 1). A partir dessa pontuação, determinou-se a categoria em que se inseriu cada uma das formulações, segundo a classificação indicada na Tabela 2.

**Tabela 1.** Pontuação atribuída para o aparecimento de cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985).

Fenômeno	Tempo (t)		
	t < 30 s	30 s ≤ t ≤ 2 min	2 min < t ≤ 5 min
Hiperemia	5	3	1

Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

**Tabela 2.** Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) para os sinais de irritação segundo o teste de irritação in vitro em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985).

Pontuação atribuída à amostra	Classificação quanto ao grau de irritação
$P \leq 1$	Praticamente não irritante
$1 < P \leq 5$	Ligeiramente irritante
$5 < P \leq 9$	Moderadamente irritante
$P > 9$	Irritante

#### 4.9 Preparação das peles de suínos: modelo de pele danificada e modelo de pele queimada

Primeiramente, as orelhas dos suínos utilizadas nos estudos foram gentilmente cedidas pelo frigorífico Nippobras (Formosa, Goiás, Brasil). As orelhas foram obtidas imediatamente após o abate do animal e antes do processo de escalda. Com isso, a pele inteira foi removida da região externa da orelha com auxílio de um bisturi e, assim, foi separada de sua camada adiposa com o auxílio de uma tesoura.

O modelo de pele queimada foi desenvolvido utilizando uma chapa metálica que foi aquecida com auxílio de um maçarico. A temperatura da chapa ( $\pm 85^\circ\text{C}$ ) foi monitorada por meio de um termômetro a laser e o tempo foi controlado por um cronômetro. Após o aquecimento da chapa, a placa metálica foi aplicada na superfície superior da pele por 4, 7 e 10 segundos.

O modelo de pele danificada foi desenvolvido seguindo a técnica de *tape stripping* (MATOS et al., 2015). Em resumo, fragmentos de pele foram removidos das orelhas de suínos e fixados a um suporte com o estrato córneo voltado para cima. O estrato córneo foi removido usando 10, 20 e 30 pedaços de fitas adesivas.

#### 4.10 Análise de TEWL (taxa de evaporação de água da superfície da pele) para avaliação da função de barreira da pele para os modelos de pele danificadas e queimadas.

A função de barreira da pele foi avaliada pela medição da taxa de evaporação de água da superfície da pele TEWL (do inglês: Transepidermal Water Loss) da região em estudo ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}/\text{h}$ ) utilizando um *Tewameter*<sup>®</sup> dispositivo TM210 (Courage & Khazaka, Colônia, Alemanha) acoplada ao equipamento MPA 6 MULTIPROBE ADAPTER. Para tanto, foi aplicado uma sonda com dois sensores diretamente na pele, um medindo a umidade e a outra medindo a temperatura.

Essa taxa é calculada com base na Lei de Difusão descoberta por *Adolf Fick* em 1885:

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: A = superfície (m<sup>2</sup>), m = água transportada (g), t = tempo (h), D = constante de difusão (0,0877 g/m.h.mmHg), p = pressão de vapor da atmosfera (mmHg), x = distância entre a superfície da pele e o ponto de medição (m).

Os valores de TWEL foram analisados *in vitro*, antes e após cada procedimento, tanto para pele danificada como para pele queimada, a fim de verificar se condições utilizadas, indicaram alterações na função da barreira da pele. Os dados adquiridos foram integrados por um computador para calcular as pressões parciais do vapor de água nos dois sensores, os valores padrões para definição da condição da pele estão descritos na tabela abaixo:

**Quadro 1.** Valores de referência para análises de TEWL em relação a condição da pele.

Condição da pele	Muito Saudável	Saudável	Normal	Estressada	Crítica
TEWL (g/h/m <sup>2</sup> )	0 - 10	10 - 15	15 - 25	25 - 30	>30

Na Figura 8, observa-se o processo de análise de TWEL e das queimaduras em pele de porco.



**Figura 8.** Análise de TWEL antes e após queimadura com chapa aquecida a 85°C.

#### 4.11 Histologia dos modelos de pele danificada e queimada

Estudos histológicos foram conduzidos anteriormente aos demais estudos com a pele de suínos para avaliar a viabilidade após aplicação dos modelos de pele queimada e de pele

danificada descritos no item 4.9, para selecionar o modelo mais parecido com uma queimadura de segundo grau. Para isso, análises histológicas da pele intacta (sem tratamento) também foram conduzidas para comparações com os novos modelos propostos.

A pele foi coletada e vários fragmentos foram preparados:

- (i) pele danificada com 10, 20 e 30 fitas adesivas
- (ii) pele queimada nos tempos de 4, 7 e 10 segundos
- (iii) pele intacta

Todas as amostras foram imediatamente fixadas em formol tamponado a 4% por 24 h e armazenado em temperatura de 4°C. Uma vez fixadas, as amostras foram transferidas para etanol a 70%, permanecendo por 30 minutos. Após esse período as amostras foram transferidas para etanol a 90% por mais 30 minutos e, assim, esse mesmo procedimento foi realizado por mais 3 vezes para a solução etanólica 100%.

O etanol foi substituído por uma mistura de xilol:etanol (1:1) por 30 minutos e, posteriormente, a mistura de xilol:etanol foi substituída por xilol em 3 ciclos de 30 minutos cada um. Logo em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina. Os blocos de parafina resultantes foram cortados em micrótomo (3 µm) montado em lâminas de vidro e corado com hematoxilina e eosina. As análises histológicas das lâminas foram realizadas sob microscopia de luz.

#### **4.12 Estudos de permeação *in vitro* em pele queimada e intacta**

Estudos de permeação *in vitro* foram realizados pelo método de permeação de *Saarbrücken* modificado (ANGELO et al., 2016). Foram utilizadas quintuplicadas das peles da orelha de suínos preparadas conforme o item 4.9 em fragmentos correspondentes a área de 5,7 cm<sup>2</sup>. No meio doador foram colocados 2 mL das formulações (NC-EXT C/QS e o NC-EXT S/QS). A permeação foi realizada por 24 horas em estufa a 32°C. Posteriormente, a pele foi picotada e foram adicionados 5 mL de hexano, deixando por agitação magnética *overnight*.

Após esse processo, uma alíquota de 1 mL foi coletada e foi aplicado o processo de esterificação (descrito no item 4.3). Ao final, as amostras foram quantificados em CG-MS.

#### **4.13 Estudos *in vitro* de atividade celular**

Após a caracterização de atividade celular das formulações foram feitos testes de viabilidade celular, testes de migração, proliferação e expressão gênica, para avaliação do potencial de cicatrização em linhagem de fibroblastos humanos.

#### 4.13.1 Avaliação da viabilidade de células tratadas

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SFB), além de 1% (v/v) de solução de penicilina/estreptomicina ( $1.000\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$  e 95% de umidade. Para determinação da toxicidade e concentração de uso, realizou-se ensaio de viabilidade celular com a análise de metabolização celular do composto MTT brometo 3-[4, 5-dimethylthiazol- 2-yl]- 2,5-diphenyltetrazólio. Os grupos controle do experimento consistiram em poços com células e meio de cultura, representando 100% de viabilidade celular e meio de cultura acrescido da solução de MTT e dimetilsulfóxido (DMSO) (branco). Os grupos experimentais foram, solução de EXT diluído em etanol e as nanocápsulas sem revestimento de quitosana ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ). A leitura foi realizada com leitura óptica de 470 nm em leitor de microplacas (*Bio-Tec PowerWave*, HT, EUA) (MOSMANN, 1983).

#### 4.13.2 Ensaio de proliferação celular

A análise de proliferação foi feita inicialmente da mesma forma que a análise de viabilidade, usando o MTT. Para tanto,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em cada poço em placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicatas. Cada placa foi utilizada, para o teste de MTT, diferentes tempos, 1, 4 e 7 dias. Em paralelo, placas idênticas foram plaqueadas para o teste de contagem de núcleos, como forma de confirmar os dados obtidos no MTT. Em cada um dos tempos de tratamento citados anteriormente, as células de cada poço foram fixadas por 10 minutos em solução de formaldeído 4%, lavadas com PBS 1x e coradas com solução de iodeto de propídeo a  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , por 5 min. Após nova lavagem com PBS 1x, as placas foram levadas ao microscópio de fluorescência e os núcleos foram contados (PASETTI, 2009).

#### 4.13.3 Ensaio de migração celular

Para a realização do ensaio de migração, foram semeadas  $2,5 \times 10^5$  células em placas de 6 poços (TPP, EUA). Após atingirem a confluência total, foram feitos, com auxílio de ponteiros de 200  $\mu\text{l}$ , traços (riscos) paralelos. O meio foi então removido e cada poço foi lavado com PBS 1x, a fim de se remover as células que se soltaram da superfície da placa. Foi então adicionado novo meio em cada poço, sendo que no poço do controle positivo se adicionou 2 % de SFB ao meio basal; no poço do controle negativo, somente meio de cultura sem SFB, e nos poços reservados para as amostras, adicionou-se solução etanoica de EXT e as NP-EXT S/QS ao meio de cultura sem SFB. As culturas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e documentadas em intervalos

previamente estabelecidos (0, 24, 48 horas), através de foto documentação. A quantidade de células que invadiram a área inicialmente riscada foi contabilizada pelo programa *ImageJ*, sendo que a capacidade de migração celular foi mensurada em relação à atividade do composto para promover este efeito, quando comparado ao SFB ou sua ausência (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

#### 4.13.4 PCR em tempo real

Após as 48 h de tratamento das células para o ensaio de migração, o RNA total das células de cada condição foi isolado utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). Os poços onde foram cultivadas as células de cada grupo teve o meio retirado e 1 mL de Trizol adicionado. Após pipetagem sucessiva para promover a lise das células, o Trizol foi então adicionado a *ependorfs* DNA-RNase free de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio a cada tubo, que foi vigorosamente agitado. Após esse procedimento, incubou-se os tubos a temperatura ambiente por 2-3 minutos e realizou-se centrifugação por 15 minutos a 4 °C e 13000 rpm. A fase superior (aquosa) foi coletada e o RNA foi precipitado com adição de álcool isopropílico (Merck, ALE) por 10 minutos. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação a 4 °C e 13000 rpm por 10 minutos e lavagem com etanol 75% (Merck, ALE), seguida de centrifugação de 10 minutos a 4 °C e 7500 rpm. O RNA foi diluído em água ultra pura autoclavada. A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm em equipamento Nanodrop (Thermofisher, EUA). As proporções de absorbância 260/280 e 260/230 foram realizadas com o intuito de se avaliar a pureza das amostras. As amostras de RNA passaram por reação de transcrição utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, seguindo-se as instruções do fabricante. Resumindo, a transcrição reversa do RNA total isolado foi realizada utilizando 500 ng de RNA total de cada amostra, transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen, EUA) e Oligo dT (12-18) *primer* (Invitrogen, EUA) em presença de inibidores de Rnase (Rnase OUT, Invitrogen, EUA) em um volume final de 20 µL, sendo a ordem e as etapas de incubação realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante dos reagentes. As amplificações por qPCR foram realizadas em duplicatas.

#### 4.14 Análises estatísticas

Os dados quantitativos, de pelo menos, três replicatas estão representados nas Tabelas e Figuras como média ± desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism 6 v.3.00. O nível de significância estatística foi fixado como sendo  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química do extrato hexânico das sementes de cupuaçu

O ácido oleico foi identificado como composto majoritário do extrato hexânico de cupuaçu com 44,44% do total dos compostos, como pode ser visto na Tabela 3. O segundo componente majoritário foi identificado como sendo o ácido esteárico (27,75%) seguido do ácido palmítico (13,57%) com um total caracterizado de 99,36%. Com isso, utilizou-se o ácido oleico como marcador dos estudos de quantificação em CG-MS. Nessa caracterização foram verificados vários tipos de ácidos graxos e alguns composto não identificados.

**Tabela 3.** Composição química do extrato hexânico das sementes de cupuaçu, apresentando como composto majoritário o ácido oleico (18:1).

<b>COMPOSTO</b>	<b>(%)</b>
Ácido Mirístico	0,15
Ácido Palmítico	13,57
Ácido Linoleico	3,85
Ácido Oleico	<b>44,44</b>
Ácido Esteárico	27,75
Etil Oleato	0,28
Metil (11E) -11-icosenoate	0,38
Ácido Eicosanóico	7,85
Não identificado	0,13
Ácido Beênico	1,09
Não identificado	0,51
<b>Total identificado</b>	<b>99,36</b>

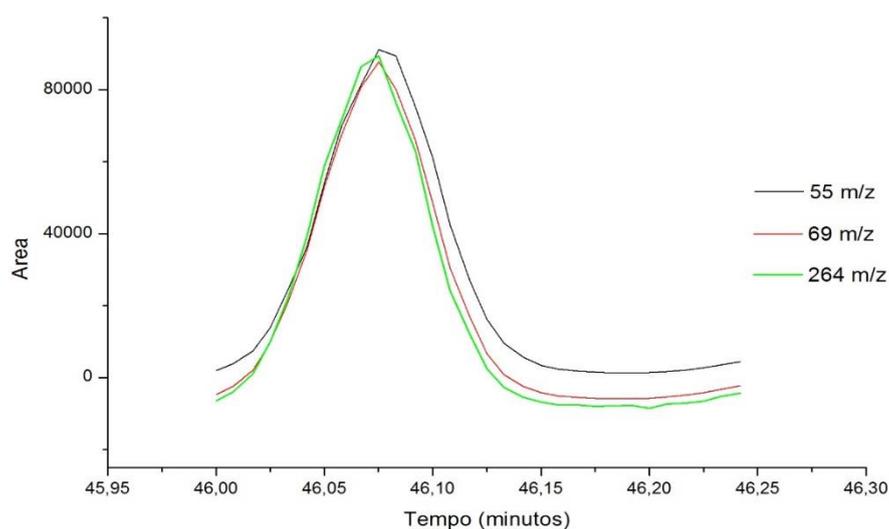
## 5.2 Validação de métodos analíticos para quantificação de ácido oleico por CG-MS

### 5.2.1 Separação e detecção dos analitos

O método mais popular para quantificação de ácidos graxos é a cromatografia gasosa devido a sua precisão e confiabilidade e também o relativo baixo custo. O ácido margárico foi definido como padrão interno para ser comparado com os ácidos graxos estudados pois este não coeluiu com nenhuma das substâncias presentes no extrato (tempo de retenção: 44,11- 44,41m), principalmente com o metil oleato (tempo de retenção foi de 46,4- 46,7 min.), utilizado como marcador para determinação indireta do componente majoritário, o ácido oléico.

### 5.2.2 Seletividade

A seletividade foi definida através do padrão de fragmentação dos íons primários e secundário do analito e do padrão interno, usando assim os dados de MIC/TIC/MC para o cálculo da área da curva. Também determinou-se o tempo específico de cada pico, assim a leitura ocorre apenas nos tempos selecionados do padrão interno (43- 43,3 m) e o Oleato de (46 – 46,25m).

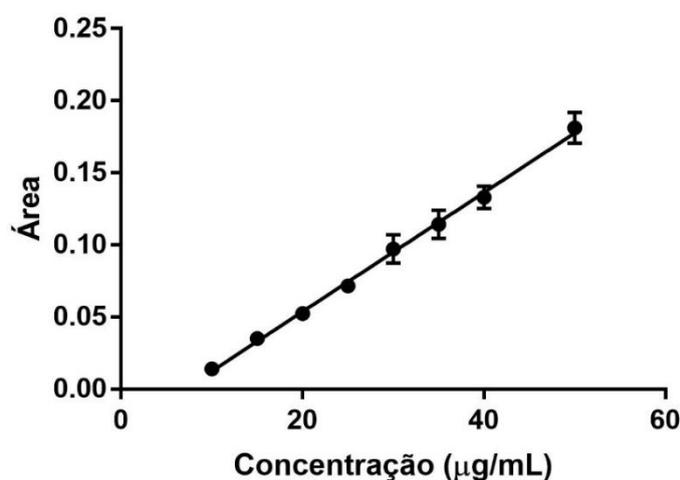


**Figura 9.** Representação gráfica dos padrões de fragmentação dos íons do oleato.

Na Figura 9, observa-se que os íons mantêm um padrão, assim demonstrando que os íons selecionados são específicos do composto, ao decorrer da corrida no equipamento apenas essas massas serão identificadas no tempo determinado de 46 m até 46,25 m.

### 5.2.3 Linearidade

O método que utilizou como solvente de diluição o hexano mostrou-se linear dentro da faixa de concentração de 5 a 50 ppm, como pode ser observado na Figura 10, com coeficiente de correlação linear (R) superior a 0,99 (ICH, 2005).



**Figura 10.** Curva analítica obtida pela análise do ácido oleico por GC/MS, utilizando como solvente o hexano, comprovando a linearidade do método. Equação da reta:  $y = 0,0041x + 0,0287$  e  $R^2 = 0,9978$ .

### 5.2.4 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão foram analisadas em relação à recuperação das amostras nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL. Os resultados são mostrados nas tabelas 4 e 5, mostrando que a exatidão das amostras interdia ficaram entre 98,61-108,12% e intradias entre 99,76 – 108,85%.

**Tabela 4.** Resultados de precisão e exatidão interdia em diferentes concentrações, VC% (coeficiente de variação).

Concentrações (µg/mL)	Precisão (VC%)	Exatidão (%)
10	17,27	108,12
30	4,48	107,17
50	2,38	98,61

**Tabela 5.** Resultados de precisão e exatidão intradias realizados em 2 dias diferentes, VC% (coeficiente de variação).

Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (VC%)	Exatidão (%)
10	4,81	108,59
30	5,10	106,20
50	2,12	101,33
Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (VC%)	Exatidão (%)
10	10,66	108,85
30	0,50	106,59
50	1,58	99,76

### 5.2.5 Limite de quantificação e detecção

Os valores de Limite de Detecção e Quantificação obtidos foram: 3,086  $\mu\text{g/mL}$  e 9,351  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

### 5.2.6 Recuperação

O estudo de recuperação do ácido oleico foi realizado para verificar a capacidade extratora em hexano, e validar o processo de extração, tornando adequada a metodologia de quantificação do ácido oleico nos estudos de penetração através da pele suína. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de recuperação, em pele intacta e pele queimada, extraídos com 5,0 mL em hexano.

**Tabela 6.** Porcentagem de recuperação da pele de suínos utilizando hexano como solvente extrator ( $n = 3$ ).

	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)
Pele queimada	30	99,77 - 100,97
Pele Intacta	30	95,6 - 123,00

Através da análise dos dados apresentados na Tabela 6, conclui-se que o processo de extração mostrou-se eficiente na quantificação nas concentrações analisadas, mesmo as amostras sendo passadas pela reação de esterificação.

## 5.3 Obtenção e caracterização da NP-QS

### 5.3.1 Tamanho de partículas e Potencial Zeta

As NC foram caracterizadas quando ao tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta. Essas foram analisadas antes da adição do extrato (NC-VAZIA) e em relação ao revestimento de quitosana no final do processo. As NC-VAZIA se mostraram com tamanho, PDI e potencial zeta adequado para tal processo. Quando o potencial zeta negativo ou positivo está mais elevado a repulsão das partículas são favorecidas e quando mais baixos pode ocorrer agregação ou floculação, assim a magnitude do potencial zeta indica a estabilidade do sistema coloidal (BHATTACHARJEE, 2016a). O potencial zeta das nanocápsulas sem o revestimento de quitosana é caracteristicamente negativo devido as cargas superficiais dos componentes da amostra, nesse sistema o potencial zeta se manteve aproximadamente em - 20 mV, mostrando uma estabilidade adequada. O revestimento das superfícies das nanocápsulas de policaprolactona pela QS foi confirmado pela mudança registrada no potencial zeta, com valores entre +33mV e +38, 5 mV, mostrando-se ideal para estabilidade das nanocápsulas. GUPTA et al., 2011 e BENDER et al., 2012 também obtiveram valores de potencial positivos quando as nanocápsulas foram revestidas. Mesmo após a encapsulação do extrato e o revestimento de quitosana as nanocápsulas tiveram um aumento no tamanho médio como demonstrado na Tabela 7, mas se mantendo ainda na escala nanométrica.

**Tabela 7.** Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP-EXT (n = 5).

	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>IPD</b>	<b>Potencial Zeta (+mV)</b>
<b>NP- Vazia s/ QS</b>	145,9 ± 3,65	0,117 ± 0,03	-20,2 ± 0,67
<b>NP- Vazia c/ QS</b>	257,2 ± 4,47	0,197 ± 0,02	33,0 ± 0,93
<b>NP- Cheia s/ QS</b>	278,3 ± 5,05	0,178 ± 0,02	-26,2 ± 0,80
<b>NP- Cheia c/ QS</b>	337,2 ± 2,15	0,269 ± 0,01	38,5 ± 0,89

O ideal para sistemas nanométricos é que o IPD se mantenha entre 0,1 á 0,4 (BHATTACHARJEE, 2016a), mantendo-se características monodispersas. Todas as nanocápsulas mantiveram valores de IPD adequados, mesmo após a adição do revestimento de quitosana que não apresentou grande alteração nos parâmetros analisados.

### 5.3.2 Eficiência de encapsulação (EE%)

A EE% foi determinada para as NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS, as duas nanocápsulas tiveram valores próximos devido ao modo de preparo ser o mesmo. O extrato hexânico de cupuaçu foi eficientemente incorporado em ambas nanocápsulas, pois mostraram eficiência de encapsulamento acima de 94%.

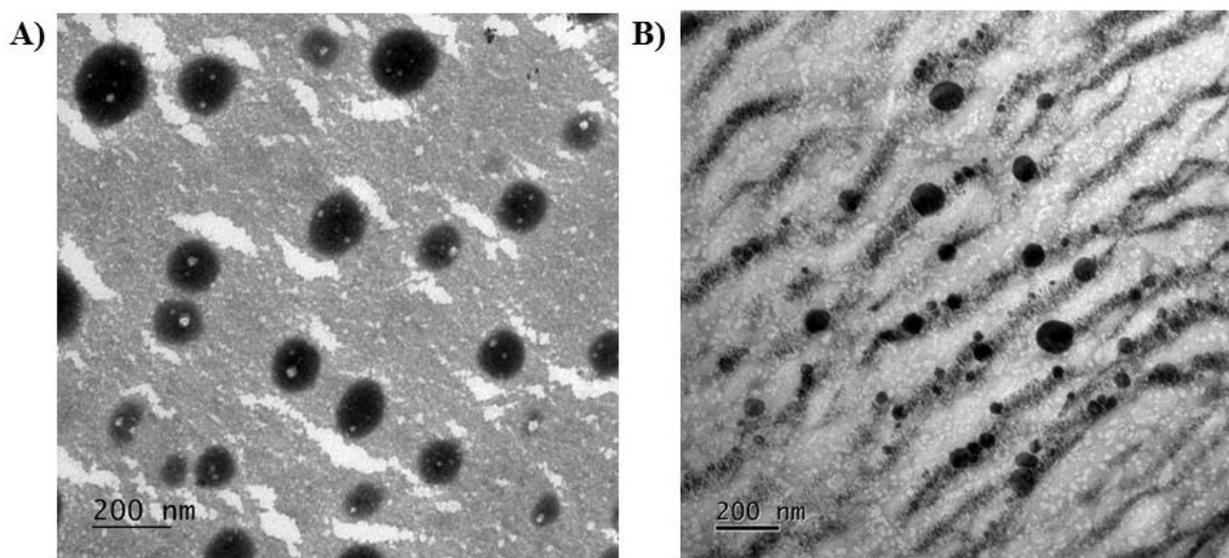
**Tabela 8.** Resultados de eficiência de encapsulação e rendimento das nanocápsulas com e sem revestimento de quitosana.

NP-EXT	Rendimento (%)	EE (%)
Sem quitosana	68,26	94,87
Com quitosana	78,91	94,76

As nanocápsulas apresentaram altas porcentagens de encapsulação e bom rendimento do processo, o que é excelente para entrega de substâncias lipofílicas na pele.

### 5.3.3 Morfologia das NC

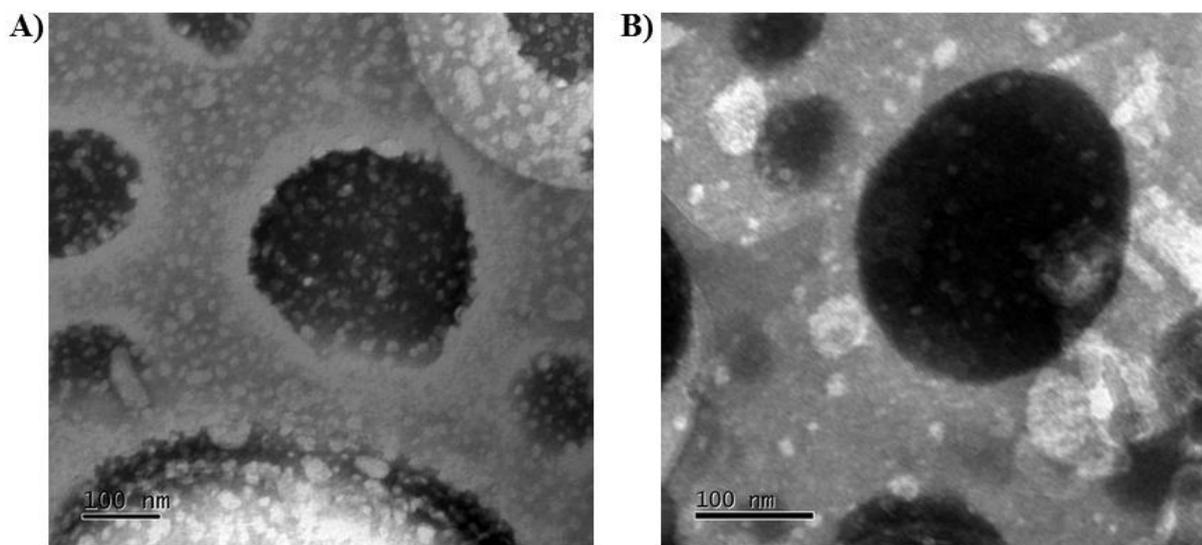
As NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS apresentaram formato esférico, conforme pode ser visualizado nas imagens obtidas por MET. Ainda, na Figura 11 podemos confirmar o tamanho médio das nanocápsulas vazias, medido anteriormente de maneira indireta por espalhamento de luz dinâmico. Além disso, as partículas não apresentaram grandes variações de tamanho, ou seja, apresentaram índice de polidispersividade relativamente baixo.



**Figura 11.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de Transmissão (MET), A) NP VAZIA S QS ( 15 K) , B) NP VAZIA C QS (20 K), confirmando o tamanho aproximado de 100 a 200 nm. Artefatos brancos na imagem são adquiridos durante o processamento da amostra por precipitação do contrastante acetato de uranila.

A superfície dessas nanopartículas, como observado, estava livre de poros ou rachaduras,

todas exibindo uma morfologia de superfície lisa como também demonstrado por (GUPTA et al., 2011). Na Figura 12 (15k) podemos observar visualmente o revestimento da quitosana como um alo esbranquiçado em volta das nanocápsulas, diferentemente na imagem B que manteve o tamanho médio aproximado mas não se observa o alo característico do revestimento.

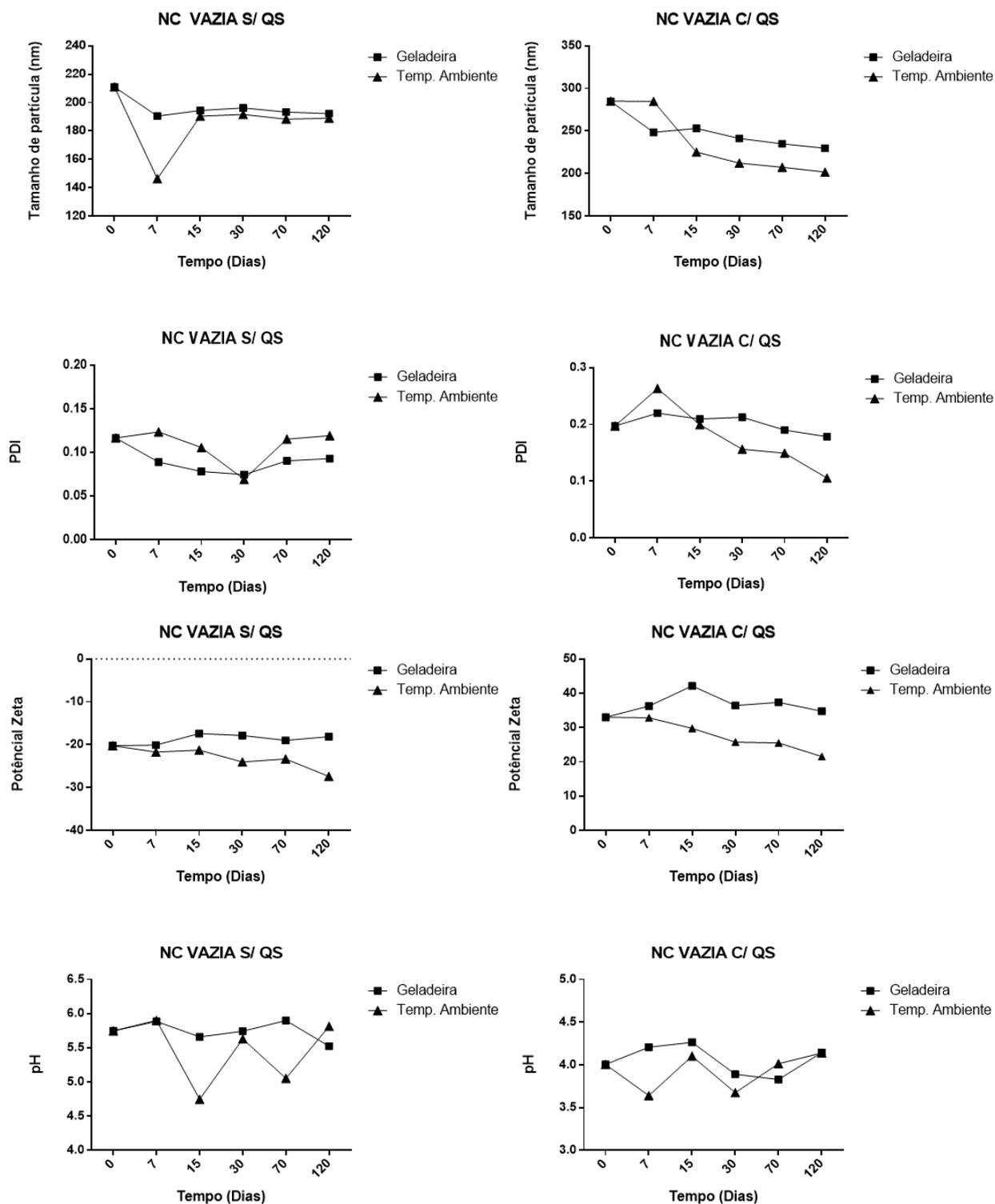


**Figura 12.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de Transmissão (MET), A) NP EXT C QS (15 K), B) NP EXT S QS (15 K). Artefatos brancos na imagem são adquiridos durante o processamento da amostra por precipitação do contrastante acetato de uranila.

As imagens obtidas visivelmente podem confirmar que não houve presença de agregados no sistema.

#### 5.3.4 Estabilidade Física das NC

As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados de estabilidade das formulações com e sem revestimento de quitosana em relação ao diâmetro hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV), PDI e pH, realizada em um período de 120 dias. Os resultados do potencial zeta das nanocápsulas sem revestimento são de caráter negativo e quando estas estão com revestimento de quitosana seu potencial zeta é caracteristicamente positivo.

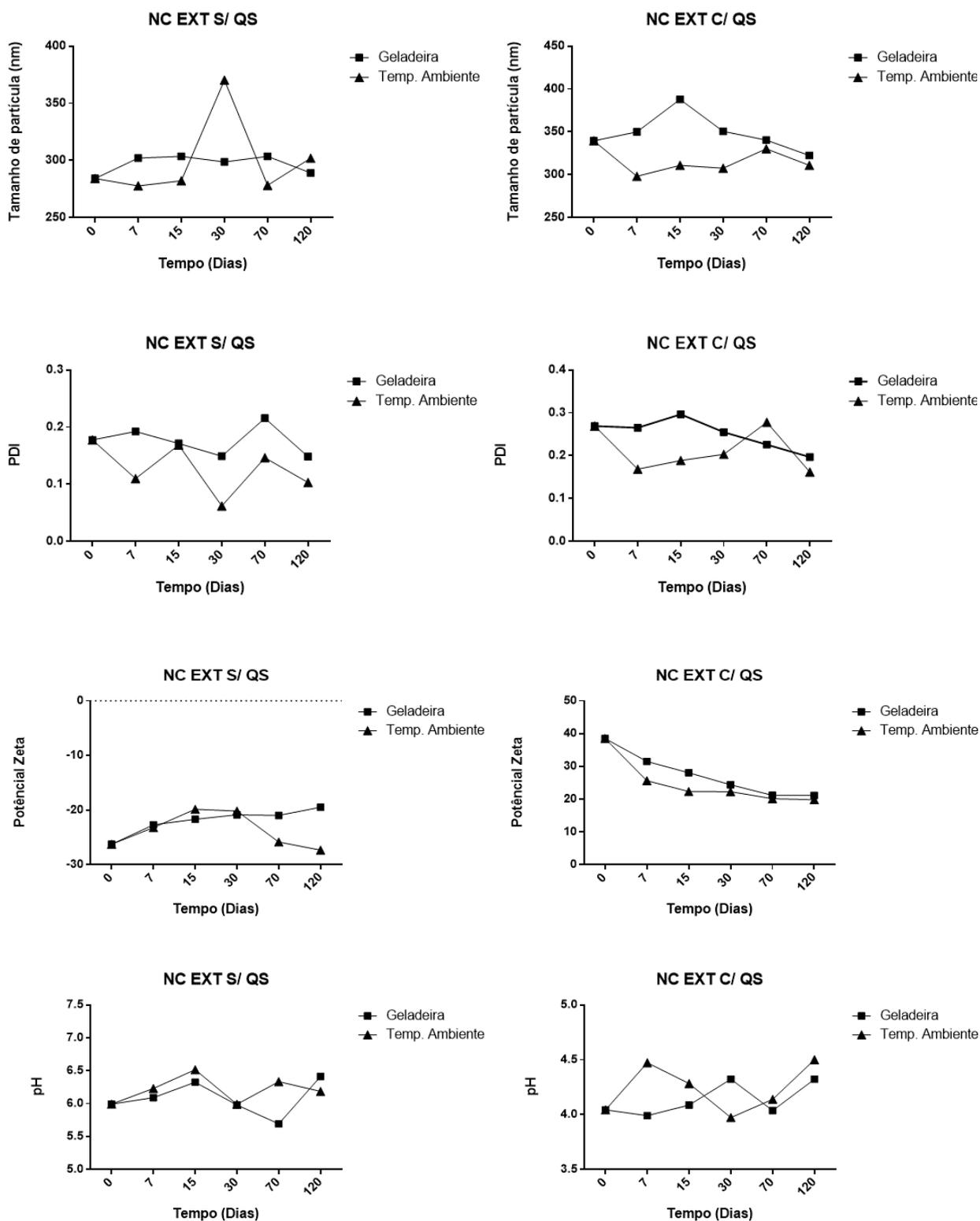


**Figura 13.** Estabilidade física das nanocápsulas vazias com e sem revestimento de quitosana, mostrando os resultados de tamanho de partícula (nm), PDI, potencial zeta e pH, com duração de 120 dias em temperatura ambiente e geladeira.

As NC-VAZIA S/QS apresentaram tamanho hidrodinâmico próximos a 200nm, PDI em torno de 0,1, potencial zeta não variou muito mantendo-se aproximadamente -20 mv e o pH variando entre 5,5 e 6,0, demonstrando que esse sistema se manteve estável durante 120 dias sob

refrigeração. Em comparação com as NC-VAZIA C/QS os resultados de tamanho e PDI foram parecidos e sem muita alteração, os valores de potencial zeta são positivos entre 30 - 40 mV devido ao revestimento e a alteração do pH se tornou mais baixo (4,0 – 4,5) após o revestimento. O potencial zeta pode mudar com a variação do pH e torna-se mais positivo e negativo em magnitude com pH baixo e alto, respectivamente (BHATTACHARJEE, 2016b). Esses sistemas em temperatura ambiente apresentaram se semelhantes quanto as condições analisadas e tendo mais variações do pH da formulação, o que pode estar relacionado com a constante mudança de temperatura do local.

As NC-EXT foram analisadas nas mesmas condições e comparadas quanto ao revestimento de quitosana. As NC EXT S/QS indicaram tamanho médio aproximadamente de 300 nm, tendo apenas um aumento do tamanho no dia 30 nas amostras armazenadas em temperatura ambiente. O IPD variou entre 0,05 – 0,2 em temperatura ambiente e se manteve próximo a 0,2 sob refrigeração. O potencial zeta e o pH foram semelhantes as nanocápsulas vazias. As NC-EXT C/QS indicaram tamanho (300 e 400nm) e IPD em torno de 0,2, mostrando estarem monodispersas durante o período analisado nas duas condições. O potencial zeta ficou acima de + 30 mV, garantido a estabilidade, pois as cargas superficiais desta magnitude evitam que haja aglomeração entre elas (CALVO et al., 1997). O pH dessa formulação manteve por volta de 4,0 e 4,5, parecidos com as NC-VAZIA C/QS.



**Figura 14.** Estabilidade física das nanocápsulas contendo extrato hexânico de cupuaçu com e sem revestimento de quitosana, mostrando os resultados de tamanho de partícula (nm), PDI, potencial zeta e pH, com duração de 120 dias em temperatura ambiente e geladeira.

Logo, observa-se que as formulações se apresentam estáveis tanto nas diferentes condições de temperatura quanto a carga de extrato adicionada e o revestimento utilizado. Para melhor controle dessas formulações pode ser indicado que o armazenamento em geladeira seja

mais adequado, diminuindo assim fatores externos não controláveis que podem desestabilizar a formulação.

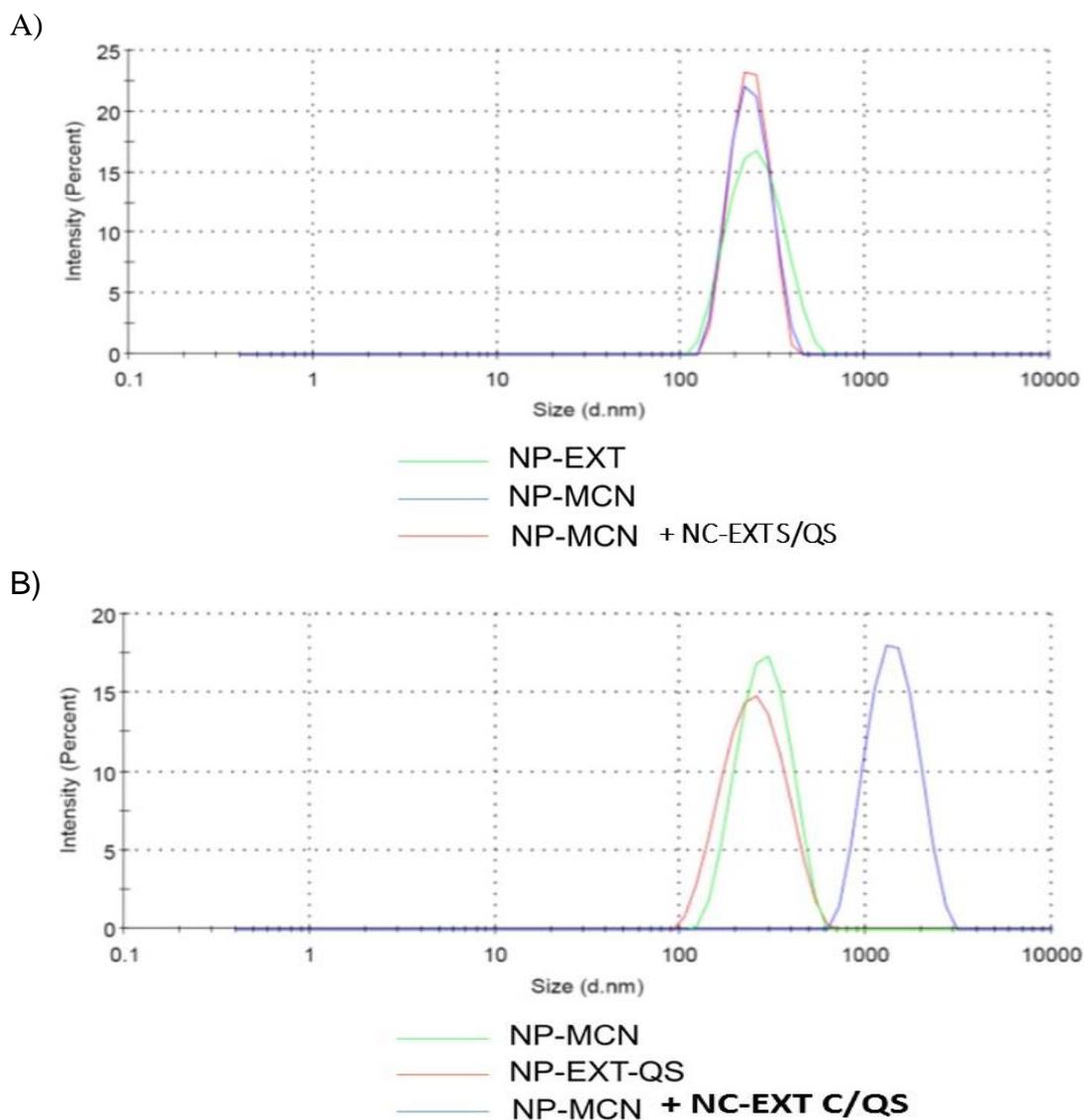
#### **5.4 Avaliação *in vitro* do potencial mucoadesivo das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS**

A mucoadesão consiste em uma interação que envolve uma forma farmacêutica e qualquer muco secretado por uma membrana (BOODUPALLI et al., 2010). A quitosana tem sido amplamente investigada no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos com liberação controlada. Particularmente, ela tem propriedades mucoadesivas devido à sua carga positiva que lhe confere interação eletrostática com a superfície mucosa de carga negativa, fazendo com que fique mais fácil a absorção de fármacos (JUNG; HAN, 2014; SHI et al., 2014; LUO et al., 2015).

Para a avaliação da mucoadesividade das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS obtidas neste estudo, essas partículas foram colocadas em contato com a NP-MCN, que é o principal componente do muco, e analisadas em relação as alterações em seu diâmetro hidrodinâmico.

A Figura 15 mostra a distribuição de tamanho das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS, que inicialmente apresentavam um diâmetro médio de  $241,03 \pm 2,95$  e  $212,1 \pm 1,55$ .

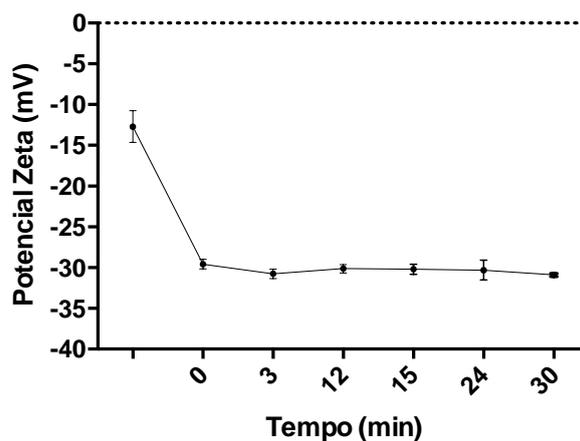
Após as NC-EXT C/QS serem misturadas a uma quantidade de NP-MCN de diâmetro médio igual a  $358,4 \pm 27,08$ , houve o surgimento de uma única população no sistema de partículas de diâmetro médio igual a  $1203,2 \pm 258,79$ . Por outro lado, as NC-EXT S/QS apresentaram um comportamento diferente. Quando estavam em contato com as NP-MCN, os tamanhos hidrodinâmicos das partículas mantiveram-se em torno de  $229,3 \pm 0,10$ .



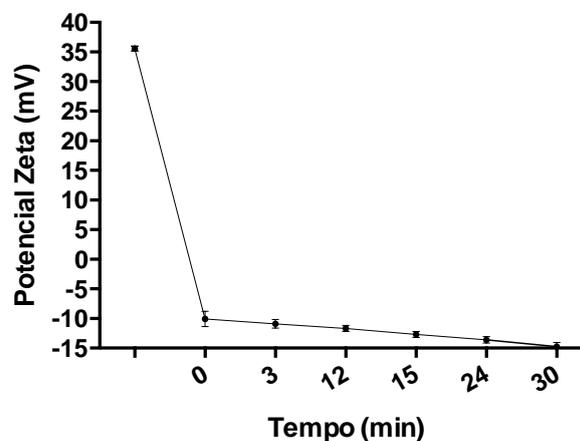
**Figura 15.** Determinação *in vitro* da mucoadesividades das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS (A) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico referente às amostras de NC-EXT S/QS, NP-MCN de incubadas com mucina. (B) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico referente às amostras de NC-EXT C/QS, NP-MCN e de NC-EXT C/QS incubadas com mucina.

A Figura 16 corrobora a ocorrência da ligação entre a mucina e as NC-EXT C/QS pelo aparecimento do súbito decaimento do potencial zeta positivo logo nos primeiros 3 min de incubação com as partículas de mucina. Observa-se ainda que os valores de carga positiva das NC-EXT C/QS ( $+35,6 \pm 0,42$ ) se aproximaram de zero antes dos 5 min de incubação. Como já era esperado, o mesmo perfil não foi observado para as NC-EXT S/QS sem o revestimento, demonstrando não ter características mucoadesivas.

A)



B)

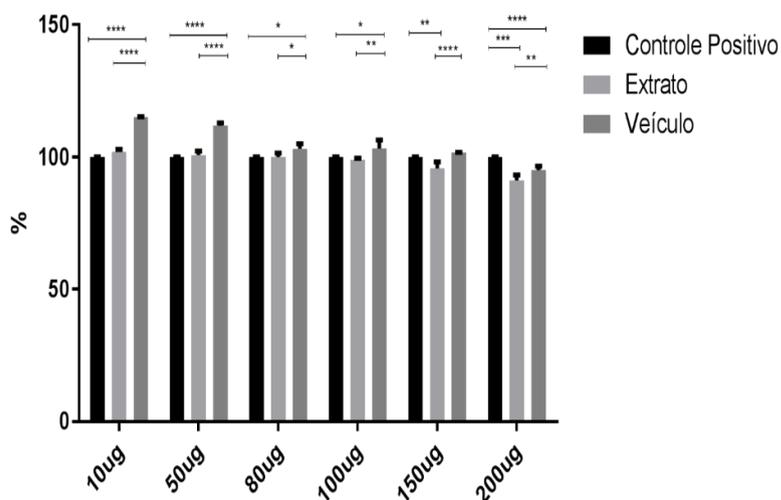


**Figura 16.** Determinação *in vitro* da mucoadesividades das NC-EXT S/QS e NC-EXT C/QS (A) Potencial zeta das NC-EXT S/QS em função do tempo de incubação com soluções de mucina e (B) Potencial zeta das NP-EXT C/QS em função do tempo de incubação com soluções de mucina.

A presença exclusiva desses agregados no sistema e o declínio no potencial zeta, demonstra, dessa forma, o potencial mucoadesivo das NC EXT C/QS.

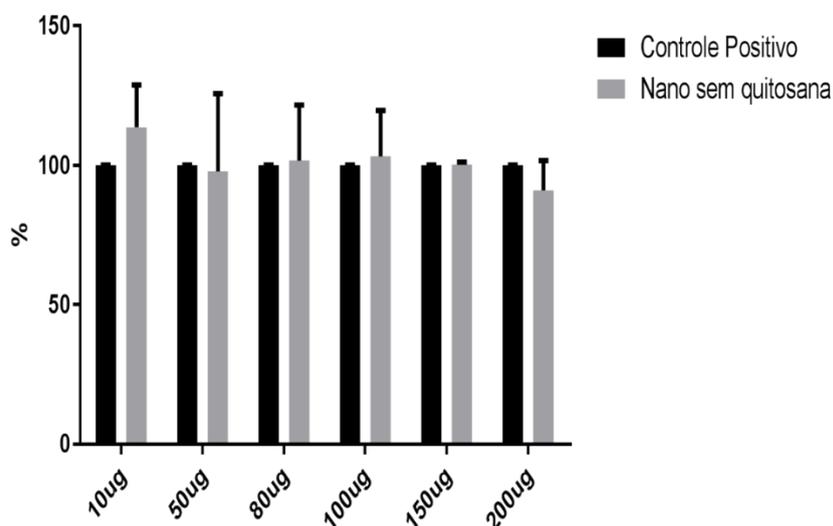
## 5.5 Avaliação da viabilidade das células tratadas com extrato livre ou nanoencapsulado

O ensaio de MTT foi realizado, visando verificar a condição de viabilidade das culturas celulares, após os tratamentos com a solução etanólica do extrato e seu veículo (solução etanol: hexano). O veículo foi utilizado para verificar se algum resíduo de hexano no extrato teria potencial tóxico para as células. Este ensaio foi realizado em várias diluições a fim de definir uma concentração em que as células se mantinham com viabilidade total.



**Figura 17.** Viabilidade dos fibroblastos na presença de tratamento com o extrato e o veículo, após 24h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two -way ANOVA e pós teste de turkey.

Os dados obtidos indicam que a viabilidade dos fibroblastos foi mantida após 24 h de incubação com extrato e com o veículo em praticamente todas as concentrações comparadas ao controle positivo (Figura 17). Assim para continuar os testes a concentração de 100ug foi escolhida por ser intermediária as concentrações utilizadas e apresentar boa viabilidade celular.



**Figura 18.** Viabilidade dos fibroblastos na presença de tratamento com NP-EXT S/QS, após 24h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Utilizou o teste two -way ANOVA e pós teste de turkey para análises estatísticas. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB.

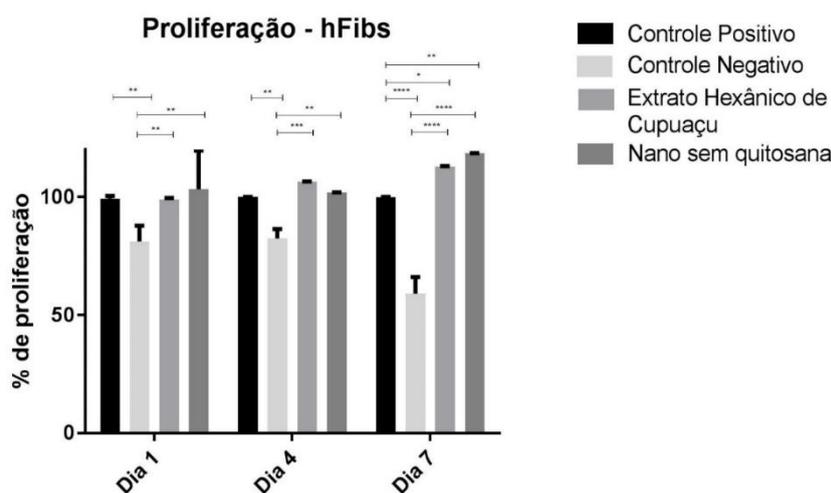
Junto a esta análise também verificou-se a viabilidade celular em relação as NC-EXT S/QS. Pode se observar que as nanocápsulas também mantiveram a viabilidade celular após 24h

(Figura 18) nas mesmas concentrações que foram utilizadas com o extrato. Dessa forma, definiu-se a concentração de 100 µg para prosseguir e padronizar os estudos.

## 5.6 Ensaio de proliferação celular

Este ensaio foi realizado a fim de verificar o potencial das formulações em promover a proliferação dos fibroblastos, este evento é essencial para regeneração celular. Após 4 dias de incubação o extrato e a NC-EXT S/QS apresentaram atividade semelhante ao controle positivo.

Em relação ao controle negativo, as formulações mostram maiores porcentagens de proliferação, sendo significativamente estatístico ( $P < 0.05$ ). No sétimo dia de incubação ambas as formulações apresentaram maior atividade de proliferação celular em relação ao controle positivo e negativo ( $P < 0.05$ ). Ainda podemos ver que as nanocápsulas obtiveram resultados superiores as outras formulações, isso pode estar relacionado a sua capacidade de proteção do ativo e uma liberação mais controlada (Figura 19).



**Figura 19.** Proliferação dos fibroblastos na presença de tratamento com o extrato hexânico de cupuaçu e as NP-EXT S/QS, após 7 de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Utilizou o teste two-way ANOVA e pós teste de turkey para análises estatísticas. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB.

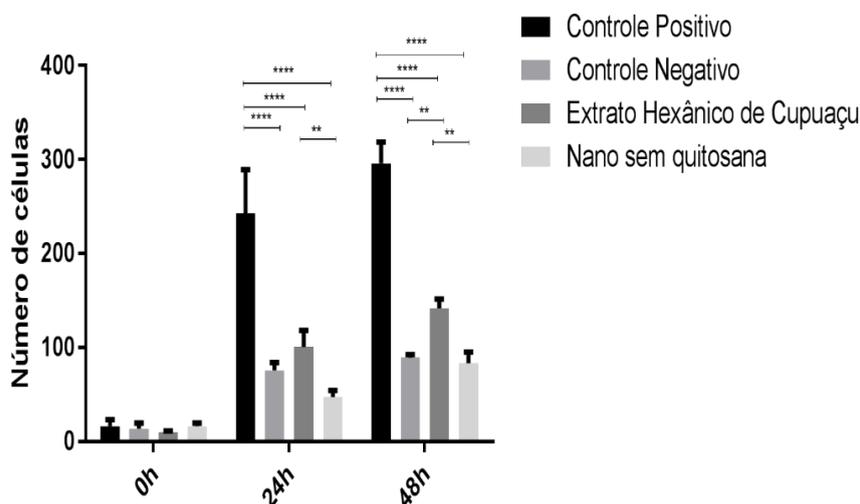
O extrato hexânico das sementes de cupuaçu apresentam uma variedade de ácidos graxos que são amplamente utilizados para o tratamento de feridas pela sua influência no processo cicatrização (FERREIRA et al., 2012). Além dos ácidos graxos constituintes do extrato, a composição das nanocápsulas apresentam triglicerídeo de ácido caprílico que atua como fonte nutricional, veículo e estabilizante da formulação e também auxilia na capacidade de regeneração dos tecidos (MAGALHÃES et al., 2008), bem como a lecitina que também proporciona

manutenção da hidratação dos tecidos e auxilia no reparo tecidual (EHRlich; HUNT, 1968). Todos esses fatores podem ser associados para utilização de uma formulação mais eficiente.

## 5.7 Ensaio de migração celular

A migração celular é um evento relevante ao processo de regeneração celular. O ensaio realizado mimetiza as condições de lesão tecidual, promovendo uma arranhadura no sistema de cultivo. Em resposta, as células tendem a ocupar a área aberta, assim como ocorre *in vivo*. Porém, diferentes tratamentos podem acelerar ou retardar a migração celular.

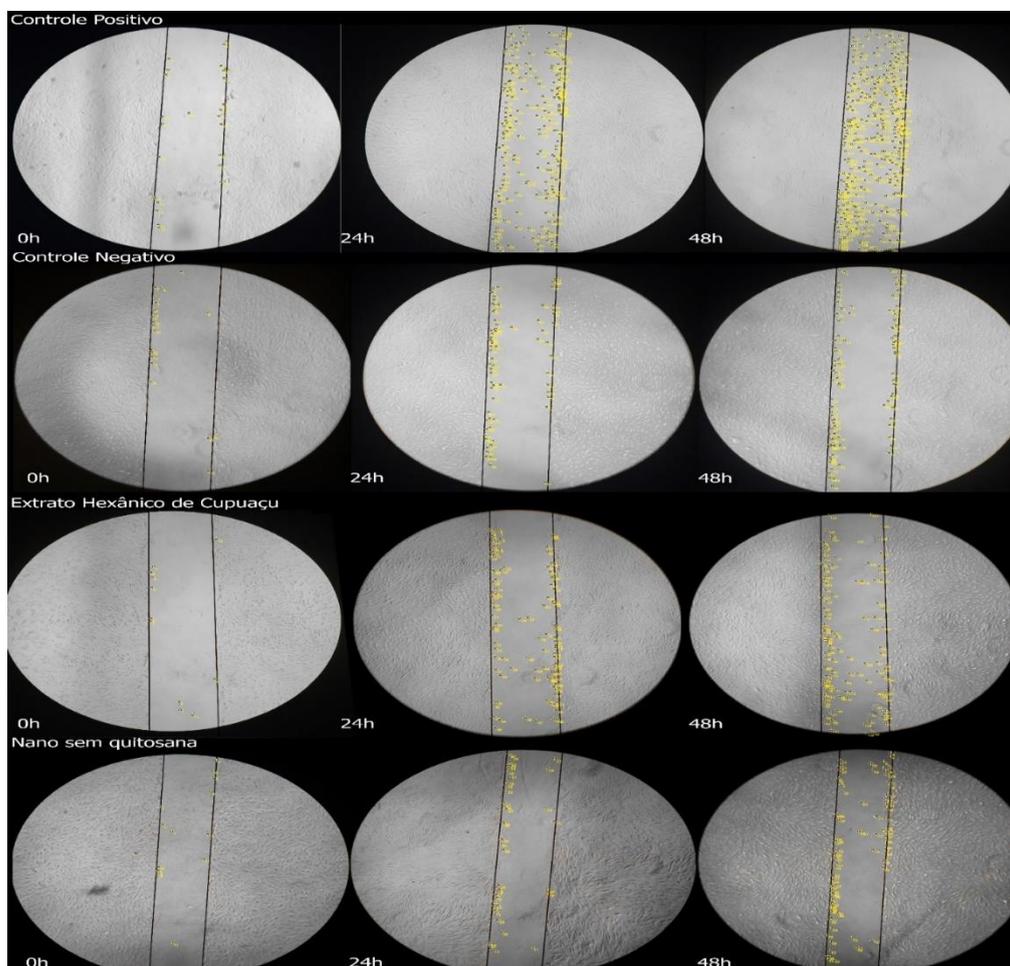
Após 24 horas de incubação podemos observar que as formulações e os controles aumentaram o número de células migradas. O controle positivo apresenta melhores resultados quando comparado aos outros grupos, este fator pode estar associado a composição do SFB que tem em sua composição grandes quantidades de ácidos graxos, fator de crescimento, aminoácidos e vitaminas, o que favorece o crescimento e a migração celular, sendo assim um meio ideal para as células. Essa comparação pode ser desvantajosa para os outros grupos que apresentam menores concentrações de ácidos graxos e não possui alguns componentes como aminoácido e vitaminas. Mesmo assim, as formulações ainda apresentaram potencial de migração celular. Após 48h pode ser observado um aumento da migração do grupo tratado com extrato em comparação ao grupo tratado com as nanocápsulas (Figura 20), este evento pode ser devido as nanocápsulas ter controle de liberação do ativo, enquanto o extrato seria liberado imediatamente.



**Figura 20.** Migração dos fibroblastos na presença de tratamento com o extrato hexânico de cupuaçu e as NC-EXT S/QS, após 48h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two-way ANOVA e pós teste de turkey. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB.

Na figura 21 podemos observar a quantidade de células migrando para o espaço arranhado,

com cada ponto amarelo representando uma célula. No tempo de 24h para 48h o controle negativo e o extrato não tiveram muita diferença na quantidade de células migradas. No caso das nanocápsulas em 24h se tem uma menor contagem de células, mas uma migração maior quando comparada a 48h. Assim podemos ver que ao longo do tempo as nanocápsulas estão liberando o ativo lentamente.



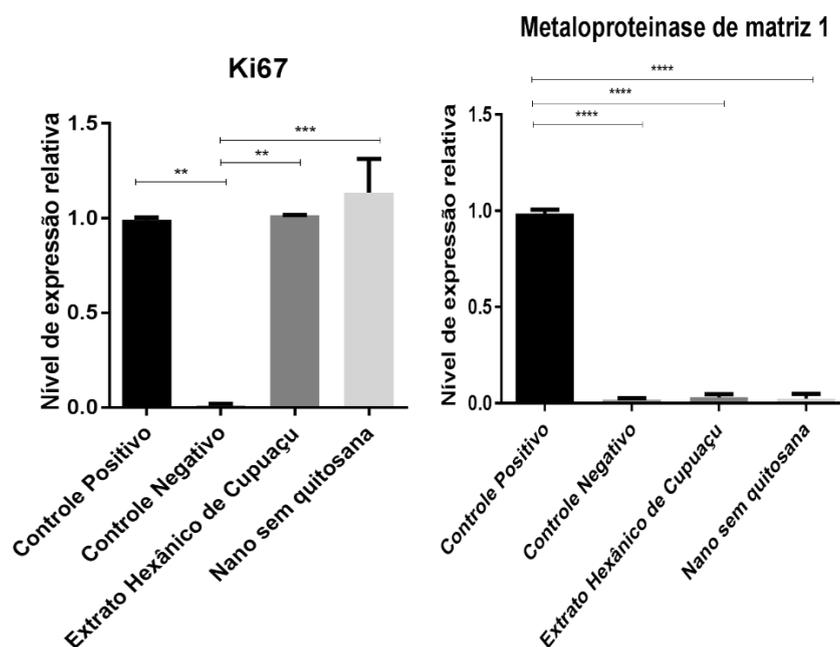
**Figura 21.** Ensaio de migração celular com os fibroblastos. Por meio do método de *scratch*. Foi avaliado o comportamento migratório dos Fibs tratados com os controles, o extrato hexânico de cupuaçu e as NC-EXT S/QS. Os pontos amarelos denotam a presença de célula em migração naquele ponto. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB.

## 5.8 PCR em tempo real

Este estudo avaliou a expressão gênica dos principais genes envolvidos no processo de regeneração tecidual. O Ki67 é um marcador importante nesta etapa pois ele está relacionado com a capacidade de restabelecer a barreira epitelial nas feridas cutâneas proliferando e migrando para área lesionada para garantir um suprimento adequado de células para fechar as feridas (PASTAR et al., 2014; GENBANK, 2019a). Os resultados indicaram que o gene Ki67 tem sua expressão muito aumentada quando as células são tratadas com as NC-EXT S/QS, sendo significativamente

diferente em relação ao controle negativo e similar ao controle positivo mesmo possuindo quantidades de componentes diferentes. Isso demonstra que a NC-EXT S/QS tem grande potencial em relação a proliferação celular (Figura 22).

A metaloproteinase de matriz 1 codifica proteínas envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, e está relacionado a reestruturação da matriz extracelular e a remodelação de tecidos (GENBANK, 2019b). Esse gene foi expresso apenas pelo controle positivo e pouco expresso pelas formulações.

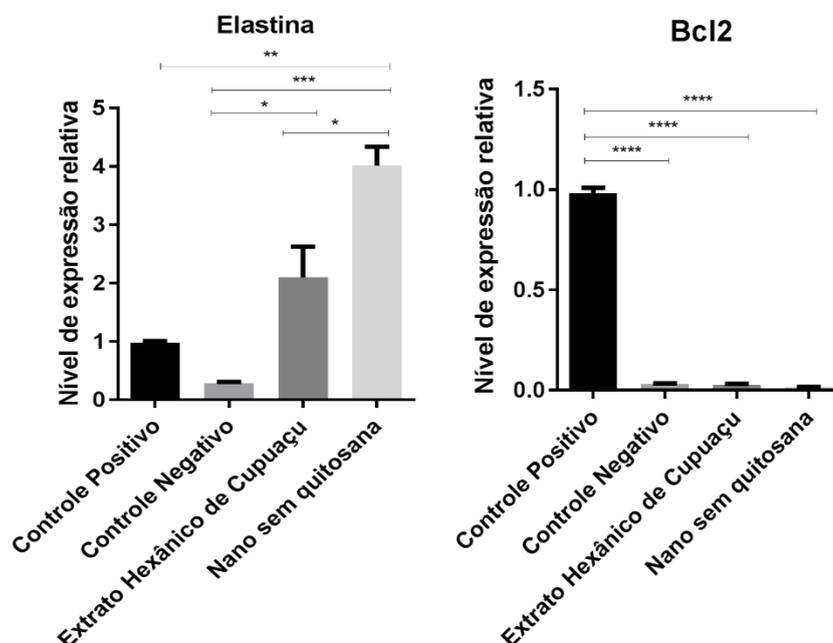


**Figura 22.** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes Ki67, MMP1, dos fibroblastos tratados com os controles, o extrato hexânico de cupuaçu e as NC-EXT S/QS. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB.

A elastina é uma proteína que está relacionada com a restauração da rede de fibras elásticas intacta e funcional que possui propriedades mecânicas e de sinalização conferindo elasticidade à pele. É muito importante para recuperar a função completa da pele após uma lesão (ALMINE; WISE; WEISS, 2012). Na Figura 23, foi demonstrado que esse gene foi expresso 4 vezes mais pela NP-EXT S/QS, comparado aos outros grupos (significativamente diferente). A elastina é formada a partir da proteína precursora tropoelastina em fibroblastos e podem ser classificadas como oxitanos (Fibras de elastina mais finas que são encontrados principalmente na derme papilar perpendicular à junção dermo-epidérmica) e elaunin (fibras mais grossas são mais horizontalmente orientada dentro da derme reticular) e ainda algumas fibras maiores de elastina são encontradas mais profundamente dentro da derme reticular (LOSQUADRO, 2017). Portanto, esses resultados podem indicar o potencial das nanocápsulas de atuarem também como uma

formulação cosmética, melhorando a reconstrução da fibra elástica e diminuindo a aparência das cicatrizes.

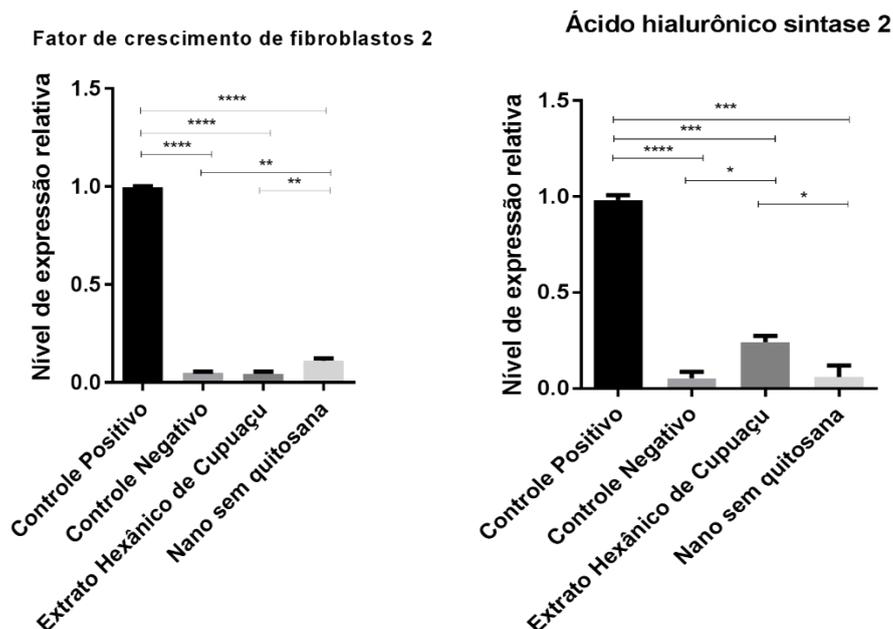
O Bcl2 é um gene associado a inibição de apoptose (GENBANK, 2019c). Sua expressão ocorreu apenas no controle positivo. Nesse caso não é interessante que sua expressão seja muito alta pois as células poderiam entrar em apoptose mais rápido.



**Figura 23.** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes, Elastina (ELN) e Bcl2, dos fibroblastos tratados com os controles, o extrato hexânico de cupuaçu e as NC-EXT S/QS. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two-way ANOVA e pós teste de turkey

O Fator de crescimento de fibroblasto 2 teve baixa expressão das formulações e do controle negativo quando com o controle positivo. Ainda assim as NP- EXT S/QS apresentaram uma maior expressão (significativamente diferente) em relação ao extrato e o controle negativo.

O Ácido hialurônico sintase 2 codifica um polissacarídeo constituinte da matriz extracelular, foi pouco expresso pelo grupo tratado com as nanocápsulas, mas apresentou uma maior expressão do extrato (significativamente diferente) comparado com o controle negativo, mostrando assim a capacidade de atuação dos ácidos graxos sobre a matriz extra celular.



**Figura 24.** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes, FGF2 (Fator de crescimento de fibroblasto 2) e Ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), dos fibroblastos tratados com o controle, o extrato hexânico de cupuaçu e as NC-EXT S/QS. O controle positivo são células tratadas com SFB e o controle negativo são as células sem suplementação de SFB. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste two -way ANOVA e pós teste de turkey.

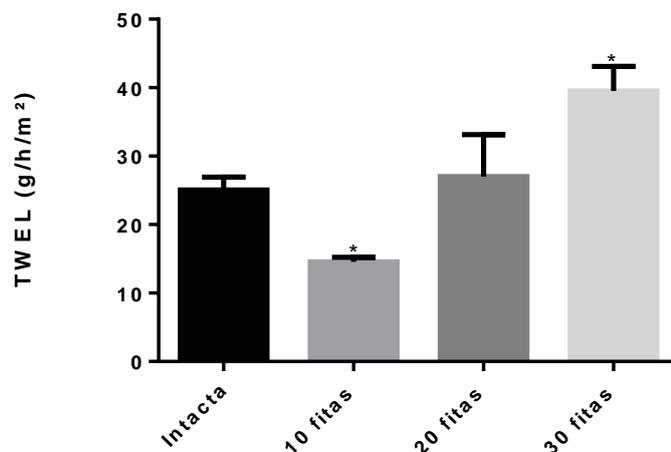
Esses resultados indicam que o extrato e a formulação apresentam atividade celular *in vitro* em linhagem celular de fibroblastos humanos, caracterizando assim seu potencial de ação como esperado.

## 5.9 Análise de TEWL (taxa de evaporação de água da superfície da pele) para avaliação da função de barreira da pele para os modelos de pele danificadas e queimadas.

A pele tem vários fatores de proteção que evita o ressecamento e também ajuda na manutenção da barreira de proteção, protegendo dos agentes externos prejudiciais ao organismo. O conteúdo aquoso do EC pode ser influenciado pela fisiologia cutânea e pelo ambiente e pode ser medido de forma não invasiva. Assim, para verificar a condição da pele após cada procedimento de danificação e queimadura foi medida a taxa de evaporação de água da superfície da pele, que aumenta quando essas estruturas de proteção são removidas.

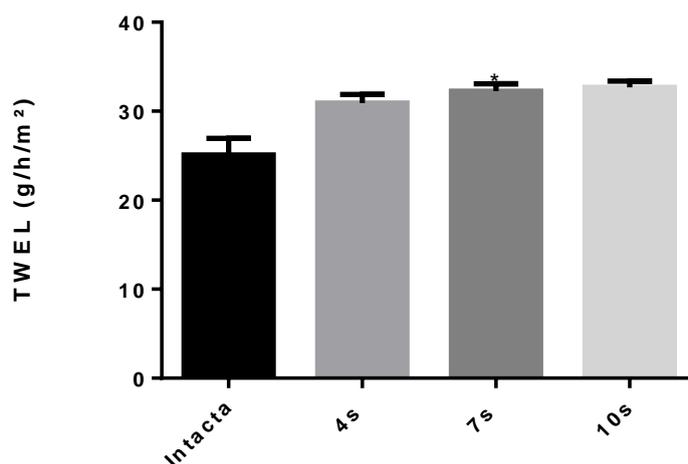
KALIA; PIROT; GUY, 1996 observou que somente após a remoção de aproximadamente 6-8 fitas *in vivo*, obteve aumentos mais acentuados de TEWL, como também foi observado nos estudos *in vitro* (figura 25) e que a remoção das camadas mais profundas o stratum comeum é necessário para causar uma significativa aumento em TEWL. Observou também um decaimento após as primeiras fitas removidas, esse comportamento se reproduziu em cada replicata. Apenas

após 30 fitas se tem um aumento significativo ( $P < 0.05$ ) e a pele entra em estado de crítico acima de  $40 \text{ g/h/m}^2$ .



**Figura 25.** Taxa de evaporação de água da superfície da pele (TWEL) verificada em pele intacta e após danificação com 10, 20 e 30 fitas de tape stripping. Diferenças estatísticas verificadas pelo t-test com dados não paramétricos.

Uma vez que as camadas mais internas (mais aquosas) foram atingidas, os valores de TWEL atingiram um valor quase constante, como observado nas queimaduras de 7 e 10 segundos. Apenas com 7 segundos de contato se teve diferença estatística em relação a pele intacta ( $P < 0.05$ ), mas com valores superiores a  $30 \text{ g/h/m}^2$  o que podemos transpor para uma condição de pele estressada a crítica de acordo com o Quadro 1. Todos os modelos apresentaram situação de estresse após a remoção das camadas superiores da pele (figura 26). As medições são claramente relacionadas a estruturas-chave e à principal função do EC.



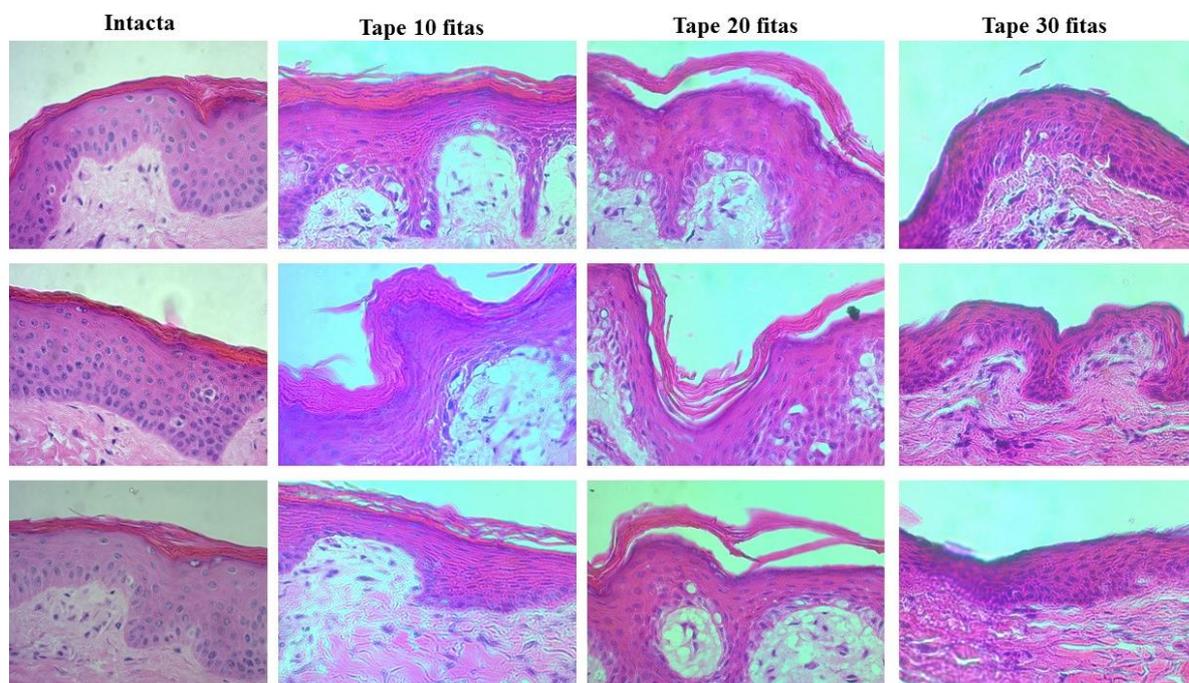
**Figura 26.** Taxa de evaporação de água da superfície da pele (TWEL) verificada em pele intacta e após queimadura com 4, 7 e 10 segundos realizados com chapa quente a  $85^\circ\text{C}$ . Diferenças estatísticas verificadas pelo t-test com dados não paramétricos.

A divergência dos estudos *in vitro* e *in vivo* é aparente apenas quando a maioria das barreiras são removidas e provavelmente resulta simplesmente pelo fato de que, em um caso (*in vivo*), o

EC ainda está em contato com um tecido biológico vivo, enquanto que, *in vitro*, o tecido subjacente é quase certamente menos hidratado (SEKKAT; KALIA; GUY, 2002). Em resumo, os resultados mostram que TEWL é uma importante técnica complementar para determinar a integridade da barreira do EC e para o exame do transporte de água. Definiu-se também como modelo de queimadura quando se utiliza 7 segundos de contato com chapa quente.

### 5.10 Histologia da pele danificada e queimada

Para definir um modelo de pele queimada *in vitro* a ser estudado, foi analisada a remoção das camadas da pele por meio de queimadura com chapa quente e pelo método de *tape stripping* que já é utilizado para retirar a camada do estrato córneo (EC) em alguns testes de quantificação de fármacos, através de imagens histológicas. As danificações foram realizadas antes da fixação do material. Como pode ser visto na Figura 27, Após a retirada de 10 fitas consecutivas as fibras do EC começam a ser desestruturadas superficialmente, mas ainda permanece com espessura parecida com a pele intacta. Com a retirada de 20 fitas parte do EC é removido, mas a parte mais interna (o estrato *conjunctum*) ainda permanece, podendo assim ainda dificultar a penetração de fármacos. Após 30 fitas o EC é praticamente todo removido.



**Figura 27.** Histologia dos modelos de pele danificados pelo método de tape stripping, fotos após 10 fitas, 20 fitas e 30 fitas.

Também foram avaliados diferentes níveis de queimadura, para avaliar o tempo e a temperatura da chapa em relação as perdas das camadas da pele.

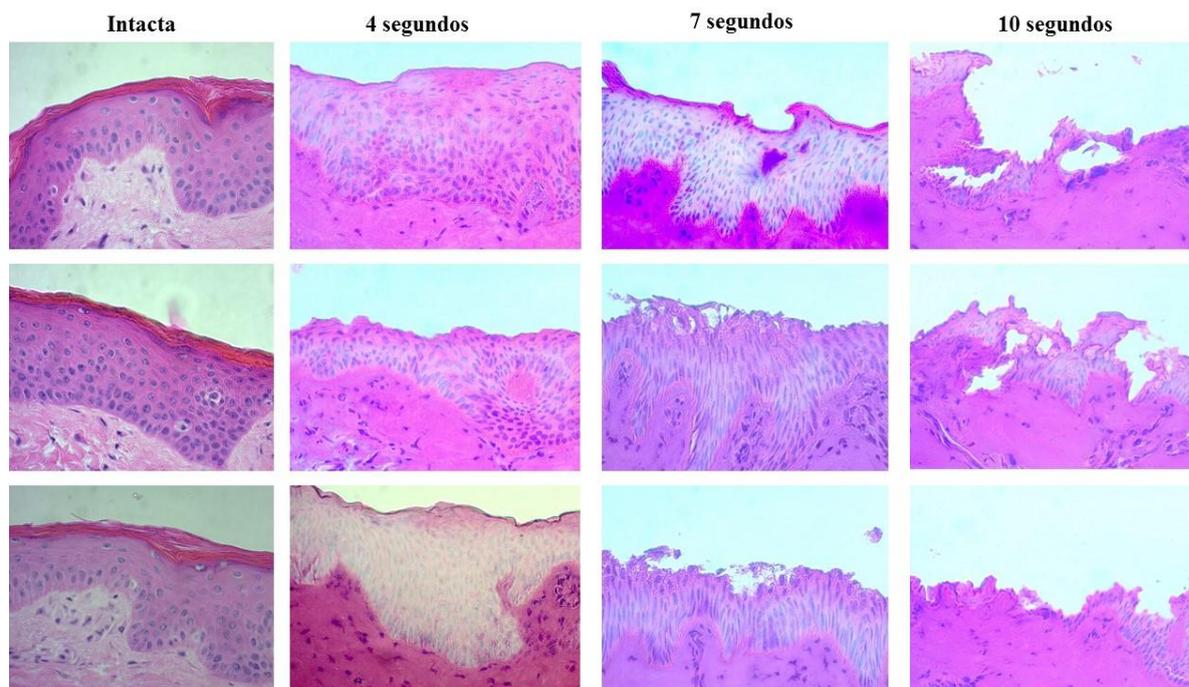
A padronização das queimaduras reduz os vieses de variabilidade das amostras e as características desejadas das queimaduras são alcançadas pela observação do tempo, da temperatura e a pressão de contato do objeto que determina a lesão (FRANCK et al., 2018).

Alguns estudos já utilizaram métodos com objetos quentes para a padronização de queimaduras em ratos, como por exemplo, utilização de um aparelho de solda com a ponta substituída por uma placa de alumínio, com temperatura aproximadamente 80° Celsius e tempo de exposição de 10 segundos para determinar queimaduras de 3° (VENTER; MONTE-ALTO-COSTA; MARQUES, 2015). Estudos *in vivo* provocam queimaduras em ratos pelo contato do aço, alumínio, latão, ferro de solda com força de peso variável entre 85g a 100g aquecidas em temperaturas entre 60 e 200° Celsius por dez segundos (ARDA et al., 2017).

Condições de tempo e temperatura também devem ser controladas *in vitro* para mimetizar o mais próximo de uma queimadura *in vivo*. Assim, métodos de penetração de fármacos podem ser realizados *in vitro* antecedendo os estudos em ratos, assim estudos *in vitro* de penetração em peles queimadas podem apresentar dados relevantes ao comitê de ética quanto a redução do número de animais.

Na Figura 26, podemos observar que após 4 segundos de queimadura tivemos toda a remoção do EC chegando atingir a superfície da epiderme, mostrando as células mais achatadas e despigmentadas quando comparadas com as células da epiderme mais arredondadas na pele intacta, assim, nesse modelo podemos reproduzir uma queimadura semelhante a 1°.

Quando o contato ocorreu por 7 segundos a camada superior foi totalmente removida e a epiderme começou a ser danificada diminuindo a sua espessura mas se limitando a camada epidérmica, as células epiteliais ficaram sem forma e definição, essa perda se aproxima de uma queimadura de 2°. Comparado com estudos de modelos de queimadura *in vivo* podemos observar semelhança da perda das camadas e também da formação de bolhas (vista durante o processamento do material para histologia) (ZHANG et al., 2017). Após 10 segundos de queimadura o modelo *in vitro* já demonstras perda total do EC e danificação da epiderme, atingindo a derme que também é afetada, esse modelo pode ser caracterizado por uma queimaduras de 3° e até mesmo podendo chegar a 4° se aumentar o tempo de contato.



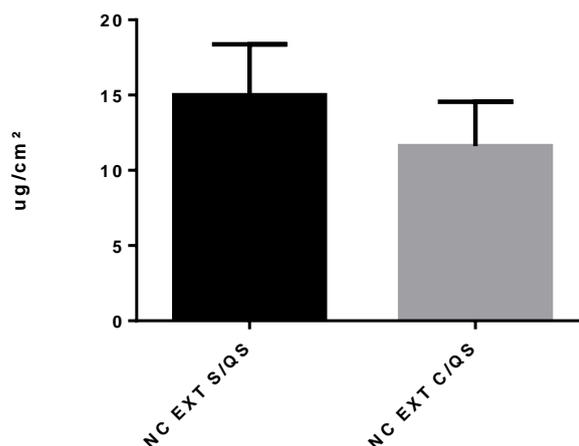
**Figura 28.** Histologia dos modelos de pele danificados com chapa quente a 85°C, após 4 segundos, 7 segundos, 10 segundos de contato.

Modelos *in vitro* de queimadura se tornam interessantes para análise de penetração de fármacos quando comparados a estudos em ratos que podem ser dolorosos, mesmo utilizando anestesia antes do ferimento, este tem recuperação lenta e com isso o animal tem que continuar o tratamento com medicamentos via oral que não aliviam totalmente a dor, pois em algumas análises de medição de dor eles ainda precisam ter o reflexo ativo (ZHANG et al., 2017).

O modelo com 7 segundos de contato a 85°C foi selecionado para prosseguir os estudos por estarem visualmente mais próximos a uma queimadura de 2°.

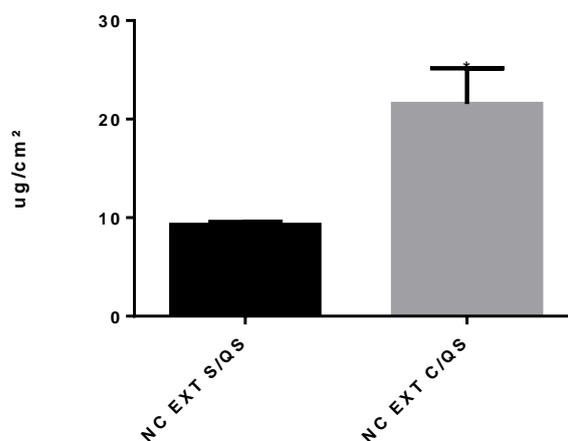
### **5.11 Estudos *in vitro* de penetração das NC contendo extrato hexânico de cupuaçu através da pele de suínos.**

Foi avaliada a penetração do ácido oleico a partir das NC EXT C/QS e NC EXT S/QS de em pele queimada e intacta. Os estudos de penetração *in vitro* foram realizados, por um período máximo de 24 horas. Quando comparada as duas nanocápsulas em pele queimada não houve diferença estatística ( $p > 0.05$ ). Com a remoção total do EC, a atividade da quitosana de desestruturar essa camada não foi acentuada. Assim, o revestimento da nanocápsula pode atuar como um protetor do extrato.



**Figura 29.** Quantidade penetrada em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ácido oleico em **pele queimada** após 24 horas com as NC EXT C/QS e NC EXT S/QS.

De acordo com a Figura 30, observa-se que a NC EXT C/QS foi a formulação que liberou maior quantidade de ácido oleico quando a estava pele intacta, sendo significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação a NC EXT S/QS, mostrando que, o revestimento de quitosana ajudou o ativo atravessar a barreira do EC aumentando assim a liberação do ácido oleico na epiderme.



**Figura 30.** Quantidade penetrada em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ácido oleico em **pele intacta** após 24 horas com as NC EXT C/QS e NC EXT S/QS ( $p > 0,05$ ). O símbolo \* representa diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, os resultados apresentados no presente trabalho são significativos no que se refere ao tratamento das queimaduras, mostrando que ocorreu a penetração do ativo tanto em pele queimada quanto em pele intacta quando encapsulados em uma nanocápsula que viabiliza a entrega do extrato. Devido a alta lipossolubilidade do ácido oleico a aplicação livre do extrato seria inviabilizada por ter baixa permeabilidade.

## 5.12 Estudos de irritabilidade *in vitro*

O HET-CAM vem sendo estudado desde 1988 como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos (WORTH, A. P & BALLS, 2001; WORTH, A. P. & CRONIN, 2001). Atualmente, em alguns países membros da Comunidade Europeia, por exemplo: França e Alemanha, o teste HET-CAM já é aceito pelas autoridades regulatórias como método usado no desenvolvimento de produtos cosméticos (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002).

As nanocápsulas contendo o extrato foram incorporadas a um gel de poloxamer e quitosana para verificar o potencial irritante, empregando-se uma modificação do método proposto por Luepke (1985), que é aceito hoje pela legislação europeia e indicado pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária, Brasil) para avaliação de segurança de produtos farmacêuticos e cosméticos (VINARDELL; GARCÍA, 2000). Apesar de se tratar de um método apenas qualitativo para medir o poder irritante de formulações e com baixa sensibilidade para classificar produtos moderadamente irritantes (DEBBASCH et al., 2005), este tipo de ensaio vem sendo bastante utilizado por ser de simples execução e uma alternativa para ensaios de irritação ocular *in vivo* utilizando coelhos, bastante condenado atualmente pela comunidade científica.

Como evidenciado na Figura 28, as NC-EXT C/QS quando incorporada ao gel apresentou-se ligeiramente irritante segundo a metodologia proposta, por não causar nenhum tipo de hemorragia ou coagulação após 5 min de contato com a CAM. A única alteração que se observou após uma das três aplicações foi uma leve hiperemia após 30 s de contato com a CAM. Acredita-se que esta leve hiperemia seja devido ao pH da formulação aproximadamente 6, o que, no entanto, não compromete o seu uso *in vivo*. As NC-EXT S/QS também incorporadas ao gel, foi classificada como não irritante.

	20s	2min	5min	Índice de Irritabilidade
Controle (+)				11,80
Controle (-)				0,07
GEL NP EXT SEM QS				0,07
GEL NP EXT COM QS				2,29

**Figura 31.** HETCAN com a Formulação em Gel com nanopartículas de extrato hexânico de cupuaçu com revestimento de quitosana e sem revestimento de quitosana, as imagens são representadas no tempo de 20 segundos, 2 minutos e 5 minutos. No controle positivo (NaOH 1M) observa-se hemorragias e hiperemia, no controle negativo com soro fisiológico não se observa nenhum fenômeno que caracterize irritabilidade. Nas formulações NC EXT C/QS observa-se uma leve hiperemia e na formulação sem quitosana não observou nenhuma mudança.

## 6. CONCLUSÃO

Um métodos analíticos para doseamento do ácido oleico por CG-MS, bem como o método de recuperação do fármaco em pele suína queimada, foi validado adequadamente, assegurando a confiabilidade analítica de todos os resultados posteriores. As nanocápsulas de policaprolactona contendo extrato hexânico de cupuaçu com e sem revestimento de quitosana desenvolvidas neste trabalho apresentaram-se como um sistema de entrega muito promissor para a terapia tópica em pele queimada, pois foi capaz de promover a entrega de um extrato sem problemas de sensibilização da pele. As nanocápsulas se apresentaram estáveis por um período de 120 dias tanto em geladaria quanto em temperatura ambiente. Ademais, esta formulação não contém solvente orgânico em sua composição, o que favorece o uso prolongado. Um modelo de pele queimada in vitro semelhante a uma queimadura de 2º foi desenvolvido a fim de avaliar a penetração do extrato encapsulado. As formulações desenvolvidas mostraram-se promissoras quanto a proliferação, migração e regeneração celular e apresentaram potencial de atuarem também como uma formulação cosmética, melhorando a reconstrução da fibra elástica e diminuindo a aparência das cicatrizes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. ed. ed. [s.l: s.n.]

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC Nº 166/2017. v. 2017, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>.

ALMINE, J. F.; WISE, S. G.; WEISS, A. S. Elastin signaling in wound repair. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 96, n. 3, p. 248–257, 2012.

ALONSO, M.J. & SANCHEZ, A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. **J Pharm Pharmacol.**, v. 55, n. 11, p. 1451–1463, 2003.

ANDREZA CANO, M.; MARIA MÁRCIA, B.; ÂNGELA LIMA, P. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 620–628, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71672008000500015&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000500015&lang=pt)>.

ANGELO, T.; BARBALHO, G. N.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Minoxidil topical treatment may be more efficient if applied on damp scalp in comparison with dry scalp. **Dermatologic Therapy**, v. 29, n. 5, p. 330–333, 2016.

APARECIDA, F.; MENDONÇA, S.; ROBERTO, J.; JUNIOR, P.; AUGUSTO, M.; ESQUISATTO, M. Wound Healing Effects of the application of Aloe vera ( L .) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats 1 Efeitos da aplicação de Aloe vera ( L .) e microcorrente no reparo de lesões cirúrgicas induzidas em ratos Wistar. v. 24, n. 2, p. 150–155, 2009.

ARDA, M. S.; KOÇMAN, A. E.; SÖZTUTAR, E.; BAKSAN, B.; ÇETIN, C. A new apparatus for standardization of experimental burn models. **Burns**, v. 43, n. 6, p. 1322–1329, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2017.01.014>>.

ARTURSSON, P.; LINDMARK, T.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). **Pharm Res.**, v. 11, n. 9, p. 1358–1361, 1994.

ASSOCIATION, A. B. Burn incidence and treatment in the US: 2016. **American Burn Association**, 2016.

BEHESHTI, A.; SHAFIGH, Y.; ZANGIVAND, A.-A.; SAMIEE-RAD, F.; HASSANZADEH, G.; SHAFIGH, N. Comparison of Topical Sucralfate and Silver Sulfadiazine Cream in Second Degree Burns in Rats. **Adv Clin exp Med**, v. 22, n. 4, p. 481–487, 2013.

BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; ABDALLA, D. S. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.051>>.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>.

BMJ. Queimaduras cutâneas. **BJM Best Practice**, 2017.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 899, de 29 de maio de 2003.** [s.l: s.n.]

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. D. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

CALVAZARA, B. B. G.; MULLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. da C. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro; cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. **EMBRAPA**, 1984.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ; J. L. VILA-JATO; ALONSO, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan – Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125–132, 1997.

CHAPKIN, V. A. Z. and R. S. METABOLISM AND FUNCTION OF SKIN LIPIDS. **Prog. Lipid Res.**, v. 27, p. 81–105, 1988.

CHUNG, J. Y.; HERBERT, M. E. Myth: silver sulfadiazine is the best treatment for minor burns. **West JMed**, v. 175, n. September, p. 205–206, 2001.

DARLENSKI, R.; SASSNING, S.; TSANKOV, N.; FLUHR, J. W. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 295–303, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.11.013>>.

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN BERGHE, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G. J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: Correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 155–165, 2005.

DODANE, V. & VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharm Sci Technol Today**, v. v.1, n. 6, p. 246–253, 1998.

DODANE, V. .; KHAN, M. A. .; MERWIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **Int J Pharm.**, v. 182, n. 1, p. 21–32, 1999.

DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A. S.; LARCHER, P.; FARIAS, R. E.; BARBOSA, N. R. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. v. 28, n. 3, p. 375–382, 2009.

EHRlich, H. P.; HUNT, T. K. Effects of cortisone and vitamin A on wound healing. **Annals of surgery**, v. 167, n. 3, p. 324–328, 1968.

ELIAS, P. M.; GRUBER, R.; CRUMRINE, D.; MENON, G.; WILLIAMS, M. L.; WAKE, J. S.; HOLLERAN, W. M.; UCHIDA, Y.; ELIAS, P. Biochimica et Biophysica Acta Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 314–318, 2014.

ELSOUS, A.; OUDA, M.; MOHSEN, S.; AL-SHAIKH, M.; MOKAYAD, S.; ABO-SHABAN, N.; HAMAD, A. A. Epidemiology and Outcomes of Hospitalized Burn Patients in Gaza Strip : A Descriptive Study. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2016.

FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. **Guidance for Industry**, n. July, p. 1–15, 2015.

FEINGOLD, K. R. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. **Journal of lipid research**, v. 48, p. 2531–46, 2007.

FERREIRA, A. M.; VIEIRA, B. M.; RIGOTTI, M. A.; ROLAN, M.; LOUREIRO, D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 3, p. 752–760, 2012.

FOGERT, F.; KAFEDJIISKI, K.; HOYER, H.; LORETZ, B.; BERNKOP-SCHNURCH; Enhanced transport of P-glycoprotein substrate saquinavir in presence of thiolated chitosan. **J Drug Target.**, v. 15, n. 2, p. 132–139, 2007.

FONG, J.; WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management : a review. v. 1, n. 4, p. 441–449, 2006.

FRANCK, C. L.; SENEGAGLIA, A. C.; LEITE, L. M. B.; RIBAS-FILHO, J. M. Padronização de queimaduras térmicas em ratos por contato direto com a superfície cutânea. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 17, n. 1, p. 14–19, 2018.

GENBANK. **MKI67 marker of proliferation Ki-67 [ Homo sapiens (human) ]**.

GENBANK. **MMP1 matrix metalloproteinase 1 [ Homo sapiens (human) ]**.

GENBANK. **BCL2, apoptosis regulator [ Homo sapiens (human) ]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>>. Acesso em: 10 jul. 2019c.

GOTTRUP F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum. A biomechanical study. **Am J Surg**, v. 140, n. 2, p. 296–301, 1980.

GUPTA, N. K.; TOMAR, P.; SHARMA, V.; DIXIT, V. K. Development and characterization of chitosan coated poly- ( ε -caprolactone ) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. **Vaccine**, v. 29, n. 48, p. 9026–9037, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.033>>.

JIA, Y.; GAN, Y.; HE, C.; CHEN, Z.; ZHOU, C. The mechanism of skin lipids influencing skin status. **Journal of Dermatological Science**, v. 89, n. 2, p. 112–119, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.006>>.

JUNG, I. W.; HAN, H. K. Effective mucoadhesive liposomal delivery system for risedronate: Preparation and in vitro/in vivo characterization. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2299–2306, 2014.

KALIA, Y. N.; PIROT, F.; GUY, R. H. Homogeneous Transport in a Heterogeneous Membrane : Water Diffusion Across Human Stratum Corneum In Vivo. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 5, p. 2692–2700, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79460-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79460-2)>.

KENDALL, A. C.; KIEZEL-TSUGUNOVA, M.; BROWNBRIDGE, L. C.; HARWOOD, J. L.; NICOLAOU, A. Biochimica et Biophysica Acta Lipid functions in skin : Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides , in a human skin organ culture model ☆. **BBA - Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1679–1689, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.016>>.

KHAN, G. R.; SCHEINMANN, F. Some recent advances in physical methods for analysis and characterization of polyunsaturated fatty acids. **Prog Chem Fats Other Lipids**, v. 15, n. 4, p. 343–367, 1978.

- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of NA**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>>.
- KINSELLA, J. E.; SHIMP, J. L.; MAI, J.; WEIHRAUCH, J. Sterol, Phospholipid, Mineral Content and Proximate Composition of Filets of Select Freshwater Fish Species. **Journal of Food Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 131–140, 1977.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 127–134, 2002.
- LIGIERO, C. B. P.; DOS REIS, L. A.; PARRILHA, G. L.; FILHO, M. B.; CANELA, M. C. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: Um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1338–1341, 2009.
- LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.
- LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985.
- LUO, Y.; TENG, Z.; LI, Y.; WANG, Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 221–229, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.084>>.
- MAGALHÃES, M. S. F.; FECHINE, F. V.; MACEDO, R. N. de; MONTEIRO, D. L. S.; OLIVEIRA, C. C.; BRITO, G. A. de C.; MORAES, M. E. A. de; MORAES, M. O. de. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats TT - Efeito da combinação de triglicerídeos de cadeia média, ácido linoléico, lecitina de soja e vitaminas A e E na cicatriza. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 262–269, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502008000300009&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/acb/v23n3/09.pdf](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502008000300009&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/acb/v23n3/09.pdf)>.
- MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, H. Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery. **J Drug Deliv Sci Technol.**, v. 18, n. 6, p. 375–386, 2008.
- MARCHINI, F.; MARTINS, D.; TEVES, D.; SIMÕES, M. Efeito do óleo de rosa mosqueta na cicatrização de feridas abertas. **Rev. paul. med.**, v. 106, n. 6, p. 356, 1988.
- MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.036>>.
- MENON, G. K. New insights into skin structure : scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 1, p. S3–S17, 2002.
- MICHELLE, I.; SOUZA, F. De. Skin thickness dimensions in histological section measurement during late - fetal and neonatal developmental period : A systematic review. n. March, p. 1–8, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SIHSUS - Sistema de Informações Hospitalares do SUS.**

**Brasília: Ministério da Saúde;2016.** Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/sistemas-e-aplicativos/hospitalares/sihsus>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.

NANJAWADE, B. K.; MANVI, F. V.; MANJAPPA, A. S. In situ.-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. **J Control Release.**, v. 122, n. 2, p. 119–134, 2007.

NASIRI, E.; HOSSEINIMEHR, S. J.; AZADBAKHT, M.; AKBARI, J. Effect of Malva sylvestris cream on burn injury and wounds in rats. v. 5, n. 4, p. 341–354, 2015.

**PASETTI, G. Triagem in vitro de compostos naturais ou sintéticos com potencial atividade imunomodulatória em células Jurkat: padronização da reação de RT-PCR para detecção da expressão do mRNA da interleucina-2.** [s.l: s.n.]

PASTAR, I.; STOJADINOVIC, O.; YIN, N. C.; RAMIREZ, H.; NUSBAUM, A. G.; SAWAYA, A.; PATEL, S. B.; KHALID, L.; ISSEROFF, R. R.; TOMIC-CANIC, M. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 445–464, 2014.

PEREIRA, G. G.; GUTERRES, S. S.; BALDUCCI, A. G.; COLOMBO, P.; SONVICO, F. Polymeric Films Loaded with Vitamin E and Aloe vera for Topical Application in the Treatment of Burn Wounds. **BioMed Research Internation**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

PROKSCH E, BRANDNER JM, J. J. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–72, 2008.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D.; SIMÕES, M.; NOVO, N.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2 por cento. **Acta Cir Bras**, v. 8, n. 1, p. 18–23, 1993.

SCHAEFER, T. J.; SZYMANSKI, K. D. Burns , Evaluation And Management Pathophysiology Treatment / Management. 2018.

SCHIPPER, N. G.; OLSSON, S. HOOGSTRAATE, J. A. DEBOER, A. G.; VARUM, K. M. A. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharm Res.**, v. 14, n. 7, p. 923–929, 1997.

SEKKAT, N.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Biophysical Study of Porcine Ear Skin In Vitro and Its Comparison to Human Skin In Vivo. v. 91, n. 11, p. 2376–2381, 2002.

SHI, Y.; WAN, A.; SHI, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. Experimental and mathematical studies on the drug release properties of aspirin loaded chitosan nanoparticles. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SMEDEN, J. Van; JANSSENS, M.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>>.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015.

VENTER, N. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; MARQUES, R. G. A new model for the standardization of experimental burn wounds. **Burns**, v. 41, n. 3, p. 542–547, 2015.

VINARDELL, M. P.; GARCÍA, L. The quantitative chloroallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 551–555, 2000.

WERTZ, P. W. Lipids and barrier function of the skin. **Acta Derm Venereol**, n. 16, p. 7–11, 2000.

WILLEY. **Mass Spectral Libraries (NIST 17 and Wiley Libraries)**, 2019. . Disponível em: <<https://www.sisweb.com/software/ms/wiley.htm>>.

WOLF, S. E.; STERLING, J. P.; HUNT, J. L.; ARNOLDO, B. D. The year in burns 2010. **Burns**, v. 37, n. 8, p. 1275–1287, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2011.10.001>>.

WORTH, A. P. & CRONIN, M. T. D. Prediction models for eye irritation potential based on endpoints of HET-CAM and Neutral Red Uptake test. **In Vitro & Molecular Toxicology**, v. 14, p. 143–156, 2001.

WORTH, A. P & BALLS, M. The importance of the prediction model in the validation of alternative test. *Alternative Laboratory Animal*. **Alternative Laboratory Animal**, v. 29, p. 135–143, 2001.

YÜCEL, B.; CORUH, A.; DENIZ, K. Salvaging the Zone of Stasis in Burns by Pentoxifylline: An Experimental Study in Rats Dr. **Journal of Burn Care & Research**, 2019.

ZAMBITO, Y.; UCCELLO-BARRETTA, G.; ZAINO, C.; BALZANO, F.; DI COLO, G. Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan. **Eur J Pharm Sci.**, v. 29, n. 5, p. 460–469, 2006.

ZHANG, K.; PEI, Y.; GAN, Z.; ZHANG, X. Local Administration of Thiamine Ameliorates Ongoing Pain in a Rat Model of Second-Degree Burn. p. 1–9, 2017.