



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante em modelo de pele humana *ex vivo***

**Cynthia Nara Pereira de Oliveira**

Ribeirão Preto  
2020

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**CYNTHIA NARA PEREIRA DE OLIVEIRA**

**Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de  
extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante  
em modelo de pele humana *ex vivo***

Ribeirão Preto  
2020

CYNTHIA NARA PEREIRA DE OLIVEIRA

**Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante em modelo de pele humana *ex vivo***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

**Orientador(a):**

Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Ribeirão Preto  
2020

OLIVEIRA,  
C. N. P

**Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de  
extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante em  
modelo de pele humana *ex vivo***

MESTRADO  
FCFRPUSP  
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Cynthia Nara Pereira

Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante em modelo de pele humana *ex vivo*,  
Ribeirão Preto, 2020.

98 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:  
Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Profª Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

1. Nanoemulsão lipídica 2. Cicatrização. 3. Extratos naturais. 4. Modelo  
*ex vivo* de pele humana.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Cynthia Nara Pereira de Oliveira

Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante em modelo de pele humana *ex vivo*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

# Dedicatória

Aos guias etéreos que, às ordens de Deus, traçaram encontros de entusiastas do altruísmo por intermédio da ciência. À Profa. Dra. Raquel Virgínia Rocha Vilela, que jamais imaginou onde chegaria seu ato de solidariedade para ajudar pacientes carentes com feridas abertas e queimaduras de pele. Ao Gustavo Cadurin de Oliveira, por permitir que sua intuição vibrasse na frequência elevada que envolve esse projeto e acreditar em todo seu potencial. À Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez por me confiar a comprovação do quão frutífero é o equilíbrio entre mentalidade empreendedora e o rigor acadêmico. Ao Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade pela avalanche de motivação que gerava à mim ao utilizar o produto na sua prática clínica, me confiando o seu nome e a idoneidade de sua carreira.

Aos meus pais Ângela e Rômulo, pelo incentivo incondicional aos estudos. Aos meus irmãos Císsia e Renan, por me lembrarem, diariamente, a importância da personalidade empreendedora como forma de assumir integralmente a responsabilidade pelo nosso sucesso ou fracasso, pelo nosso autoconhecimento e pela contribuição do mundo ao nosso redor.

À Bruna Paula Amaral Ceolin pela parceria, companheirismo, amor, zelo incondicional e, principalmente, pela compreensão da minha ausência em tantos momentos importantes. Sem dúvidas essa trajetória foi mais amena porque você se fez presente.

À Pabline Santos e José Marçal Oliveira que endossaram minha responsabilidade de criar um mundo melhor para as próximas gerações. Nosso organismo é efêmero, mas nossas contribuições ficam para eternidade.

# Agradecimento

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo apoio e suporte durante a etapa do mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez pelo exemplo de mulher da forma mais íntegra; aquela que não permite que a competência e presença profissional prejudicasse a dedicação aos filhos e aos pais.

Aos colegas do laboratório NanoTop e Shaiane Gil pelas discussões científicas e trocas de experiências, pela solicitude e disponibilidade.

A Yugo Martins pela amizade para toda vida, que, para mim, tem muito mais valor que qualquer título.

Aos técnicos de laboratório, Eduardo, José Orestes, Henrique, Roberta, Cici e Marina pela ajuda e ensinamentos, em especial à Patrícia pela amizade.

Aos servidores Henrique e Eleni pela presteza e profissionalismo nas atividades da secretaria.

Ao Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade que deixou à minha total disposição toda estrutura sob sua responsabilidade, pelos ensinamentos técnicos e discussões e, sobretudo, por sempre renovar em mim o propósito da nossa profissão: a ajuda ao próximo.

Aos colegas da FMRP Marcel, Natália, Gislaine, Danielly, Marcinha e Soninha pela amizade, momentos de descontração e por todas discussões científicas e ajuda nos experimentos.

À empresa Lipid Ingredients & Technology pelo apoio financeiro e aos colegas Gustavo, Daniela Bernardi e Roger por toda ajuda no início do projeto, solicitude e disponibilidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro por meio de projetos regulares de auxílio à pesquisa (Processo 2014/22451-7).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio técnico e financeiro à pesquisa brasileira. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às amigas de BD pela fraternidade, alegria e companheirismo durante todos esses anos em todos âmbitos da vida e por comemorarem todas minhas conquistas como se fossem suas.

Aos meus familiares por serem minha base, por sempre acreditarem em meu potencial e por me lembrar que estamos nessa passagem para servir e gerar valor.

*“Somente você pode tornar o sonho grande  
o bastante até que ele seja sua própria  
realidade”*

*Raquel Vilela*

## RESUMO

Oliveira, C. N. P. **Desenvolvimento de nanoemulsão lipídica à base de extratos vegetais e avaliação da atividade cicatrizante em modelo de pele humana *ex vivo***. 2020. 98 F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Acometimentos cutâneos que requerem estímulos pró-cicatrizantes para seu tratamento, tais como dermatite atópica, queimaduras e úlceras de decúbito, representam um alto potencial de perdas econômicas e de qualidade de vida do paciente. Além disso, o tratamento de lesões cutâneas enfrenta outro sério problema: a falta de produto acessível e de eficácia cientificamente comprovada. A incorporação de óleos vegetais com atividade cicatrizante em nanoemulsões é uma estratégia promissora para diminuir a toxicidade, possibilitar a administração de óleos no leito hidrofílico das feridas, aumentar a biodisponibilidade dos componentes bioativos desses óleos e, dessa forma, aumentar a eficácia do tratamento de tais acometimentos cutâneos. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver nanoemulsões contendo óleos de girassol e de rosa mosqueta, ambos com aclamada atividade cicatrizante, e avaliar sua atividade em úlceras induzidas em modelo *ex vivo* de pele humana. Ademais, a influência da combinação de fosfolipídios extraídos do girassol e da soja nas características e atividade das nanoemulsões também foi avaliada. Duas nanoemulsões foram obtidas: uma utilizando uma mistura de fosfolipídios e emulsificantes sintéticos (Nano 1) e outra utilizando apenas fosfolipídios (Nano 2). Os emulsificantes sintéticos investigados para obtenção de Nano 1 estável foram o polissorbato 80 e 60 e o polietilenoglicol 40, na presença e ausência de estabilizantes, como álcool cetosteárilico e álcool cetílico. Já a formulação Nano 2 foi desenvolvida e otimizada com base em um delineamento experimental do tipo Box-Behnken 3<sup>3</sup>. As variáveis independentes foram a combinação em diferentes proporções de três fosfolipídios de origem natural: S75, fosfolipídio extraído da soja com 75% de fosfatidilcolina, H100, fosfatidilcolina purificada extraída do girassol, e H20, mistura de fosfolipídios extraídos do girassol, contendo 20% de fosfatidilcolina. As variáveis dependentes foram tamanho de partículas e índice de polidispersão (PDI), avaliados por espalhamento de luz dinâmico; porcentagem de emulsificação, avaliada por centrifugação; viscosidade, utilizando um reômetro de geometria do tipo Couette (cilindro concêntrico); pH e custo. A morfologia, o número médio de partículas e a presença de estruturas líquido-cristalinas nas nanoemulsões otimizadas também foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão, análise de rastreamento de nanopartículas e microscopia de luz polarizada, respectivamente. Nano 1 e Nano 2 foram investigadas quanto a sua citotoxicidade em células de queratinócitos e fibroblastos, capacidade de alteração da expressão de moléculas de adesão, por ensaio *Scratch*, potencial inflamatório, por ensaios de imunoabsorção enzimática, e capacidade em se distribuir e penetrar na pele humana, por estudos de penetração cutânea *in vitro*. A atividade cicatrizante das nanoemulsões foi avaliada em feridas induzidas em cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC), a partir da análise histológica e imuno-histoquímica de cortes de fragmentos de pele tratados. As nanoemulsões apresentaram gotículas com dimensões nanométricas (de 130 a 370 nm), PDI menor do que 0,3 e concentração na ordem de 10<sup>13</sup> partículas/mL. O diâmetro das gotículas da Nano 2 foi em torno de 3 vezes maior do que o da Nano 1, com custo estimado também 2,5 vezes maior. Entretanto, a Nano 2 apresentou-se menos citotóxica para fibroblastos e queratinócitos quando comparada à Nano 1 e com capacidade de direcionar a penetração dos óleos para a epiderme. Em contrapartida, a Nano 1 foi capaz de permear a pele íntegra até a derme e apresentou um efeito cicatrizante mais proeminente do que a Nano 2 nas avaliações no modelo hOSEC. Ambas nanoemulsões apresentaram-se estáveis, com baixo potencial de induzir processos inflamatórios e de interferir na expressão de moléculas de adesão. Nos estudos de cicatrização no modelo hOSEC verificou-se, pela primeira vez, a importância em se determinar a concentração de nanopartículas depositadas no leito da ferida para possibilitar a mobilidade celular e permitir a resposta adequada do modelo ao tratamento. Por fim, as nanoemulsões à base de óleos vegetais estimularam de maneira mais evidente o fechamento de feridas induzidas no modelo hOSEC do que nanoemulsões controles à base de óleo mineral. Em resumo, foi possível estabilizar nanoemulsões de óleo vegetal com combinações adequadas de fosfolipídios de origem natural. Alterações nessas combinações resultaram em nanoemulsões com características de tamanho e custo distintas, com impacto na penetração cutânea e celular dos óleos, citotoxicidade e cinética de cicatrização. As nanoemulsões à base de óleos vegetais obtidas nesse trabalho são, portanto, sistemas de liberação versáteis com potencial para serem utilizadas tanto no tratamento da pele íntegra como em lesões ulceradas.

Palavras-chave: Nanoemulsão lipídica, cicatrização, extratos naturais, modelo *ex vivo* de pele humana.

## ABSTRACT

Oliveira, C. N. P. **Development of lipid nanoemulsion based on plant extracts and evaluation of healing activity in *ex vivo* human skin model.** 2020. 98 F. Dissertation (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Skin disorders that require pro-healing stimuli for treatment, such as atopic dermatitis, burns and decubitus ulcers, represent a high potential for economic losses and quality of life for the patient. In addition, the treatment of skin lesions faces another serious problem: the lack of accessible product and scientifically proven effectiveness. The incorporation of vegetable oils that presents healing activity in nanoemulsions is a promising strategy to reduce toxicity, enable the administration of oils in the hydrophilic environment of wounds, increase the bioavailability of the bioactive components of these oils and, thus, increase the effectiveness of the treatment of these cutaneous disorders. Thus, the objective of this work was to develop nanoemulsions containing sunflower and rosehip oils, both with acclaimed healing activity, and to evaluate their activity in ulcers induced in an *ex vivo* model of human skin. In addition, the influence of the combination of phospholipids extracted from sunflower and soy on the characteristics and activity of nanoemulsions was also evaluated. Two nanoemulsions were obtained: one using a mixture of phospholipids and synthetic emulsifiers (Nano 1) and the other using only phospholipids (Nano 2). The synthetic emulsifiers investigated to obtain stable Nano 1 were polysorbate 80 and 60 and polyethylene glycol 40, in the presence and absence of stabilizers, such as ceto-stearyl alcohol and cetyl alcohol. The Nano 2 formulation was developed and optimized based on a Box-Behnken 3<sup>3</sup> experimental design. The independent variables were the combination in different proportions of three phospholipids from natural origin: S75, phospholipid extracted from soy with 75% phosphatidylcholine; H100, purified phosphatidylcholine extracted from sunflower; and H20, mixture of phospholipids extracted from sunflower, containing 20% phosphatidylcholine. The dependent variables were particle size and polydispersity index (PDI), assessed by dynamic light scattering; percentage of emulsification, assessed by centrifugation; viscosity, using a Couette type geometry rheometer (concentric cylinder); pH and cost. The morphology, the average number of particles and the presence of liquid-crystalline structures in the optimized nanoemulsions were also evaluated by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and polarized light microscopy, respectively. Nano 1 and Nano 2 were investigated for their cytotoxicity in keratinocyte and fibroblast cells, ability to influence the expression of adhesion molecules, by Scratch assay, inflammatory potential, by enzyme-linked immunosorbent assays, and ability to distribute and penetrate the skin by *in vitro* skin penetration studies. The healing activity of nanoemulsions was evaluated in wounds induced in human organotypic skin explant culture (hOSEC), based on histological and immunohistochemical analysis of cuts of treated skin fragments. The nanoemulsions presented droplets with nanometric dimensions (from 130 to 370 nm), PDI less than 0.3 and concentration in the order of 10<sup>13</sup> particles / mL. The droplet diameter of Nano 2 was around 3 times greater than that of Nano 1, with an estimated cost also 2.5 times greater. However, Nano 2 was less cytotoxic to fibroblasts and keratinocytes than Nano 1 and with the ability to drive the oils penetration into and to the epidermis. In contrast, Nano 1 was able to permeate intact skin to the dermis and had a more prominent healing effect than Nano 2 in the hOSEC model evaluations. Both nanoemulsions were stable, with a low potential to induce inflammatory processes and to interfere in the expression of adhesion molecules. In the healing studies in hOSEC model, the importance of determining concentration of nanoparticles placed in contact with the wound was verified for the first time to enable cell mobility and allow the model to respond appropriately to treatment. Finally, nanoemulsions based on vegetable oils stimulated the closure of wounds induced in the hOSEC model more clearly than control nanoemulsions based on mineral oil. In summary, it was possible to stabilize vegetable oil nanoemulsions with suitable combinations of phospholipids of natural origin. Changes in these combinations resulted in nanoemulsions with different size and cost characteristics, with an impact on skin and cellular penetration of oils, cytotoxicity and healing kinetics. The nanoemulsions based on vegetable oils obtained in this work are, therefore, versatile release systems with the potential to be used both in the treatment of intact skin and in ulcerated lesions.

Keywords: Lipid nanoemulsion, healing, natural extracts, *ex vivo* model of human skin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gráficos 3D (A) e de superfície de resposta (B) para a viscosidade em função da concentração em (%) dos fatores H20 e H100 .....	42
<b>Figura 2.</b> Gráficos 3D (A) e de superfície (B) de resposta para o custo em função da concentração em (%) dos fatores H20, H100 e S75 .....	43
<b>Figura 3.</b> Rampas de otimização numérica para formulação otimizada a partir da minimização da resposta custo e viscosidade dentro do intervalo entre 61 e 253 cP .....	44
<b>Figura 4.</b> Representação gráfica do comportamento dos valores de tamanho de gotículas obtidos por DLS em diferentes diluições .....	46
<b>Figura 5.</b> Perfil de intensidade de luz espalhada em função do tamanho de partícula para as nanoemulsões Nano 1 (A) e Nano 2 (B) .....	47
<b>Figura 6.</b> Comportamento reológico das preparações .....	48
<b>Figura 7:</b> Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada de Nano 1 (A) e Nano 2 (B) sem diluição da amostra .....	48
<b>Figura 8.</b> Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras diluídas 100 vezes em água destilada. Nano 1 (A) e Nano 2 (B) .....	49
<b>Figura 9.</b> Valores de viabilidade celular, avaliada utilizando MTT, para cultura de fibroblastos NIH-3T3 (A) e queratinócitos HaCat (B) tratadas com $10^{12}$ partículas/mL das formulações após 24 e 48 horas de incubação .....	50
<b>Figura 10.</b> Valores de taxa de internalização celular (% de <i>uptake</i> ) encontrados para Nano 1 e Nano 2, na concentração de $10^{12}$ partículas/mL, após 5 e 15 minutos de contato com monocamada de fibroblastos e queratinócitos.....	51
<b>Figura 11.</b> Valores de taxa de internalização celular (% de <i>uptake</i> ) encontrados para Nano 1 (220 nm), Nano 2 (369 nm) e Nano 2.2 (227 nm) após 5 minutos de contato com monocamada de fibroblastos e queratinócitos. ....	52
<b>Figura 12.</b> Imagens representativas obtidas por microscopia confocal do ensaio de <i>uptake</i> das formulações Nano 1 (painel esquerdo) e Nano 2 (painel direito) após 15 minutos de contato com as células queratinócitos HaCat (A) e fibroblastos NIH-3T3 (B). $\lambda$ exc/em = 477/512 nm para visualização do Bodipy em verde, $\lambda$ exc/em = 405/413-472 nm para visualização do núcleo das células - DAPI em azul .....	53
<b>Figura 13.</b> Imagens representativas do ensaio <i>Scratch</i> em cultura de fibroblastos NIH-3T3 para avaliação da migração celular em função do tempo .....	54

<b>Figura 14.</b> Proliferação das células, tratadas com diferentes concentrações das nanoemulsões, representada pela diminuição da distância entre as extremidades do arranhão, após 24 h. (A) queratinócitos (HaCat) e (B) fibroblastos (3T3) .....	54
<b>Figura 15.</b> Expressão de IL-6 e de TNF- $\alpha$ induzidas pelo tratamento de macrófagos humanos com LPS (controle positivos) e nanoemulsões e Dersani® .....	55
<b>Figura 16.</b> Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de cortes transversais de pele humana tratada por 1 hora com Dersani® (A), Nano 1 (B) e Nano 2 (C) .....	56
<b>Figura 17.</b> Cortes histológicos dos fragmentos de pele humana imediatamente (D0) após indução da úlcera (A), após 7 dias (D7) mantidos no meio de cultura DMEM (B) e após D7 tratados com aplicação diária de Nano 1 na ferida (C) .....	57
<b>Figura 18:</b> Avaliação imuno-histoquímica das bordas esquerdas das úlceras provocadas nos fragmentos de pele humana imediatamente (D0) após instalação da úlcera (A) e após 7 dias (D7) tratados diariamente com a Nano 1 (B e C) .....	59
<b>Figura 19:</b> Imagens histológicas dos fragmentos de pele humana imediatamente após indução da úlcera (D0), e após 14 dias mantidos em meio de cultura DMEM com aplicação diária de Nano 1, NC e Dersani® .....	60
<b>Figura 20.</b> Representação gráfica das taxas de cicatrização encontrados para os fragmentos de pele humana tratados diariamente por 7 dias com meio de cultura (Basal), formulação Nano Controle (NC), produto Dersani® (Dersani), Nano 1 e Nano 2 .....	61
<b>Figura 21.</b> Estruturas moleculares dos agentes emulsificantes utilizados no desenvolvimento de Nano 1 e Nano 2 .....	74

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Tensoativos sintéticos testados para preparo da Nano 1 .....	30
<b>Tabela 2.</b> Delineamento experimental do tipo Box-Behken para preparo de Nano 2 .....	31
<b>Tabela 3:</b> Características físico-químicas e custo de nanoemulsões preparadas durante o desenvolvimento de Nano 1 .....	39
<b>Tabela 4:</b> Características físico-químicas e custo de nanoemulsões preparada no desenvolvimento da Nano 2 .....	40
<b>Tabela 5:</b> Resultados da significância dos modelos matemáticos mais adequados encontrados após ANOVA para cada variável dependente .....	41
<b>Tabela 6:</b> Análise estatística do efeito estimado de preditores na viscosidade (Log) e custo (modelo linear) na nanoemulsão .....	41
<b>Tabela 7:</b> Composição de Nano 2 para se obter as respostas desejadas .....	44
<b>Tabela 8:</b> Dados experimentais obtidos após preparo de Nano 2 com composição .....	45
<b>Tabela 9:</b> Caracterização físico-química das nanoemulsões lipídicas 24 h após o preparo e seguida do teste de estabilidade preliminar .....	45
<b>Tabela 10.</b> Características das nanoemulsões resultantes das análises por DLS e NTA .....	47
<b>Tabela 11.</b> Porcentagem de fechamento da ferida em função da concentração de formulação aplicada e do tempo de tratamento .....	61

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA - Análise Estatística de Variância  
ATP - Adenosina Trifosfato  
BSA - Albumina Sérica Bovina  
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa  
Ck10 - Citoqueratina 10  
cp - Centipoise  
DA Dermatite Atópica  
DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol  
DLS - Espectroscopia de Autocorrelação de Fótons  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
EFG - Fator de Crescimento Epidermal  
FGF - Fator de Crescimento dos Fibroblastos  
GAGs - Glicosaminoglicanas  
GP IIb/ IIIa - Glicoproteína IIb/IIIa  
H100 - Lipoid H100  
H20 - Lipoid H20  
HAP - Homogeneizadores à Alta Pressão  
HIF-1a - Fator Induzido por Hipóxia 1a  
hOSEC - Cultura de Explante de Pele Organotípica Humana  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
IP - Iodeto de Propídeo  
LPS - Lipopolissacarídeo Bacteriano  
LTP - Proteína de Transferência Lipídica  
MEC - Matriz Extracelular  
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MMPs - Metaloproteinases de Matriz  
MPO - Mieloperoxidase  
MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilbrometo de tetrazólio  
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato  
NC - Nano Controle

NK - Natural killer  
NO - Óxido Nítrico  
NOX2 - NADPH oxidase  
NTA - Análise de Rastreamento de Nanopartículas  
PAF - Fator de Ativação Plaquetária  
PBS - Tampão fosfato-salino  
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas  
PDI - Índice de Polidispersão  
PEG 40 - Polietilenoglicol 40  
PGE2 - Prostaglandinas E2  
PGI2 - Prostaglandinas I2  
PPAR $\alpha$  - Proliferador de Peroxissoma do Tipo Alfa  
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
S75 - Lipoid S75  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TGF- $\beta$  - Fator de Transformação do Crescimento Beta  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral  
TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato  
VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Morfofisiologia cutânea</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Epidemiologia das lesões cutâneas</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 <i>Queimadura</i> .....	5
2.2.2 <i>Riodermatite</i> .....	6
2.2.3 <i>Dermatite atópica</i> .....	7
2.2.4 <i>Lesão por pressão</i> .....	7
2.2.5 <i>Pé diabético</i> .....	7
2.2.6 <i>Incisões Cirúrgicas</i> .....	8
<b>2.3 Cicatrização</b> .....	<b>8</b>
2.3.1 <i>Fase inflamatória</i> .....	9
2.3.2 <i>Fase Proliferativa</i> .....	14
2.3.3 <i>Fase de remodelação</i> .....	15
<b>2.4 Extratos vegetais com propriedades cicatrizantes em potencial</b> .....	<b>17</b>
2.4.1 <i>Óleo de Girassol</i> .....	18
2.4.2 <i>Óleo de Rosa Mosqueta</i> .....	21
<b>2.5. Cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6. Nanoemulsões</b> .....	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Objetivos específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. Material</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2. Preparo das nanoemulsões</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3. Caracterização e estabilidade das nanoemulsões lipídicas</b> .....	<b>31</b>
4.3.1 <i>Ciclo Gela/Desgela</i> .....	32
4.3.2 <i>Centrifugação</i> .....	32
4.3.3 <i>Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e análise do número de partículas</i> .....	32
4.3.4 <i>pH</i> .....	32
4.3.5 <i>Determinação da viscosidade aparente</i> .....	32
4.3.6 <i>Presença de estruturas anisotrópicas</i> .....	33

4.3.7 Morfologia .....	33
<b>4.4. Estudos <i>in vitro</i> em cultura de células .....</b>	<b>33</b>
4.4.1. Citotoxicidade .....	33
4.4.2. Avaliação do uptake celular das formulações em função do tempo de incubação.....	34
4.4.2.1 Citometria de fluxo .....	34
4.4.2.2 Microscopia confocal de varredura a laser .....	34
4.4.3. Avaliação da migração / proliferação celular – Ensaio Scratch .....	35
4.4.4. Expressão de citocinas e mediadores do processo de inflamação.....	36
<b>4.5. Estudos <i>in vitro</i> de penetração utilizando pele humana .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6. Estudos <i>ex vivo</i> em cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC) ...</b>	<b>37</b>
4.6.1. Avaliação histológica .....	38
4.6.2. Avaliação imunohistoquímica .....	38
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Preparo das nanoemulsões .....</b>	<b>39</b>
5.1.1 Triagem de emulsificantes sintéticos para obtenção de sistema emulsionante em conjunto com fosfolipídios - Nano 1 .....	39
5.1.2 Delineamento experimental para obtenção de nanoemulsão otimizada composta apenas da combinação de fosfolipídios como sistema emulsionante - Nano 2 .....	40
5.1.3. Otimização da Nano 2 e validação do método .....	43
<b>5.2. Caracterização e estabilidade das nanoemulsões selecionadas .....</b>	<b>45</b>
5.2.1 Teste de centrífuga, pH, viscosidade aparente e características físico-químicas pré e pós testes de estabilidade preliminar .....	45
5.2.2 Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e análise do número de partículas .....	45
5.2.3 Determinação da viscosidade aparente .....	47
5.2.4 Presença de estruturas anisotrópicas .....	48
5.2.5 Morfologia .....	49
<b>5.3 Estudos <i>in vitro</i> em cultura de células .....</b>	<b>49</b>
5.3.1 Citotoxicidade .....	49
5.3.2 Avaliação do uptake celular das formulações em função do tempo de incubação .....	50
5.3.3 Avaliação da migração / proliferação celular – Ensaio do Arranhão (Scratch Assay) .....	53
5.3.4 Expressão de citocinas e mediadores do processo de inflamação .....	55
<b>5.4 Estudos <i>in vitro</i> de penetração utilizando pele humana .....</b>	<b>55</b>
<b>5.5 Estudos <i>ex vivo</i> em cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC) ....</b>	<b>57</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>8. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pele tem dentre suas principais funções a proteção dos tecidos subjacentes e a reserva de nutrientes (Baroli, 2010). Qualquer evento que acarrete em perda de sua integridade resulta no estímulo de mediadores celulares, bioquímicos e imunológicos que precisam agir harmoniosamente para restaurar o tecido lesionado (Masson, 2011). Nos casos em que o acometimento cutâneo requer estímulos pró-cicatrizantes para seu tratamento, como na dermatite atópica, queimaduras, úlceras de decúbito, radiodermite, pé diabético e lesões provenientes de traumatismos físicos, químicos, infecções e vasculites, a qualidade de vida do paciente decai consideravelmente e o potencial de perdas econômicas é alto (Okuma et al, 2013). Por exemplo, dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária afirmam que o custo anual decorrente de complicações no manejo de pacientes, como infecções no sítio cirúrgico, pode chegar até US\$ 1,6 bilhões de dólares (ANVISA, 2017).

A falta de produto acessível e de eficácia cientificamente comprovada é, em grande parte, responsável pelos problemas recorrentes no processo de tratamento de feridas (McQuestion et al., 2011). Muitos produtos disponíveis são falhos quanto à sua eficácia por não compreenderem nas suas ações terapêuticas o aspecto multifatorial do processo de cicatrização, que, independente da etiologia, se constitui de um processo biológico complexo com interação simultânea de eventos celulares, bioquímicos e imunológicos (Alison et al., 2006).

Além da tentativa de recuperação dos constituintes da pele e do controle de infecções bacterianas e fúngicas, as estratégias pró-cicatrizantes devem considerar a modulação da inflamação tecidual e a interrupção da geração de radicais livres decorrentes dos processos inflamatórios (Masson, 2011) ou do ambiente externo, como a radiação ionizante na radiodermite. Nesse contexto, a etapa racional para o desenvolvimento de um produto de ação cicatrizante deve considerar compostos com conhecida propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e com potencial de reestabelecer os constituintes originais da pele.

Existem na natureza várias plantas cujos extratos apresentam muitas dessas propriedades. Elas variam em função da diversidade de componentes ativos encontrados em cada espécie vegetal, uma vez que, majoritariamente, os constituintes agem sinergicamente e, assim, aumentam o potencial terapêutico da composição (Musthaba et al., 2009). A partir da compreensão da cicatrização na sua complexidade multifatorial, aliada ao entendimento da capacidade dos extratos vegetais em exercer atividade simultânea em diferentes etapas do processo de cicatrização, a escolha dos extratos que compõem uma formulação voltada para a cicatrização deve se pautar nos achados bibliográficos daqueles extratos que reúnam maior influência nos eventos da cicatrização de forma concomitante e sinérgica.

O óleo de girassol é um composto lipídico extraído da semente de espécies do gênero *Helianthus* (Aboki et al., 2012). Quando aplicado topicamente, os ácidos graxos presentes no óleo reduzem a perda transepidermal de água de 33 a 50% (Eichienfield et al., 2009). O óleo de girassol também apresenta substâncias antioxidantes (Pereira et al., 2016), antimicrobianas (Aboki et al., 2012) e anti-inflamatórias (Eichienfield et al., 2009). A efetividade do óleo de girassol na preservação do tecido cutâneo está relacionada à semelhança dos lipídios que o constitui com

aqueles presentes no estrato córneo (Eichenfield et al., 2009). O principal componente lipídico do óleo de girassol é o ácido linoleico na forma de triglicerídeo (61,5%), mas ele também possui em sua composição o ácido oleico (24,3%), o palmítico (9,3%), o esteárico (3,7%) e o linolênico (1%) (Eichenfield et al., 2009). Além desses ácidos graxos essenciais, o óleo de girassol destilado ainda apresenta 5% de fitoesteróis e 1% de vitamina E, substâncias de elevada atividade antioxidante (Belilovsky et al., 2015). Alguns estudos relatam que a semelhança do conteúdo lipídico do óleo de girassol e matriz lipídica cutânea estimula a produção de ceramidas epidérmicas, síntese de colesterol e ativação dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo alfa (PPAR $\alpha$ ), que desempenham um papel essencial na regulação da diferenciação celular e estão envolvidos na homeostase da barreira cutânea e no processo inflamatório (Belilovsky et al., 2015).

O óleo de rosa mosqueta é outro óleo extraído de semente de planta com pronunciada atividade antioxidante, anti-inflamatória e repositora de constituintes lipídicos da pele. Seus constituintes aromáticos responsáveis pela ação antioxidante e, portanto, protetora das células em processo de reepitelização, são ricos em fenóis (glicosídeos flavonóides e proantocianidinas), vitaminas E e C, carotenóides (Salminen et al., 2005). Já seus constituintes graxos variam de acordo com a espécie e seus valores de concentração nos extratos estão compreendidos entre 43 e 49% de ácido linoléico, 32 e 38% de ácido linolênico, 14 e 16% de ácido oléico, 3 e 5% de ácido palmítico, 0,1 e 5% de ácido palmitoléico, 1 e 2% de ácido esteárico, além de outros ácidos graxos presentes em concentrações menores de 1%, como o láurico, mirístico, araquidônico, gadoléico e behênico (Ozcan et al., 2004). Esses ácidos graxos são capazes de aumentar a permeabilidade da membrana celular e facilitar a entrada de fatores de crescimento, estimulando a proliferação, migração celular e neoangiogênese, atuando, assim, diretamente na fase proliferativa da cicatrização. De forma simultânea, altas concentrações de ácido ascórbico encontradas no óleo da semente de rosa mosqueta têm importante papel na regeneração tecidual, sendo um importante elemento para a formação e deposição das fibras colágenas sobre a cicatriz, além de estimular, também, a proliferação celular (Santos et al., 2009).

Pela expressão dessas atividades desejadas de forma sinérgica e concomitante, o uso de fitoterápicos no mercado mundial tem aumentado a cada ano. De 2005 para 2011, por exemplo, este mercado aumentou de US\$ 18 bilhões de dólares para US\$ 26 bilhões (Musthaba et al., 2009). Essa popularidade crescente de preparações contendo ervas medicinais fortalece a necessidade de desenvolver composições fitoterápicas seguras. Neste contexto, as nanoemulsões surgem como uma alternativa interessante para formulação de fitoterápicos, pois além de elevarem a solubilidade dos compostos ativos lipofílicos, possuem boa estabilidade termodinâmica, facilidade de fabricação, clareza óptica e excelente estabilidade cinética (Musthaba et al., 2009). Podem ainda sustentar a liberação das substâncias ativas, evitando sua degradação imediata no leito da ferida e, assim, aumentar sua biodisponibilidade. Consequentemente, é possível reduzir a dose administrada, os efeitos adversos e o custo do tratamento (Uchechi et al., 2014).

As nanoemulsões podem ser definidas como sistemas de liberação metaestáveis heterogêneos, nos quais um líquido (fase interna) é disperso em outro líquido (fase externa ou contínua) na forma de gotículas de dimensões nanométricas estabilizadas por um sistema

emulsificante (Oliveira, 2014) e dependentes do método de preparação (Salleh et al., 2012). Fosfolipídios podem ser utilizados como emulsionantes desses sistemas e ainda funcionarem como repositores dos conteúdos graxos da pele. Além disso, podem ser extraídos de fontes naturais, como do próprio girassol, que, como descrito anteriormente, tem várias potencialidades como agente cicatrizante. Além da função estrutural, é descrito que os fosfolipídios têm capacidade de intervir em diversos processos metabólicos, tais como o processo ativo de fosforilação, mitose, organização celular, intercâmbios iônicos e síntese de compostos biologicamente ativos, como prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido araquidônico (McClements et al, 2017).

Métodos de produção específicos, no entanto, são necessários para a obtenção de nanoemulsões. A homogeneização a alta pressão é o método usado na obtenção de nanoemulsões com maior potencial para a produção em larga escala. Em um homogeneizador de alta pressão, a mistura de óleo e água é submetida a intensos campos de fluxo turbulento e de cisalhamento causados pela ação de dois fenômenos: cavitação hidrodinâmica e homogeneização (Floury et al., 2000). A taxa de ruptura no fluxo dos líquidos durante a formação da nanoemulsão é determinante para uma maior superfície de contato entre eles e estabelece a distribuição do tamanho da gotícula, influenciando, assim, na estabilidade e textura da formulação. O controle dessa taxa requer, no entanto, o conhecimento do efeito dos parâmetros operacionais e da composição da nanoemulsão (Floury et al., 2000).

Este trabalho visa o desenvolvimento de nanoemulsões utilizando a homogeneização à alta pressão como um método de preparo escalonável. As diferentes variáveis operacionais do processo, que incluem a escolha dos equipamentos e concentração dos insumos, a pressão e número de ciclos produtivos necessários foram, portanto, estudados. Mais ainda, as nanoemulsões foram desenvolvidas utilizando como base os próprios extratos e óleos que contêm os componentes bioativos necessários para a cicatrização de feridas cutâneas. Tanto o sistema de liberação nanoemulsionado, como os componentes bioativos dos extratos que compõe as formulações promoveram aumento da eficácia e redução na toxicidade do produto final, contribuindo, desta forma, para o tratamento de feridas cutâneas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Morfofisiologia cutânea

A pele tem dentre suas principais funções a proteção dos tecidos subjacentes, a reserva de nutrientes (Baroli, 2010), termorregulação imunológica, preservação contra toxinas e infecções, homeostase hidroeletrólítica, secreção endócrina, percepção tátil e integridade bioquímica (Barbosa & Lima, 2019). Esse órgão extenso é composto por duas camadas, a epiderme e a derme. Logo abaixo dessa última tem-se a hipoderme, que embora não faça parte da pele confere a ela suporte e interação com os demais tecidos.

A epiderme é a camada mais externa da pele, constituída de um epitélio multiestratificado, isto é, formado por várias camadas (estratos) de células justapostas, e da lâmina basal, de origem mesodérmica, separando a derme da epiderme (Feingold et. al, 2007). Os estratos da epiderme são denominados estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo. Cada estrato representa um estágio de diferenciação idiossincrático dos queratinócitos, que são as principais células que compõe a epiderme (Leite, 2016).

A camada basal representa o estrato mais interno da epiderme, dotado de queratinócitos que se dividem rapidamente, e outros importantes tipos celulares, como terminações nervosas (células de Merkel), melanócitos e células do sistema imune, tais como células de Langerhans e linfócitos. Já a camada espinhosa, que encontra-se na epiderme-média, é formada por queratinócitos que sofreram as etapas iniciais de diferenciação. O estrato granuloso consiste em queratinócitos mais diferenciados e numerosos corpos lamelares, lipídios pró-barreira, intercalados com enzimas e peptídeos antimicrobianos (Menon et. al, 2012). A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, é formada por queratinócitos que sofreram diferenciação terminal, queratinizados, chamados de corneócitos (Feingold et. al, 2007). Os corneócitos estão embebidos em uma matriz lipídica formando uma estrutura muito organizada conhecida como “brick and mortar”, em analogia as paredes formadas por tijolo, que seriam os corneócitos, e argamassa, a matriz lipídica (Menon et. al, 2012).

No nível molecular, os componentes da matriz lipídica do estrato córneo têm uma elevada complexidade estrutural e funcional, passível de adaptações metabólicas e capacidade de autopoese (auto-manutenção por renovação constante). Constitui-se assim de uma mistura altamente complexa de cerca de 13 espécies de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres em uma proporção equimolar, sendo sua organização responsável pelo correto estabelecimento da função barreira lipídica da pele (Baroli, 2010; Menon et. al, 2012; Feingold et. al, 2007).

A derme, camada abaixo da epiderme, é a parte mais espessa da pele, composta por colágeno, fibras elásticas e glicosaminoglicanas (GAGs) produzidos por fibroblastos. Além disso, é na derme

que se estabelecem os vasos sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, terminações nervosas e células do sistema imunológico, como células dendríticas, células B, natural killer (NK), neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos (Leite, 2016).

A importância da derme reside em suas anastomoses capilares, que direcionam nutrientes e oxigênio para a epiderme e retiram dela produtos do metabolismo celular e de agentes estranhos penetrantes. Já a epiderme, se estabelece como uma camada protetora quando mantidas condições para interações positivas entre a macro e a microestrutura do estrato córneo (Baroli, 2010). Já a hipoderme é muito importante para a termo-regulação e proteção contra impactos de todo organismo, uma vez que é formada principalmente por vasos sanguíneos e tecido adiposo. Pode-se observar, portanto, que cada camada tem sua própria relevância para a manutenção fisiológica geral do órgão (Leite, 2016).

Qualquer evento que acarrete a perda da integridade da pele, caracterizando uma lesão, resulta no estímulo de mediadores celulares, bioquímicos e imunológicos que precisam agir harmoniosamente para restaurar o tecido lesionado (Masson, 2011).

## **2.2 Epidemiologia das lesões cutâneas**

As lesões cutâneas representam um problema de saúde pública significativo, sendo responsáveis por 8,5% de todas as mortes no mundo em 2015. Mundialmente, as lesões são a quarta principal causa de morte (11% do total de mortes), atrás apenas de doenças cardiovasculares, infecciosas e neoplásicas (Jeschken et. al, 2020).

Elas podem ser classificadas em relação ao agente etiológico, como traumas, práticas cirúrgicas, substâncias tóxicas, doenças autoimunes, infecções e isquemias, pressão, insuficiência arterial ou venosa (Barbosa & Lima, 2019). Nos acometimentos cutâneos que requerem estímulos pró-cicatrizantes para seu tratamento, como na dermatite atópica, queimaduras, lesões por pressão, radiodermite, pé diabético, infecções e vasculites, a qualidade de vida do paciente decai consideravelmente e o potencial de perdas econômicas é alto (Okuma et al, 2013), acompanhando os números epidemiológicos também elevados. A seguir, uma breve descrição dos principais acometimentos cutâneos que corroboram com esses números.

### *2.2.1 Queimadura*

Entre as lesões cutâneas, as queimaduras apresentam-se como um grave problema de saúde pública. Em todo o mundo, estima-se que a incidência de queimaduras graves o suficiente para exigir apresentação ambulatorial ou admissão no hospital foi de 31 milhões de pessoas em 2015. Atualmente, a mortalidade mundial varia de 500 mil a um milhão de mortes anual (Jeschken et. al, 2020). Em alguns países, dados disponíveis permitem estimar a incidência anual de queimaduras de

aproximadamente 500 mil nos Estados Unidos da América, 10 a 15 mil internações hospitalares na Alemanha (Spanholtz et. al, 2009) e 700 a 800 mil novos casos na Índia (Atiyeh et. al, 2009). No Brasil, estima-se que ocorram cerca de um milhão de casos de queimaduras por ano, sendo que apenas 100 mil vítimas procuram serviço médico para atendimento, enquanto cerca de 2.500 morrem por consequência direta ou indireta destas queimaduras (Cruz et. al, 2012). Ainda, segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS), este tipo de agravo é responsável por aproximadamente 30 mil internações hospitalares por ano, demonstrando a importância do tema no planejamento público de saúde (Dias et. al, 2015).

### 2.2.2 Radiodermatite

Radiodermatites ou radiodermites, que são lesões induzidas pela radiação ionizante da radioterapia, atingem aproximadamente 95% dos pacientes submetidos a esse procedimento (Singh et. al, 2016; Hegedus et. al, 2016). Considerando o número alarmante de 18,1 milhões de pacientes acometidos por câncer no mundo, muitos dos quais são submetidos a radioterapia, a radiodermatite assume uma posição de destaque como comorbidade que prejudica a adesão ao tratamento e contribui para o número global de 9,5 milhões de óbitos por ano de câncer (Ferlay et. al, 2019). No Brasil, para o biênio 2018-2019, a ocorrência de mais de 600 mil casos da doença foram estimados (INCA, 2018).

Atualmente, embora algumas intervenções mostrem resultados promissores, não existe tratamento que tenha provado ter um benefício claro e significativo para a radiodermatite (Hegedus et. al, 2016). Em parte, a complexidade do tratamento advém do fato do seu desenvolvimento depender das características do tratamento oncológico, bem como de fatores de risco individuais relacionados ao paciente. Além disso, a radiodermatite origina-se de uma combinação complexa do efeito direto da radiação e da resposta inflamatória secundária (Singh et. al, 2016; Sønstevoid et. al, 2015), onde pode-se observar eritema, descamação seca, descamação úmida (Singh et. al, 2016), além de atrofia crônica e fibrose (Feight et. al, 2011).

Dado que as reações da radiação na pele são resultantes do desequilíbrio entre a produção normal de células na camada basal e a destruição das células na superfície da pele, outras intervenções precisam ser desenvolvidas com o objetivo de estimular os mecanismos fisiológicos subjacentes de reparo tecidual (McQuestion, 2011). Apesar dos avanços tecnológicos e do maior direcionamento ao alvo das doses de radiação, as radiodermatites ainda não podem ser evitadas (Kodiyam et. al, 2015). A aplicação de corticosteróides tópicos é indicada, mas seu uso deve ser restrito devido ao risco de atrofia cutânea (Sharp et. al, 2013).

### *2.2.3 Dermatite atópica*

A dermatite atópica (DA) merece destaque devido a sua incidência nos países desenvolvidos, onde afeta aproximadamente 20% das crianças e 1-3% dos adultos. Ela é uma doença crônica, pruriginosa, inflamatória da pele com uma ampla gama de agravamentos. Em 85% dos pacientes, a DA desenvolve-se antes da idade de 5 anos e tipicamente atenua-se pela adolescência, mas pode persistir na idade adulta (Simpson et. al., 2010). No Brasil, a prevalência da DA entre adolescentes oscila entre 7,1% e 12,5%, com tendência à estabilização (Antunes et. al., 2017).

### *2.2.4 Lesão por pressão*

As lesões por pressão afetam milhares de pacientes e acarretam em custos globais que atingem a casa de bilhões de dólares por ano o (Bansal et. al, 2005). No Brasil, afetam cerca de 1% da população adulta e 3 a 5% da população com idade superior a 65 anos. Na Europa, estima-se que os gastos com tratamento de úlceras correspondam a cerca de 2% do orçamento com cuidados primários de saúde (Fonder et. al, 2008). De uma maneira geral, no ambiente hospitalar, a prevalência de úlceras é extremamente alta, variando de 2,7% a 29,5%. De forma específica, analisando a lesão por pressão como uma comorbidade, tem-se que em pacientes tetraplégicos a incidência é de 60%. Em idosos com fraturas de colo de fêmur esse número chega a 66% e em pacientes criticamente doentes a incidência é de 33%. Pacientes com lesões medulares que completam o seu tratamento desenvolvem lesão por pressão em 40% dos casos (Costa et. al, 2005). No Brasil, estudos em unidade de terapia intensiva estimam incidências de úlceras variando de 10,62% a 62,5%, variação essa que acompanha o nível social em que se encontra a unidade, corroborando com o fato de que a lesão por pressão é um dano evitável. Em clínica médica, a incidência estimada é de 42,6% e em unidades cirúrgicas de 39,5% (Anselmi et. al, 2009).

### *2.2.5 Pé diabético*

Denomina-se pé diabético a presença de infecção, ulceração ou destruição de tecidos profundos associados às anormalidades neurológicas e aos vários graus de doença vascular periférica em pessoas portadoras de diabetes mellitus (Brasil, 2016). As complicações do pé diabético são responsáveis por 40% a 70% do total de amputações não traumáticas de membros inferiores na população geral e 85% das amputações de membros inferiores em diabéticos são precedidas de ulcerações (Brasil, 2016). Dados da sociedade americana de diabetes afirmam que, diariamente, 4.110 americanos são diagnosticados com diabetes e, desses, 295 são submetidos à amputação de membros decorrente da instalação do pé diabético, que ocorre em 25% dos diabéticos nos EUA. Essa instituição também calculou o custo anual com essa comorbidade: US\$15 bilhões. Afirmam ainda, que 80% das amputações poderiam ser evitadas se houvesse prevenção adequada

para os pacientes que ainda não desenvolveram o pé diabético, o que resultaria em uma economia anual de US\$3,5 bilhões (American Diabetes Association, 2019).

### *2.2.6 Incisões Cirúrgicas*

O correto manejo da cicatrização em ambiente hospitalar é importante não apenas em úlceras, mas também nos sítios cirúrgicos. Estima-se que sejam realizadas 234 milhões de cirurgias de grande porte anualmente no mundo e as infecções do sítio cirúrgico decorrentes de falhas de cicatrização são as complicações mais comuns, que ocorrem no pós-operatório em cerca de 3 a 20% dos pacientes (ANVISA, 2017). Além desses prejuízos, o atraso na cicatrização pode prolongar a estadia do paciente no leito e aumentar a chance de readmissão hospitalar e cirurgias adicionais. Consequentemente, eleva-se exorbitantemente os gastos assistenciais com o tratamento, que pode chegar a US\$1,6 bilhões anuais apenas considerando o manejo de pacientes com infecções do sítio cirúrgico que prejudicam o processo de cicatrização (ANVISA, 2017).

## **2.3 Cicatrização**

Aliado às perdas econômicas e pessoais, o tratamento de feridas e lesões cutâneas enfrenta outro sério problema: falta de produto acessível e de eficácia cientificamente comprovada (McQuestion, 2011). Muitos produtos disponíveis são falhos quanto à sua eficácia por não compreenderem, nas suas ações terapêuticas, o aspecto multifatorial do processo de cicatrização, que, independente da etiologia, se constitui de um processo biológico complexo com interação simultânea de eventos celulares, bioquímicos e imunológicos, além de requerer um ambiente livre de microorganismos para o pleno estabelecimento (Slemp et al., 2006).

A complexidade da cicatrização advém dos diferentes mecanismos celulares característicos de cada fase do processo de reparo que, resumidamente, é dividido em três fases: inflamação, proliferação ou formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular, e remodelação (Balbino et al., 2005).

Embora, didaticamente, o processo de cicatrização esteja dividido nessas três fases, na realidade elas não são estanques e sim interdependentes. Dessa forma, para a evolução de cada uma das fases ocorrem eventos celulares, como migração e transmigração celular, tissulares, como vasoconstrição, vasodilatação, angiogênese e formação de tecido de granulação, e metabólicos, como coagulação e deposição de matriz extracelular. Todos esses eventos ocorrem de maneira sobreposta e dinâmica (Pedroso et al., 2019).

### 2.3.1 Fase inflamatória

O início de uma lesão é caracterizado por alterações nas junções entre as células ou nas próprias células endoteliais, podendo envolver ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus constituintes. Os eventos iniciais do processo de reparo do dano tissular estão assim voltados para o tamponamento desses vasos lesionados. Quase concomitantemente ao estímulo que causou a lesão ocorre vasoconstrição, como consequência da descarga adrenérgica, e degranulação de mastócitos, que liberam vasoconstritores. Em seguida, ocorre a deposição de plaquetas, prosseguindo com sua ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas, caracterizando o início da cascata de coagulação (Leite, 2016; Silva et al., 2016; Pedroso et al., 2019).

O resultado dessa sequência é a formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial. Esse trombo rico em plaquetas (trombo branco) é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso. Logo após, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa e forma-se, então, o trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. Este, além de limitar a perpetuação da perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo. A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana (Balbino et al, 2005).

As proteínas de adesão presentes nas membranas plaquetárias possuem um papel importante na adesão das plaquetas à superfície lesionada. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/ IIIa). Esses receptores possuem sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand, vitronectina, fibronectina e trombospondina.

Após a adesão à superfície lesionada, as plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial na corrente sanguínea. O colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação são fortes agonistas da adesão, agregação, ativação plaquetária e consequente liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários (Pedroso et al., 2019). Além disso, a plaqueta ativada aumenta a ação da protrombinase, que estimula ainda mais a produção da trombina, a partir da protrombina, promovendo, assim, a manutenção das condições para a amplificação da adesão plaquetária (Balbino et al., 2005). Mecanismos bioquímicos importantes, portanto, decorrem da ativação das proteínas e receptores de membrana, dotados, por sua vez, de capacidade intrínseca de perpetuar outras bioativações sinalizadoras do processo de reparo nas células periféricas à lesão.

A ação de macromoléculas de superfície bioativas não são restritas apenas às plaquetas. Por exemplo, as integrinas são proteínas de adesão transmembranares de queratinócitos que consistem em subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  e funcionam como os principais receptores para adesão celular à matriz

extracelular. Abundante em queratinócitos basais da epiderme, as integrinas  $\alpha 6\beta 4$  e  $\alpha 3\beta 1$  mediam a adesão à membrana basal celular subjacente (Longmate, et al., 2018; Martin et al., 2015). O LN-332 é o principal ligante adesivo na membrana basal cutânea, tanto para  $\alpha 3\beta 1$  quanto  $\alpha 6\beta 4$ , e mutações herdadas em cada uma das cadeias LN-332 individuais, bem como nas subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  e  $\beta 4$  integrina, dificultam a união entre as camadas da pele, levando a formação de bolhas na pele, doença conhecida como epidermólise bolhosa.

Além de seus papéis bem conhecidos na adesão celular, foi demonstrado que várias integrinas epidérmicas regulam a proteólise e a montagem da matriz extracelular (MEC) através de suas habilidades para controlar a expressão ou funções das metaloproteinases de matriz (MMPs) ou outras proteases extracelulares degradantes da MEC. Alterações nessas funções da integrina contribuem para o desencadeamento de feridas crônicas, doenças cutâneas vesiculares e certos tipos de câncer de pele (Longmate, et al., 2018).

Estando essas macromoléculas localizadas na superfície das membranas celulares e voltadas para o ambiente externo, o entendimento do microambiente em que se encontram tais células se torna primordial para a compreensão dos estímulos que ativam, geneticamente, os mecanismos de reparo (Pedroso et al., 2019).

Sendo o início de uma lesão caracterizada por alterações nas junções ou nas próprias células endoteliais, podendo envolver ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus constituintes, é possível o entendimento de que o dano representa tanto um estímulo físico quanto um estímulo químico (Martin et al., 2015).

As alterações físicas que culminam na alteração de pH do microambiente e corroboram para o disparo dos mecanismos de reparo tissular, decorrem da baixa tensão de oxigênio e presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kurahashi et al., 2015); ao passo que as alterações químicas decorrem das ligações entre estruturas das células rompidas com os receptores localizados na superfície da membrana de células íntegras que margeiam a lesão. Dentre tais estruturas bioativas, pode-se citar: fragmentos da membrana celular, organelas, macromoléculas inertes dos tecidos (como colágenos, elastinas e fibronectinas), proteínas séricas e mediadores inflamatórios pré-formados que extravasam dos vasos rompidos. As ligações nos receptores de membrana realizadas por tais estruturas induzem profundas modificações no metabolismo das células próximas à lesão, na expressão gênica e, conseqüentemente, em seus fenótipos (Martin et al., 2015). De fato, estudos do transcriptoma da ferida de camundongo revelaram numerosos genes aumentados após a lesão, e muitas dessas induções de genes ocorrem no epitélio da borda da ferida, estendendo-se até 70 ou mais linhas de células dessa adjacência (Cooper et al., 2004).

As primeiras regulações genéticas são os genes clássicos imediatos, incluindo Ap1, Fos e Jun, e os fatores de transcrição dos dedos de zinco krox. Elas permitem um aumento na proliferação

celular e migração epidérmica necessária à projeção de queratinócitos das bordas para o centro da lesão, a denominada língua de queratinócitos, que ocorre na interface entre a crosta e o tecido de granulação saudável da ferida (Martin et al., 2015).

Além das alterações na expressão genética, para que tal avanço celular seja possível, ocorre também uma alteração da adesão entre os queratinócitos da borda da lesão e a matriz de sustentação subjacente. Tal modificação na adesão é mediada tanto por alterações na adesividade das proteínas de adesão, as integrinas  $\alpha6\beta4$  e  $\alpha3\beta1$  e seu ligante LN-332, como discutido anteriormente, quanto pela alteração da constituição da matriz específica de uma região de ferida, que apresenta uma maior concentração de fibrina do que uma matriz íntegra. Essa constituição da matriz rica em fibrina particular ao tecido lesionado é caracterizada por uma menor força adesiva à superfície dos queratinócitos, favorecendo a migração dessas células para o centro da ferida, no sentido de reconstituir o epitélio que fora lesionado (Singh et al., 2009; Longmate et al., 2018; Martin et al., 2015).

A fibrina é uma macromolécula proteica que se constitui de partes monoméricas passíveis de polimerização pela ação do fator XIII. Ela resulta da clivagem do fibrinogênio sérico pela trombina resultante das vias de coagulação (Isaac et al., 2010). A trombina se constitui, então, de uma protease bioativa na cascata de coagulação, dotada da capacidade de converter o fibrinogênio solúvel do plasma em fibrina. A fibrina infiltra os agregados de plaquetas nos locais de lesão vascular e converte os tampões de plaquetas primários e instáveis em tampões hemostáticos firmes e estáveis (Silva et al., 2016). Ao infiltrar esse trombo rico em plaquetas, a rede de fibrina transforma-se em um trombo fibrinoso com capacidade de capturar eritrócitos, formando, então, o trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido (Gonzalez et al., 2016).

Dessa forma, a rede de fibrina, além de restabelecer a homeostase e formar uma barreira contra a invasão de microorganismos, organiza a matriz temporária de força adesiva alterada para os queratinócitos e adequada para a migração celular. A migração restaura a função da pele como barreira protetora, promovendo a manutenção da sua integridade (Gonzalez et al., 2016).

Como dito anteriormente, os eventos que culminam na cicatrização ocorrem de forma concomitante. Ao passo que a rede de fibrina é importante para constituição de uma barreira física contra invasão de microorganismos, a ativação plaquetária, já discutida, também representa um importante papel, tanto na formação da matriz provisória, quanto no combate a esses agentes potencialmente patogênicos (Isaac et al., 2010).

As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), quimiocinas como o CTAPIII e também outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina que são encontradas em seus grânulos. A interação das proteínas dos grânulos plaquetários com

proteínas da matriz extracelular somadas à massa de corpos plaquetários agregados, ao se estabilizarem, auxiliam na formação da matriz provisória. Esta se torna mais consistente à medida que a fibrina se polimeriza pelas vias intrínscas ou extrínscas da coagulação (Huang et al, 2020).

Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como TGF- $\beta$ , PDGF, tromboxanos e fator de ativação plaquetária (PAF) se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células (tanto da circulação como das regiões adjacentes) envolvidas com a instalação da resposta inflamatória. Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesionados. Ao final de um dia após a lesão eles constituirão 50% das células migradas ao local.

Além dos mediadores liberados durante a agregação plaquetária, o recrutamento de mais neutrófilos é influenciado também por quimiocinas produzidas pelos neutrófilos coletados pelo trombo provisório e leucotrienos liberados das células ativadas também pelo trombo provisório. Os leucotrienos são mediadores lipídicos da família dos eicosanóides, que, assim como as prostaglandinas e tromboxanos, são derivados da via mediada pela lipo-oxigenase da cascata do ácido araquidônico (Pedroso et al., 2019).

A principal ação dos metabólitos do ácido araquidônico é a promoção da resposta inflamatória aguda, caracterizada pela produção de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas E2 (PGE2) e prostaglandinas I2 (PGI2), seguidos por uma segunda fase na qual podem ser gerados mediadores lipídicos com atividades pro-restauradoras. A resolução da inflamação não é mais considerada um processo passivo, mas uma resposta programada ativa, regulada por mediadores com capacidade de reparo (Tallima et al., 2017).

A produção e liberação dos mediadores acima descritos são isoladamente insuficientes para o recrutamento de neutrófilos a partir da circulação. A força de arraste da corrente circulatória impede seu contato com as paredes dos vasos. Por ação dos eicosanóides, citocinas (principalmente interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral ou TNF $\alpha$ ) produzidas por macrófagos, mastócitos, células estromais e outros mediadores, as células endoteliais dos vasos não lesionados são induzidas a expressarem em sua membrana as integrinas, ou proteínas de adesão para leucócitos (Zhao et al., 2016). A expressão de integrinas ocorre por externalização das mesmas via corpúsculo de Weibel-Palade e/ou pela síntese de novas moléculas de integrinas, especialmente quando estão presentes IL-1 e TNF $\alpha$ . Estas, em situações normais encontram-se internalizadas e, após a influência destes mediadores, são expressas na região de sua membrana voltada para o leito vascular (Desai et al., 2013).

É também por ação de tais mediadores inflamatórios que os capilares dos vasos não lesionados se dilatam. Esse mecanismo lentifica a circulação sanguínea e diminui a sua força de arraste permitindo, assim, a marginação dos leucócitos e sua ligação às moléculas de adesão expressas nas células endoteliais (Balbino et al., 2005). Como consequência, ocorrem no tecido lesionado a infiltração de polimorfonucleares circulantes, como neutrófilos e monócitos, e a migração de células das áreas adjacentes, como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Estas últimas, em cooperação com as células locais, anteriormente ativadas, são os protagonistas da fibroplasia, ou produção de colágeno, deposição de MEC, angiogênese, cicatrização e reepitelização da região da ferida (Martin et al., 2015). Já os monócitos se infiltram em resposta a estímulos semelhantes aos dos neutrófilos, e se diferenciam em macrófagos sob o estímulo de substâncias como o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), de modo a aumentar a síntese proteica, seu tamanho celular, o aparelho de Golgi e o número de lisossomos, microtúbulos e microfilamentos (Komi et al., 2019).

Além de representarem importantes agentes no combate aos microorganismos, os macrófagos também desempenham um papel importante na cicatrização, dada a diversidade e relevância dos fatores de crescimento sintetizados por esse tipo celular, dentre os quais se incluem: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), TGF- $\beta$  e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A quimiotaxia de fibroblastos e sua proliferação é uma das funções dos EGF, FGF e PDGF. Ademais, o FGF também atua positivamente na migração e proliferação de queratinócitos, enquanto o TGF- $\beta$  na deposição de elementos da matriz pelos fibroblastos. O VEGF e o FGF atuam ainda como potentes fatores angiogênicos (Isaac et al., 2010), estimulando o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, essenciais à entrega do oxigênio, elemento essencial para a geração de energia requerida na renovação tissular (Dunnill et al., 2015).

Além de ser essencial para obtenção de altos rendimentos de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial, o oxigênio é precursor de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como moléculas secundárias de sinalização de algumas mensagens pró-cicatrizantes. Níveis basais de ROS mantêm o funcionamento celular normal e a homeostase tecidual, enquanto baixos níveis de ROS induzem a interrupção do ciclo celular, ou seja, são citostáticos (Kurahashi et al., 2015).

O termo 'ROS' aplica-se às moléculas que contêm  $O_2$ , mas que sofreram oxi-redução com a adição de elétrons, originando radicais altamente reativos. Membros bem conhecidos da família de moléculas ROS são ânion superóxido  $\cdot O_2^-$ , peróxido  $\cdot O_2$ , peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , radicais hidroxila  $\cdot OH$  e íons hidroxila  $OH^-$  (Dunnill et al., 2015).

Na fase inflamatória, os neutrófilos e os macrófagos, ao alcançarem a região da ferida, secretam grandes quantidades de ROS, além de citocinas pró-inflamatórias e enzimas proteolíticas, como MMP. A nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ou NADPH oxidase (NOX2) é uma

enzima expressa em altos níveis nas membranas plasmáticas das células inflamatórias e é ativada durante a fagocitose, o que resulta na produção de grandes quantidades de ânions radicais superóxidos. As ROS geradas atacam diretamente os patógenos invasores e os aniquilam no processo de fagocitose (Kurahashi et al., 2015). No interior das células de defesa, as ROS podem surgir da fosforilação oxidativa mitocondrial durante a produção de adenosina trifosfato (ATP) do retículo endoplasmático ou de uma classe de enzimas conhecidas como oxidoredutases, como a NOX2 (Bryan et al., 2012).

Em função do desequilíbrio da sua densidade eletrônica, ROS são dotadas da capacidade de capturar elétrons de outras moléculas próximas por meio de uma reação de oxidação que prejudica a estrutura da espécie que sofreu o ataque. Dessa forma, da mesma maneira que níveis baixos de ROS podem prejudicar a cicatrização pelo efeito citostático, níveis elevados de ROS podem ser prejudiciais à medida que danificam os tecidos circundantes (Kurahashi et al., 2015) e possuem ação na ativação de proteínas pró-apoptóticas para subsequente indução de morte celular e até necrose celular (Dunnill et al., 2015).

### *2.3.2 Fase Proliferativa*

A segunda fase da cicatrização, denominada fase proliferativa ou fase de formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular, também é influenciada pelas espécies reativas de oxigênio, uma vez que nessa fase intensifica-se o processo de angiogênese, que, por sua vez, é nortado por estados de hipóxia tecidual e gradiente de ROS. Essa condição de baixo teor de oxigênio estimula macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos a sintetizar VEGF (Schreml et al., 2010). A hipóxia ativa um fator de transcrição específico, denominado Fator Induzido por Hipóxia 1a ou HIF-1a. O HIF-1a se liga ao elemento de resposta à hipóxia na região promotora do gene VEGF, que, por sua vez, regula positivamente o VEGF. O VEGF, como principal fator de crescimento angiogênico, estimula as células endoteliais a migrar, proliferar e formar inúmeros novos capilares (Schreml et al., 2010).

Os novos capilares se ramificam e invadem a matriz provisória da ferida, que é substituída aos poucos por uma nova MEC, produzida e depositada por fibroblastos. A MEC emergente, na qual fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e macrófagos são incorporados, consiste em colágeno imaturo (tipo III), proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibrina, fibronectina e ácido hialurônico (Tallima et al., 2017). Nesse contexto, a produção e a deposição de colágeno representam fatores fundamentais no processo de reparo, pois reconstituem o alinhamento e a integridade da pele (Balbino et al., 2005). Tais fatores também são responsivos à tensão de oxigênio: os fibroblastos precisam de uma pressão de oxigênio de 30 a 40 mmHg para que ocorra a hidroxilação de resíduos de prolina e lisina na síntese de colágeno (Schreml et al., 2010).

A angiogênese e a síntese da MEC são processos interdependentes, pois novos vasos sanguíneos precisam de nova MEC como suporte tridimensional para seu crescimento, enquanto o metabolismo celular de, por exemplo, fibroblastos precisa de novos vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e outros nutrientes. O fato das mesmas citocinas estimularem cada processo interliga essas etapas da cicatrização de feridas. As citocinas da superfamília de TGF- $\beta$ , secretadas por fibroblastos e queratinócitos, parecem desempenhar o papel mais proeminente na formação de tecido de granulação. Moléculas de MEC como fibrinogênio, fibronectina, fibrina e vitronectina são interativas com tais citocinas e também regulam a diferenciação da proliferação e a migração de fibroblastos (Eming et al. 2015).

Paralelamente à formação de tecido de granulação, é iniciada a reepitelização. A reepitelização visa cobrir a superfície da ferida por uma camada de epitélio e baseia-se na diferenciação, proliferação e migração de queratinócitos epidérmicos. As vias de estresse ativadas pela lesão levam à liberação dependente de oxigênio de certas citocinas e quimiocinas (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, EGF e PDGF) por células parenquimatosas, como queratinócitos. Essas citocinas, principalmente o TNF- $\alpha$ , parecem estimular as células epidérmicas nas bordas da ferida e nos folículos capilares de maneira autócrina para reestruturar seu citoesqueleto, um processo que depende do oxigênio e inicia algumas horas após a lesão (Schreml et al, 2010), como discutido anteriormente.

### *2.3.3 Fase de remodelação*

A última fase, fase de remodelação, também é oxigênio-dependente. Essa fase é caracterizada pela contração da ferida, mediante diferenciação de fibroblastos em um subgrupo contrátil, os miofibroblastos. A contração dos miofibroblastos é desencadeada por oxigênio e mediada por TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e PDGF (Schreml et al, 2010). Nessa fase, gradualmente, o colágeno provisório (tipo III) é substituído pelo colágeno tipo I mais estável, produzido por fibroblastos estritamente de forma oxigênio-dependente e depositado em um alinhamento fisiológico. Assim, a ferida cicatrizante ganha maior resistência à tração. As fibras de colágeno se contraem para que o tecido da ferida encolha (Eming et al. 2015).

Outros mediadores proeminentes do anabolismo e catabolismo do colágeno que detêm síntese oxigênio-dependente são as MMPs, sintetizadas pelos macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos. De ação catalítica sobre proteínas da matriz extra celular, a síntese e ativação das MMPs são reguladas positivamente e proporcionalmente pelo gradiente das ROS. Isso é indicativo de que altas quantidades de ROS não apenas danificam proteínas da estrutura extracelular, lipídios e DNA, mas também estimulam vias complexas de transdução de sinal, levando a uma expressão aprimorada de MMPs e outras proteases, além de citocinas inflamatórias, como explanado anteriormente (Dunnill et al., 2015)

De fato, é esse dano tecidual mediado pelas ROS que desempenha um papel significativo no envelhecimento e foi levantada a hipótese de que a dependência das ROS durante a inflamação se torna maior ao longo do envelhecimento. Como reflexo, tem-se que as feridas crônicas são frequentemente caracterizadas pela presença de ROS excessivas ou pela ausência de moléculas antioxidantes eliminadoras de ROS, como vitaminas E, C e glutatona (Kurahashi e Fujii, 2015).

As moléculas com capacidade antioxidante atuam através de mecanismos que envolvem a redução de hidroperóxidos em álcool e água, sem gerar radicais livres (Montes et al, 2019). É interessante notar que os níveis de antioxidantes da ferida diminuem à medida que envelhecemos, o que corresponde às respostas retardadas da cicatrização de feridas observadas em idosos. Isso sugere que a cicatrização reduzida ou retardada da ferida ocorre como consequência de menores concentrações de antioxidantes, permitindo que a reação ROS da ferida prossiga sem controle, aumentando progressivamente o dano tecidual (Schafer e Werner, 2008). Na literatura, esse fenômeno das moléculas antioxidantes foi demonstrado em diversos tecidos além do tecido cutâneo (Neha et al., 2019; Kaur et al., 2006; Sindh et al., 2013; Seifried et al., 2007).

Dessa forma, após percorridas todas ações das espécies reativas de oxigênio, é imperativo a relevância do estabelecimento de um equilíbrio entre os efeitos benéficos e os efeitos degenerativos das ROS (Bryan et al, 2012). Os antioxidantes, portanto, se mostram espécies moleculares cruciais para obtenção de radicais de menor reatividade para o alcance desse equilíbrio e obtenção um processo de cicatrização sustentável.

É a partir do entendimento da forma como moléculas antioxidantes neutralizam o efeito deteriorador de espécies reativas de oxigênio, que compreende-se seu caráter anti-inflamatório. Ao prevenir ou tratar doenças relacionadas ao estresse oxidativo, neutralizando o efeito deteriorador das ROS, os antioxidantes desempenham um papel crucial na conservação das melhores funções celulares (Neah et al, 2019). Dessa forma, além da tentativa de recuperação dos constituintes da pele e do controle de infecções por microorganismos, as estratégias pró-cicatrizantes devem considerar a modulação da inflamação tecidual e a interrupção da geração de radicais livres decorrentes dos processos inflamatórios (Masson, 2011) ou do ambiente externo, como a radiação ionizante na radiodermite. Nesse contexto, a etapa racional para o desenvolvimento de um produto de ação cicatrizante deve considerar compostos com conhecida propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e com potencial de reestabelecer os constituintes originais da pele.

## 2.4 Extratos vegetais com propriedades cicatrizantes em potencial

Os produtos à base de ervas medicinais têm um importante papel no gerenciamento da saúde e são fontes de moléculas bioativas (Krishnank et al, 2019). Eles se diferenciam em função da diversidade de componentes ativos encontrados em cada espécie vegetal, uma vez que, majoritariamente, os constituintes agem sinergicamente e, assim, aumentam o potencial terapêutico da composição natural (Musthaba et al., 2009). Na literatura, os resultados apresentados sobre o potencial antioxidante de plantas medicinais comprovam a presença de compostos com capacidade de interagir com os radicais livres, melhorando a homeostase entre estresse oxidativo e status antioxidante, importante no estímulo pró-cicatrizante (Montes et al., 2019). Os fitoquímicos antioxidantes mais comuns encontrados nas plantas são as moléculas das classes dos alcaloides, das quinonas, dos terpenóides e as macromoléculas da classes dos polifenóis. Os polifenóis são substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos. Como exemplos de polifenóis podemos citar, as saponinas, os taninos, e os flavonóides (Krishnank et al., 2019).

De uma maneira geral, essas macromoléculas podem interagir com receptores ou enzimas envolvidas na tradução do sinal, modificando a oxidação celular no sentido de promover uma condição antioxidante. Os polifenóis, alcaloides e quinonas também podem exibir propriedades anti-inflamatórias e propriedades antioxidantes pela ação conjunta do bloqueio da liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e inibição da produção de óxido nítrico (NO) e PGE2. Dessa forma, diminuem a ativação da enzima fosfato de dinucleótido de NADPH oxidase e impedem a formação de ROS (Schaffer & Halliwell, 2012).

Dentre os polifenóis, os flavonóides são produzidos como um mecanismo de proteção contra agentes exógenos que afetam a integridade da planta. A estrutura química característica dessa classe contém dois anéis benzênicos unidos por uma cadeia central de três átomos de carbono. Diferentes classes de flavonóides podem ser identificadas dependendo do restante de sua estrutura: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonóides, proantocianidinas (catequinas) e antocianidinas. Sua atividade antioxidante é atribuída às propriedades redox, onde atuam como agentes redutores, doadores de elétrons ou quelantes de metais (Djekic et al, 2015).

Ao considerar o processo de cicatrização, além da comprovada ação contra radicais superóxidos, é descrito na literatura que os flavonóides melhoram o processo de reparo tissular também devido à sua propriedade adstringente e antimicrobiana que, em conjunto, favorecem a contração da ferida e melhoram taxa de reepitelização (Krishnank et al., 2019). Vale ressaltar que o efeito antioxidante dos flavonóides diminui a peroxidação lipídica, impedindo ou diminuindo o início da necrose celular, além de contribuir com a vascularização. Portanto, considera-se que todo agente com capacidade de inibir a peroxidação lipídica também acaba por promover a viabilidade

das fibrilas de colágeno, a força das fibras de colágeno, aumenta a circulação, impede o dano celular e estimula a síntese de DNA (Schaffer & Halliwell, 2012).

Da mesma maneira, outras moléculas com grupamentos aromáticos a, incluindo taninos, ácidos cinâmicos substituídos, ácidos fenólicos e fenilpropanóides, mostraram propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Taninos são polifenóis solúveis em água, que podem se ligar a proteínas e carboidratos, resultando em uma redução na digestibilidade dessas macromoléculas, promovendo assim a inibição do crescimento microbiano. Os taninos aumentam o processo de cicatrização de feridas por meio de vários mecanismos celulares. Quelantes de radicais livres, melhoram a contração da ferida, aumentam a resistência do vaso capilar e a proliferação de fibroblastos. Sua atividade antioxidante permite com que reduzam a peroxidação lipídica e a necrose das células, além de melhorar a vascularização (Krishnank et al., 2019).

Tal atividade antioxidante também é propriedade da estrutura molecular das Saponinas, definidas como glicosídeos de triterpenos e esteróides. Devido às suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, as saponinas são valiosas na contração da ferida e na reepitelização. As propriedades adstringentes e antimicrobianas dos triterpenos são responsáveis por sua ação promotora da cicatrização de feridas.

Já os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos de baixa massa molecular que contêm nitrogênio em um estado de oxidação negativo. Devido às suas propriedades analgésicas, antiespasmódicas e bactericidas, os alcalóides são usados como agentes medicinais.

Também caracterizados por moléculas de baixo peso molecular, os terpenóides que ocorrem como monocíclicos ou multicíclicos também foram identificados como possuindo atividade contra bactérias, vírus e fungos, o que justifica a utilização de extratos ricos em terpenóides em produtos cicatrizantes (Montes et al, 2019).

#### 2.4.1 Óleo de Girassol

Fonte de compostos fenólicos, flavonóides e vitaminas (Guo et al., 2017), extratos do óleo da semente da espécie *Helianthus annuus*, conhecida popularmente como girassol, possuem propriedades antioxidante (Pereira et al., 2016), antimicrobiana (Aboki et al., 2012; Regente & Canal, 2000; Menéndez, 2010), anti-inflamatória (Eichienfield et al., 2009), anti-hipertensiva (Pal et al, 2011) e cicatrizante (Magalhães et al, 2007; Pal et al, 2011; Wendt, 2005). Ademais, o óleo das sementes de girassol representa uma importante fonte de ácidos graxos insaturados, dentre eles o ácido oleico e o ácido linoleico (Moreski et al., 2018).

Os ácidos graxos são divididos de acordo com a localização das ligações químicas. Dois importantes grupos incluem os n-3 ou ômega-3 e os n-6 ou ômega 6. Os principais ácidos graxos que compõem o grupo ômega 3 são: ácido alfa-linolêico, ácido eicosapentanóico e o ácido

docosa-hexanoico. Os principais ácidos graxos que compõem o grupo ômega 6 são: ácido linoleico e ácido araquidônico. Os ácidos graxos dos grupos ômega 3 e 6 não são sintetizados pelo organismo animal, tampouco bioconvertidos um no outro. Sendo assim, a obtenção destas substâncias deve, obrigatoriamente, ocorrer através da suplementação exógena (Wendt, 2005).

O óleo de girassol assume destaque dentre as fontes de ômega 6, uma vez que o principal componente lipídico do óleo de girassol é o ácido linoleico na forma de triglicerídeo (61,5%). Entretanto, também possui em sua composição o ácido oleico (24,3%), o palmítico (9,3%), o esteárico (3,7%) e o linolênico (1%) (Eichenfield, 2009), representando, portanto, uma fonte adicional de ômega-3. Além de tais ácidos graxos essenciais, o óleo de girassol destilado ainda apresenta substâncias de elevada atividade antioxidante, como 5% de fitoesteróis e 1% de vitamina E (Belilovsky et al, 2015).

Além da presença de tais moléculas de ação anti-oxidante, a efetividade do óleo de girassol na preservação do tecido cutâneo está relacionada à semelhança de seus lipídios com aqueles presentes no estrato córneo (Eichenfield et al., 2009). Alguns estudos mostraram que o óleo de girassol estimula a produção de ceramidas epidérmicas, a síntese de colesterol e a ativação dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo alfa (PPAR $\alpha$ ), que desempenham um papel essencial na regulação da diferenciação celular e estão envolvidos na homeostase da barreira cutânea (Belilovsky et al., 2015).

De fato, quando aplicado topicamente, os ácidos graxos presentes no óleo reduzem a perda transepidermal de água de 33 a 50% (Eichienfield et al., 2009). Adicionalmente à semelhança com constituintes da matriz lipídica da pele, o ácido linoleico está relacionado com propriedades promotoras da neovascularização (angiogênese) local, interferindo positivamente na migração celular, proliferação e diferenciação fibroblástica e, conseqüentemente, na síntese de MEC (Moreski et al., 2018).

Sendo assim, o óleo de semente de girassol com alta concentração de ácido linoléico pode ser indicado como uma alternativa terapêutica para auxiliar no processo de cicatrização de feridas. Marques et al., 2004, encontraram que após 3 dias do tratamento com óleo de semente de girassol em cordeiros machos jovens, as áreas das feridas reduziram em 300% e após 7 dias o aspecto das cicatrizes melhoraram macroscopicamente em comparação com as feridas não tratadas. Esses resultados confirmam a eficiência de aminoácidos e ácidos graxos essenciais na cicatrização de feridas relatados por Baie & Sheikh e Guo. Os ácidos linoléico e araquidônico são importantes não apenas na manutenção de uma barreira cutânea à perda de água e como precursor das prostaglandinas, mas também desempenham um papel na regulação da divisão celular, diferenciação da epiderme e, conseqüentemente, no controle da descamação da pele. Van Dorp e Prottey et al. observaram que o óleo de girassol com alto teor de ácido linoléico pode reverter e

curar lesões escamosas e dermatose em humanos. Darmstadt et al. testaram o impacto da aplicação tópica de óleo de semente de girassol 3 vezes ao dia em bebês prematuros com menos de 34 semanas de idade gestacional sobre a condição da pele. Os tratamentos com o óleo de semente de girassol resultaram em uma melhora significativa na condição da pele e na redução da incidência de infecções nosocomiais. As propriedades antimicrobianas do óleo dependem dos diferentes fitoquímicos nele presentes. Os taninos, por exemplo, formam complexos irreversíveis com proteínas ricas em prolina, resultando na inibição da síntese de proteínas das células microbianas.

A atividade antibacteriana e antifúngica do óleo de semente de girassol foi investigada determinando a zona de inibição formada ao redor do disco, revelando vários graus de potência para inibir *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholera*, *Aspergillus fumigates*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*. Os autores atribuíram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo aos flavonóides, alcalóides, saponinas e taninos extraídos que comprovadamente inativam aderências microbianas, enzimas e proteínas de transporte de envelopes celulares (Guo et al., 2017).

Além da atividade antimicrobiana conferida pelos polifenóis, o óleo das sementes de girassol, assim como o de outras sementes, possui Ha-AP10. Polipeptídeo básico de 10 kDa homólogo de proteína de transferência lipídica (LTP) de plantas, o Ha-AP10 apresenta alta atividade antifúngica (Regente et al., 2000).

As atividades antioxidante e antiinflamatórias do óleo da semente de girassol são atribuídas principalmente aos polifenóis nele presentes e a sua capacidade de inibir as ROS. Xi et. al., 2008 mostraram que os efeitos antioxidantes e antiglicativos do óleo de girassol foram eficazes no tratamento e prevenção do diabetes, por eliminar as ROS que induzem as principais vias bioquímicas associadas a complicações diabéticas, incluindo o pé diabético. Outros estudos evidenciaram que é possível com ele reduzir o edema de pata induzido por carragenina em 79,5% em comparação com a indometacina (56,2%), um medicamento anti-inflamatório amplamente utilizado, mas cuja administração causa danos gástricos evidentes em ratos. A administração de indometacina em conjunto com o óleo de girassol não causou dano gástrico estatisticamente significativo nas cobaias. De fato, o óleo de girassol reduz os danos oxidativos em mucosas e, portanto, quando combinado a indometacina, potencialmente evita os danos por ela causados (Guo et al., 2017).

Três ácidos diterpenos (ácidos grandiflorólico, caurenóico e traquilobanóico) isolados do extrato oleoso de girassol reduziram, de maneira concentração-dependente, a produção de NO, PGE2 e TNF- $\alpha$ , bem como a expressão de NOX-2 quando avaliados em linhagem de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS. *In vivo*, suprimiram o edema da orelha de camundongo induzido por

12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e inibiram a ação da mieloperoxidase (MPO), um índice de infiltração celular (Pal et al, 2011).

Alguns produtos comerciais já estão bem estabelecidos no mercado por explorar tais atividades inerentes ao óleo de girassol. Como exemplo, tem-se o óleo Dersani® (óleo de girassol com vitaminas; Laboratório Saniplan, Brasil) e óleo Oleozon® (óleo de girassol ozonizado; Ozone Research Center, Havana City, Cuba), ambos com vastos estudos científicos publicados na literatura. O Oleozon® tem uma ação germicida comprovada. Muitos estudos se referem a seus efeitos antimicrobianos contra vírus, fungos e bactérias, incluindo cepas resistentes. Além disso, estudos toxicológicos demonstraram que o Oleozon® não é mutagênico ou genotóxico. O produto foi registrado em Cuba para o tratamento de tinea pedis e impetigo .

Tendo em vista a atividade fungicida do Oleozon® e a necessidade de encontrar agentes tópicos mais eficazes, foi realizado um estudo controlado, fase III, randomizado, envolvendo 400 pacientes ambulatoriais com onicomicose. Este ensaio demonstrou a superioridade da atividade fungicida do Oleozon® tópico, mesmo em comparação com tratamento oral convencional. Este produto possui um amplo espectro de ação, não se relacionou com a resistência a patógenos, apresentou boa difusão tecidual e foi bem tolerado por pacientes sem quaisquer reações adversas. Em comparação, o cetoconazol tópico não reduziu a carga de fungos nas unhas afetadas, com apenas pequenas melhorias no terceiro mês de tratamento (Menendez et.al., 2010).

Assim como o Oleozon®, o produto Dersani® também está presente em muitos estudos científicos. Magalhães e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do produto em modelo cutâneo de cicatrização por segunda intenção em ratos Wistar e concluiu que a loção oleosa, isoladamente, intensificou a neovascularização e, por conseguinte, o tecido de granulação, influenciando positivamente no processo cicatricial. Evidências clínicas em humanos também foram publicadas. Bruzi e colaboradores (2011) relataram que o uso de Dersani® revitaliza e preserva o equilíbrio hídrico da pele, melhora a elasticidade, e, assim, contribui para restabelecer a integridade cutânea.

#### 2.4.2 Óleo de Rosa Mosqueta

A rosa mosqueta (*Rosa aff. rubiginosa*) pertence ao gênero *Rosa*, da família Rosaceae, e possui aproximadamente 70 espécies diferentes em todo o mundo (Santos et al., 2009). O óleo de rosa mosqueta dotado de atividade biológica é extraído da semente da planta e demonstrou pronunciada atividade antioxidante, anti-inflamatória e repositora de constituintes lipídicos da pele. (Santos et al., 2009; Eurides et al., 2011; Pichonelli et al., 2016 e Delbon et al., 2017). Seus constituintes aromáticos responsáveis pela ação antioxidante e, portanto, protetora das células em processo de reepitelização, são ricos em fenóis (glicosídeos flavonóides e proantocianidinas), vitaminas E e C e carotenóides (Salminen et al., 2005). Já seus constituintes graxos variam de

acordo com a espécie e suas concentrações estão compreendidas entre 43 e 49% de ácido linoléico, 32 e 38% de ácido linolênico, 14 e 16% de ácido oléico, 3 e 5% de ácido palmítico, 0,1 e 5% de ácido palmitoléico, 1 e 2% de ácido esteárico, além de outros ácidos graxos presentes em concentrações menores de 1%, como o láurico, mirístico, araquidônico, gadoléico, behênico e fosfolipídios (Matthaus et al., 2014).

Os ácidos graxos essenciais têm ainda uma função estrutural, formando parte dos fosfolipídios das membranas celulares dos tecidos do organismo, sendo os precursores de prostaglandinas e leucotrienos a partir da síntese do ácido araquidônico. Já os fosfolipídios intervêm em diversos processos metabólicos, tais como no processo ativo de fosforilação, na mitose e organização celular e nos intercâmbios iônicos, o que confere ao óleo de rosa mosqueta um alto potencial no tratamento de feridas e cicatrização tecidual (Dabrowska et al., 2019).

Além disso, os ácidos graxos são capazes de aumentar a permeabilidade da membrana celular e facilitar a entrada de fatores de crescimento, estimulando a proliferação e migração celular e neoangiogênese, atuando, assim, diretamente na fase proliferativa da cicatrização. De forma simultânea, altas concentrações de ácido ascórbico (vitamina C) encontradas no óleo da semente de rosa mosqueta têm relevante papel na regeneração tecidual, sendo um importante elemento para a formação e deposição das fibras colágenas sobre a cicatriz (Santos et al., 2009).

Em menores quantidades, o óleo da semente dessa espécie vegetal contém, ainda, acetaldeído, ácido t-retinóico, ácido quínico, ácidos orgânicos, aminoácidos, antocianinas, benzaldeído, citral, citronelol, eugenol, metil-éster, quercetina, quercitrina, pectina, sais minerais, saponina e tanino. As revisões sobre o tema ressaltam a grande quantidade de fenóis (glicosídeos flavonóides e proantocianidinas) e carotenóides encontrados no óleo da rosa mosqueta, além de catequinas, compostos incolores, hidrossolúveis, pertencentes a um grupo de polifenóis com intensa atividade antioxidativa, o que aprofunda as propriedades antioxidantes atribuídas a essa espécie, justificando seu uso na alimentação e como agente medicinal pelo saber popular antigo (Santos et al., 2019; Delbon et al., 2017; Pichonelli et al., 2016; Tome et al., 2009).

Em função dessa composição rica em macromoléculas bioativas, a ação fisiológica do óleo de rosa mosqueta foi justificada em diversas investigações pré-clínicas e clínicas. Marchini et al. relataram resultados positivos em estudo experimental controlado realizado com ratos cujas lesões em dorso foram tratadas com óleo de rosa mosqueta. Seus achados histológicos evidenciaram aceleração do processo de cicatrização e menor atividade inflamatória no grupo de estudo em relação ao grupo-controle (Santos et al. 2009).

Moreno et al., do Departamento de Dermatología Médico- Quirúrgica y Venereologia da Faculdade de Medicina, Universidade de Sevilla, em suas experiências com o uso de óleo de semente de Rosa Mosqueta em feridas abertas, relata excelentes resultados. Foi verificada “uma

rápida cicatrização pela indução de um bom tecido de granulação”, não se observando reações de sensibilização, mesmo naqueles pacientes com alguma história de sensibilidade a algum outro produto. Por esses achados, ele e sua equipe recomendam o uso desse preparado em lesões abertas e mesmo na preparação pré-operatória de intervenções cirúrgicas (Santos et al., 2009).

Em estudo clínico com grupo-controle, discutido no trabalho de Santos et al., 2009, os autores demonstraram uma melhora no tempo e na qualidade de cicatrização entre pacientes em uso de óleo de rosa mosqueta a 26% em comparação ao grupo controle. Foram avaliados pacientes com úlceras varicosas, úlceras pós-traumáticas, eczemas de contato e deiscências pós-cirúrgicas. Todos apresentaram resultados positivos em relação ao grupo de comparação, ocorrendo uma diferença de até 29 dias de cicatrização entre os grupos avaliados (23,2 dias para o grupo terapêutico contra 52,2 dias para o grupo-controle). Dos pacientes com úlceras varicosas ou pós-traumáticas, apenas um apresentou recidiva.

Em 1993, Thielemann e sua equipe estudaram o efeito de cremes à base de óleo de rosa mosqueta na atenuação dos efeitos do envelhecimento, especialmente na atenuação de rugas de expressão, chegando a resultados satisfatórios (Thielemann et al., 1993). Dermatologicamente tem-se utilizado o óleo de rosa mosqueta em cicatrizes quelóideas hipertróficas, cicatrizes acneiformes e radiodermites com resultados variáveis. O emprego nos efeitos secundários da radioterapia foi a primeira indicação deste preparado, mostrando-se altamente eficaz (Santos et al., 2009).

## **2.5. Cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC)**

Comprovar a segurança da formulação durante o desenvolvimento de um produto fitoterápico é imprescindível, uma vez que, se as misturas de vários extratos brutos, quando em preparações medicinais, podem resultar em aumento dos efeitos benéficos, é racional considerar também que pode ocorrer aumento da toxicidade da preparação final (Elvin-Lewis et al., 2001).

Praticamente todos os extratos naturais bioativos podem causar reações alérgicas e vários podem ser responsáveis pela fotossensibilização (Ernst et al., 2000), o que torna primordial o estudo da toxicidade da preparação, bem como das alternativas de elevar sua segurança e reduzir as chances de efeitos adversos do tratamento.

Os estudos sobre a cicatrização de lesões e as estratégias de substitutos cutâneos para ensaios pré-clínicos concentraram-se na intervenção de estágios da cicatrização normal da pele para observação do efeito dos tratamentos que se pretende investigar. Nesse sentido, o uso de culturas de monocamada *in vitro* de células da pele humana são comumente utilizados para compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na cicatrização de feridas. Dentre os ensaios *in vitro* para tal finalidade, destacam-se o ensaio do arranhão (*scratch assay*) e estudo de *uptake* celular, que pode ser tanto quantitativo, via análise citométrica, ou qualitativo, por microscopia confocal.

Tais estudos são relevantes para o entendimento da interação entre superfície celular e o tratamento aplicado e a intensidade com que ocorre a internalização de substâncias de interesse ou de um sistema de liberação pelas células estudadas. Com ensaios *in vitro* é possível obter, por exemplo, conclusões importantes sobre a concentração requerida de uma substância para se conseguir determinado efeito, e influência do tratamento na expressão de moléculas de adesão na superfície celular. Assim, entender a citocompatibilidade das intervenções é um passo importante durante a caracterização inicial de formulações com ação cicatrizante (Dobrovolskaia, et al., 2008).

Entretanto, os ensaios *in vitro* em monocamadas são limitados por não considerarem a complexidade das interações celulares e moleculares que ocorrem no ambiente 3D multidimensional (Sami et al., 2019). Embora seja bem aceito que estudos *in vivo* em humanos ofereçam resultados conclusivos e eficazes para aplicações clínicas, tais estudos apresentam várias preocupações práticas, éticas e morais. Como tal, estudos *in vivo* em modelos animais receberam maior atenção, pois permitem uma análise exaustiva da interação celular e da fisiologia no tecido vivo. No entanto, a eficácia clínica do uso de modelos animais, como os murinos e os suínos, que têm diferentes perfis de pele e cicatrização dos humanos, permanece incerta e ainda se relacionam com questões práticas, éticas e morais. Como tal, estudos *in vitro* usando equivalentes de pele humana organotípicos e 3D semeados com queratinócitos ou fibroblastos ou ambos são amplamente utilizados para preencher a lacuna entre os métodos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, embora esses modelos forneçam um ambiente multidimensional ao redor das células, as matrizes são simplificadas com fidelidade limitada à pele humana *in vivo* (Bage et al., 2019).

Nesse contexto, as metodologias *ex vivo* surgem como alternativas às limitações de complexidade dos modelos *in vitro* e limitações éticas dos modelos *in vivo*, uma vez que configuram um modelo onde se mantêm vivos, em cultura, fragmentos de pele humana com todos seus tipos celulares, a citar: melanócitos, células de Langerhans, queratinócitos e toda a estrutura de fibroblastos dérmicos, glicosaminoglicanos e colágeno (N. Lebonvallet et al., 2010). Dessa forma, os modelos *ex vivo* de cultura de explante de pele humana configuram arcabouço mais completo que os modelos validados tridimensionais existentes, que são feitos apenas de queratinócitos e fibroblastos em uma matriz extracelular desvitalizada (Xu et al., 2012).

Certamente, os dados da fisiologia da pele mais confiáveis são aqueles coletados em estudos em humanos. No entanto, esses estudos geralmente não são viáveis durante o desenvolvimento inicial de uma nova forma de dosagem farmacêutica ou a consideração de um novo candidato a medicamento. Assim, um dos principais desafios da pesquisa biofarmacêutica é encontrar uma correlação entre estudos *ex vivo*, animais e humanos, para prever a atividade percutânea em humanos do novo tratamento e, assim, encurtar e economizar o processo de desenvolvimento de medicamentos e minimizar o número de estudos em animais e humanos (Bage et al., 2019).

Uma metodologia recente que está sendo estudada para ultrapassar esse desafio é o ensaio *ex vivo* de cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC), uma metodologia alternativa para análise histológica da pele humana. Ao apresentar uma interface ar-líquido, onde a derme fica totalmente submersa no meio rico em nutrientes e a epiderme na superfície, possibilitando o contato e trocas gasosas com ar, o sistema hOSEC permite a manutenção da viabilidade do microambiente cutâneo por até 75 dias (Frade et al., 2015). Além disso, por preservar o estrato córneo, o modelo possibilita a aplicação de cremes, pomadas e substâncias lipossolúveis na camada córnea, diferentemente dos sistemas *in vitro* em cultura de células que apenas permitem o uso de formulações solúveis no meio celular e são desprovidos de estrato córneo (Andrade, 2012). O sistema hOSEC constitui-se, então, de um sistema de pele humana em cultura que muito se aproxima da condição *in vivo*, uma vez que mantém toda a estrutura da pele humana e preserva a atividade fisiológica idiossincrática.

Além de manter elementos importantes da pele *in vivo*, mostrando vantagens significativas frente aos estudos de cicatrização *in vitro* de feridas, o modelo hOSEC, quando associado a testes de citotoxicidade é capaz de auxiliar na avaliação da segurança e eficácia dos produtos tópicos, sejam eles constituídos por um único insumo ativo ou combinação de vários compostos dotados de atividade biológica (Xu et al., 2012 e Frade et al., 2015).

## 2.6. Nanoemulsões

Durante muito tempo, as ervas medicinais não foram consideradas para o desenvolvimento como novas formulações devido à falta de justificativa científica e dificuldades de processamento, como padronização, extração e identificação de componentes individuais de medicamentos em sistemas complexos, contendo mais de um extrato. Hoje, com esses conhecimentos, é possível combinar extratos com diferentes características físico-químicas e potencializar suas atividades terapêuticas a partir de sua incorporação em sistemas de liberação nanoparticulados, como nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, entre outros (Musthaba et al., 2009).

Como a maioria das substâncias ativas de ervas são pouco solúveis em meio aquoso e têm uma natureza hidrofóbica, as nanoemulsões surgem como uma alternativa promissora para formulação de fitoterápicos, pois além de elevarem a solubilidade dos compostos ativos lipofílicos, possuem boa estabilidade termodinâmica, facilidade de fabricação, clareza óptica e excelente estabilidade cinética (Musthaba et al., 2009). Além disso, estão relacionadas com vantagens no aspecto final das preparações, melhorando propriedades de espalhabilidade e textura, o que acaba por contribuir para adesão do paciente ao tratamento dermatológico.

Nanoemulsão pode ser definida como um sistema metaestável no qual um líquido (fase interna ou dispersa) é disperso em outro líquido (fase externa, contínua ou dispersante) na forma de pequenas gotículas estabilizadas por um sistema emulsificante (Oliveira, 2014; Salleh et al., 2012). As nanoemulsões se distinguem das emulsões convencionais pelo menor diâmetro das gotículas dispersas, maior superfície de contato entre as fases, e maior capacidade de entrega de substâncias ativas (Lee et al., 2011).

A maior capacidade de entrega de substâncias ativas por partículas de diâmetros na escala nanométrica em formulações de aplicação tópica é amplamente relatada na literatura (Khandavilli et al., 2007). Acredita-se que o aumento da biodisponibilidade das substâncias ativas conseguida em virtude do menor tamanho de gotícula está relacionado à maior superfície de contato e consequente interação entre elas e a pele (Subramaniana et al., 2008 e Oliveira, 2014).

Em um estudo que combina nanoemulsões e extratos vegetais, Wang e colaboradores tentaram melhorar a atividade antiinflamatória da curcumina incorporando-em nanoemulsões o/a (óleo em água) obtidas por diferentes métodos. As melhores formulações apresentavam gotículas de 80 a 120 nm. Quando comparadas com uma solução aquosa de curcumina contendo 10% de polissorbato 20 (Tween 20) em relação à capacidade de redução de edema de orelha de rato induzido por 12-O-tetradecanoilforor-13-acetato, as nanoemulsões preparadas por um método de homogeneização à alta pressão mostraram atividade aumentada em comparação com aquelas preparadas usando um método de alta velocidade. Nenhuma inibição foi observada quando a solução aquosa contendo a curcumina foi aplicada (Wang et al., 2008).

Em 2008, Ali e seus colaboradores compararam o efeito antiinflamatório de um óleo de babchi (*Psoralea corylifolia*) incorporado em nanoemulsões e em emulsões convencionais. As nanoemulsões foram preparadas por um método aquoso de titulação de fase, apresentaram tamanho médio de gotículas de aproximadamente 80 nm e foram espessadas com um polímero carboxivinílico (carbopol-940), resultando em uma formulação com a mesma viscosidade da emulsão. Os efeitos anti-inflamatórios das preparações, que foram determinados em ensaios *in vivo* pelo edema de pata, sugeriram que a nanoemulsão apresentou melhores efeitos do que a emulsão convencional (Ali et al., 2008)

Para reduzir a toxicidade do triptolido, um diterpenóide extraído da espécie *Tripterygium wilfordii*, pesquisadores estudaram sistemas de nanoemulsão para administração transdérmica de triptolido. A formulação de nanoemulsão contendo triptolido 0,025%, ácido oleico a 6%, Tween 80 20%, propilenoglicol 10%, água 62,95% e mentol 1% (como promotor de permeação) tinha um tamanho médio de partícula de 71 nm e apresentou melhor proteção contra a irritação, durante 7 dias após a aplicação em estudos *in vivo*, do que uma formulação simples com 20% de propilenoglicol contendo 0,025% de triptolido, a qual causou eritema e edema (Chen et al., 2004).

O tamanho muito pequeno das gotículas em nanoemulsões significa que elas geralmente têm boa resistência à agregação e à separação gravitacional, o que caracteriza uma dispersão estável. Uma emulsão é considerada estável quando as partículas dispersas são capazes de reter suas características iniciais e permanecerem uniformemente distribuídas pela fase contínua durante todo tempo de prateleira desejado (Lee et al., 2011).

Um fator relevante para estabilizar as gotículas em diminutas dimensões é estabelecer um sistema emulsionante eficaz. Tanto a natureza e concentração dos tensoativos utilizados para constituir o sistema emulsionante quanto o método utilizado para homogeneizar as duas fases imiscíveis, são determinantes para se conseguir atingir gotículas de diâmetro na escala nanométrica (Guglielmini et al., 2008; Lee et al., 2011). Isso se deve à função desempenhada pelos tensoativos de diminuir a tensão interfacial, que leva à redução da energia necessária para deformar e fragmentar as gotículas durante a homogeneização de dois líquidos imiscíveis (Guglielmini et al., 2008). O sistema emulsionante pode atuar também como uma barreira mecânica contra coalescência e garantir a estabilidade da emulsão (Guglielmini et al., 2008; Oliveira, 2014).

As lecitinas vem sendo utilizadas como estabilizadores no preparo de diversos sistemas de liberação, dentre eles lipossomas e nanoemulsões. Elas compreendem uma mistura de fosfolipídios insolúveis em acetona e outras substâncias menores, como triglicerídeos e carboidratos (Cabezas et al., 2012). A lecitina de girassol e soja, utilizadas como estabilizadores no presente trabalho, são subprodutos do processo de degomagem do óleo da semente de girassol e óleo de soja. Elas se apresentam como uma alternativa interessante para constituir sistemas emulsionantes em produtos tópicos, uma vez que são consideradas substâncias não geneticamente modificadas (non-GMO) (Cabezas et al., 2012), não contêm alérgenos declarado (Komaiko et al., 2015) e podem ser obtidas com elevada pureza (Lipoid, 2016). Vários estudos comprovam que concentrações elevadas de lecitinas contribuem para a qualidade de emulsões por retardarem processos desestabilizantes, como cremagem e coalescência (Komaiko et al., 2015).

Um estudo clínico, monocêntrico, randomizado, parcialmente aberto com 35 pacientes portadores de enxerto de pele observaram o efeito de hidrogel contendo preparação com e sem lecitina. Os resultados foram sugestivos de que a presença da lecitina auxiliou na promoção da retração da ferida (Reimer et al., 2000). O relatório final sobre a avaliação da segurança da lecitina hidrogenada e não hidrogenada publicada no *International Journal of Toxicology da American College of Toxicology* apresenta vários estudos que evidenciam o aumento de permeação cutânea de substâncias ativas em preparações contendo lecitina de origem vegetal. Sugere-se que formulações contendo lecitina causem uma ligeira desorganização da estrutura da pele, permitindo a permeação de várias substâncias (Fiume et al., 2001; Baroli, 2010). O relatório ainda conclui ser a lecitina um

insumo seguro, com baixo potencial irritante, sem efeitos sistêmicos cumulativos e com baixa probabilidade de resultar efeitos adversos quando aplicada topicamente.

A literatura comprova que lecitinas podem compor sistemas emulsificantes estáveis tanto para emulsões óleo em água quanto para emulsões água em óleo (Pan et al., 2002). Quando o sistema emulsionante é constituído por moléculas lipídicas, as emulsões podem ser classificadas como emulsões lipídicas. Para alcançar uma qualidade adequada, as emulsões lipídicas de uso tópico devem ser dotadas de estabilidade físico-química, tamanho de partículas na escala sub-micrométrica, com pequena variação de tamanho e carga superficial favorável para o correto equilíbrio entre forças repulsivas e atrativas entre as gotículas. A formulação também deve ser estável em temperaturas extremas e ter custo acessível para os pacientes, consumidores finais (McClements et al., 2012).

Além do adequado sistema estabilizante, o método de preparo é uma variável importante para a obtenção de nanoemulsões estáveis, com tamanho de partícula pequeno e uniforme. Os processos mecânicos são os mais comumente utilizados para produção de nanoemulsões (Schubert et al., 2001) e os homogeneizadores à alta pressão (HAP) tomam papel de destaque na classe dos misturadores mecânicos que promovem a eficiência de contato entre dois líquidos imiscíveis. Ademais, os HAP apresentam outras vantagens sobre os demais homogeneizadores, como simplicidade do processo, redução de custos, facilidade de produção em larga escala e redução da contaminação do produto por possibilitarem sistemas fechados de produção (Li et al., 2015).

Em um HAP, os líquidos são submetidos a intensos campos de fluxo turbulento e de cisalhamento (Floury et al., 2000). A turbulência que leva à ruptura da fase dispersa em pequenas gotículas é dito ser o mecanismo predominante, mas o cisalhamento laminar e cavitação hidrodinâmica também tem um papel importante no tamanho de gotículas e estabilidade da formulação final (Oliveira, 2014). Essa taxa de ruptura das gotas durante a formação da emulsão determina a distribuição do tamanho da partícula e, por isso, também é determinante para a vida de prateleira, bem como a textura da emulsão. O controle dessa taxa requer o conhecimento dos efeitos dos parâmetros operacionais, bem como da composição da emulsão e seu sistema emulsionante (Floury et al., 2000).

### **3. OBJETIVOS:**

Desenvolver nanoemulsões lipídicas baseadas em óleos vegetais, utilizando processo escalonável, e avaliar sua atividade cicatrizante visando o tratamento de lesões cutâneas.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Obter nanoemulsões lipídicas utilizando como fase interna óleos vegetais e como agentes emulsionantes fosfolipídios extraídos do girassol e da soja;
- Caracterizar as nanoemulsões e avaliar sua estabilidade físico-química;
- Avaliar a citotoxicidade das nanoemulsões em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos, além de sua influência na migração, adesão e proliferação celular;
- Quantificar, em cultura de células de macrófagos humanos, a expressão de citocinas inflamatórias participantes do processo de cicatrização, na presença e ausência das nanoemulsões;
- Avaliar o potencial cicatrizante das nanoemulsões em modelo *ex vivo* de cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS:

### 4.1. Material:

Os insumos óleo da semente de girassol, óleo de rosa mosqueta, alfa-bisabolol e os fosfolipídios extraídos do girassol (H), contendo fosfatidilcolina a 20% (Lipoid H20) e a 100% (Lipoid H100), e os extraídos da soja (S), contendo 75% de fosfatidilcolina (Lipoid S75), foram gentilmente cedidos pela empresa Lipid Ingredients & Technology (Brasil). Polietilenoglicol 40 (PEG 40), polissorbato 80 (Tween 80), polissorbato 60 (Tween 60), álcool cetílico e álcool cetosteárfico foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

### 4.2. Preparo das nanoemulsões

Foram preparadas nanoemulsões cuja fase oleosa foi composta pela combinação de 15% de óleo de girassol e 3% de óleo de rosa mosqueta, além de 0,3% de alfa-bisabolol como antioxidante. A fase aquosa foi composta por 5% de glicerina e quantidade de água suficiente para 200 g. Como agentes emulsionantes foram usados 4,5% de uma mistura de emulsionante sintético e fosfolipídios extraídos de vegetais (Nano 1) ou apenas a combinação de fosfolipídios extraídos de vegetais (Nano 2). A Nano 1 foi preparada com polissorbato 60, como emulsionante sintético, e com fosfatidilcolina extraída do girassol (H100) e da soja (S75). Já para o sistema emulsionante de Nano 2 a substituição do tensoativo sintético ocorreu pela adição do insumo Lipoid H20 (H20), que, assim como H100, se constitui de uma matéria-prima extraída do girassol, porém com menor teor de fosfatidilcolina e mais baixo custo. Nano 2 foi, portanto, estabilizada pela combinação de H20, H100 e S75.

No desenvolvimento de Nano 1, a proporção entre os componentes do sistema emulsionante foi definida a partir da avaliação da estabilidade da formulação quando manipulada com diferentes tensoativos sintéticos combinados com o par de fosfolipídios de concentrações fixas, como apresentado na Tabela 1. Para Nano 2 o sistema emulsionante foi determinado com base na execução de delineamento experimental do tipo *Box-Behken* (BOX e BEHKEN, 1960) de 3 fatores em 3 níveis (3<sup>3</sup>), a partir de 15 experimentos randomizados, conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 1.** Tensoativos sintéticos testados para preparo da Nano 1

<i>Formulações</i>	<i>Tensoativo</i>	<i>Tensoativo (%)</i>	<i>H100/S75 (%)</i>
<i>F1</i>	Tween 80	3,0	0,5/1,0
<i>F2</i>	Tween 60	3,0	0,5/1,0
<i>F3</i>	PEG 40	3,0	0,5/1,0
<i>F4</i>	Álcool Cetosteárfico + PEG 40	3,0 (1,0+2,0)	0,5/1,0
<i>F5</i>	Álcool Cetílico + PEG 40	3,0 (1,0+2,0)	0,5/1,0

**Tabela 2.** Delineamento experimental do tipo Box-Behken para preparo de Nano 2

<i>Formulações</i>		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>F1</i>		-1	-1	0
<i>F2</i>		+1	-1	0
<i>F3</i>		-1	+1	0
<i>F4</i>		+1	+1	0
<i>F5</i>		-1	0	-1
<i>F6</i>		+1	0	-1
<i>F7</i>		-1	0	+1
<i>F8</i>		+1	0	+1
<i>F9</i>		0	-1	-1
<i>F10</i>		0	+1	-1
<i>F11</i>		0	-1	+1
<i>F12</i>		0	+1	+1
<i>F13</i>		0	0	0
<i>F14</i>		0	0	0
<i>F15</i>		0	0	0
Variáveis codificadas	Variáveis decodificadas	Níveis		
		-1	0	+1
A	H20 (%)	8,0	10,0	12,0
B	H100 (%)	0,0	0,5	1,0
C	S75 (%)	2,0	2,5	3,0

Todas emulsões testadas foram manipuladas de forma idêntica. Sob aquecimento à 75°C, os agentes emulsionantes foram dispersos na fase aquosa sob agitação a 15 mil r.p.m por 5 minutos, usando um homogeneizador de alto cisalhamento (Ultra Turrax, IKA). A fase oleosa, também a 75°C, foi vertida sob a fase aquosa. A pré-emulsão formada foi submetida a um homogeneizador de alta pressão (Niro Soavi, Panda 2K, NS 1001L). As válvulas foram ajustadas para acerto da pressão em 800 bar e as preparações foram submetidas à 3 ciclos no homogeneizador.

Para o desenvolvimento de Nano 1 foram avaliadas a influência das combinações dos diferentes tensoativos sintéticos com o par de fosfolipídios naturais nos valores de tamanho e índice de polidispersão (PDI). Já para Nano 2, a influência de diferentes combinações entre os fosfolipídios foi analisada também em relação ao tamanho de partículas e PDI, mas ainda em relação à porcentagem de emulsificação, viscosidade, pH e custo, de acordo com os métodos descritos no item 3.3. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para identificar os principais efeitos e as interações entre as variáveis. Foi obtido o modelo matemático mais adequado em função do R<sup>2</sup> previsto e ajustado, valores de F, precisão, desvio padrão e nível de significância (P) para a estimativa dos parâmetros. O software utilizado foi o Software Design-Expert 11.1.0 © 2018 Stat-Ease.

Uma nanoemulsão composta por 18% de óleo mineral, em substituição aos óleos vegetais de girassol e de rosa mosqueta, e emulsionantes sintéticos Tween 80 (2,5%) e Span 80 (2,5%) foi preparada da mesma forma que as outras formulações e utilizada como controle nos estudos em cultura de células e de cicatrização.

### **4.3. Caracterização e estabilidade das nanoemulsões lipídicas**

As nanoemulsões foram avaliadas quanto aos seus aspectos organolépticos, tamanho de gotículas, pH, morfologia e alteração desses parâmetros frente ao estresse térmico e físico após centrifugação para determinar a estabilidade.

#### *4.3.1. Ciclo Gela/Degela*

Todas as preparações listadas na Tabela 1 (Nano 1) e a Nano 2 otimizada foram submetidas à 6 ciclos de 24 horas a  $45 \pm 2^\circ \text{C}$ , e 24 horas a  $-5 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 12 dias e, em seguida, foram analisadas as seguintes características: aspecto, cor, odor, pH e separação de fases.

#### *4.3.2. Centrifugação*

Cada emulsão foi pesada em frascos graduados e submetida a centrifugação à 3000 rpm (Thermo Scientific, Osterode, Alemanha) por 30 minutos à temperatura ambiente. Formulações que apresentaram separação de fases foram desconsideradas na obtenção de Nano 1 e, na obtenção de Nano 2, tiveram seus valores de porcentagem de emulsificação calculados e considerados no delineamento.

#### *4.3.3. Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e análise do número de partículas*

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das gotículas para todas formulações manipuladas foram determinados por espectroscopia de autocorrelação de fótons (DLS) utilizando Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK) a  $25^\circ\text{C}$ . Para essa análise a formulação Nano1 foi diluída 100 vezes, enquanto a Nano 2 foi diluída 2000 vezes para que a transparência das amostras fosse garantida para a reprodutibilidade dos resultados. A concentração de gotículas das formulações finais Nano 1 e Nano 2 foi determinada utilizando o rastreador de nanopartículas NanoSight NS 300 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido Reino Unido) e software “Análise de Rastreamento de Nanopartículas NTA 3.1”. Para análise de NTA ambas formulações foram diluídas 50000 vezes.

#### *4.3.4. pH*

Foi utilizado um pHmetro digital (Digimed, São Paulo, Brasil) para as análises de todas preparações manipuladas no presente trabalho.

#### *4.3.5 Determinação da viscosidade aparente*

A viscosidade aparente de todas as formulações do delineamento experimental (Tabela 2) para obtenção de Nano 2 foi determinada usando o reômetro de cilindros axiais LBDV-III Ultra -

(Brookfield Engineering Laboratories, EUA) acoplado ao spindle SC4-25 para as formulações F2, F4, F6, F8, F9 e F12 e acoplado ao spindle SC4-18 para as demais formulações. A temperatura foi de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  e as taxas de cisalhamento para análises com spindle SC4-25 e SC4-18 foram, respectivamente,  $11 \text{ s}^{-1}$  e  $12 \text{ s}^{-1}$ .

#### 4.3.6. Presença de estruturas anisotrópicas

A presença de estruturas anisotrópicas foi investigada a partir da observação das formulações em microscópio de luz polarizada (ZEISS, modelo Primo Vert AxioCam ERc 5s, Alemanha). Uma gota das formulações sem qualquer diluição foi gentilmente depositada entre lâmina e lamínula para observação no microscópio. A observação foi feita com aumento de 32 vezes, na ausência e presença de luz polarizada.

#### 4.3.7 Morfologia

A análise da morfologia utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi executada para as preparações finais Nano 1 e Nano 2. Amostras das nanoemulsões foram depositadas em grades metálicas (200 mesh) de níquel com revestimento de pioloform e adicionadas de acetato de uranila a 2% como contraste negativo. Após 24 horas de secagem em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100CX II, Alemanha) com voltagem de 80 kV e aumento de 20, 50 e 100 mil vezes.

### 4.4. Estudos *in vitro* em cultura de células

Os estudos *in vitro* e *ex vivo* foram realizados com as formulações Nano 1 escolhida (sistema emulsionante constituído de 3% Tween 60, 0,5% H100 e 1% S75), Nano 2 otimizada (cujos emulsificantes foram 9% H20 e 2% S75) e nanoemulsão controle (NC), esta última preparada na ausência dos óleos vegetais e com tensoativos sintéticos. Nano 1 e Nano 2 continham ambas 15% de óleo de girassol e 3% de óleo de rosa mosqueta como fase oleosa (item 3.2).

#### 4.4.1. Citotoxicidade

A viabilidade celular de fibroblastos NIH-3T3 e de queratinócitos humanos (HaCaT) frente às nanoemulsões foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilbrometo de tetrazólio). De maneira geral, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços a  $4,0 \times 10^3$  células/poço em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), incubadas por 24 e 48 horas à  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após este período, o mesmo volume de 200  $\mu\text{L}$ , porém com diferentes concentrações das nanoemulsões lipídicas, variando de  $1,0 \times 10^{12}$  a

$2,5 \times 10^{11}$  partículas/mL, foram adicionadas ao meio de cultura e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico. Controles foram realizados na ausência das formulações para verificar ocorrência de interferência dessas no teste colorimétrico na presença dos reagentes.

#### *4.4.2. Avaliação do uptake celular das formulações em função do tempo de incubação*

O estudo do *uptake* celular dos sistemas nanoestruturados foi realizado com as linhagens celulares de fibroblastos murinos (NIH-3T3) e queratinócitos humanos (HaCat) e foi avaliado por duas diferentes técnicas: citometria de fluxo e microscopia confocal de varredura a laser. Para esses ensaios, o agente fluorescente bodipy (1,3-Dimethyl-BODIPY,  $\lambda_{exc}$  470 nm e  $\lambda_{em}$   $512 \pm 20$  nm,  $\log P$  -3,03), sintetizado no laboratório de Química de Heterocíclcos coordenado pelo Prof. Flavio da Silva Emery, na FCFRP-USP, foi solubilizado na fase oleosa da nanoemulsão, de forma que o valor da sua concentração final nas formulações foi igual a 1 mg/mL.

##### *4.4.2.1 Citometria de fluxo*

Foi utilizado um citômetro BD FACSCanto II (BD Biosciences, EUA). As células de fibroblastos e queratinócitos foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de  $8 \times 10^4$  células/poço e incubadas por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após este período, as células foram lavadas com solução salina e tratadas por 5 ou 15 min com as nanoemulsões diluídas em meio de cultura DMEM por 100 vezes. Após o tratamento, as células foram lavadas cinco vezes com salina e tripsinizadas com 200  $\mu\text{L}$  de tripsina 0,25%. Em seguida, a ação da tripsina foi neutralizada adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. As células foram coletadas em tubos cônicos. Para análise no citômetro de fluxo, adicionou-se 2  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo (IP) na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) como marcador de células mortas. A marcação do IP foi visualizada utilizando  $\lambda_{exc}$  488 nm e  $\lambda_{em}$   $630 \pm 22$  nm e a marcação do bodipy foi monitorada pelo  $\lambda_{exc}$  470 nm e  $\lambda_{em}$   $512 \pm 20$  nm.

##### *4.4.2.2 Microscopia confocal de varredura a laser*

Para a análise do *uptake* celular por microscopia confocal, foram utilizadas placas de 24 poços nas quais foram colocadas lamínulas circulares esterilizadas de 20 mm de diâmetro (VidroBras, São Paulo, Brasil) no assoalho de cada poço. As células foram plaqueadas sobre as lamínulas na densidade de  $8 \times 10^4$  células/poço e incubadas por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após este período, as células foram tratadas por 15 minutos com as nanoemulsões diluídas por 50 vezes no meio de cultura. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e as células foram lavadas três vezes com solução salina, seguido-se da adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução de paraformaldeído 1%, por 15 minutos, em cada poço para

fixação. Após fixadas, retirou-se o paraformaldeído, seguindo de lavagens sucessivas com salina. As lamínulas, contendo as células fixadas e lavadas, foram retiradas dos poços e vertidas em lâmina histológica contendo uma gota do meio de montagem Prolong Diamante® com marcador de núcleo DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) (Thermo Fisher Scientific, Oregon, EUA), de modo que a face da lamínula contendo as células fixadas fosse vertida na gota do meio de montagem com marcador DAPI. As lâminas foram mantidas em repouso e protegidas da luz por 24 h previamente a visualização em microscópio confocal de varredura a laser (Leica, TCS SP8, Alemanha). As imagens foram obtidas com aumento de 63 vezes em objetiva de imersão de óleo. Para visualização do núcleo (DAPI) foi utilizado o laser de comprimento de onda de 405 nm para excitação e a detecção da emissão foi monitorada na faixa de 409 a 514 nm, Já para visualização das formulações (bodipy) utilizou-se um laser de 470 nm para excitação e a emissão foi monitorada na banda de 512 nm.

#### *4.4.3. Avaliação da migração / proliferação celular – Ensaio Scratch*

Fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos HaCat foram plaqueados em microplacas de 24 poços de fundo plano, na densidade de  $8,0 \times 10^4$  células/poço, em triplicata. As placas foram incubas à 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> para aderência e confluência. Com auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL foi criado um risco (“arranhão”) na monocamada das células e retirada de todo volume do meio de cultura. Em seguida, foram adicionados aos poços 500 µL das formulações Nano 1 e Nano 2 diluídas em meio de cultura, de forma que a concentração de partículas depositadas sobre a monocamada variou de 1,0 a  $4,0 \times 10^{11}$  partículas por mL (concentrações não citotóxicas). Uma solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 50% em meio de cultura, denominada controle negativo, foi utilizada para cessar a migração celular e obter imagens do momento inicial do experimento (Leite, 2016). Os poços que receberam apenas meio de cultura e não entraram em contato com a formulação foram denominados controle positivo ou basal. As placas foram incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após este período, os poços foram lavados com solução salina (PBS). Em seguida, 200 µL de paraformaldeído 4% foram adicionados e mantidos por 20 minutos. Seguiu-se novamente com lavagem utilizando PBS e adicionou-se 200 µL do marcador nuclear DAPI, mantendo a placa ao abrigo de luz. Para cada concentração estudada, foram capturadas 10 fotos em microscópio invertido com fluorescência no mesmo aumento, de forma a capturar imagens ao longo de toda extensão do arranhão. As imagens foram analisadas e, utilizando-se o software ImageJ 1.46, foram mensuradas as distâncias entre as duas extremidades do arranhão. Para cada replicata foram executadas 12 mensurações de distância em cada grupo tratado, totalizando 36 medidas de distância para cada grupo em cada tipo celular. Com as médias das

distâncias obtidas, realizou-se o tratamento estatístico em comparação com a distância inicial (grupo tratado com DMSO em seguida do arranhão). O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.4.4. Expressão de citocinas e mediadores do processo de inflamação

A influência da Nano 1 e Nano 2 na expressão dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$  foi investigada em macrófagos humanos extraídos de 3 diferentes participantes (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), protocolo CEP/FCFRP n°. 506 – CAAE: 11726919.0.0000.5403, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.712.502). Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico em tubos para coleta de sangue a vácuo com heparina (Vacuplast, Brasil). Em seguida, adicionou-se 20 mL de solução fisiológica 0,9% ao volume de sangue coletado. 15 mL da suspensão resultante foram transferidos para tubos contendo 3 mL de solução Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich, EUA) e centrifugados à 400 g, por 30 minutos à 25°C (Thermo Scientific, Osterode, Alemanha). Após centrifugação, as células mononucleares foram cuidadosamente recolhidas e lavadas duas vezes em solução fisiológica 0,9% e centrifugadas à 400 g, por 30 minutos à 25°C (Thermo Scientific, Osterode, Alemanha). O *pellet* obtido foi resuspenso em 2 mL de meio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). Seguiu-se para a contagem das células em câmara de Neubauer após coloração Turks. A suspensão de células foi então diluída à uma densidade de  $2 \times 10^6$  células por mL em meio RPMI contendo 2,5% de soro bovino fetal (SBF). 500  $\mu$ L da suspensão foram transferidos para placas de 24 poços e incubados por 2 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células aderidas foram reconhecidas como macrófagos e a cultura em monocamada foi utilizada para experimentação.

A cultura de macrófagos foi tratada com as nanoemulsões, na concentração de aproximadamente  $3 \times 10^{11}$  partículas/mL (diluídas 200 vezes em meio de cultura), e com a solução oleosa comercial Dersani®, composta por mistura de óleos vegetais, na mesma diluição. Como controle positivo, o estado inflamatório dos macrófagos foi induzido incubando-se as células com 10 mg/mL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Silva, et al., 2011). Para todos os tratamentos, as células foram incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A expressão dos mediadores foi avaliada por ELISA, utilizando o Multi-Analyte Elisa Array Kit (Quiagen, Valencia, EUA).

#### 4.5. Estudos *in vitro* de penetração utilizando pele humana

Os estudos de penetração cutânea foram realizados com as nanoemulsões e o produto Dersani® sem diluição. As preparações foram marcadas com agente fluorescente bodipy, de forma que sua concentração nas formulações foi de 1mg/mL. Foram utilizadas células de difusão vertical (células do tipo “Franz”), com área de penetração de 0,95 cm<sup>2</sup>, e fragmentos de pele humana

provenientes de abdominoplastia como membrana de difusão (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo CEP/FCFRP n°. 506 – CAAE: 11726919.0.0000.5403, conforme Parecer Consubstanciado do CEP n° 3.712.502). O tecido subcutâneo dos fragmentos foi descartado, de forma a preservar a derme e a epiderme, e armazenado a -20°C até a utilização. Imediatamente antes da realização dos experimentos de penetração, os fragmentos foram retirados do freezer e descongelados para o estudo. A célula de difusão vertical foi montada com os fragmentos posicionados entre os compartimentos doador e receptor, com o estrato córneo voltado para o doador. O compartimento receptor, em contato com a derme, foi preenchido com tampão fosfato-salino isotônico 10 mmol/L pH 7,4 (PBS), ao passo que o compartimento doador foi preenchido com 1 mL da formulação teste. Após 1 h de contato com a pele, a formulação foi removida e seu excesso retirado com lavagem em PBS. Em seguida, a pele foi retirada da célula de difusão e recortada, preservando o diâmetro da área que ficou em contato com a formulação, e acondicionada em *blisters* de plástico contendo tissue tek®. Em seguida, obteve-se blocos sólidos a partir do contato dos fragmentos embebidos de tissue tek® com gelo seco. Os blocos foram congelados a -80°C. Os resultados foram analisados pela técnica de Microscopia Confocal: os blocos contendo os fragmentos de pele humana congelados a -80°C foram seccionadas em Criostato (Leica CM1860, Alemanha) na espessura de 20 µm, dispostos em lâminas de vidro e lamínulas e fixados com fluoromount (Sigma-Aldrich). As micrografias foram realizadas em Microscópio Confocal (Leica SP8, Alemanha) com excitação em 470 nm e faixa de emissão em 512 nm, com objetiva de 20x.

#### **4.6. Estudos *ex vivo* em cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC)**

A pele foi obtida com o consentimento informado de pacientes submetidos a cirurgias plásticas, de acordo com as diretrizes éticas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo CEP/FCFRP n°. 506 – CAAE: 11726919.0.0000.5403, conforme Parecer Consubstanciado do CEP n° 3.712.502). Após a remoção do excesso de tecido adiposo subcutâneo, os explantes foram cortados compreendendo uma área de 1 cm<sup>2</sup>. Em seguida, em cada fragmento, foi criada uma úlcera excisional circular com diâmetro de 4 mm utilizando-se *punch* cirúrgico para biópsia de pele. Os fragmentos de pele foram, então, posicionados sobre papel de filtro apoiado em grades metálicas. A derme foi mantida em contato com o papel filtro, enquanto o estrato córneo foi posicionado voltado para cima. Nessa disposição, os fragmentos foram cultivados em placas padrão de 6 poços contendo 5 mL de meio de cultura (DMEM suplementado com 10% de SBF, 1% de solução contendo 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina

e 25 µg de anfotericina B e 1% de L-glutamina) a 37°C em 5% de ar umidificado com CO<sub>2</sub>. A epiderme, portanto, permaneceu acima da interface meio/ar (Masson, 2011). Na primeira série de experimentos (hOSEC 1), os explantes foram tratados com aplicação tópica diária, durante 7 dias, de 5 µL de Nano 1 sem qualquer diluição. Na segunda série, os explantes foram tratados, durante 30 dias, com as formulações Nano 1, óleo comercial Dersani® e nanoemulsão controle (NC). Para essa segunda série de experimentos, as formulações tratamento foram testadas em diferentes diluições: diluídas 200, 100 e 50 vezes. Na última série de experimentos, os fragmentos foram tratados com as formulações Nano 1, Nano 2, NC e Dersani® diluídas 200 vezes em meio de cultura, por 7 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e os testes realizados em triplicata. Decorrido o período de tratamento, os explantes foram colhidos, fixados em formalina, incorporados em parafina e corados para análise histológica e imunohistoquímica (Frade et al, 2015).

#### 4.6.1. Avaliação histológica

As secções parafinadas (3 µm) foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise histomorfológica (Masson, 2011). A morfologia da epiderme foi analisada qualitativamente utilizando o microscópio óptico LEICA® DM-4000B com a câmera LEICA® DFC 280 conectada ao computador com o software *LAS® - Leica Application* para capturar imagens (Leica Microsystems, Alemanha) (Masson et al., 2011), e quantitativamente pela diferença entre o diâmetro da úlcera na imagem do corte subtraído do somatório da extensão da reepitelização nas bordas da lesão (língua de queratinócitos), utilizando o software ImageJ 1.51m9 (National Institutes of Health, EUA).

#### 4.6.2. Avaliação imunohistoquímica

Secções parafinadas de três micrômetros foram submetidas à recuperação de antígenos por autoclave em tampão citrato, pH 6,0, por 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% em PBS, seguida de bloqueio inespecífico com BSA a 1%. As secções foram incubadas com anticorpo primário em albumina sérica bovina (BSA) a 1% durante a noite à 4° C. Os anticorpos utilizados foram citoqueratina 10 (Ck10) (1:100) e proteína Ki-67 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Utilizou-se o Kit Sistema de Detecção de Polímero NovoLink (Novocastra Laboratories Ltd, Reino Unido). A reação de cor foi desenvolvida pelo tetrahydrocloroto de 3,3 diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, Alemanha). As secções foram contrastadas com a hematoxilina de Mayer e montadas em Entelan (Sigma-Aldrich, Alemanha). A expressão de Ck10 e Ki-67 foram analisadas qualitativamente.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Preparo das nanoemulsões

#### 5.1.1 Triagem de emulsificantes sintéticos para obtenção de sistema emulsionante em conjunto com fosfolipídios - Nano 1

Para comparação dos efeitos dos fosfolipídios na estabilidade físico-química de nanoemulsões e no processo de cicatrização cutânea, foram desenvolvidas nanoemulsões com fase interna e externa idênticas, mas estabilizadas ou por uma mistura de emulsificantes sintéticos e fosfolipídios (Nano 1) ou apenas por fosfolipídios (Nano 2).

A Tabela 3 apresenta as características físico-químicas das formulações obtidas com a mistura de diferentes emulsionantes sintéticos e fosfatidilcolina e os custos dos materiais usados para a produção de 1 Kg de cada uma das dispersões.

**Tabela 3:** Características físico-químicas e custo de nanoemulsões preparadas durante o desenvolvimento de Nano 1, produzidas com óleo de girassol (15%) e de rosa mosqueta (3%) como fase interna, estabilizadas com fosfolipídios H100 (0,5%) e S75 (1%) e misturas de diferentes emulsionantes sintéticos (3%)

Características da Nanoemulsão	Tween 80	Tween 60	PEG	Álcool cetosteárilico + PEG 40	Álcool cetílico + PEG 40
Tamanho 1 <sup>a</sup> (nm)	150	113,3	106	491,9	398,5
PDI 1 <sup>a</sup>	0,126	0,155	0,172	1	0,5
Tamanho 2 <sup>b</sup> (nm)	252,9	122,3	119,5	-*	-*
PDI 2 <sup>b</sup>	0,153	0,153	0,146	-*	-*
Estabilidade <sup>c</sup>	Estável	Estável	Estável	Separação de fases	Separação de fases
Custo/Kg (R\$) <sup>d</sup>	16,36	19,59	19,17	18,15	18,42

<sup>a</sup>Determinados após 24 h do preparo, <sup>b</sup>Determinados após teste de estabilidade preliminar, <sup>c</sup>Frente a centrifugação e teste de estabilidade preliminar, <sup>d</sup>Calculado em outubro de 2017. \*Não determinados devido a separação de fases.

Pode-se observar na Tabela 3 que a nanoemulsão com menor tamanho de partícula e menor variação do tamanho após o teste de estabilidade preliminar (item 3.3.1), foi aquela preparada com Tween 60 como tensoativo adicional à mistura de fosfolipídios. Sendo assim, esta formulação, com custo estimado de R\$ 19,59 por Kg foi escolhida como representante da Nano 1 e usada nos estudos subsequentes.

### 5.1.2 Delineamento experimental para obtenção de nanoemulsão otimizada composta apenas da combinação de fosfolipídios como sistema emulsionante - Nano 2

A Tabela 4 apresenta os resultados das variáveis dependentes obtidas após o preparo das nanoemulsões com as diferentes porcentagens de insumos fontes de fosfolipídios (H20, H100 e S75). São elas: diâmetro de gotícula (nm), distribuição do diâmetro de gotícula (PDI), viscosidade aparente (cP), taxa de emulsificação (%), pH e custo (R\$).

**Tabela 4:** Características físico-químicas e custo de nanoemulsões preparadas no desenvolvimento da Nano 2 em função das variáveis independentes (porcentagens de H20, H100 e S75) avaliadas de acordo com o delineamento experimental (Tabela 2).

<b>Formulações</b>	<b>Características das nanoemulsões/manipuladas para obtenção de Nano 2</b>					
	<i>Tamanho (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Viscosidade (cP)</i>	<i>Taxa de emulsificação (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Custo (R\$)</i>
<b>F1</b>	392	0,430	61	37	5,8	49,75
<b>F2</b>	388	0,340	477	100	4,3	63,15
<b>F3</b>	387	0,272	116	66	5,7	63,33
<b>F4</b>	448	0,283	5819	100	5,9	76,73
<b>F5</b>	384	0,337	109	81	5,5	51,95
<b>F6</b>	353	0,257	1932	100	6,1	65,35
<b>F7</b>	339	0,232	72	100	5,6	61,13
<b>F8</b>	385	0,269	1596	100	5,4	74,53
<b>F9</b>	391	0,278	75	100	5,6	51,86
<b>F10</b>	370	0,306	426	100	5,4	65,44
<b>F11</b>	304	0,197	355	100	5,7	61,40
<b>F12</b>	367	0,270	253	100	5,7	74,12
<b>F13</b>	342	0,232	166	100	6,0	63,24
<b>F14</b>	358	0,250	378	100	5,7	63,24
<b>F15</b>	403	0,310	385	100	5,6	63,24

As nanoemulsões apresentaram gotículas com tamanhos médios que variaram entre 304 e 403 nm. A distribuição do tamanho das gotículas (PDI) variou de 0,197 a 0,430. Entretanto, a maioria apresentou distribuição estreita, menor do que 0,3. O pH das nanoemulsões variou de 4,3 a 6,1. Já a viscosidade aparente das nanoemulsões variou consideravelmente, de 61 cP a 5819 cP. Essas diferenças repercutiram na necessidade de se utilizar dois *spindles* diferentes para a determinação da viscosidade. Quanto aos custos, os sistemas emulsionantes das formulações manipuladas para obtenção de Nano 2 custaram uma média de R\$ 63,23 ± 7,68 por Kg.

Para compreender a influência das variáveis selecionadas nas características das nanoemulsões, os valores obtidos das variáveis dependentes foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) e modelagem matemática (Tabela 5). A significância estatística de cada variável dependente está apresentada na Tabela 5, assim como o modelo que melhor descreve a força de contribuição de cada fator independente nas respostas dependentes avaliadas.

**Tabela 5:** Resultados da significância dos modelos matemáticos mais adequados encontrados após ANOVA para cada variável dependente (Software Design-Expert 11.1.0 © 2018 Stat-Ease)

Variáveis Dependentes	Modelo Matemático	Significância (P)*
Taxa de emulsificação (%)	Quadrático	> 0,05
Tamanho médio (nm)	Quadrático	> 0,05
PDI	Média	> 0,05
Viscosidade (cP)	Linear (log)	< 0,05
pH	Interação de 2 fatores	> 0,05
Custo (/Kg R\$)	Linear	< 0,05

\*P<0,05: estatisticamente significante

Foram consideradas estatisticamente significativas aquelas respostas que apresentaram um nível de significância menor do que 0,05 (P<0,05). Os modelos preditivos encontrados para as variáveis dependentes taxa de emulsificação, tamanho médio, PDI e pH não foram significativos, indicando que, para essas variáveis, a média geral pode ser um melhor preditor da resposta do que o modelo matemático (Software Design-Expert 11.1.0 © 2018 Stat-Ease).

Para as variáveis dependentes que apresentaram significância estatística, viscosidade e custo, o modelo matemático que apresentou valores mais adequados de estatística de ajuste foi o linear, com transformação Log na base 10 para a viscosidade. A Tabela 6 apresenta os resultados da análise por ANOVA para esses modelos, termos da equação e falta de ajuste (valor de F) e um resumo com as equações dos modelos e os coeficientes de correlação ajustado e predito.

**Tabela 6:** Análise estatística do efeito estimado de preditores na viscosidade (Log) e custo (modelo linear) na nanoemulsão

<i>Estatística de ajuste</i>				
	Viscosidade (Y1)		Custo (Y2)	
<i>Desvio padrão</i>		0,26		0,08
<i>R<sup>2</sup></i>		0,84		0,99
<i>R<sup>2</sup> ajustado</i>		0,79		0,99
<i>R<sup>2</sup> predito</i>		0,68		0,99
<i>Precisão adequada</i>		13,48		608,82
<i>Valor de F</i>	Para o modelo	19,44 (significante)	Para o modelo	40904,51 (significante)
	Para os resíduos	1,63 (não significante)	Para os resíduos	0,00
<i>Valor de P</i>	Para o modelo	0,0001 (significante)	Para o modelo	<0,0001 (significante)
	H20	<0,0001	H20	<0,0001
	H100	0,0202	H100	<0,0001
	S75	0,8030	S75	<0,0001
<i>Equações</i>	$Log_{10}(Y1) = -1,1 + 0,3(H20) + 0,5(H100)$		$Y2 = -0,2 + 3,3(H20) + 13,5(H100) + 9,3(S75)$	

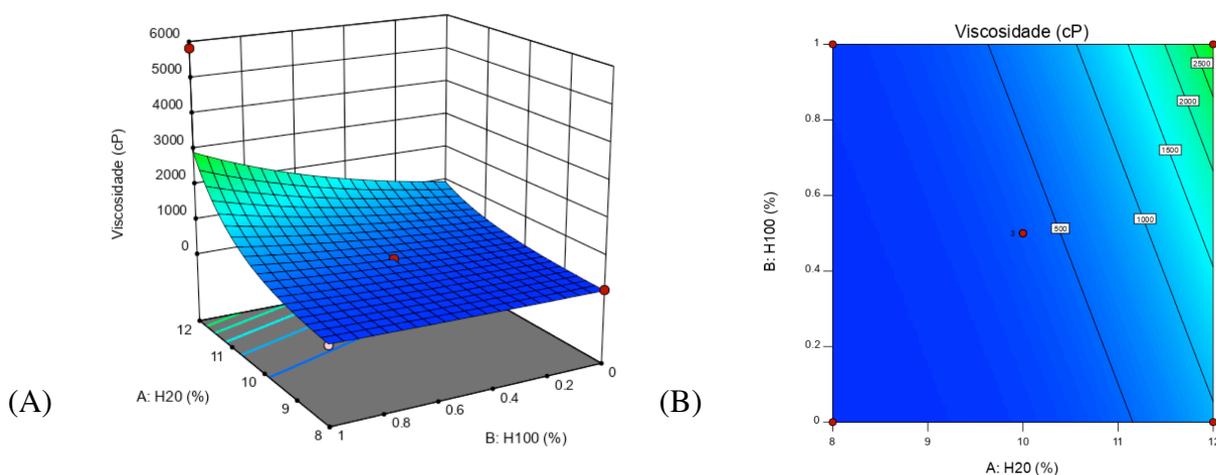
Os valores de F e de P para os modelos de viscosidade e custo comprovam que os mesmos são significativos, isto é, existe apenas uma chance de 0,01% de que valores de F dessas magnitudes ocorram devido à expressão de ruídos. Os valores de R<sup>2</sup> preditos e ajustados para as duas variáveis em questão apresentam uma diferença entre eles menor do que 0,2, sugerindo adequação dos valores e ausência de efeitos de bloco (Software Design-Expert 11.1.0 © 2018 Stat-Ease).

A precisão adequada é uma relação entre o sinal e o ruído que compara o intervalo dos valores previstos nos pontos de design com o erro de previsão médio. O modelo apresentou um valor de precisão adequado maior do que 13 para viscosidade e maior do que 600 para custo (Tabela 6). Valores de precisão adequados maiores que 4 configuram correta discriminação do modelo, indicando que o modelo pode ser usado para investigações dentro do espaço delineado.

Em relação aos fatores independentes, pode-se observar na Tabela 5 que, para a viscosidade, o valor de P para H20 e H100 foram menores do que 0,05, indicando que esses fatores interferem significativamente na viscosidade. O valor de P para S75 de 0,8030 é indicativo de que a porcentagem desse insumo não influencia significativamente na viscosidade e, portanto, não foi considerado na equação final (Tabela 6) que descreve a influência dos fatores independentes na viscosidade.

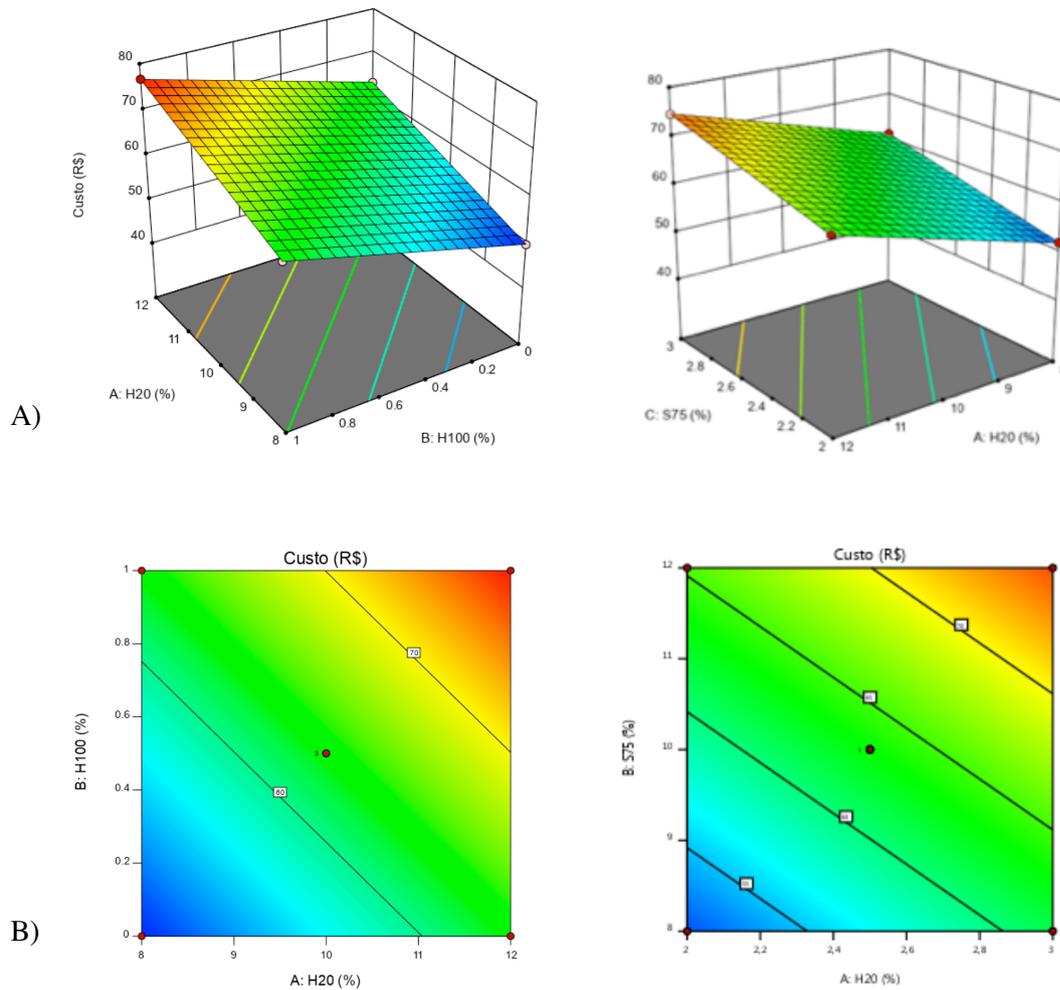
O efeito da concentração dos emulsificantes H20 e H100 na viscosidade das preparações finais está ilustrado na Figura 1. Os gráficos 3D e de superfície de resposta foram obtidos a partir da equação de viscosidade (Y1) apresentada na Tabela 6.

**Figura 1.** Gráficos 3D (A) e de superfície de resposta (B) para a viscosidade em função da concentração em (%) dos fatores H20 e H100.



A equação final para o custo (Y2) está descrita na Tabela 6. A presença das três variáveis H20, H100 e S75 na equação indica a interferência significativa no custo de todos os três fatores (Figura 2).

**Figura 2.** Gráficos 3D (A) e de superfície (B) de resposta para o custo em função da concentração em (%) dos fatores H20, H100 e S75.

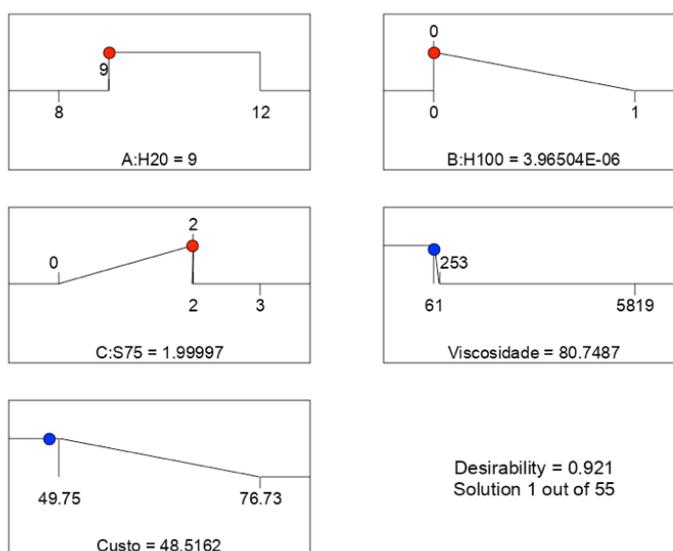


### 5.1.3. Otimização da Nano 2 e validação do método

A otimização da formulação usada para se preparar a Nano 2 foi realizada usando a função de desabilidade do *software* Design Expert com base nas equações obtidas no delineamento e nas características desejadas. Assim, para a variável independente custo, a meta de resposta definida foi a minimização do seu valor. Para a variável independente viscosidade foram definidos valores com base na adequação da viscosidade para veiculação da fórmula em embalagem com dispositivo spray. Para tal forma de acondicionamento e dispersão da formulação, o intervalo de viscosidade definido foi obtido a partir da minimização de valores nominais especificados dentro do intervalo de 61 a 253 cP. Valores superiores a 253 cP não se mostraram experimentalmente satisfatórios para veiculação de formulações em embalagem com dispositivo spray.

Usando o software Design Expert foi possível definir as porcentagens de cada um dos emulsificantes necessárias para se obter a nanoemulsão desejada. Dados os intervalos numéricos para viscosidade e o comando para minimização do custo, o valor de desejabilidade obtido foi de 0,921 e as concentrações ótimas foram de 9% para H2O, 0% para H100 e 2% para S75, como apresentado na Figura 3.

**Figura 3.** Rampas de otimização numérica para formulação otimizada a partir da minimização da resposta custo e viscosidade dentro do intervalo entre 61 e 253 cP.



A Tabela 7 descreve a formulação final otimizada de Nano 2, de menor custo e menor viscosidade, dentro do intervalo pré-determinado, e os valores esperados para os demais parâmetros avaliados usando o modelo previsto.

**Tabela 7:** Composição de Nano 2 para se obter as respostas desejadas

<i>Componentes</i>	<i>%</i>
<i>Alfa-bisabolol</i>	0,3
<i>Óleo de rosa mosqueta</i>	3,0
<i>Óleo de girassol</i>	15,0
<i>H2O</i>	9,0
<i>S75</i>	2,0
<i>Glicerina</i>	5,0
<i>Água</i>	64,7
<i>Euxyl</i>	1,0
<b><i>Custo (R\$)</i></b>	48,5162
<b><i>Viscosidade (cP)</i></b>	80
<b><i>Tamanho</i></b>	374,18
<b><i>Pdi</i></b>	0,2842
<b><i>pH</i></b>	5,6

Para verificar se o modelo previsto era válido, foram preparados três lotes distintos de nanoemulsões com as proporções especificadas na Tabela 7 e determinadas a viscosidade, tamanho, PDI e pH das nanoemulsões obtidas. Os resultados estão dispostos na Tabela 8.

**Tabela 8:** Dados experimentais obtidos após preparo de Nano 2 com composição sugerida pelo modelo, conforme descrito na Tabela 7

<i>Teste</i>	<i>Viscosidade</i>	<i>Tamanho</i>	<i>PDI</i>	<i>pH</i>
1	72	362,5±6,637	0,240±0,015	5,4
2	87	381,6±9,445	0,200±0,009	5,8
3	77	362,7±18,89	0,244±0,065	5,9
Média	79	368,9±14,60	0,228±0,040	5,7

## 5.2. Caracterização e estabilidade das nanoemulsões selecionadas

### 5.2.1 Teste de centrifuga, pH, viscosidade aparente e características físico-químicas pré e pós testes de estabilidade preliminar

As formulações de Nano 1 e Nano 2 selecionadas não apresentaram separação de fases após o teste de centrifuga. As características organolépticas e físico-químicas dessas preparações pré e pós teste de estabilidade preliminar estão descritas na Tabela 9. Ambas formulações não tiveram suas características alteradas de forma estatisticamente significativa após o teste, sugerindo estabilidade satisfatória.

**Tabela 9:** Caracterização físico-química das nanoemulsões 24 h após o preparo e seguida do teste de estabilidade preliminar

<i>Característica</i>	<i>Nanoemulsão</i>			
	<i>Nano 1</i>		<i>Nano 2</i>	
<i>Cor</i>	Branco		Bege claro	
<i>Viscosidade</i>	20 cP		78 cP	
<i>Odor</i>	Característico		Característico	
<i>pH</i>	Pré teste estabilidade	5,4	Pré teste	5,4
	Pós teste estabilidade	5,5	Pós teste	5,8
<i>Tamanho (nm)</i>	Pré teste estabilidade	130±3	Pré teste	363±15
	Pós teste estabilidade	130±5	Pós teste	332±14
<i>PDI</i>	Pré teste estabilidade	0,197 ± 0,025	Pré teste	0,228±0,040
	Pós teste estabilidade	0,210 ± 0,012	Pós teste	0,185±0,056

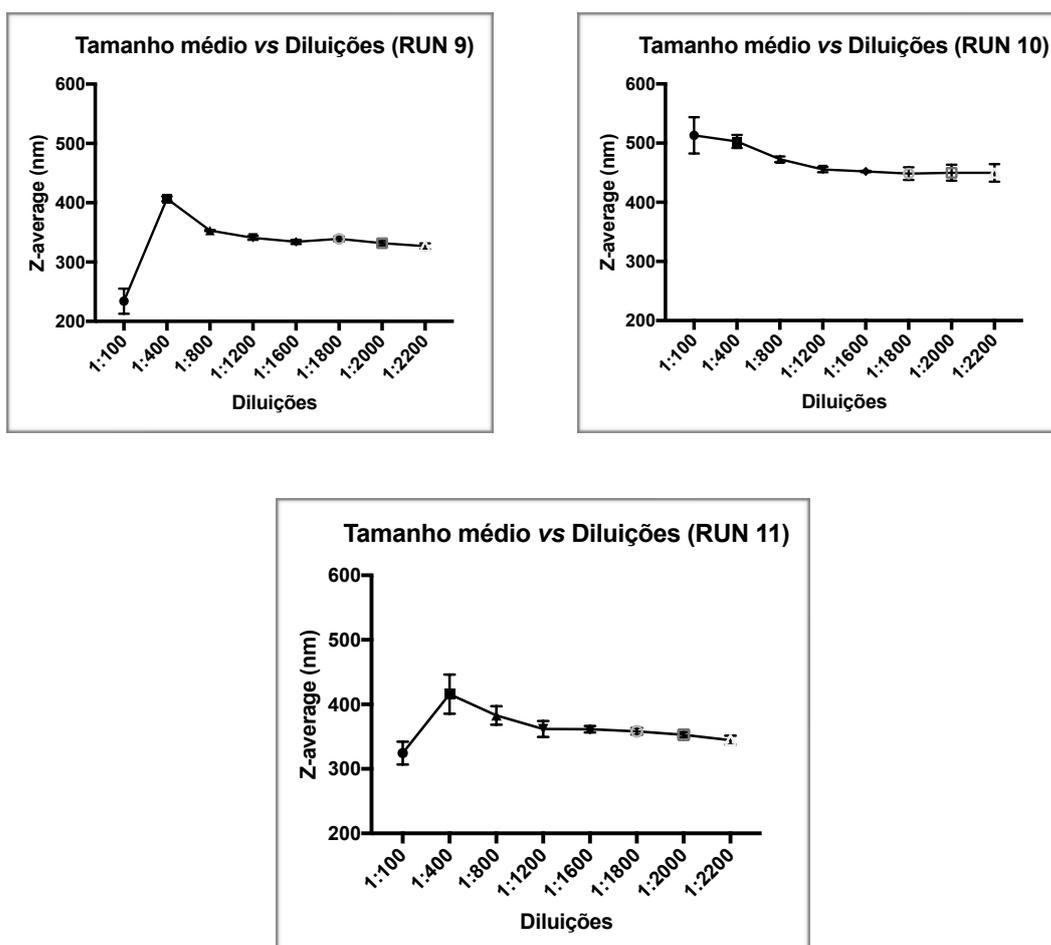
### 5.2.2 Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e análise do número de partículas

A caracterização das nanoemulsões Nano 1 e Nano 2 se pautou na investigação do diâmetro médio das gotículas da fase interna, pelas técnicas de DLS e NTA.

Para análise do tamanho das gotículas de Nano 1, a diluição de 1:100 em água destilada se mostrou adequada para ser adotada, diferentemente de Nano 2, que necessitou um estudo de diluição para obter o valor adequado.

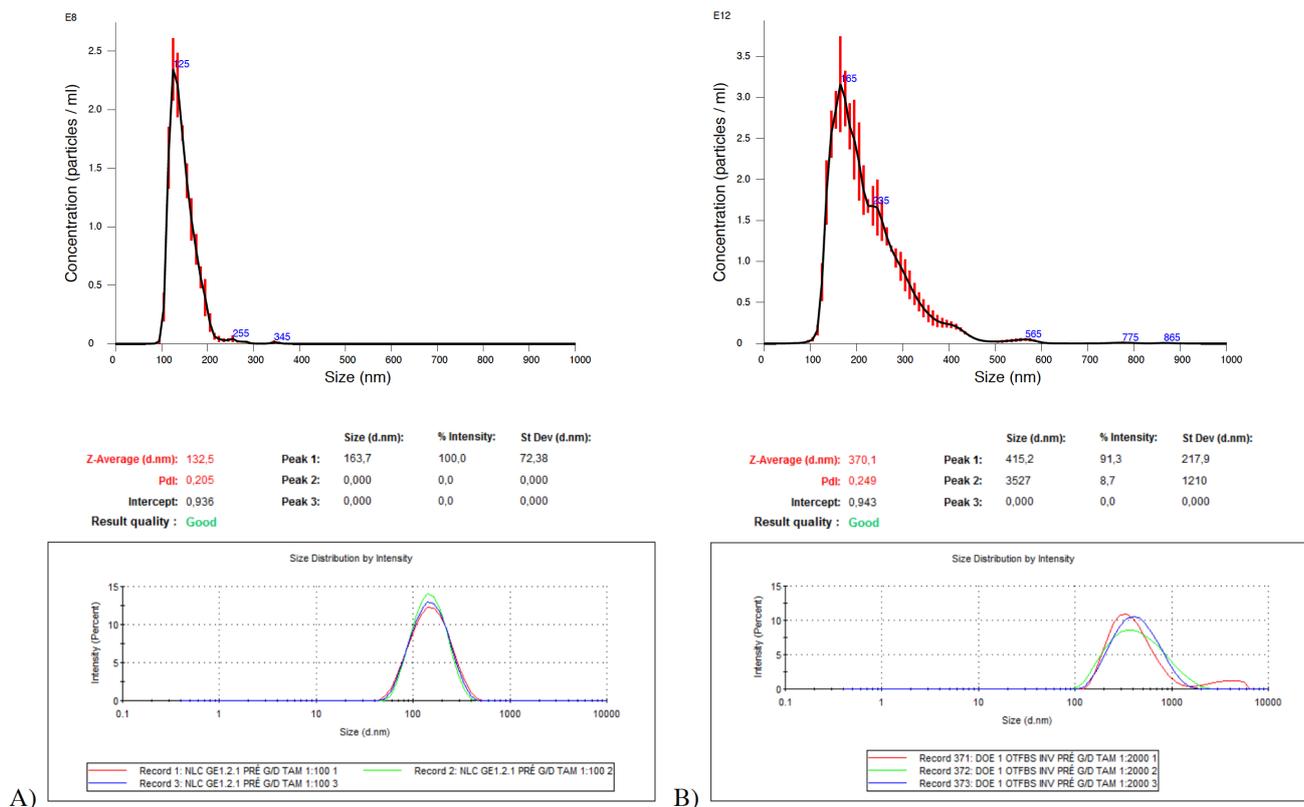
Para investigação da melhor diluição de Nano 2 para obtenção do tamanho médio de partícula (Z-average) por DLS, crescentes diluições de três formulações distintas selecionadas de forma aleatória foram testadas, plotadas em gráficos e submetidas à análise estatística. A diluição escolhida para análise e obtenção dos valores de tamanho de Nano 2 foi 1:2000. Esse valor está compreendido no intervalo de diluições (1:1200 - 1:2200), que não apresentou variação estatisticamente significativa no tamanho das gotículas, conforme Figura 4.

**Figura 4.** Representação gráfica do comportamento dos valores de tamanho de gotículas obtidos por DLS em diferentes diluições.



A Figura 5 apresenta o perfil de distribuição de tamanho de partículas por DLS e NTA de Nano 1 e Nano 2 e a Tabela 10 apresenta os resultados de tamanho de partículas e polidispersão obtidos por DLS e por NTA, além da concentração das partículas por mL das nanoemulsões avaliadas por NTA.

**Figura 5.** Perfil de intensidade de luz espalhada em função do tamanho de partícula para as nanoemulsões Nano 1 (A) e Nano 2 (B). Os perfis superiores são referentes à análise por NTA, enquanto os inferiores são referentes a análise por DLS.



**Tabela 10.** Características das nanoemulsões resultantes das análises por DLS e NTA

Características	Nanoemulsão	
	Nano 1	Nano 2
Tamanho (nm) por DLS	129,9±2,85	368,9±14,60
PDI	0,197 ± 0,025	0,228±0,040
Tamanho (nm) por NTA	146±28,7	224±81,6
SPAN*	0,5	1,0
Número de partículas/ml	6,50x10 <sup>13</sup>	3,70x10 <sup>13</sup>

O tamanho e o número de partículas de NC encontrado pela técnica de NTA foram, respectivamente 180 nm e 5,9 partículas/mL.

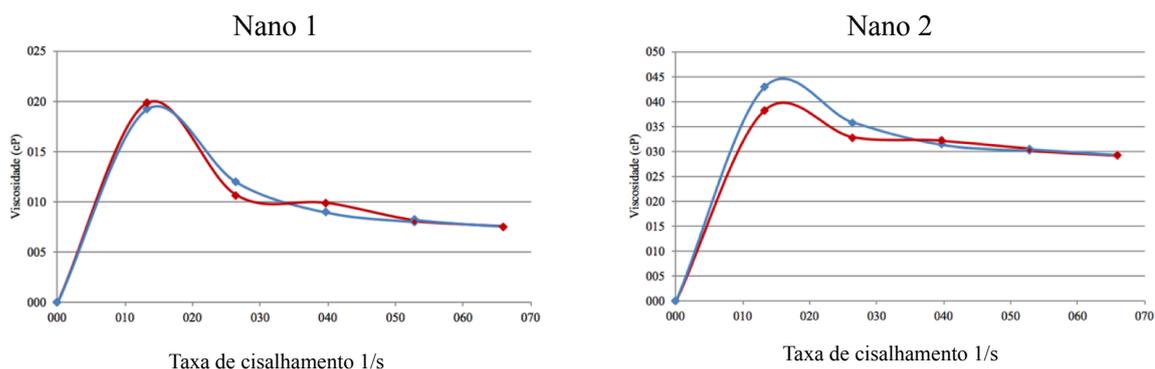
\* Polidispersividade dada pela análise no NTA: SPAN = (D90-D10)/D50, onde D10, D50 e D90 são os diâmetros a 10, 50 e 90% dos volumes acumulados, respectivamente.

Pode-se observar na Tabela 10 que a Nano 2 apresentou tamanho de gotículas quase 3 vezes maior do que a Nano 1. Essa, por sua vez, apresentou tamanho médio semelhante (teste t, P>0,05) ao apresentado pela NC (preparada apenas com óleo mineral e tensoativos sintéticos).

### 5.2.3 Determinação da viscosidade aparente

A Figura 6 mostra o comportamento reológico da Nano 1 e da Nano 2. A análise dos gráficos permite a observação da redução do valor de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, bem como a restauração da viscosidade inicial com a redução do cisalhamento, característico de comportamento tixotrópico para ambas formulações.

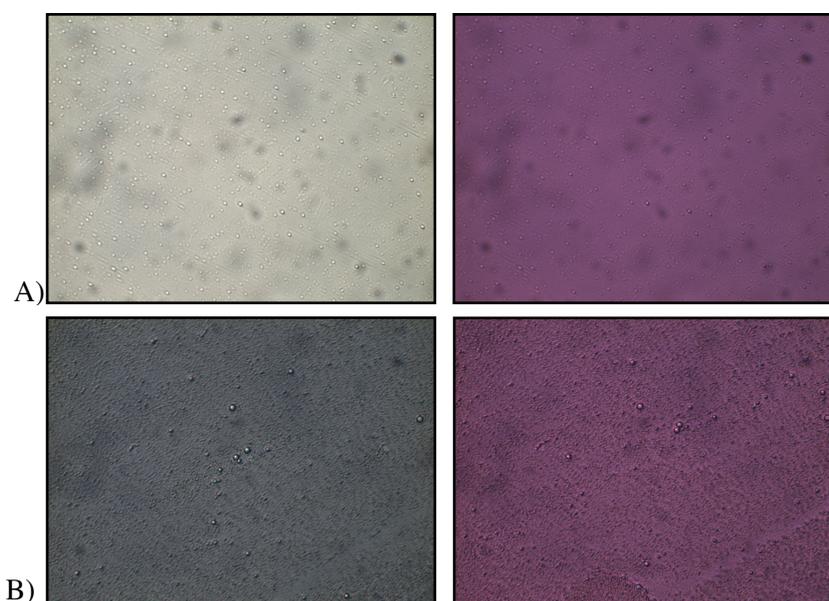
**Figura 6.** Comportamento reológico das preparações. Em vermelho, os valores de viscosidade relacionados ao aumento da taxa de cisalhamento e na cor azul valores obtidos após redução do cisalhamento.



### 5.2.4 Presença de estruturas anisotrópicas

Para investigar preliminarmente a presença de estruturas líquido-cristalinas nas nanoemulsões, amostras de Nano 1 e Nano 2 foram analisadas ao microscópio de luz polarizada. A Figura 7 mostra fotomicrografias representativas das nanoemulsões na presença e ausência de luz polarizada.

**Figura 7:** Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada de Nano 1 (A) e Nano 2 (B) sem diluição da amostra. As imagens do painel esquerdo foram tiradas na ausência da luz polarizada e as do painel direito na presença do feixe de luz polarizada. Aumento de 32 vezes.

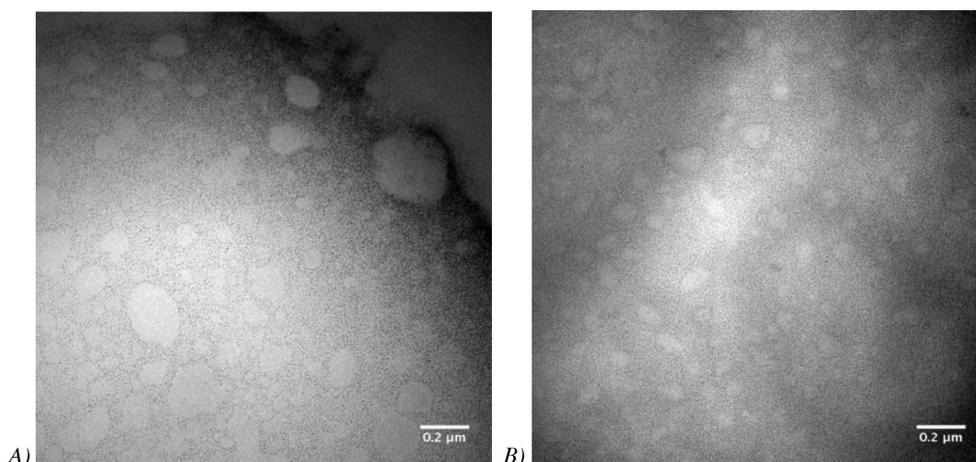


Não foram observadas presença de estruturas líquidas-cristalinas lamelares ou hexagonais, sugerindo que as formulações não apresentam transições de fases características de sistemas que desviam luz polarizada.

### 5.2.5 Morfologia

As imagens obtidas pela técnica de MET das formulações Nano 1 e Nano 2 estão apresentadas na Figura 8.

**Figura 8.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras diluídas 100 vezes em água destilada. Nano 1 (A) e Nano 2 (B). Aumento de 100 mil vezes



As imagens apresentam gotículas de contorno bem definido, com diâmetro médio de 700 nm, maior do que o observado quando as amostras foram analisadas por DLS e NTA, sugerindo coalescência das gotículas durante o preparo das lâminas.

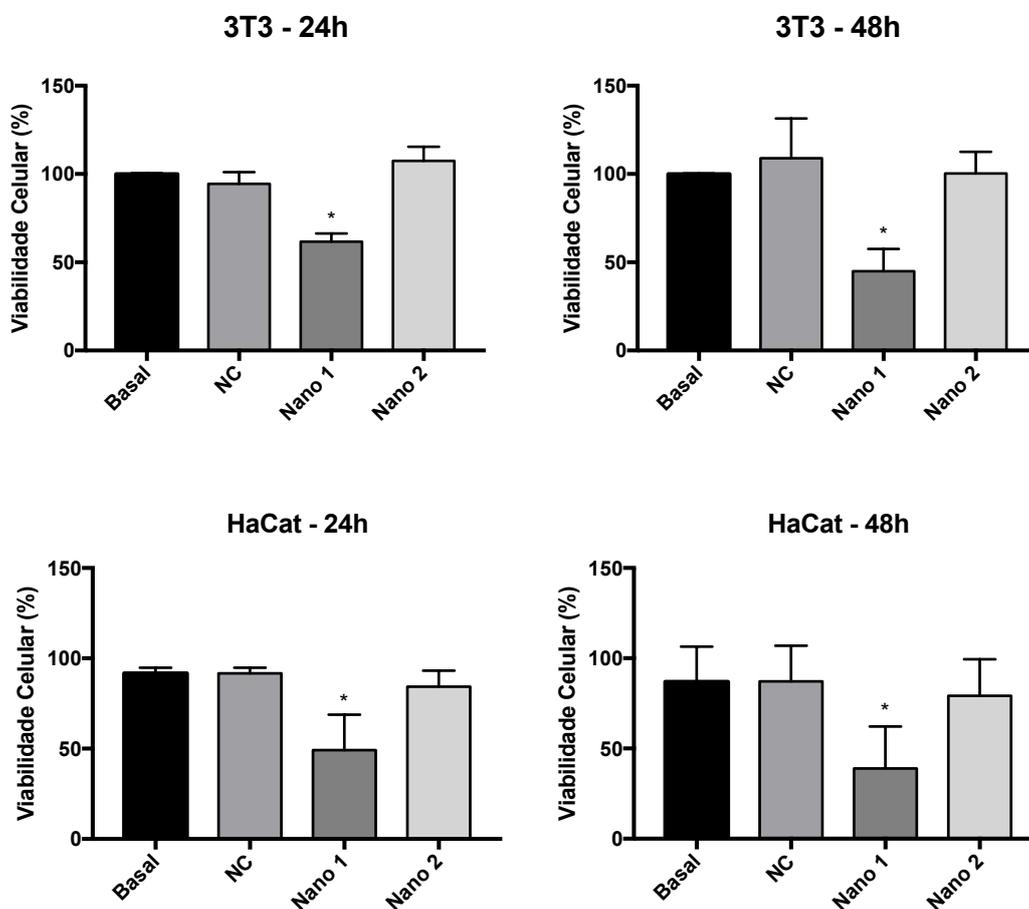
## 5.3 Estudos *in vitro* em cultura de células

### 5.3.1 Citotoxicidade

A viabilidade celular das nanoemulsões Nano 1 e Nano 2 foi investigada em cultura de fibroblastos (NIH-3T3) e queratinócitos (HaCat). Adicionalmente à avaliação da citotoxicidade inerente às preparações, o experimento foi conduzido no intuito de se estabelecer a faixa de concentração passível de ser aplicada *in vitro* nos estudos subsequentes sem causar morte celular.

A faixa de concentração avaliada foi determinada em função do número de partículas presentes nas nanoemulsões (Tabela 9). Sendo assim, a concentração de partículas no meio de cultura variou de  $1,0 \cdot 10^{12}$  a  $2,5 \cdot 10^{11}$  partículas/mL. Os resultados do ensaio de citotoxicidade das formulações em contato com a monocamada por 24 e 48 horas estão apresentados na Figura 9.

**Figura 9.** Valores de viabilidade celular, avaliada utilizando MTT, para cultura de fibroblastos NIH-3T3 (A) e queratinócitos HaCat (B) tratadas com  $10^{12}$  partículas/mL das formulações após 24 e 48 horas de incubação. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $P < 0,05$  ( $n = 3$  determinações).

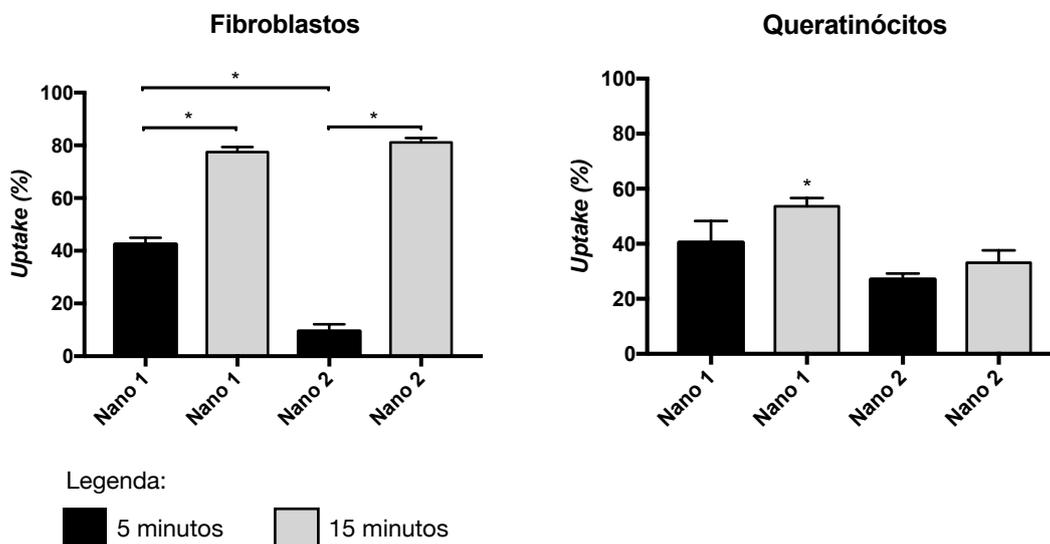


Pode-se observar na Figura 9 que apenas a Nano 1 diminuiu a viabilidade de fibroblastos e queratinócitos quando aplicada nas células na concentração de  $10^{12}$  partículas/mL. Nano 2 e NC não interferiram na viabilidade celular de nenhuma das células nas condições e tempos estudados.

### 5.3.2 Avaliação do uptake celular das formulações em função do tempo de incubação

A Figura 10 apresenta os gráficos resultantes das taxas de *uptake* das gotículas de Nano 1 e Nano 2 após 5 e 15 minutos de contato das formulações com monocamada de fibroblastos e queratinócitos.

**Figura 10.** Valores de taxa de internalização celular (% de *uptake*) encontrados para Nano 1 e Nano 2, na concentração de  $10^{12}$  partículas/mL, após 5 e 15 minutos de contato com monocamada de fibroblastos e queratinócitos. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $P < 0,05$  ( $n = 3$  determinações).

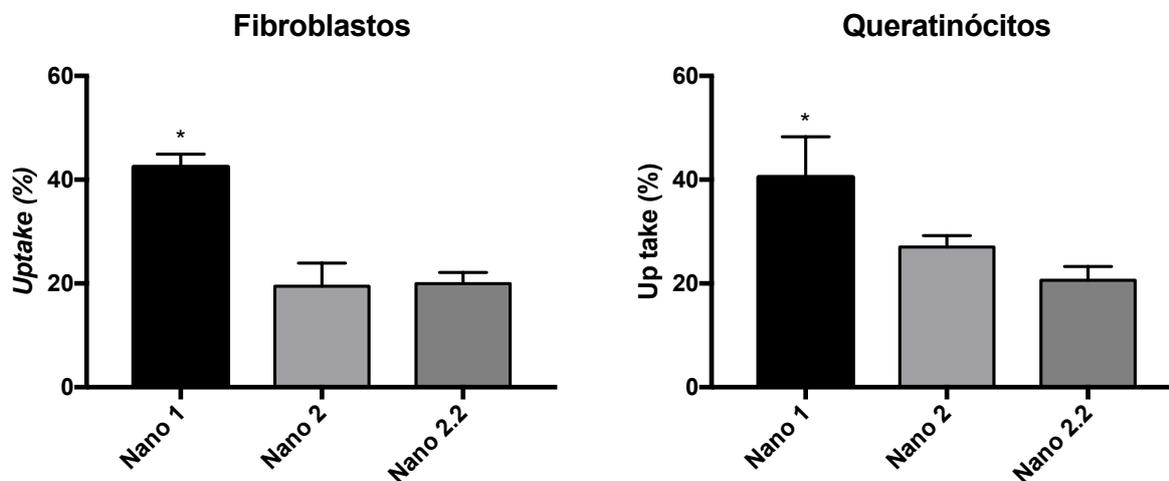


Para ambos tipos celulares, a formulação Nano 1 sofreu maior taxa de *uptake* após 5 minutos de contato, quando comparado com Nano 2. Entretanto, após 15 minutos de contato, ambas formulações sofrem a mesma taxa de internalização em fibroblastos. Já no perfil apresentado pelos queratinócitos, não houve diferença significativa da porcentagem de gotículas internalizadas após 5 ou 15 minutos de contato para Nano 2, diferentemente de Nano 1, que em 15 minutos de contato sofreu internalização mais expressiva.

Ao observar os resultados encontrados para Nano 2, é possível constatar que essa formulação sofre maior internalização em 5 minutos de contato com queratinócitos (aproximadamente 30%) do que com fibroblastos (aproximadamente 10%). Porém, decorridos 15 minutos de contato, a maior internalização é característica dos fibroblastos.

As diferenças observadas na velocidade de *uptake* se deve às características distintas de Nano 1 e Nano 2, ou seja, à constituição de seus sistemas emulsionantes e ao diâmetro de suas gotículas. Com o objetivo de identificar qual dessas características mais contribui para o resultado encontrado, a formulação Nano 2 foi submetida à maior força de cisalhamento em seu preparo, de forma que seu tamanho de gotícula ficasse próximo ao observado para Nano 1, obtendo a formulação denominada Nano 2.2. O teste de *uptake* com 5 minutos de contato foi novamente realizado com as 3 formulações (Nano 1, Nano 2 e Nano 2.2). O resultado está apresentado na Figura 11.

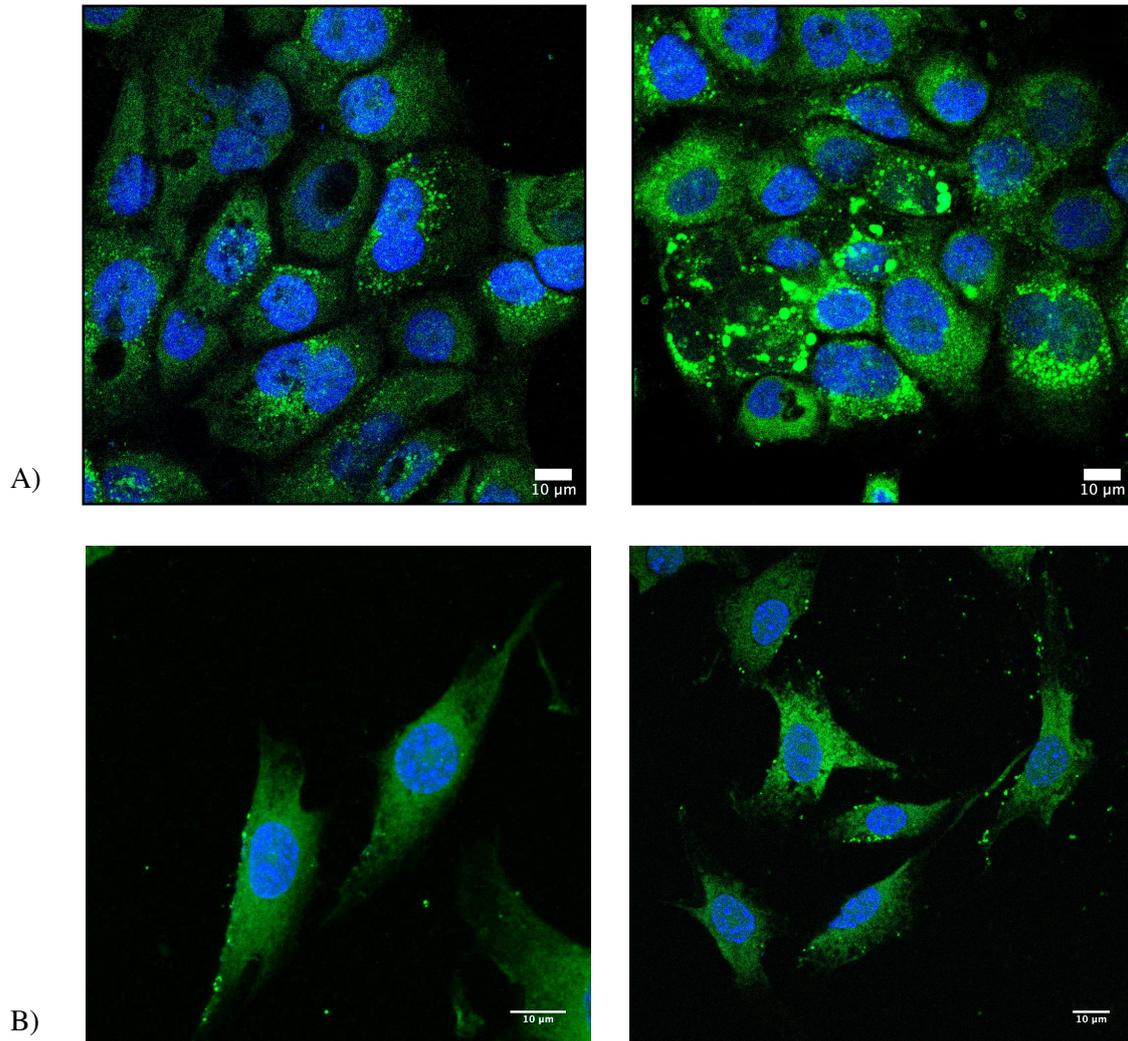
**Figura 11.** Valores de taxa de internalização celular (% de *uptake*) encontrados para Nano 1, Nano 2 e Nano 2.2 após 5 minutos de contato com monocamada de fibroblastos e queratinócitos. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  (n = 3 determinações).



De maneira geral, a diminuição do diâmetro das gotículas da Nano 2 não resultaram em aumento de seu *uptake*. Assim, a Nano 2.2, com partículas de tamanho semelhante a Nano 1 não apresentou velocidade de internalização maior do que essa última, sugerindo que a diferença de *uptake* entre as formulações está relacionada com os componentes do sistema emulsionante.

A Figura 12 mostra imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser das células de fibroblastos e queratinócitos tratadas com Nano 1 e Nano 2 por 15 min. Não foram observadas diferenças na distribuição das formulações no interior das células após esse tempo de experimento.

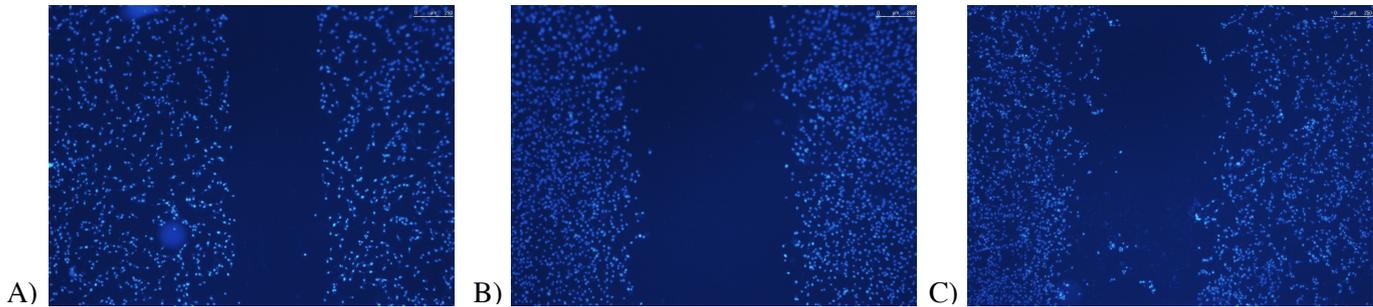
**Figura 12.** Imagens representativas obtidas por microscopia confocal do ensaio de *uptake* das formulações Nano 1 (painel esquerdo) e Nano 2 (painel direito) após 15 minutos de contato com as células queratinócitos HaCat (A) e fibroblastos NIH-3T3 (B).  $\lambda$  exc/em = 477/512 nm para visualização do bodipy em verde,  $\lambda$  exc/em = 405/413-472 nm para visualização do núcleo das células - DAPI em azul.



### 5.3.3 Avaliação da migração / proliferação celular – Ensaio do Arranhão (*Scratch Assay*)

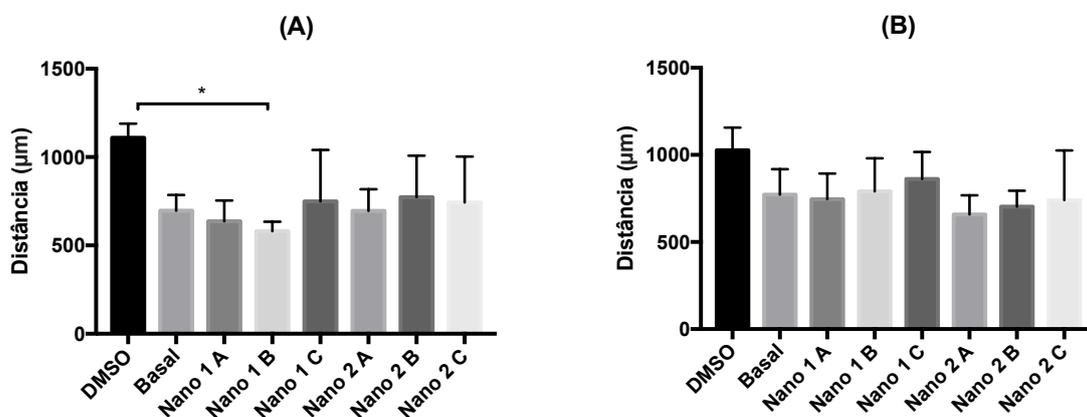
A Figura 13 ilustra a migração de fibroblastos NIH-3T3 das adjacências do arranhão para seu centro no decorrer das horas após tratamento com DMSO 50% (controle negativo) e com meio de cultura (controle positivo / migração basal). As células foram evidenciadas com marcador nuclear DAPI.

**Figura 13.** Imagens representativas do ensaio *Scratch* em cultura de fibroblastos NIH-3T3 para avaliação da migração celular em função do tempo. Em (A) a disposição das células no momento do arranhão ou tempo 0; em (B) o aspecto do arranhão após 12 horas de incubação em meio de cultura DMEM suplementado com soro bovino e l-glutamina (controle positivo) e em (C) após 24 horas de incubação com o meio de cultura.



A Figura 14 representa a diminuição do espaço aberto no meio de cultura pelo arranhão (*scratch*) após 24 horas de incubação com diferentes concentrações das nanoemulsões.

**Figura 14.** Proliferação das células, tratadas com diferentes concentrações das nanoemulsões, representada pela diminuição da distância entre as extremidades do arranhão, após 24 h. (A) queratinócitos (HaCat) e (B) fibroblastos (3T3). A, B e C representam as concentrações das nanoemulsões a  $4 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$  e  $10^{11}$  partículas/mL, respectivamente. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $P < 0,05$  ( $n = 3$  determinações).

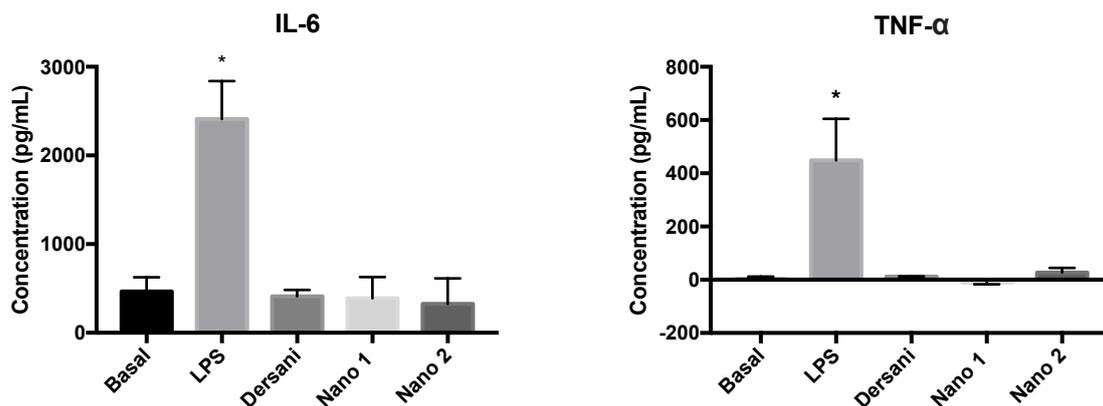


O tratamento dos queratinócitos apenas com o meio de cultura (basal) por 24 h permite que as células migrem, diminuindo a distância entre as extremidades do arranhão e aumentando a proliferação celular em relação ao controle negativo (DMSO) em aproximadamente 33% (test-t,  $P < 0,05$ ). O tratamento com as diferentes concentrações de Nano 1 e Nano 2, de  $10^{11}$  a  $4 \times 10^{11}$  partículas/mL, não alterou significativamente ( $P \geq 0,05$ ) essa proliferação (Figura 14A) quando comparado com o basal. O mesmo perfil migratório foi observado para os fibroblastos tratados (Figura 14B).

### 5.3.4 Expressão de citocinas e mediadores do processo de inflamação

A Figura 15 apresenta a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos humanos extraídos e isolados de 3 diferentes participantes e tratados com diferentes formulações.

**Figura 15.** Expressão de IL-6 e de TNF- $\alpha$  induzidas pelo tratamento de macrófagos humanos com LPS (controle positivos) e nanoemulsões e Dersani® diluídas 200 vezes em meio de cultura. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $P < 0,05$  ( $n = 3$  determinações).



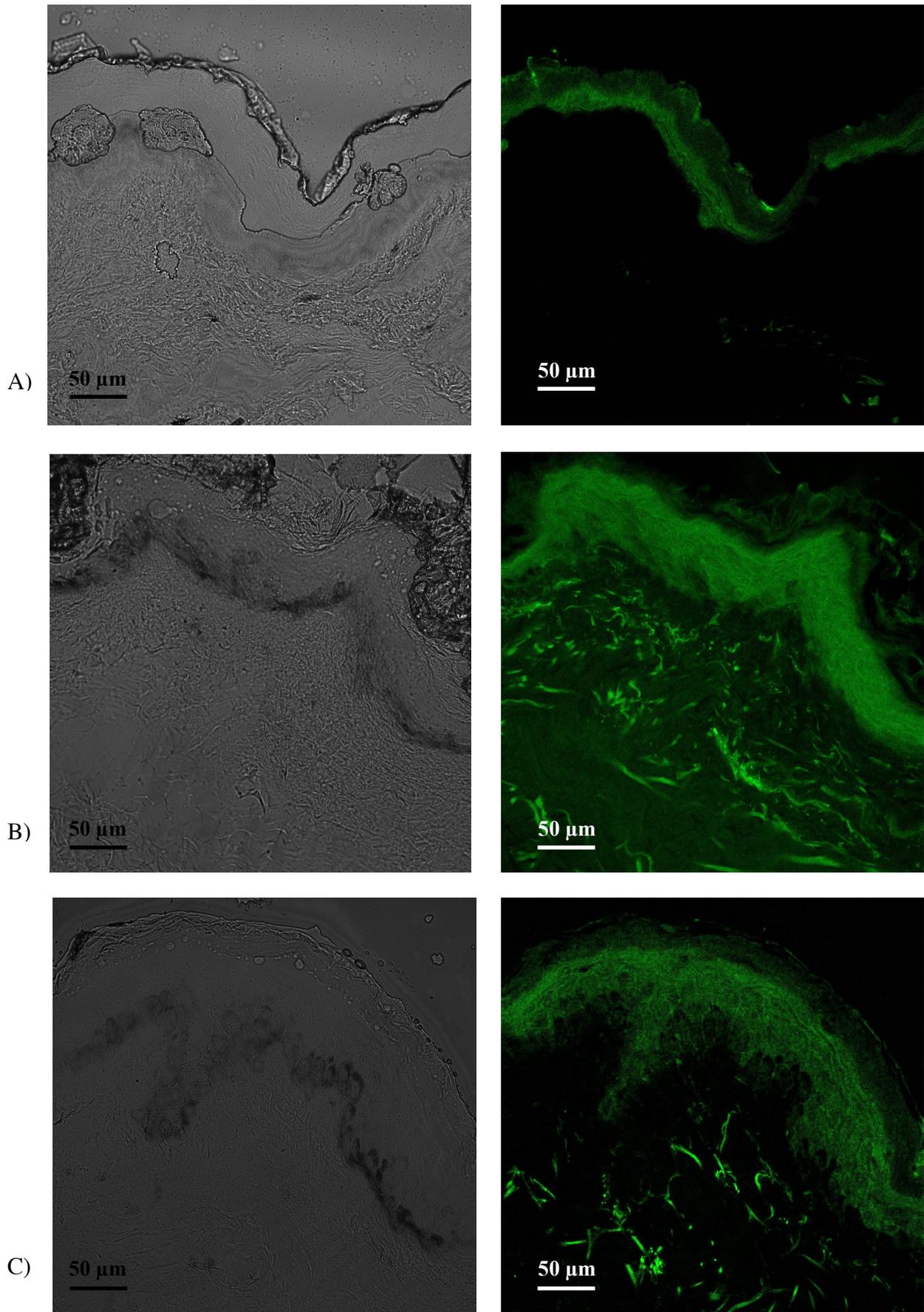
O tratamento dos macrófagos com as nanoemulsões, na concentração de aproximadamente  $3 \times 10^{11}$  partículas/mL (diluídas 200 vezes em meio de cultura), e com o Dersani® na mesma diluição não alterou significativamente (ANOVA,  $P: \geq 0,05$ ) a expressão basal dos mediadores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$ . Já o tratamento com LPS, como esperado, aumentou significativamente a produção desses mediadores. Esses resultados sugerem que as formulações estudadas não induzem processo inflamatório.

### 5.4 Estudos *in vitro* de penetração utilizando pele humana

A Figura 16 mostra imagens representativas obtidas por microscopia confocal de cortes transversais de pele humana tratadas por 1 hora com Dersani® e com as nanoemulsões Nano 1 e Nano 2 marcadas com o marcador fluorescente lipofílico bodipy.

A Nano 1 foi capaz de se distribuir homogeneamente por todas as camadas da pele (Figura 16B). Já a penetração da Nano 2 ficou restrita à epiderme, mas distribuída homogeneamente em todas as suas camadas (Figura 16C), diferentemente do Dersani® cuja distribuição na epiderme foi heterogênea e menor do que a observada para as nanoemulsões (Figura 16A).

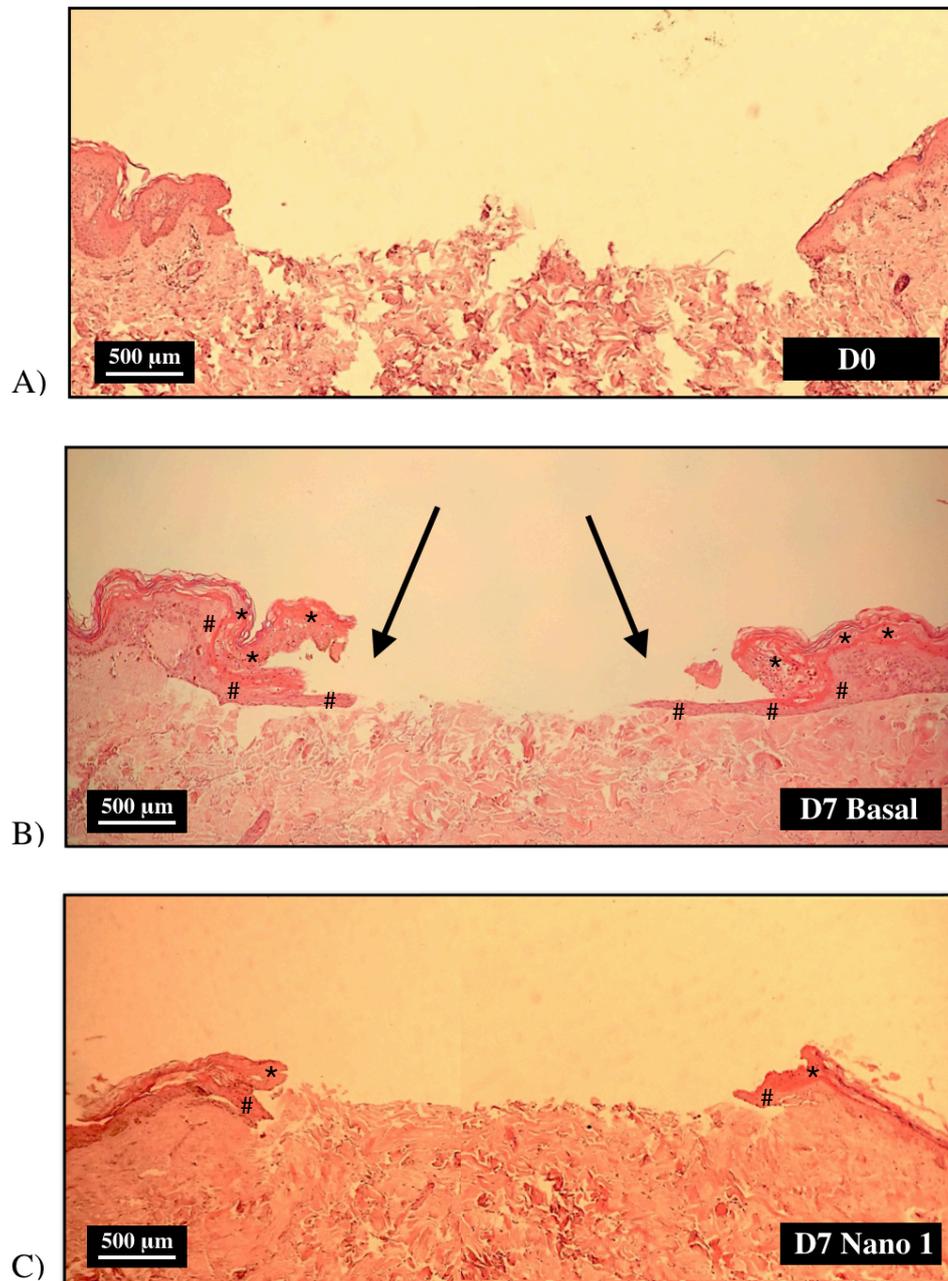
**Figura 16.** Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de cortes transversais de pele humana tratada por 1 hora com Dersani® (A), Nano 1 (B) e Nano 2 (C). O painel esquerdo representa o campo claro.



### 5.5 Estudos *ex vivo* em cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC)

A Figura 17 mostra cortes histológicos das feridas feitas nos explantes de pele humana tratados com a Nano 1 sem diluição e com meio de cultura (Grupo Basal) por 7 dias.

**Figura 17.** Cortes histológicos dos fragmentos de pele humana imediatamente (D0) após indução da úlcera (A), após 7 dias (D7) mantidos no meio de cultura DMEM (B) e após D7 tratados com aplicação diária de Nano 1 na ferida (C). Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 100x. Setas evidenciam o revestimento da úlcera por um novo epitélio. \* camada córnea, # novo epitélio.



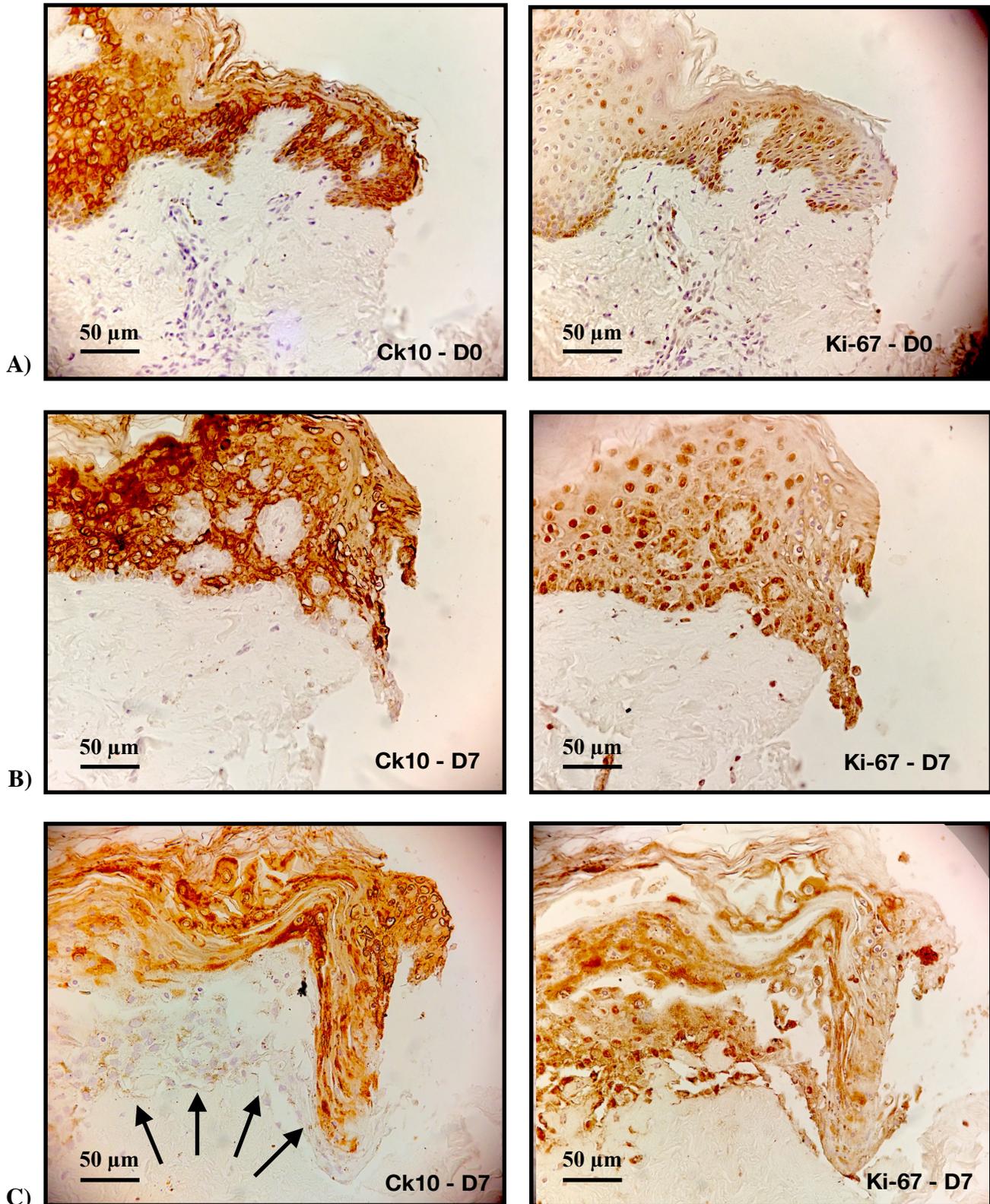
Pode-se observar que a cultura dos explantes não tratados com formulação, Grupo Basal (Figura 17B), por 7 dias possibilita a migração e projeção de queratinócitos das bordas para o interior da lesão, dando origem a língua de queratinócitos (setas na Figura 17B). Já o tratamento com a Nano 1 não diluída prejudicou essa projeção (Figura 17C).

Para avaliar se o tratamento com a Nano 1 estava resultando em morte celular, os cortes foram corados com marcadores de citoqueratina 10 (Ck10) e da proteína Ki-67 (Ki-67), marcadores específicos para células em diferenciação e células em proliferação, respectivamente. A Figura 18 ilustra o aspecto de regiões de borda de lesão no início (D0) e após 7 dias (D7) de tratamento diário dos fragmentos de pele com a Nano 1 não diluída.

**Figura 18:** Avaliação imuno-histoquímica das bordas esquerdas das úlceras provocadas nos fragmentos de pele humana imediatamente (D0) após instalação da úlcera (A) e após 7 dias (D7) tratados diariamente com a Nano 1 (B e C). As fotos do painel direito representam as marcações da proteína Ki-67 e as do painel esquerdo representam marcações da citoqueratina 10 (Ck10). As setas em indicam células em fase inicial de diferenciação. Aumento de 200x.

### Citoqueratina 10 (Ck10)

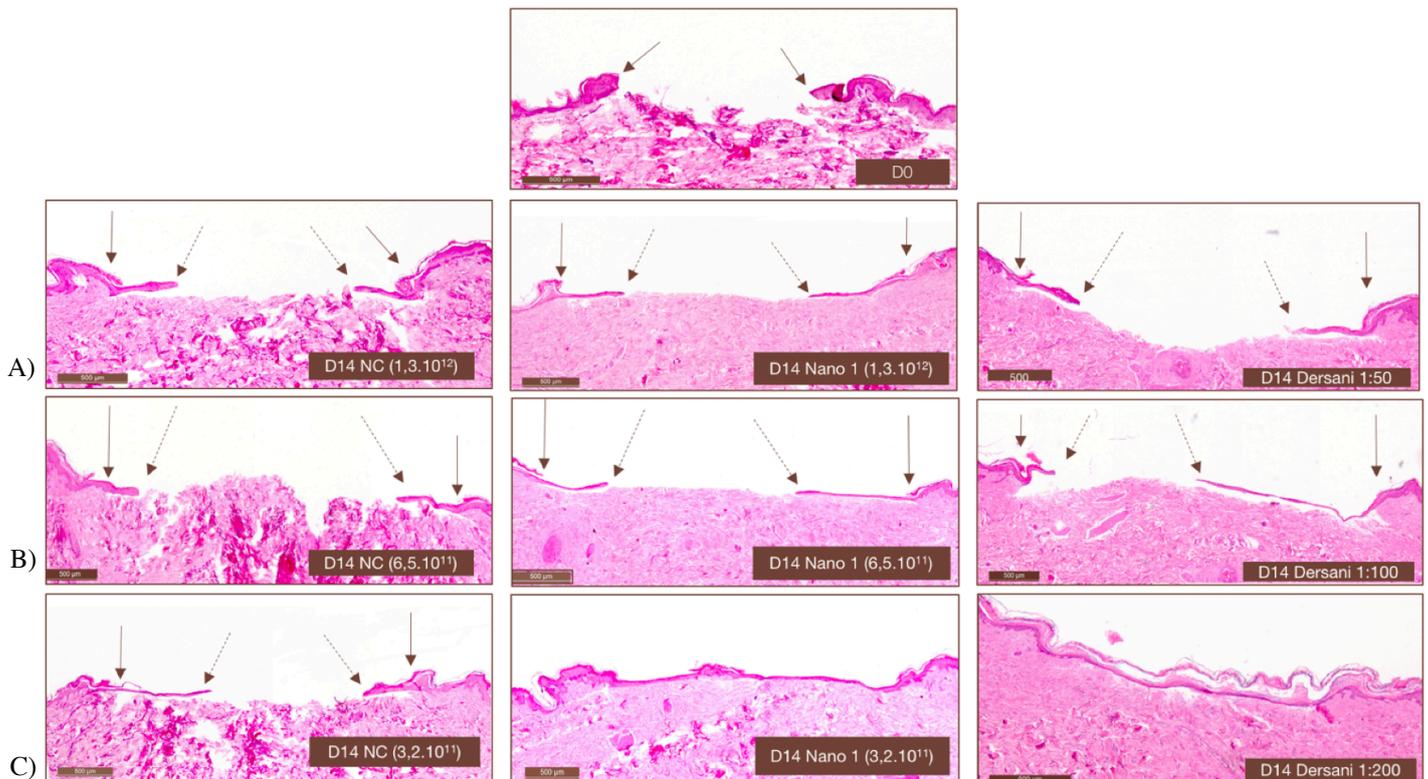
### Proteína Ki-67 (Ki-67)



As células dos fragmentos tratados com Nano 1 foram marcadas tanto com o marcador de Ck10 quanto com o de Ki-67 (Figura 18) sugerindo que as células estão viáveis. A dificuldade dos queratinócitos em proliferarem para o centro da úlcera, observada na Figura 17C, parece estar correlacionada, portanto, a um impedimento físico causado pela alta concentração de nanoemulsão.

Dessa forma, as úlceras induzidas nos fragmentos de pele foram tratadas com diferentes concentrações de nanoemulsão para investigar essa hipótese. A Figura 19 reúne imagens representativas das peles tratadas com a nanoemulsão controle (NC), Nano 1 e Dersani® no início (D0) e após 14 dias (D14) de tratamento. A Tabela 10 mostra a porcentagem de fechamento da ferida em função da concentração de nanoemulsão e do tempo de tratamento. O óleo Dersani®, diluído em meio de cultura da mesma forma que as nanoemulsões foi utilizado como controle positivo, já que esse óleo é comercializado e corriqueiramente aplicado em feridas em humanos.

**Figura 19:** Imagens histológicas dos fragmentos de pele humana imediatamente após indução da úlcera (D0), e após 14 dias mantidos em meio de cultura DMEM com aplicação diária de Nano 1, NC e Dersani®. A)  $1,3 \cdot 10^{12}$  partículas/mL de Nano 1 e NC e diluição 1:50 de Dersani®, B)  $6,5 \cdot 10^{11}$  partículas/mL de Nano 1 e NC e diluição 1:100 de Dersani® e C)  $3,2 \cdot 10^{12}$  partículas/mL de Nano 1 e NC e diluição 1:200 de Dersani®. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 100x. As setas contínuas indicam o início da ulceração, enquanto as setas tracejadas indicam o revestimento de um novo epitélio.



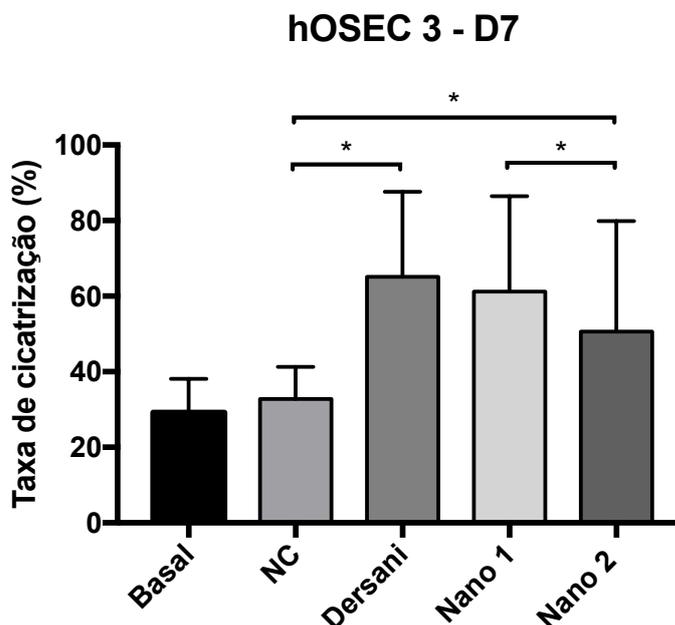
**Tabela 11.** Porcentagem de fechamento da ferida em função da concentração de formulação aplicada e do tempo de tratamento. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  ( $n = 3$  determinações).

Formulação	Concentração de partículas/mL ou diluição	% de fechamento da ferida em relação ao D0	
		D7	D14
Basal	1,3.10 <sup>12</sup>	30 ± 10	22 ± 3
	6,5.10 <sup>11</sup>	22 ± 5	19 ± 8
	3,2.10 <sup>11</sup>	30 ± 9	16 ± 4
NC	1,3.10 <sup>12</sup>	30 ± 10	22 ± 3
	6,5.10 <sup>11</sup>	22 ± 5	19 ± 8
	3,2.10 <sup>11</sup>	31 ± 9	16 ± 4
Nano 1	1,3.10 <sup>12</sup>	43 ± 9	28 ± 1
	6,5.10 <sup>11</sup>	48 ± 2	75 ± 25
	3,2.10 <sup>11</sup>	66 ± 26	76 ± 17
Dersani	1:50	44 ± 10	76 ± 24
	1:100	59 ± 35	25 ± 12
	1:200	61 ± 35	59 ± 29

Pode-se observar na Tabela 10 que as úlceras tratadas com a Nano 1 na diluição de  $3,25 \times 10^{11}$  partículas/mL apresentaram porcentagens de fechamento superiores do que as tratadas com maiores concentrações de nanoemulsão. Sendo assim, essa densidade de nanopartículas foi a escolhida para ser a utilizada na última série de experimentos com os fragmentos de pele.

A Figura 20 apresenta a porcentagem de cicatrização das úlceras após 7 dias de tratamento diário com as formulações administradas em concentrações semelhantes.

**Figura 20.** Representação gráfica das taxas de cicatrização encontrados para os fragmentos de pele humana tratados diariamente por 7 dias com meio de cultura (Basal), nanoemulsão controle de óleo mineral (NC), solução de óleo vegetal Dersani® (Dersani), Nano 1 e Nano 2. A aplicação dos tratamentos e controles foi realizada 1 vez a cada 24 horas. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (\*) indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  ( $n = 3$  determinações).



Todas as formulações que continham extratos vegetais (Nano 1, Nano 2 e Dersani®) apresentaram valores de taxa de cicatrização significativamente superiores àquelas encontrada para os grupos controle NC e Basal. Adicionalmente, as taxas de cicatrização encontradas para Dersani® e Nano 1 não apresentaram diferença estatística entre si, ao passo que foram significativamente superiores ao achado para Nano 2.

## 5. DISCUSSÃO

O tratamento de lesões cutâneas, apesar de todos os avanços terapêuticos, ainda representa um grande desafio. Os produtos pouco acessíveis e de eficácia não comprovada cientificamente, corroboram com os números alarmantes de perdas econômicas e pessoais, inerentes à epidemiologia de feridas (McQuestion, 2011). Muitos produtos disponíveis são falhos quanto à sua eficácia por não compreenderem, nas suas ações terapêuticas, o aspecto multifatorial do processo de cicatrização, que, independente da etiologia, se constitui de um processo biológico complexo, com interação simultânea de eventos celulares, bioquímicos e imunológicos (Alison et al., 2006). Dessa forma, um produto de ação cicatrizante deve estimular, concomitantemente, a recuperação dos constituintes da pele, o controle de infecções bacterianas e fúngicas, a modulação da inflamação tecidual e a interrupção da geração de radicais livres. Esses últimos, podendo decorrer dos processos inflamatórios endógenos (Masson, 2011) ou do ambiente externo, como a radiação ionizante na radiodermite.

Nesse contexto, a etapa racional para o desenvolvimento de um produto de ação cicatrizante deve considerar compostos com conhecida ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e com potencial de reestabelecer os constituintes originais da pele. Tais atividades foram consideradas na escolha dos extratos vegetais que constituíram as nanoemulsões desenvolvidas nesse trabalho, bem como seus respectivos sistemas emulsionantes. A escolha dos componentes de Nano 1 e Nano 2 foi pautada no sucesso dos tratamentos de distúrbios dermatológicos descritos na literatura, de onde foram selecionados dados científicos em relação à eficácia e segurança de preparações contendo os extratos vegetais selecionados.

De maneira geral, as atividades encontradas para extratos naturais de preparações fitoterápicas dependem da ação de uma variedade de componentes ativos encontrados em cada espécie vegetal, uma vez que, majoritariamente, os constituintes fornecem ação sinérgica e assim aumentam o valor terapêutico da composição (Musthaba et al., 2009). Assim, produtos de uso tópico contendo fitofármacos estão ganhando interesse devido aos benefícios que podem resultar da sua utilização (Uchechi et al., 2014). Esses atributos desejáveis justificam o aumento significativo do uso de fitoterápicos no mercado mundial, que aumentou de US \$ 18 bilhões de dólares de 2005 para US \$ 107 bilhões em 2017 (Musthaba, 2009; Sen & Chakraborty, 2020). De acordo com os relatórios da OMS, cerca de três quartos da população mundial atualmente faz uso da fitoterapia e outras formas de medicamentos naturais tradicionais (Sen & Chakraborty, 2020). Essa popularidade crescente de preparações contendo

ervas medicinais, aliada aos estudos científicos acerca do tema, representam indicativos de que é possível conseguir composições fitoterápicas seguras.

A garantia da segurança de composições naturais perpassa primariamente pela comprovação de sua estabilidade físico-química e, na sequência, por ensaios pré-clínicos no nível laboratorial. Além das investigações acerca da segurança e eficácia das preparações Nano 1 e Nano 2 no presente trabalho, tais estudos objetivaram evidenciar as diferenças entre dois sistemas emulsionantes distintos, compostos por diferentes fosfolipídios.

O interesse nesses emulsionantes de fonte natural advém do fato de que os fosfolipídios, além de atuarem como agentes estabilizantes de formas farmacêuticas termodinamicamente instáveis, como as emulsões, também auxiliam na reposição de componentes graxos da pele (Baroli, 2010). Por essa razão, a multifuncionalidade dessas macromoléculas é muito explorada nos produtos para aplicação tópica (Hoogevest & Fahr, 2019). Entretanto, os processos de extração e purificação das mesmas são onerosos, resultando em formulações de custo elevado.

Uma alternativa para redução dos custos é a combinação de fosfolipídios com tensoativos sintéticos como parte do sistema emulsionante (Lind et al., 2008; Kanet al., 1999; Lawson et al., 2004). Dessa forma, para comparação dos efeitos dos sistemas emulsionantes compostos por fosfolipídios na estabilidade físico-química, na segurança, e na eficácia em cicatrização cutânea, foram desenvolvidas nanoemulsões com fase interna e externa idênticas, porém emulsionadas ou com uma mistura de emulsificantes sintéticos e fosfolipídios purificados (Nano 1), ou apenas com fosfolipídios (Nano 2). Os processos e parâmetros de preparo de ambas nanoemulsões também foram idênticos.

O desenvolvimento de Nano 1 se pautou na triagem de tensoativos sintéticos para obtenção de sistemas emulsionantes em conjunto com concentrações fixas de dois insumos fontes de fosfolipídios de pureza elevada, isto é, elevado teor de fosfatidilcolina (98% em H100 e 75% em S75), como apresentado na Tabela 1.

Para investigar a substituição do tensoativo sintético de Nano 1 por outro emulsionante fonte de fosfolipídios de origem natural, traçou-se, para obtenção de Nano 2, o delineamento experimental com variações nas concentrações de H100 e S75 e adição do insumo H20, constituído da mistura de diferentes fosfolipídios, sendo garantido pelo fabricante 20% de fosfatidilcolina. Por não representar uma matéria-prima tão pura quanto H100 e S75, H20 possui custo consideravelmente menor. Dessa forma, H100, S75 e H20 representaram as variáveis independentes do delineamento experimental elaborado para obtenção de Nano 2 (Tabela 2). Durante o desenvolvimento tanto de Nano 1 quanto de Nano 2, foram encontradas formulações com gotículas de tamanhos distintos, conforme a composição do sistema emulsionante de cada formulação manipulada (Tabelas 3 e 4). Todas elas, no entanto,

apresentaram diâmetro inferior a 500 nm, a maioria com distribuição estreita, com PDI menor do que 0,3, e podem ser consideradas sistemas nanoparticulados adequados para administração tópica (Yukuyama et al., 2016). A literatura reporta que nanoemulsões óleo em água dotadas de gotículas com diâmetro compreendidos entre 50 e 500 nm, quando aplicadas topicamente, possuem capacidade de interação com a barreira do estrato córneo. Esse contato pode resultar na desorganização da matriz lipídica da camada córnea e, desta forma, permitir o aumento da penetração e partição dos fármacos que são por elas carregados para as camadas mais profundas da pele (Dalmolin, 2019). Além disso, essa faixa de tamanho nanométrico confere às dispersões estabilidade cinética, prorrogando seu prazo de validade (Yukuyama et al., 2016), facilitando a espalhabilidade (Silva et al., 2013) e aumentando a superfície de contato com o local onde será aplicada (Yukuyama et al., 2016).

Uma vez que um maior tamanho de gotículas e maior PDI está relacionado a menor estabilidade cinética, as formulações com menores tamanhos e valores de PDI, após estudo de estabilidade preliminar, foram escolhidas para as investigações subsequentes.

As variáveis custo, viscosidade, e pH dos protótipos obtidos durante o desenvolvimento de Nano 1 não variaram consideravelmente (Tabela 3), diferentemente daqueles obtidos no desenvolvimento de Nano 2 (Tabela 4). Para essas formulações, o pH variou de 4,3 a 6,1. Para produtos de administração tópica esta faixa de pH é considerada ideal, pois se encontra dentro do intervalo de pH das camadas superiores de uma pele saudável. O pH fisiológico do estrato córneo de mamíferos varia de 4,5 a 5,5 em sua superfície e aproxima-se da neutralidade na interface entre estrato córneo e estrato granuloso (Baroli, 2010).

A viscosidade das preparações manipuladas durante o desenvolvimento da Nano 2 também variou consideravelmente, de 61 cP a 5819 cP. Essa discrepância repercutiu na necessidade de se utilizar dois *spindles* distintos para a determinação da viscosidade. Adicionalmente, tais resultados sugerem a possibilidade de se obter tanto nanoemulsões fluidas como semi-sólidas com as combinações de fosfolipídios H20, H100 e S75 utilizadas, contribuindo para a versatilidade das preparações que podem ser desenvolvidas a partir delas e para a conveniência de aplicação em função do local e tipo de lesão instalada. Por exemplo, nanoemulsões mais fluidas podem ser administradas na forma de spray para o tratamento de lesões de difícil alcance e muito sensíveis, como aquelas que acometem mucosas, ou lesões provenientes de queimaduras. A facilidade de aplicação e característica indolor são determinantes para adesão do paciente e para o sucesso do tratamento (Boateng et al., 2008). Por outro lado, preparações semi-sólidas estão relacionadas com maior tempo de permanência no leito da lesão (Boateng et al., 2008), compensando eventuais prejuízos na absorção sistêmica dos princípios ativos topicamente aplicados.

Os resultados encontrados para o parâmetro viscosidade ilustram o descrito por Filipovic et al., 2016, que afirmam que a consistência, o empacotamento e a reologia das formulações podem frequentemente ser manipuladas usando combinações de emulsificantes. Misturas de tensoativos com diferentes massas moleculares e polaridades podem alterar a curvatura na qual se posicionam na interface óleo/água, influenciando, assim, a formação e a estabilidade da emulsão. De fato, propriedades reológicas das emulsões podem ser moduladas usando emulsificantes mistos, cuja mistura altera a organização individual de cada emulsificante na interface, organização essa, fortemente influenciada pela natureza das interações intermoleculares na superfície da gotícula (McClements et. al, 2017).

Quanto aos custos, os sistemas emulsionantes das formulações manipuladas para obtenção de Nano 2, de R\$ 63,23 ± 7,68 por Kg (Tabela 4), foram mais de 3 vezes mais altos do que o custo médio com os tensoativos usados na obtenção da Nano 1, de R\$ 18,34 ± 1,11 por Kg (Tabela 3). O uso da mistura de fosfolipídios com polissorbitos para estabilidade de sistemas heterogêneos, como realizado para obtenção de Nano 1, é vastamente descrito na literatura (Lin et al., 2014; Simin et al., 2016). A combinação é importante não apenas para viabilizar custos de formulação, como também para diminuir o tamanho das gotículas da fase interna da dispersão, promovendo a estabilidade do sistema nanoparticulado (McClements et al., 2017). Além disso, a redução do tamanho da gotícula favorece o *uptake* celular e a capacidade de entrega de princípios ativos (Lin et al., 2014). No entanto, a demanda pela substituição de tensoativos sintéticos por substâncias naturais e sustentáveis, em produtos de consumo humano, está aumentando devido à crescente conscientização sobre os prejuízos à saúde relacionados à toxicidade de certos compostos e à conscientização social acerca da sustentabilidade ambiental (McClements et al., 2017). Uma vez que os emulsionantes de origem vegetal estão relacionados à uma maior biocompatibilidade, menor toxicidade e maior biodegradabilidade (Rahman et al., 2017), os estudos *in vitro* e *ex vivo*, aos quais foram submetidas as formulações finais Nano 1 e Nano 2, foram delineados no sentido de investigar se as diferenças apresentadas na toxicidade e no potencial cicatrizante das formulações justificam o maior custo de Nano 2.

A necessidade de redução de custos para Nano 2 explica a abordagem do fator custo no delineamento experimental e, portanto, da sua minimização no momento da otimização da formulação final desejada (Figura 3).

A faixa de viscosidade entre 61 a 253 cP foi outro fator considerado na otimização da formulação final. Isso porque desejou-se nesse trabalho a veiculação da formulação em embalagem com dispositivo spray, visando a facilidade de aplicação e administração sem contato das mãos do paciente ou do médico com a ferida que se pretende tratar.

As variáveis dependentes custo e viscosidade foram de fato as únicas que influenciaram significativamente ( $P < 0,05$ ) na obtenção das nanoemulsões desenvolvidas com base no delineamento experimental elaborado (Tabela 5). Foram elas, dessa forma, as consideradas para definir o modelo matemático mais adequado (Tabela 6) para se prever as características da Nano 2 final com as propriedades desejadas: estável, de baixo custo e com viscosidade adequada para ser administrada na forma de spray (Figura 3). A Tabela 6 mostra assim, os resultados das análises estatísticas que evidenciam o efeito individual e interativo dos preditores na viscosidade e custo das formulações manipuladas para obtenção de Nano 2.

A Tabela 6 também apresenta os valores de  $R^2$  ajustado e  $R^2$  predito. O  $R^2$  ajustado é uma medida da quantidade de variação sobre a média explicada pelo modelo, enquanto que o  $R^2$  predito é uma medida de quão bem o modelo é capaz de prever um valor de resposta.  $R^2$  ajustado e  $R^2$  predito devem apresentar uma diferença de até 0,2 para estarem em concordância aceitável. Pode-se observar na Tabela 6 que houve uma diferença menor do que 0,2 entre o  $R^2$  ajustado e predito para as respostas viscosidade e custo, sugerindo adequação do modelo e ausência de efeitos de bloco (Kapoor et al., 2019).

A Tabela 6 ainda apresenta os valores de Precisão Adequada para ambas variáveis dependentes estatisticamente significantes. A Precisão Adequada é uma relação entre o sinal e o ruído que compara o intervalo dos valores previstos nos pontos do delineamento experimental com o erro de previsão médio. O modelo apresentou um valor de precisão adequado de aproximadamente 13 para viscosidade e maior do que 600 para custo. Valores de precisão adequados maiores que 4 configuram correta discriminação do modelo, indicando que o modelo matemático definido pode ser usado para investigações dentro do espaço delineado.

Pode-se observar nas equações matemáticas definidas a partir do delineamento (Tabela 6), que apenas as variáveis independentes H20 e H100 influenciam na viscosidade da formulação (Figura 1). O emulsificante S75 não influencia significativamente, portanto, nessa variável dependente (viscosidade).

Conforme pode ser observado na Figura 1, quanto maior a concentração de H20 e H100, maior a viscosidade da preparação final. Por representar uma misturas de diferentes fosfolipídios, o insumo H20 pode favorecer a formação de multicamadas de lecitinas na superfície da gotícula da fase interna da nanoemulsão, influenciando suas propriedades físico-químicas, textura, aparência e viscosidade. Já o insumo H100 garante a presença de fosfatidilcolina, fosfolipídio reconhecidamente importante na garantia da estabilidade de dispersões heterogêneas (Kumari et al., 2017).

Em relação ao custo, pode-se observar na equação definida no modelo (Tabela 6) que os três insumos utilizados como emulsificantes, H20, H100 e S75 influenciam no preço final da nanoemulsão. Na Figura 2, assim como na equação de predição do custo, é possível observar que o fator que mais contribui para o custo da preparação final é a variável independente H100. De fato, uma vez que esse insumo garante a presença de 98% de fosfatidilcolina e representa um insumo inovador no mercado de fosfolipídios - uma vez que o girassol é uma fonte nova para extração de lecitinas - a variável independente H100 é a matéria-prima que mais fortemente impacta positivamente no custo final da preparação.

Com o modelo matemático e equações obtidos a partir do delineamento experimental foi possível realizar a otimização numérica e definir as porcentagens de cada um dos emulsificantes necessárias para se obter a nanoemulsão desejada. Dados o intervalo de valores desejados para viscosidade (61 a 253 cP) e o comando para minimização do custo, as concentrações ótimas de cada um deles foram obtidas (Tabela 7) e utilizadas para obtenção da nanoemulsão desejada. A desejabilidade é uma função objetiva que varia de 0, fora dos limites, até 1, maior desejabilidade possível, para os comandos fornecidos ao software utilizado para o delineamento experimental. A otimização numérica é, portanto, a maneira com a qual se encontra um bom conjunto de condições que atendam a todas as metas, ou seja, que o valor de desejabilidade seja próximo de 1. Sendo o valor de desejabilidade para os parâmetros avaliados igual a 0,921 (Figura 3), é alta a probabilidade da nanoemulsão com as características desejadas serem obtidas usando as porcentagens de emulsificantes fornecidas pela modelagem (Wang et al., 2009).

Para validar o modelo, as formulações foram preparadas conforme definido, em triplicata, e caracterizadas quanto às variáveis dependentes pesquisadas. Como pode ser observado na Tabela 8, os valores obtidos experimentalmente ficaram dentro do intervalo de predição (Tabela 7) e foram estatisticamente semelhantes (teste T de Student pareado,  $P > 0,05$ ) aos previstos pelo modelo, evidenciando a capacidade de predição satisfatória do delineamento experimental utilizado.

Definidas, portanto, Nano 1 e Nano 2, seguiu-se para caracterização comparativa de ambas preparações. A Tabela 9 reúne os resultados encontrados pré e pós testes de estabilidade preliminar para cor, viscosidade, odor, pH, tamanho de gotícula e PDI. A diferença de cor entre as preparações é justificada pela presença de H20, de cor acastanhado, em Nano 2 e ausente em Nano 1. A viscosidade encontrada para ambas preparações é adequada para aplicação via dispositivo *spray* e apresentaram comportamento reológico adequado para preparações de aplicação tópica (Figura 6).

A análise do comportamento reológico de Nano 1 e Nano 2, apresentado na Figura 6, permite observar a redução do valor de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, bem como a restauração da viscosidade inicial com a redução do cisalhamento, indicativo de comportamento de fluxo pseudoplástico e tixotrópico. Tal comportamento é importante para preparações destinadas ao envase em embalagem com dispositivo spray, uma vez que o aumento da fluidez do líquido, dada a força de acionamento do dispositivo (ou seja, aumento da taxa de cisalhamento sobre o líquido), facilita não somente a passagem da formulação pelo spray, como também auxilia na sua dispersão e pulverização homogênea no local de aplicação. Cessada a pressão externa responsável pelo aumento da taxa de cisalhamento da preparação, a formulação retorna à sua fluidez inicial no local em que foi aplicada, contribuindo para bioadesão por dificultar o escoamento após aplicação. Para as formulações mais viscosas destinadas ao envase em embalagens de semissólidos, o comportamento pseudoplástico também é adequado, uma vez que configura uma menor resistência, iniciada a força de aplicação da formulação. A menor oposição conferida promove as propriedades relacionadas à espalhabilidade, imprescindíveis para produtos destinados à aplicação em pele sensível (Silva et al., 2013).

Em relação aos tamanhos das gotículas e suas variações (PDI), para ambas formulações não foram encontrados valores que variaram de forma significativa pré e pós testes de estabilidade preliminar (Tabela 9), sugerindo boa estabilidade. O tamanho das gotículas e seu perfil de distribuição variaram, no entanto, dependendo da mistura de emulsificantes. A Nano 1, que continha o tensoativo sintético além do fosfolípido, apresentou tamanho de gotículas quase 3 vezes menor do que a Nano 2 (Tabela 10), composta apenas por emulsificantes de origem natural, além de distribuição monomodal dessas gotículas (Figura 5). Já o perfil obtido para a Nano 2 acusou a presença de uma pequena população com partículas de maior tamanho, sendo, portanto, de perfil bimodal (Figura 5), confirmado pelo valor mais elevado de SPAN observado para essa nanoemulsão (Tabela 10).

O maior tamanho de gotículas apresentado pela Nano 2 refletiu em uma menor concentração de gotículas em cada mililitro da formulação, como pode ser observado na Tabela 10). Ainda, a análise de Nano 1 obtida por NTA resultou em valores de tamanho médio de partículas semelhantes aos obtidos por DLS (Tabela 10). Para a Nano 2, no entanto, as análises por DLS e NTA resultaram em tamanhos médios de partículas significativamente diferentes. A diferença pode estar relacionada às técnicas distintas de análise. Enquanto a técnica de NTA baseia-se no rastreamento individual do movimento browniano de partículas para aferir o coeficiente de difusão translacional, que é posteriormente considerado na equação de Stokes-

Einstein, o DLS considera o valor do diâmetro hidrodinâmico do conjunto de partículas que atravessam o feixe de laser para análise das flutuações do espalhamento de luz.

As técnicas por espalhamento de luz, como o DLS e o NTA, exibem certas limitações e podem fornecer informações incompletas. Primeiramente, podem não acusar de forma discriminada a presença de uma pequena população de gotículas grandes nas nanoemulsões, do mesmo modo que outros agregados menores não são evidenciados. Tais agregados (que podem decorrer da presença de emulsificantes), como vesículas lipossômicas, micelas ou outras estruturas lamelares, não são detectados; a organização discriminada das várias estruturas presentes no sistema coloidal permanece, portanto, desconhecida. No entanto, a presença de tais estruturas deve ser considerada, pois são subprodutos frequentes do processo de homogeneização de alta pressão (Klang et al., 2012).

Além disso, a forma das gotículas de óleo analisadas é geralmente considerada uma esfera perfeita para o cálculo dos resultados de DLS, o que nem sempre é o caso, como observado na Figura 8. Dessa forma, como a técnica foi desenvolvida para análise de partículas esféricas, os valores para partículas não-esféricas estarão sempre relacionados aos erros inerentes à modelação matemática para a forma de esfera, de forma que medidas de tamanho podem estar tendenciosas para valores maiores que o real. Assim, a determinação do tamanho de gotículas de formato variável pode não ser representada em sua totalidade. Além disso, amostras das nanoemulsões desenvolvidas foram consideravelmente diluídas antes das medidas por DLS e NTA para garantir transparência suficiente para determinação precisa do tamanho das gotículas. Como consequência, fenômenos de desestabilização reversíveis, como a floculação ou o aparecimento de agregados maiores, podem permanecer despercebidos (Klang et al., 2012).

A diluição é um ponto crítico quando se tem em mente que os equipamentos que se utilizam de espalhamento de luz para aferições, como DLS e NTA, foram planejados para realizar mensurações apenas em dispersões diluídas. Para se ter confiabilidade no resultado, a condição de monoespalhamento é primordial. Isso significa que a detecção do espalhamento de luz deve ser proveniente da ação de uma única partícula. Quando não se trabalha em uma diluição adequada, analisando uma amostra concentrada, as partículas se encontram muito próximas, de forma que no momento da incidência do laser, o espalhamento da luz proveniente de uma partícula encontra outra partícula próxima e retroespalha essa luz. Dessa forma, o detector não captura o espalhamento de uma partícula, mas sim o retroespalhamento de uma partícula imediatamente próxima àquela que espalhou a luz incidida, fornecendo, assim, valores irreais do tamanho da partícula.

Por esse motivo, traçou-se o perfil de diluição de três formulações distintas, protótipos de Nano 2 selecionadas de forma aleatória, para investigação da melhor diluição para aferição do tamanho de gotículas durante o desenvolvimento de Nano 2 (Figura 4). Para plotar os perfis de diluição, medidas de tamanho de gotícula foram realizados na mesma amostra com diferentes diluições até se obter um correlograma adequado, indicativo de monoespalhamento, ou seja, até se observar estabilidade no valor de tamanho obtido. O correlograma é um gráfico fornecido pelo equipamento que dá informações sobre o tempo gasto para relacionar as flutuações de espalhamento de luz com o diâmetro da partícula, de forma que, para preparações homogêneas, de baixo PDI e sem presença de agregados, o equipamento levará pouco tempo para fazer essa relação.

Além disso, informações sobre a diluição da amostra podem ser obtidas a partir da observação da parte final da curva do correlograma, pois a presença de ruídos na calda final também pode indicar excesso de partículas ou formulação instável, evidenciando a necessidade de estudar novamente as proporções entre os constituintes da nanopartícula. A presença de ruídos é, portanto, indicativa de que algo pode contribuir para elevar a tendência dos valores de tamanho para valores maiores.

Outro valor que foi considerado na investigação da melhor diluição para mensurações de Nano 2 foi o valor do Intercepto (ou “intercept”). Esse valor, quando próximo de 1, é indicativo de boa correlação. Se a correlação foi satisfatória (o equipamento demorou pouco tempo para fazer a correlação) o valor fica próximo de 1 e o “Result quality” indicará “Good”. Dessa forma, se a amostra estiver muito diluída, poucas partículas passarão pelo feixe de luz e o equipamento levará mais tempo para conseguir correlacionar a flutuação de espalhamento de luz com o diâmetro, o que gerará um baixo valor de “intercept”.

Independente das diferenças entre as técnicas de análises, o tamanho médio das gotículas de Nano 2 é pelo menos o dobro daquelas encontradas em Nano 1. O maior tamanho, bem como a maior polidispersão encontrada para Nano 2, podem estar relacionados com a mistura de fosfolipídios presentes em H<sub>2</sub>O, que são constituídos por diferentes grupos de cabeça e cauda, bem como outros tipos de lipídios, além da fosfatidilcolina, tais como lisofosfatidilcolina, ácidos graxos, triglicerídios, glicolipídios e esteróis (Lipoid, 2017). As caudas apolares desses lipídios consistem tipicamente de dois ácidos graxos que podem ter números diferentes de átomos de carbono e duplas ligações e, como consequência, apresentarem diferentes formas de interação e morfologia estrutural (Grapentin et al., 2015, McClements et al., 2017). Além do tipo de fosfolipídio, a concentração dessas moléculas também impacta o tamanho das gotículas e a estrutura da emulsão (Sommerling et al., 2018). Por exemplo, certos tipos de lecitina de girassol formam camadas únicas de fosfolipídio ao

redor de gotículas de óleo, quando usadas em baixas concentrações, mas formam multicamadas nas superfícies das gotículas e também outras vesículas, micelas, lipossomas e até estruturas líquido-cristalinas, quando são dispersos na fase aquosa em altas concentrações (McClements et al., 2017). A presença destas multicamadas e estruturas lamelares influenciam as propriedades físico-químicas das emulsões, alterando sua textura, aparência ou estabilidade e explicam valores elevados de PDI (Sommerling et al., 2018).

Com a finalidade de investigar o comportamento das fases em que se encontravam organizados os emulsificantes nas formulações Nano 1 e Nano 2, foram realizadas análises por microscopia de luz polarizada. As imagens apresentadas na Figura 7 não evidenciam estruturas que desviam a luz polarizada, ou seja, as formulações analisadas não apresentaram comportamento anisotrópico, sem indícios, portanto, de estruturas líquido cristalinas lamelares ou hexagonais (Filipovic et al., 2016).

Vale ressaltar, que além dos constituintes dos sistemas emulsionantes e suas concentrações, as condições nas quais obtém-se uma emulsão é de suma relevância para as características finais da preparação. O processo de emulsificação da fase oleosa na aquosa também é afetado significativamente por condições como porcentagem de água, intensidade de cisalhamento e temperatura (Wang et al., 2017) mantidos durante o preparo. Uma vez que no presente trabalho todas as preparações foram manipuladas com as mesmas condições, isto é, mesma temperatura, tempo e velocidade de agitação no ultraturrax, e mesmo número de ciclos e pressão no HAP, a discussão se pautará em como o conjunto de tensoativos é capaz de afetar a estabilidade de um sistema termodinamicamente instável que se constitui uma emulsão.

Essa instabilidade advém da tensão interfacial relativamente alta em uma interface óleo-água, devido ao contato termodinamicamente desfavorável entre as moléculas de óleo e água associadas ao efeito hidrofóbico (McClements et. al, 2017). A presença das moléculas dos emulsificantes reduzem essa tensão interfacial quando adsorvidas na interface entre óleo e água. A capacidade de um emulsificante de reduzir a tensão interfacial é, portanto, altamente dependente de suas características moleculares, como massa molecular e localização de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (Szymczyk et. al, 2018). Um dos principais efeitos opostos à adsorção de emulsificantes é a redução em sua entropia translacional e, portanto, a redução na tendência de adsorver em uma interface. Tal entropia também é altamente dependente da massa molecular de um emulsificante, de forma que quanto menor ela for, maior a entropia em oposição à adsorção (Glenn et. al, 2005).

A tendência idiossincrática de um emulsificante de adsorver à interface óleo-água pode ser descrita usando a Equação Isotérmica de Adsorção de Gibbs (Equação I), que relaciona a

quantidade de emulsificante adsorvido na interface ( $\Gamma$ ) à tensão interfacial ( $\gamma$ ) e à concentração de emulsificante no restante da formulação ( $c$ ):

$$\Gamma = -\frac{1}{pRT} \left( \frac{d\gamma}{d\ln(c)} \right) \quad (I)$$

Onde,  $\Gamma$  é a concentração do emulsificante na interface,  $\gamma$  é a tensão superficial,  $c$  é a concentração do emulsificante na fase contínua,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura absoluta e  $p$  é um parâmetro que depende das propriedades iônicas do emulsificante (McClements et. al, 2017).

A concentração do emulsificante na interface está também relacionada com a área mínima ocupada por molécula de tensoativo, conforme descrito na Equação II.

$$A_{\min} = \frac{1}{N\Gamma_{\max}} \quad (II)$$

Onde  $A_{\min}$  é a área mínima ocupada por molécula de tensoativo na interface,  $N$  representa o número de Avogrado ou o número de partículas por mol.

A partir da Equação (II) entende-se que a área mínima ocupada por molécula de tensoativo é inversamente proporcional à concentração de moléculas na interface óleo/água que, por sua vez, é inversamente proporcional à tensão superficial (equação I). Dessa forma, quanto maior a área mínima, menor é a concentração de tensoativo necessária para se organizar na interface óleo-água. Em outras palavras, menor quantidade de energia é necessária para transferir 1 mol da molécula de tensoativo para a interface óleo/água (Glenn et al, 2005; McClements et al., 2017).

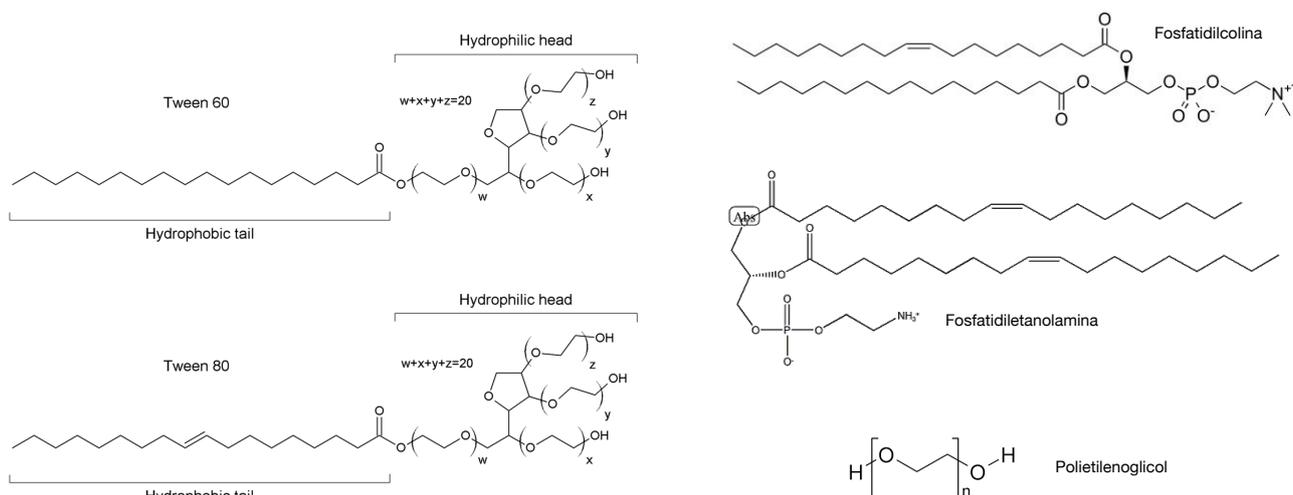
Além da área molecular impactar diretamente a tensão superficial, como discutido, é descrito na literatura que a mesma estrutura molecular é responsável por interagir com a fase externa da emulsão. Segundo Szymczyk e colaboradores (Szymczyk et. al, 2018), a tensão superficial do tensoativo pode ser dividida entre interações da cauda e da cabeça. A tensão superficial da cauda de hidrocarboneto resulta das interações intermoleculares Lifshitz-van der Waals e da cabeça hidrofílica das interações Lifshitz-van der Waals, ácido-base de Lewis e eletrostática.

A intensidade de tais interações é particular tanto de cada classe de moléculas, quanto dos constituintes que compõe a fase externa, que pode ser dotada de características que altere a

área de interação com os tensoativos e, conseqüentemente, a capacidade do emulsificante em reduzir a tensão interfacial (Glenn et al, 2005).

A Figura 21, a seguir, ilustra as diferentes estruturas moleculares dos agentes emulsificantes utilizados nas nanoemulsões obtidas nesse trabalho.

**Figura 21.** Estruturas moleculares dos agentes emulsificantes utilizados no desenvolvimento de Nano 1 e Nano 2



Considerando a discussão supracitada e a análise das estruturas moleculares apresentadas na Figura 21, é compreensível as diferenças observadas nos valores de tamanho de gotícula, PDI, taxa de emulsificação e viscosidade encontradas nas diferentes formulações obtidas durante o desenvolvimento de Nano 1 e Nano 2. Uma vez que todas as preparações foram formuladas mantendo os mesmos valores de temperatura e taxa de cisalhamento, considera-se que foi fornecido às fases heterogêneas a mesma quantidade de energia. Somado ao fato da fase externa e interna serem de constituição idênticas, é possível a conclusão de as diferenças encontradas para todos os parâmetros físico-químicos investigados deve-se aos componentes do sistema emulsionante, suas concentrações, e a dinâmica de suas interações.

Para investigação da morfologia das nanoemulsões, Nano 1 e Nano 2 foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET). As imagens apresentadas na Figura 8 mostram gotículas de contorno bem definido e de formas e tamanhos irregulares, o que pode explicar as diferenças entre tamanhos obtidos pela Nano 2 pela técnica de NTA e DLS e sua polidispersão mais elevada.

É descrito na literatura que alta concentração de tensoativos na interface óleo/água pode ser a responsável por alguma deformação temporária da borda externa em glóbulos de óleo. Os

achados afirmam, ainda, que a perda temporária da forma esférica das gotículas não altera a estabilidade do sistema (Lawson et al, 2004).

A análise por MET mostrou também gotículas com diâmetro médio maior do que o observado por DLS e NTA (Tabela 10), tanto para Nano 1 quanto para Nano 2. É possível que esse maior tamanho esteja relacionado a artifícios inerentes a técnica de preparo para análise por MET. A evaporação da fase externa da nanoemulsão pode resultar em rearranjo dos emulsificantes na interface e coalescência das gotículas, resultando no maior tamanho de gotículas observado com essa técnica.

Compreendidos os diferentes resultados encontrados durante a caracterização de Nano 1 e Nano 2 a partir de seus sistemas emulsionantes distintos, as investigações seguiram no sentido de entender como essas diferenças podem influenciar a interação de ambas preparações com fibroblastos murinos da linhagem NIH-3T3 e queratinócitos humanos imortalizados HaCat.

Para o ensaio de citotoxicidade, em ambas as células, a formulação Nano 1 esteve relacionada com um valor de viabilidade celular significativamente menor que NC e Nano 2 (Figura 9). O fato de NC e Nano 2 não apresentarem diferença no valor da viabilidade celular, é indicativo de que existem combinações de tensoativos sintéticos que podem ser tão inócuos quanto emulsificantes extraídos de fontes naturais. De fato, é descrito na literatura que diferentes tensoativos apresentam diferentes concentrações tóxicas em estudos que utilizam células em monocamada. Arechabala e colaboradores (Arechabala et al., 1999) compararam a citotoxicidade de vários emulsionantes em culturas de fibroblastos humanos usando o ensaio MTT. Foram encontradas diferenças nos valores de toxicidade inerente aos tensoativos e o Tween 60, presente em Nano 1, se apresentou mais citotóxico que o Tween 80, presente em NC. Os resultados encontrados para o teste de citotoxicidade de Nano 1, Nano 2 e NC corroboram, portanto, com o achado de Arechabala et al.

Além disso, o efeito deletério dos tensoativos sobre as células depende do status da molécula: se livre em solução; orientado na interface óleo/água; ou ainda da sua conformação nessa interface. Os grupos moleculares capazes de gerar danos às células podem estar expostos ou favoravelmente blindados, alterando, assim, a toxicidade idiossincrática da molécula quando compõe uma partícula (Muller et al, 1997). Dessa forma, a toxicidade inerente à Nano 1 pode estar tanto no excesso de Tween 60, favorecendo a forma livre e mais tóxica do tensoativo em solução, quanto na forma com que esse tensoativo se orienta na superfície da gotícula. Muller e seus colaboradores também descreveram a redução de toxicidade de Tween 80 em 50% quando ligado à um sistema de liberação. Fenômeno semelhante pode ter ocorrido com esse emulsionante em NC.

Reduções na citotoxicidade podem, ainda, serem decorrentes do prejuízo ou falha na internalização celular do tratamento estudado. Para investigar a taxa de internalização de Nano 1 e Nano 2, estudos de *uptake* foram realizados, tanto quantitativamente, por citometria de fluxo (Figuras 10 e 11), quanto qualitativamente, por microscopia confocal (Figura 12). Os resultados obtidos a partir da citometria de fluxo indicam que aproximadamente 80% das gotículas foram absorvidas pelos fibroblastos após 15 min de incubação, independente das características da formulação. As gotículas da Nano 1 foram, no entanto, mais rapidamente absorvidas do que as da Nano 2, já que em apenas 5 min de incubação, aproximadamente 50% delas já foram internalizadas contra 10% das gotículas da Nano 2 (Figura 10). Perfil semelhante é observado para os queratinócitos, apesar da porcentagem de células internalizadas por eles após 15 min ser menor do que a internalizada pelos fibroblastos no mesmo período.

Já foi demonstrado que diferentes propriedades de nanopartículas, como tamanho, forma, material e revestimento da superfície, bem como o tipo de célula, idade, interação com outras células e o ambiente celular, influenciam a captação de nanopartículas e o comportamento da célula (Ikomi et al., 1995; Kuhn et al., 2014). Com a finalidade de compreender se os diferentes resultados obtidos nos ensaios de *uptake*, decorreram da composição dos sistemas emulsionantes de Nano 1 e Nano 2 ou se de seus diferentes diâmetros, a formulação Nano 2 foi retrabalhada, recebendo mais energia de homogeneização, até que o tamanho de suas gotículas atingisse tamanho semelhante ao da Nano 1. Essa preparação fora denominada Nano 2.2. Não foram, no entanto, observadas diferenças estatisticamente significativas entre a taxa de internalização de Nano 2 e Nano 2.2 para ambos tipos celulares (Figura 11). Esse resultado sugere que a constituição química dos sistemas emulsionantes e seu arranjo na superfície das gotículas é mais relevante para a internalização das gotículas do que seu tamanho.

As características das células também influenciam no *uptake* das gotículas, sendo que uma maior porcentagem da Nano 1 foi internalizada pelos queratinócitos do que a Nano 2 no período em que o experimento foi realizado. É possível, nesse caso, que excesso do tensoativo Tween 60, que compõe a Nano 1, tenha algum efeito de permeabilização nas membranas celulares, o que reflete numa maior internalização das gotículas e maior toxicidade (Figura 9) quando comparada com a Nano 2, que não tem esse tensoativo sintético.

Ainda durante as investigações acerca da forma de interação entre gotículas e células, a microscopia confocal foi realizada e mostrou que ambas formulações se distribuem de maneira uniforme no citoplasma das células (Figura 12). A diferença na intensidade de fluorescência encontrada para Nano 1 e Nano 2 decorre, provavelmente, do maior tamanho e teor lipídico de

Nano 2, mais rica em porcentagem de fosfolipídios. Assim, o agente fluorescente utilizado, bodipy, fortemente lipofílico é mais evidente.

Seguindo os estudos para entendimento da interação da superfície das gotículas de Nano 1 e Nano 2 na superfície celular, ensaios de arranhão (*scratch assays*) foram realizados para verificar possíveis alterações na expressão de moléculas de adesão na membrana celular, quando fibroblastos e queratinócitos são colocados em contato com concentrações crescentes de Nano 1 e Nano 2.

Para que o tempo zero, inicial, do experimento fosse determinado com maior clareza, um grupo de células foi inativada com DMSO logo após a realização do arranhão. A proliferação das células nos outros grupos foi determinada em função do tempo zero desses grupos. Essa estratégia possibilita a determinação do tempo inicial com mais acurácia, mas leva a maiores variações experimentais uma vez que a porcentagem de proliferação é feita em relação a culturas celulares distintas. Esse é um dos motivos de não terem sido observadas diferenças entre os grupos tratados com DMSO (células paralisadas imediatamente após o arranhão), grupo sem tratamento (basal), e grupos tratados com ambas formulações nas diferentes concentrações testadas quando realizado o teste estatístico ANOVA. No entanto, quando o teste foi realizado comparando o grupo controle (com DMSO) com o basal foi possível afirmar que aproximadamente 30% das células migravam em função das bordas em direção ao centro do arranhão (Figura 14). As células tratadas com as nanoemulsões apresentaram proliferação semelhante a do grupo basal sugerindo, assim, que as nanoemulsões não prejudicam a migração dos queratinócitos nas concentrações e condições testadas, mas também não a estimulam a migração.

O ensaio scratch possui, no entanto, várias limitações. Suas principais desvantagens incluem a dificuldade em se induzir arranhões regulares nas placas de cultura e a possível destruição dos revestimentos da matriz extracelular. De fato, esse ensaio está relacionado com variações entre os experimentos na velocidade de raspagem e na geometria da região ferida, o que pode dificultar a comparação entre os experimentos (Riahi et al., 2012). Além disso, as células removidas podem se acumular na borda do espaço gerado artificialmente ou o conteúdo celular pode ser liberado para o ambiente, o que pode impedir a análise dos dados, além de afetar a proliferação e migração consequentes necessárias para o fechamento da ferida (Stamm et al., 2016). Assim, é difícil controlar a extensão da lesão celular, o que pode complicar o processo de migração celular. Dessa forma, o rendimento e a reprodutibilidade do ensaio convencional de cicatrização de feridas são, frequentemente, limitados (Riahi et al., 2012).

As limitações nos modelos 2D de estudo da cicatrização evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novos modelos tridimensionais (3D) *in vitro* para estudar os processos de

cicatrização. Tal desenvolvimento marca o próximo passo na pesquisa de cicatrização de feridas. Os modelos alternativos ao uso de animais que se baseiam em cultura de células 3D empregam *scaffolds* semeados com células para induzir o mecanismo complexo de cicatrização, como interações célula-matriz e célula-célula, ou cultivam tecidos vivos, como o modelo hOSEC (cultura de explante de pele organotípica humana) para investigações em pele humana, preservados todos os seus constituintes.

Desses constituintes, pode-se citar os melanócitos, as células de Langerhans, queratinócitos, toda a estrutura de fibroblastos dérmicos, glicosaminoglicanos e colágeno (Lebonvallet et al., 2010), além de folículos pilosos, glândulas sebáceas e células de defesa, como macrófagos e linfócitos remanescentes.

Certamente, os dados da fisiologia da pele mais confiáveis são aqueles coletados em estudos com fragmentos de tecido humano. Previamente aos estudos com os explantes verificou-se, no entanto, a segurança das formulações em relação a qualquer atividade pró-inflamatória. Tal ensaio é importante, pois para o estabelecimento de um ambiente favorável à cicatrização é primordial o equilíbrio entre a ação oxidante das ROS e a ação anti-inflamatória, que preserva o tecido. As ROS são liberadas por células de defesa, destacando-se os macrófagos, após estímulo por citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Enquanto a ação oxidante das ROS é relevante por ser deletéria aos microorganismos que infectam a lesão, são igualmente deletérias ao tecido adjacente que entram em contato. Dessa forma, espécies de ação anti-inflamatória são tão necessárias quanto a expressão de moléculas oxidantes, mas o estímulo de espécies reativas pelas formulação pode levar a um desequilíbrio entre essas espécies e dificultar o processo de cicatrização.

A influência das formulações na expressão de mediadores pró-inflamatórios foi avaliada *in vitro* em macrófagos extraídos do sangue humano e cultivados em cultura. Pode-se observar na Figura 15 que as nanoemulsões não alteraram a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  dos macrófagos, mostrando que são seguras para serem administradas.

Por outro lado, os óleos que compõem as formulações podem apresentar ação anti-inflamatória no tecido lesado. Isso porque, como mencionado anteriormente, são numerosos os estudos que comprovam os efeitos anti-inflamatórios do óleo de girassol (Aboki et al., 2012; Eichienfield et al., 2009; Guo et al., 2017; Moreski et al., 2018; Wendt, 2005; Belilovsky et al., 2015; Regente et al., 2000; Menendez et al., 2010). Em doses não tóxicas, polifenóis extraídos do óleo de girassol (ácidos grandiflorólico, caurenólico e traquilobanólico) reduziram, de maneira concentração-dependente, a produção de NO, PGE2 e TNF- $\alpha$ , bem como a expressão de NOS-2 e COX-2. Esses diterpenóides exibiram significativa atividade anti-inflamatória *in vivo* e suprimiram o edema da orelha de camundongo induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Além

disso, também foi encontrada inibição da ação da mieloperoxidase (MPO), um índice de infiltração celular relacionada à esses compostos (Pal et al., 2011). A grande quantidade de polifenóis encontradas no óleo de rosa mosqueta, como glicosídeos flavonóides e proantocianidinas, além de carotenóides aprofundam as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias atribuídas a essa espécie (Santos et al., 2009; Delbon et al., 2017; Pichonelli et al., 2016) e que podem propiciar às formulações desenvolvidas esses efeitos.

Os lipídios que constituem os óleos de girassol e de rosa mosqueta podem também apresentar pronunciada contribuição no reestabelecimento da função barreira lipídica da pele e no aumento da permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada de fatores de crescimento e estimulando, assim, a proliferação e migração celular e a neoangiogênese. Dessa forma, podem interferir diretamente na fase proliferativa da cicatrização. De forma simultânea, altas concentrações de ácido ascórbico (vitamina C) encontradas no óleo da semente de rosa mosqueta têm relevante papel na regeneração tecidual, sendo um importante elemento para a formação e deposição das fibras colágenas sobre a cicatriz (Santos et al., 2009).

Achados na literatura ainda afirmam que, além da manutenção da barreira cutânea contra a perda de água, o ácido linoleico, presente nos óleos de girassol e rosa mosqueta atuam como precursor das prostaglandinas e desempenham um papel na regulação da divisão celular, diferenciação da epiderme e, conseqüentemente, no controle da descamação da pele (Guo et al., 2017).

Com intuito de comprovar esses achados, foram realizados os ensaios *ex vivo* no modelo de cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC). No primeiro experimento (hOSEC 1), a formulação Nano 1, sem qualquer diluição, contendo  $6,5 \times 10^{13}$  partículas/mL, foi aplicada 1 vez ao dia no interior das úlceras. A morfologia das bordas da lesão, em função do tempo, foi comparado com a morfologia de úlceras tratadas somente com o meio de cultura, o grupo basal (Figura 17). O início da fase proliferativa da cicatrização é caracterizado pela migração e projeção de queratinócitos das bordas para o interior da lesão. A linha de queratinócitos em proliferação sobre a derme origina-se na epiderme viável adjacente à lesão e é denominada “língua de queratinócitos”, ou, segundo alguns autores, “cabeça de cobra” (evidenciada pelas setas na Figura 17-B). O desenvolvimento do estrato córneo é condicionado ao desenvolvimento da “língua de queratinócitos”, pois é esse novo epitélio que servirá de sustentação para o desenvolvimento da camada córnea.

Apesar da língua de queratinócitos ter sido observada para ambos grupos tratado com Nano 1 e grupo basal, ela estava muito mais evidente no grupo basal. Diferenças na junção derme-epiderme nas bordas da lesão também puderam ser observadas após 7 dias de tratamento (D7) em relação ao

início (D0). Em D0, a junção entre derme e epiderme na adjacência da úlcera apresentava papilas dérmicas bem definidas, diferentemente de D7 nos demais grupos. Nota-se que em D0 (Figura 17-A) a descontinuidade do estrato córneo foi abrupta, de forma que ainda não são observadas morfologias características de borda de lesão, como o aspecto “cabeça de cobra” e projeção da “língua de queratinócitos”, além de alterações da junção derme-epiderme. Tais morfologias, entretanto, são observadas em D7.

O grupo tratado com Nano 1, apesar de apresentar a morfologia “cabeça de cobra” nas bordas de suas lesões, não apresentou, em nenhuma replicata, o avanço das células epiteliais para o centro da lesão, como ocorreu no Grupo Basal. Tal resultado, além de validar o modelo como promissor para investigação de reepitelização cutânea, evidenciou a fragilidade do tecido neoformado, indicando que investigações acerca da influência da formulação Nano 1 na diferenciação e proliferação de queratinócitos deveria ser realizada.

Para tal, executou-se, via ensaios de imuno-histoquímica, a coloração dos cortes com marcadores de citoqueratina 10 (Ck10) e da proteína Ki-67 (Ki-67), marcadores específicos para células em diferenciação e células em proliferação, respectivamente. A Figura 18 ilustra o aspecto de regiões de borda de lesão em D0 e em D7, daqueles fragmentos tratados diariamente com Nano 1. Os resultados do ensaio de imuno-histoquímica evidenciaram que o tratamento com Nano 1 sem diluição não altera a expressão de Ck10, tampouco de Ki-67, dos queratinócitos que se encontram na borda da lesão e entraram em contato com a formulação. Os fragmentos tratados com Nano 1 não apresentaram, portanto, características indicativas de morte celular, citotoxicidade ou alteração nos processos de proliferação e diferenciação celular, seja em estágio inicial ou final. Esse achado é indicativo de que a presença das partículas da formulação no interior da úlcera poderia constituir uma barreira física que prejudica a proliferação e migração dos queratinócitos das bordas para o leito da lesão.

Como não foram encontrados, até o momento em que foram obtidos tais resultados, trabalhos que dissertam sobre a influência da densidade de partículas no leito de úlceras provocadas em fragmentos de pele humana mantidos em cultura, alterações na execução do experimento foram realizadas, de forma pioneira, no sentido de investigar a influência da densidade de partículas de preparações no crescimento do novo epitélio utilizadas no modelo. Portanto, na segunda série de experimentos realizadas no modelo hOSEC diferentes concentrações de partículas de Nano 1 e NC ( $1,3 \cdot 10^{12}$ ,  $6,5 \cdot 10^{11}$  e  $3,2 \cdot 10^{11}$  partículas/mL) foram aplicadas sobre as úlceras.

É possível observar na Figura 19 a formação de um novo epitélio (início da projeção da “língua de queratinócitos”) a partir do D7 que aumenta de extensão em função do tempo, reepitelizando a úlcera induzida. Tanto em D7 como em D14, a extensão desse novo epitélio nos

grupos tratados com a Nano 1 e com o óleo vegetal Dersani®, em todas as concentrações estudadas, foi maior do que a reepitelização observada nos grupos não tratados (controle) e tratados com a nanoemulsão de óleo mineral (NC) (Tabela 10), indicando que os extratos vegetais presentes em Nano 1 e Dersani® podem influenciar positivamente a reepitelização.

Para todos os grupos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de taxa de reepitelização entre as concentrações de partículas quando observamos o mesmo grupo. No entanto, ao comparar os resultados obtidos entre os diferentes grupos, as amostras tratadas com menor número de partículas de Nano 1 ( $3,25 \times 10^{11}$  partículas/mL) e maior diluição de Dersani® (1:200), apresentaram taxa de reepitelização superior e estatisticamente significativa em detrimento dos controles negativo (NC), sugerindo que os experimentos subsequentes considerassem os maiores valores de diluições (ou menores valores de densidade de partículas) das formulações testadas no leito da lesão.

Alguns estudos que dissertam sobre influências físicas no retardo da cicatrização em achados clínicos abordam a presença de biofilmes e pontos de pressão em pacientes acamados. Tanto a presença dos microorganismos em rede, quando as protuberâncias ósseas impedem, fisicamente, a migração e proliferação de queratinócitos das bordas para o leito da lesão instalada, dificultando a cicatrização (Metcalf et al., 2013). Mecanismo semelhante de impedimento pode ter ocorrido com a presença das formulações em concentrações elevadas no ensaio hOSEC 2. Isso não significa, no entanto, que as nanoemulsões terão que ser diluídas para aplicações *in vivo*. Os resultados sugerem apenas que, para bem avaliar sistemas nanoparticulados em modelos *ex vivo* do tipo hOSEC, o controle da concentração de partículas é importante para não prejudicar a proliferação celular.

Outro resultado obtido com essa segunda série de experimentos discorre acerca da morfologia encontrada na região da derme para os grupos que receberam formulações-tratamento, quando comparada com a derme do grupo controle (NC) e D0. Fibroblastos presentes na derme dos grupos tratados com Nano1 e Dersani®, apresentaram distribuição mais homogênea e melhor empacotamento em todos os tempos estudados (Figura 19).

De fato, são abundantes os achados na literatura que comprovam os benefícios na produção de colágeno causada pelos extratos naturais presentes em Nano 1 e Dersani®. A ação antioxidante dos polifenóis e vitaminas presentes nos óleos vegetais, além de reduzirem taxas de peroxidação lipídica, também promovem a viabilidade das fibrilas de colágeno, a força das fibras de colágeno, o aumento da circulação, retardam o dano celular e estimulam a síntese de DNA (Schaffer e Halliwell, 2012). Fitoquímicos, como os taninos e saponinas, adicionalmente auxiliam na contração da ferida por estarem relacionados com o aumento da resistência do vaso capilar e a proliferação de fibroblastos (Krishnank et al., 2019). Já o ácido linoleico está relacionado com propriedades

promotoras da neovascularização (angiogênese) local, interferindo positivamente na migração celular, proliferação e diferenciação fibroblástica e, conseqüentemente, na síntese de matriz extracelular, rica em colágeno (Moreski et al., 2018). Ainda, altas concentrações de ácido ascórbico (vitamina C) encontradas no óleo da semente de rosa mosqueta têm relevante papel na regeneração tecidual, sendo um importante elemento para a formação e deposição das fibras colágenas sobre a cicatriz (Santos et al., 2009).

Mesmo com a presença dos mesmos constituintes naturais na fase interna, a taxa de cicatrização de Nano 1 e Nano 2 não foram semelhantes na terceira série de experimentos realizada (Figura 20). Utilizando a densidade de partículas adequadas para observar efeitos no modelo hOSEC ( $3,25 \times 10^{11}$  partículas/mL), o terceiro ensaio foi conduzido no sentido de compreender se haveria diferença significativa entre a taxa de cicatrização de Nano 1, Nano 2 e Dersani®, bem como comprovar a diferença entre os grupos tratados com os extratos naturais e os grupos controle (Basal e NC).

Os resultados desse ensaio apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados com óleos naturais e controles, corroborando com os resultados obtidos na segunda série de experimentos, na qual as taxas de cicatrização foram superiores para Nano 1 e Dersani®, que não apresentaram diferenças significativas entre si. No entanto, houve diferença significativa entre esses dois grupos e aqueles tratados com Nano 2. Uma vez que a concentração dos extratos naturais em Nano 1 constitui aproximadamente 20% da formulação, sendo os demais 80% fase aquosa, e que Dersani® se constitui em sua totalidade da mistura de óleos, pode-se sugerir que o sistema de liberação desenvolvido em Nano 1 potencializou em 5 vezes a ação dos óleos naturais na taxa de cicatrização. Ademais, sendo Nano 2 também composta pela mesma fração de fase oleosa idêntica à Nano 1, é possível a conclusão de que o sistema emulsionante pode influenciar a atividade de insumos ativos encapsulados ou estabilizados por eles, potencializando mais (Nano 1) ou menos (Nano 2) essa atividade.

Para melhor compreensão de como se estabelece essa diferença na atividade dos insumos ativos quando em contato com estruturas da pele mediados pelo sistema emulsionante de Nano 1 e Nano 2, um estudo de penetração foi conduzido. Adicionalmente, com esse estudo objetivou-se a investigação do comportamento de ambas formulações em acometimentos cutâneos que requerem estímulos pró-cicatrizantes, mas que mantêm a camada córnea, como ocorre nas dermatites.

A influência da emulsificação dos óleos na fase interna das nanoemulsões pode ser observada na Figura 16. Quando em solução (Dersani®), a penetração do óleo na epiderme foi heterogênea, como mostra a Figura 16-A. A encapsulação de apenas 18% dos óleos nas nanoemulsões possibilitou uma penetração mais homogênea e dependente do sistema emulsionante: Nano 1

penetrou em todas as camadas da pele (Figura 16-B) enquanto que Nano 2 se manteve na epiderme (Figura 16-C). A maior intensidade de fluorescência do bodidy, molécula lipofílica utilizada como marcador da penetração dos óleos, observada quando as nanoemulsões foram aplicadas em relação ao Dersani® indicam maior penetração dos óleos quando emulsificados. Salienta-se que em todos os casos 1 mL das formulações foi aplicado sobre a pele, mas que os óleos compunham apenas 18% das nanoemulsões em detrimento dos 100% de óleo que compõem o Dersani®. As nanoemulsões aumentaram consideravelmente, dessa forma, a penetração cutânea dos óleos, possibilitando uma maior entrega de seus princípios ativos para a pele.

A influência do sistema emulsificante, já observada nos estudos de cicatrização, também pode ser ressaltada nos estudos de penetração cutânea. A presença do tensoativo sintético Tween 60 na Nano 1 aumentou a penetração dos óleos nas camadas mais profundas da pele quando comparado com a Nano 2, que não continha esse tensoativo. Esses resultados corroboram com os estudos de *uptake* celular, apresentados nas Figuras 10 e 11, que mostraram uma maior internalização da Nano 1 pelos queratinócitos, sugerindo uma provável permeabilização das membranas celulares, comprovada nos estudos de penetração cutânea.

Em contrapartida, a presença apenas dos emulsificantes naturais na Nano 2 foram capazes de manter altas concentrações dos óleos na epiderme viável. Esse direcionamento é bastante interessante quando se pretende tratar doenças de pele, uma vez que a penetração até a derme, como observado para Nano 1, com seus múltiplos capilares, possibilita a entrega de substâncias para a circulação sistêmica. Essa entrega não é desejada, na maioria das vezes, em tratamentos dermatológicos, pois pode induzir efeitos adversos fora do local do tratamento.

Esses estudos mostram ainda a versatilidade das nanoemulsões desenvolvidas. Os estudos *ex vivo* com explante de pele humana sugeriram que a Nano 1 tem um maior potencial no tratamento de feridas abertas, como as úlceras induzidas nos fragmentos de pele. Já a Nano 2 tem grande potencial para tratamento de distúrbios cutâneos que atingem a pele. Ambas nanoemulsões são carregadores promissores para moléculas lipofílicas, sendo a Nano 1 capaz de carregá-las para camadas mais profundas da pele e a Nano 2 capaz de direcionar sua entrega para a epiderme.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, óleos vegetais foram emulsificados com sucesso em nanoemulsões estáveis, com viscosidade adequada para administração na forma de spray, utilizando-se como agentes emulsionantes fosfolipídios extraídos do girassol e da soja. A adição de pequena porcentagem de um tensoativo sintético resultou em nanoemulsões com gotículas oleosas com menores diâmetros, maior *uptake* celular e permeação cutânea, além de maior potencial cicatrizante. Nanoemulsões compostas somente por fosfolipídios de origem natural como emulsificantes e estabilizantes foram capazes de direcionar a penetração dos óleos vegetais para a epiderme viável e apresentaram menor potencial citotóxico do que as nanoemulsões que continham o tensoativo sintético.

Ainda, mostrou-se pela primeira vez nesse trabalho a importância da padronização da concentração de nanopartículas para garantir respostas fiáveis em ensaios de cicatrização utilizando-se modelo *ex vivo* de cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC).

Conclui-se, assim, que a combinação adequada de fosfolipídios de origem natural possibilita a obtenção de nanoemulsões de óleos vegetais com características específicas e versáteis, com potencial aplicação para o tratamento de distúrbios cutâneos.

## 7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABOKI, M. A.; MOHAMMED, M.; MUSA, S. H.; ZURU, H. M.; ALIYU, G. M.; ALIBE, I. M.; INUWA, B. Physicochemical and Anti-Microbial Properties of Sunflower (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) Seed Oil. **International Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 4, p. 151–194, 2012. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Ibrahim\\_Alibe3/publication/311081213\\_Physicochemical\\_and\\_anti-microbial\\_properties\\_of\\_sunflower\\_HELIANTHUS\\_ANNUUS\\_L\\_seed\\_oil/links/583d4e2908aeb3987e30fcf0/Physicochemical-and-anti-microbial-properties-of-sunflower-HEL](https://www.researchgate.net/profile/Ibrahim_Alibe3/publication/311081213_Physicochemical_and_anti-microbial_properties_of_sunflower_HELIANTHUS_ANNUUS_L_seed_oil/links/583d4e2908aeb3987e30fcf0/Physicochemical-and-anti-microbial-properties-of-sunflower-HEL)>.

ALI, J.; AKHTAR, N.; SULTANA, Y.; BABOOTA, S.; AHUJA, A. Antipsoriatic microemulsion gel formulations for topical drug delivery of Babchi oil (*Psoralea corylifolia*). **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 277, 2008. Disponível em: <[http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk\\_journals.xml\\_summary\\_pr?p\\_JournalId=6&p\\_RefId=1185802&p\\_IsPs=N](http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=6&p_RefId=1185802&p_IsPs=N)>.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 42, n. January, p. 204, 2019.

ANDRADE, T. A. M. de. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012.

ANSEMI, M. L.; PEDUZZI, M.; FRANÇA JUNIOR, I. Incidência de úlcera por pressão e ações de enfermagem. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 257–264, jun. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-21002009000300004&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-21002009000300004&lng=pt&tlng=pt)>.

ANTUNES, A. A.; SOLÉ, D.; CARVALHO, V. O.; BAU, A. E. K.; KUSCHNIR, F. C.; MALLOZI, M. C.; MARKUS, J. R.; SILVA, M. G. N. E.; PIRES, M. C.; MELLO, M. E. E. A.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; SARINHO, E. S. C.; CHONGNETO, H. J.; RUBINI, N. P. M.; SILVA, L. R. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 2, p. 131–156, 2017. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2526-5393.20170019>>.

ANVISA. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde 4. **Anvisa**, v. 2ª EDIÇÃO, n. Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde Medidas, p. 122, 2017.

ATIYEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S. N.; DIBO, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, v. 33, n. 2, p. 139–148, 2007.

BAGE, T.; EDYMANN, T.; METCALFE, A. D.; DHEANSA, B.; MBUNDI, L. Ex vivo culture of keratinocytes on papillary and reticular dermal layers remodels skin explants differently: towards improved wound care. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 8, p. 647–652, 5 out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00403-019-01941-w>>.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, mar. 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322005000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

BANSAL, C.; SCOTT, R.; STEWART, D.; COCKERELL, C. J. Decubitus ulcers: A review of the literature. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 10, p. 805–810, 2005.

BARBOSA, M. T. A.; LIMA, Y. A. **ANÁLISE TEMPORAL DA MORBIDADE HOSPITALAR DE LESÕES DE PELE NO BRASIL**. 2019. Universidade Tiradentes, 2019.

BAROLI, BIANCAMARIA. **Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality?** **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21-50, 2010.

BELILOVSKY, C. de; CHADOUTAUD, B.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P. Sunflower oleodistillate: A topical PPAR- $\alpha$  agonist developed for atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 2, p. AB58, 2011.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.21210>>.

BRASIL. **Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica**. [s.l: s.n.]

BRUZI, L. M.; MENDES, D. C. Importância da assistência de enfermagem no manejo de complicação relacionada ao cateter totalmente implantável. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 2, p. 522–526, abr. 2011. Disponível

e m : <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0080-62342011000200031&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342011000200031&lng=pt&tlng=pt)>.

CABEZAS, D. M.; MADDOERY, R.; DIEHL, B. W. K.; TOMÁS, M. C. Emulsifying properties of different modified sunflower lecithins. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 355–361, 2012.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 3, p. 427–436, 2004.

COOPER, L.; JOHNSON, C.; BURSLEM, F.; MARTIN, P. Wound healing and inflammation genes revealed by array analysis of “macrophageless” PU.1 null mice. **Genome biology**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2005.

COSTA, M. P.; GUSTAVO, S.; FABIO, P.; MARCUS, C.; TARCISIO, B. O. Riginal a Rticle Epidemiological Profile and Treatment of Pressure Sores : Experience With 77 Cases. v. 13, n. 3, p. 124–132, 2005.

DĄBROWSKA, M.; MACIEJCZYK, E.; KALEMBA, D. Rose Hip Seed Oil: Methods of Extraction and Chemical Composition. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 8, p. 1800440, 27 ago. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201800440>>.

DALMOLIN, L. **Iontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada a terapia fotodinâmica tópica do melanoma**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

DANBY, S. G.; ALENEZI, T.; SULTAN, A.; LAVENDER, T.; CHITTOCK, J.; BROWN, K.; CORK, M. J. Effect of Olive and Sunflower Seed Oil on the Adult Skin Barrier: Implications for Neonatal Skin Care. **Pediatric Dermatology**, v. 30, n. 1, p. 42–50, 3 jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.02.017>>.

DE, B.; CRUZ, F.; CORDOVIL, P. B. L.; DE, K.; BATISTA, N. M.; CRUZ, F. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. v. 11, n. 4, p. 246–250, 2012.

DELBON, M. F.; MANIN, T. M.; ANDRÉO, B. G. C.; PILON, T. P. F. Avaliação da estabilidade física de sistemas nanoestruturados contendo o óleo de rosa mosqueta e o miristato. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 38, n. Agosto, p. 4532, 2017.

DESAI, D.; SINGH, P.; VAN DE WATER, L.; LAFLAMME, S. E. Dynamic Regulation of Integrin  $\alpha 6 \beta 4$  During Angiogenesis: Potential Implications for

Pathogenic Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 8, p. 401–409, out. 2013. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2013.0455>>.

DIAS, L. D. F.; OLIVEIRA, A. F.; JULIANO, Y.; FERREIRA, L. M. Burn Care Unit of São Paulo Federal University: an epidemiological profile. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery**, v. 30, n. 1, 2015.

DJEKIC, L.; KRAJISNIK, D.; MICIC, Z. Polyphenolics-phospholipid complexes as natural cosmetic ingredients: Properties and application. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v. 52, n. 3, p. 186–192, 2015.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; AGGARWAL, P.; HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487–495, 30 ago. 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp800032f>>.

DUNNILL, C.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J.; DRYDEN, M.; COOKE, J.; LEAPER, D.; GEORGOPOULOS, N. T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, v. 14, n. 1, p. 89–96, fev. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/iwj.12557>>.

EICHENFIELD, L. F.; MCCOLLUM, A.; MSIKA, P. The benefits of sunflower oleodistillate (SOD) in pediatric dermatology. **Pediatric Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 669–675, 2009.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2–3, p. 141–164, 2001.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, 2014.

EURIDES, D.; DA SILVA, L. A. F.; DALECK, C. R.; FREITAS, P. M. C.; ALVES, L. B. Efecto del extracto de óleo de rosa mosqueda (*Rosa aff. Rubiginosa*) en la cicatrización de heridas cutánea. **Revista Electronica de Veterinaria**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2011.

FEIGHT, D.; BANEY, T.; BRUCE, S.; MCQUESTION, M. Putting Evidence Into Practice. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 15, n. 5, p. 481–492, 1

out. 2011. Disponível em: <<http://cjon.ons.org/cjon/15/5/putting-evidence-practice-evidence-based-interventions-radiation-dermatitis>>.

FEINGOLD, K. R. The Importance of Lipids in Cutaneous Function. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 12, p. 2529–2530, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.E700004-JLR200>>.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.31937>>.

FILIPOVIĆ, M.; LUKIĆ, M.; KRSTONOŠIĆ, V.; ĐORĐEVIĆ, S.; PANTELIĆ, I.; GLEDOVIĆ, A.; VULETA, G.; SAVIĆ, S. Feasibility of a Natural Surfactant as a Stabilizer for Cosmetics with Liposome-Encapsulated Plant Stem Cells: Pre-Formulation and Formulation Through Stability Studies. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 53, n. 3, p. 214–226, 17 maio 2016. Disponível em: <<http://www.hanser-elibrary.com/doi/10.3139/113.110426>>.

FIUME, M. Z. Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. **International Journal of Toxicology**, v. 20, n. SUPPL. 1, p. 21–45, 2001.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIÈRES, J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 127–134, 2000.

FRADE, M. A. C.; ANDRADE, T. A. M. de; AGUIAR, A. F. C. L.; GUEDES, F. A.; LEITE, M. N.; PASSOS, W. R.; COELHO, E. B.; DAS, P. K. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 3, p. 347–350, jun. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962015000300347&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962015000300347&lng=en&tlng=en)>.

GLENN, K. M.; MOROZE, S.; BHATTACHARYA, S. C.; PALEPU, R. M. Effect of Ethylene Glycol on the Thermodynamic and Micellar Properties of Tween 40, 60, and 80. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 79–86, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DIS-200040137>>.

GONZALEZ, A. C. D. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. D. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, out. 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962016000500614&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962016000500614&lng=en&tlng=en)>.

GRAPENTIN, C.; BARNERT, S.; SCHUBERT, R. Monitoring the stability of perfluorocarbon nanoemulsions by Cryo-TEM image analysis and dynamic light scattering. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

GUGLIELMINI, G. Nanostructured novel carrier for topical application. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 4, p. 341–346, 2008.

GUO, S.; GE, Y.; NA JOM, K. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 95, 29 dez. 2017. Disponível em: <<https://bmccchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-017-0328-7>>.

HEGEDUS, F.; MATHEW, L. M.; SCHWARTZ, R. A. Radiation dermatitis: an overview. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 9, p. 909–914, 2017.

HUANG, W. W.; AHN, C. S. **Clinical Manual of Dermatology**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. [s.l.] Ministério da Saúde, 2018. v. 33

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S. de; RÊGO, F. M. P. do; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125–131, 2010.

JESCHKE, M. G.; WOLF, S. E. **Handbook of Burns Volume 1**. [s.l.: s.n.]v. 1

KAUR, I.; GEETHA, T. Screening Methods for Antioxidants-A Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 305–312, 1 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=6&issue=3&spage=305>>.

KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: Peroral and dermal delivery studies in rats. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 154–162, 2007.

KLANG, V.; MATSKO, N. B.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability

assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>>.

KNOWLEDGE, I.; SEN, S.; CHAKRABORTY, R. **Herbal Medicine in India**. Singapore: Springer Singapore, 2020.

KODIYAN, J.; AMBER, K. T. Topical antioxidants in radiodermatitis: a clinical review. **International Journal of Palliative Nursing**, v. 21, n. 9, p. 446–452, 2 set. 2015. Disponível em: <<http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/ijpn.2015.21.9.446>>.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122–128, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.003>>.

KOMI, D. E. A.; KHOMTCHOUK, K.; SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 7, n. Fevereiro, p. 1–15, 7 fev. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12016-019-08729-w>>.

KRISHNAN K, A.; THOMAS, S. Recent advances on herb-derived constituents-incorporated wound-dressing materials: A review. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 30, n. 4, p. 823–838, abr. 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pat.4540>>.

KUHN, D. A.; VANHECKE, D.; MICHEN, B.; BLANK, F.; GEHR, P.; PETRI-FINK, A.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1625–1636, 24 set. 2014. Disponível em: <<https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/5/174>>.

KURAHASHI, T.; FUJII, J. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. **Journal of Developmental Biology**, v. 3, n. 2, p. 57–70, 27 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2221-3759/3/2/57>>.

LAWSON, L. B.; PAPADOPOULOS, K. D. Effects of a phospholipid cosurfactant on external coalescence in water-in-oil-in-water double-emulsion globules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, n. 1–3, p. 337–342, dez. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775704004935>>.

LEBONVALLET, N.; JEANMAIRE, C.; DANOUX, L.; SIBILLE, P.; PAULY, G.; MISERY, L. The evolution and use of skin explants: Potential and limitations for dermatological research. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 671–684, 2010.

LECITHIN, N. **PRODUCT CATALOG Natural Lecithin and Phospholipids We make beauty natural** . [s.l.] Lipoid Kosmetik, 2017.

LEE, S. J.; CHOI, S. J.; LI, Y.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: Comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 415–427, 2011.

LEITE, M. N. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO MARCEL NANI LEITE Eficácia do soro do látex natural da seringueira**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

LI, Y.; ZHAO, X.; ZU, Y.; ZHANG, Y. Preparation and characterization of paclitaxel nanosuspension using novel emulsification method by combining high speed homogenizer and high pressure homogenization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 324–333, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.070>>.

LIN, C. C.; LIN, H. Y.; CHI, M. H.; SHEN, C. M.; CHEN, H. W.; YANG, W. J.; LEE, M. H. Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line. **Food Chemistry**, v. 154, p. 282–290, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.012>>.

LONGMATE, W. M.; LYONS, S. P.; DEFREEST, L.; VAN DE WATER, L.; DIPERSIO, C. M. Opposing Roles of Epidermal Integrins  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 9\beta 1$  in Regulation of mTLD/BMP-1–Mediated Laminin- $\gamma 2$  Processing during Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 2, p. 444–451, fev. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.09.004>>.

MAGALHÃES, M. S. F. **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DERSANI® E DA ÁGUA DE COCO LIOFILIZADA NO MODELO CUTÂNEO DE CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS WISTAR**. 2007. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2007.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370–378, 2015.

MASSON, D. dos S. **Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. 2011. Universidade de São Paulo, 2011.

MATTHAUS, B.; ÖZCAN, M. M. Fatty acid, tocopherol and squalene contents of rosaceae seed oils. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 1–6, 2014.

MCCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 205–236, 2017.

MCQUESTION, M. Evidence-Based Skin Care Management in Radiation Therapy: Clinical Update. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 27, n. 2, p. e1–e17, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2011.02.009>>.

MENÉNDEZ, S.; FALCÓN, L.; MAQUEIRA, Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON® in patients suffering from onychomycosis. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 272–277, set. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2010.01898.x>>.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 3–9, out. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>>.

METCALF, D.; BOWLER, P. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. **Burns & Trauma**, v. 1, n. 1, p. 5, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/burnstrauma/article/1/1/5-12/5649311>>.

MONTEIRO E SILVA, S. A. et al. Estudo de estabilidade, análise de comportamento reológico e investigação de Cristais-Líquidos de formulações contendo pó-de-pérola. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 94, n. 14, p. 199–210, 2013.

MONTES, F. O.; VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, A.; FENTON-NAVARRO, B. Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects. **INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY**, v. 88, p. 1–10, 2019.

MORESKI, D. B.; GIACOMINI BUENO, F.; VIEIRA DE SOUZA LEITE-MELLO, E. AÇÃO CICATRIZANTE DE PLANTAS MEDICINAIS: UM ESTUDO DE REVISÃO. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 1, p. 63–69, 28 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/6300>>.

MÜLLER, R. H.; RÜHL, D.; RUNGE, S.; SCHULZE-FORSTER, K.; MEHNERT, W. **Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant** *Pharmaceutical Research*, 1997. .

MUSTHABA, S. M.; BABOOTA, S.; AHMED, S.; AHUJA, A.; ALI, J. Status of novel drug delivery technology for phytotherapeutics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 6, p. 625–637, 8 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425240902980154>>.

OKUMA, C. H.; ANDRADE, T. A. M.; CAETANO, G. F.; FINCI, L. I.; MACIEL, N. R.; TOPAN, J. F.; CEFALI, L. C.; POLIZELLO, A. C. M.; CARLO, T.; ROGERIO, A. P.; SPADARO, A. C. C.; ISAAC, V. L. B.; FRADE, M. A. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. February, p. 62–72, 2015.

OLIVEIRA, C. N. P. de. **AVALIAÇÃO DO MODELO DE UM NOVO REATOR DE CAVITAÇÃO HIDRODINÂMICA PARA PRODUÇÃO DE EMULSÕES EM ESCALA SUB-MICROMÉTRICA**. 2014. Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

PAL, D. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds in Health and Nutrition. In: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 1097–1105.

PANDIT, J.; AQIL, M.; SULTANA, Y. Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils. In: **Encapsulations**. [s.l.] Elsevier, 2016. 49p. 597–640.

PEDROSO, ANA CAROLINA B. R., SOUZA, JOEL P. C., JÚNIOR MARCOS L., MOURA, VERIDIANA MARIA B. D., BRANDESTETTER, LUCIANA R. G.. Plasma rico em plaquetas e cicatrização. **Investigação**, v. 18, n. 1, p. 35-44, 2019.

PEREIRA, TATIANA A., GUERREIRO, CAROLINA M., MARUNO, MÔNICA, FERRARI, MARCIO, ROCHA-FILHO PEDRO A. Exotic Vegetable Oils for Cosmetic O/W Nanoemulsions: In Vivo Evaluation. **Molecules**, v. 21, n. 248, p. 1-16, 2016.

PICHONELLI, A.; PIRONI, A. M.; SANTOS, D. de C.; XAVIER, H. C.; ANDRÉO, B. G. C.; PILON, T. P. F. Desenvolvimento e caracterização de nanocosmético contendo óleo de rosa mosqueta e ácido ascórbico como alternativa no tratamento de estrias. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica**

e **Aplicada**, v. 37, n. Agosto, p. 4532, 2016. Disponível em: <[https://www.bertelsmann-stiftung.de/fileadmin/files/BSt/Publikationen/GrauePublikationen/MT\\_Globalization\\_Report\\_2018.pdf%0Ahttp://eprints.lse.ac.uk/43447/1/India\\_globalisation%2C\\_society\\_and\\_inequalities%28lsero%29.pdf%0Ahttps://www.quora.com/What-is-the](https://www.bertelsmann-stiftung.de/fileadmin/files/BSt/Publikationen/GrauePublikationen/MT_Globalization_Report_2018.pdf%0Ahttp://eprints.lse.ac.uk/43447/1/India_globalisation%2C_society_and_inequalities%28lsero%29.pdf%0Ahttps://www.quora.com/What-is-the)>.

PIOCHON, M.; LEGAULT, J.; GAUTHIER, C.; PICHETTE, A. Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -d-fucopyranoside and analogues. **Phytochemistry**, v. 70, n. 2, p. 228–236, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.11.013>>.

PROTTEY, C.; HARTOP, P. J.; PRESS, M. Correction of the cutaneous manifestations of essential fatty acid deficiency in man by application of sunflower-seed oil to the skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 228–234, 1975.

RAHMAN, P. K. S. M.; MAYAT, A.; RANDHAWA, K. S.; RELPH, L. E.; ARMSTRONG, M. C. Biosurfactants and Bio-Emulsifiers from Algae. v. 53, p. 2–5, 2017.

REGENTE, M. C.; DE LA CANAL, L. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 110, n. 2, p. 158–163, out. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.2000.110203.x>>.

SALLEH, S. H. A.; HAMID, K. A.; EFFENDI, T. J. B.; JAMIL, N. Characterization and stability evaluation of olive oil nanoemulsion-based hydrogel formulation by nanophase emulsification technique. **ISBEIA 2012 - IEEE Symposium on Business, Engineering and Industrial Applications**, p. 824–828, 2012.

SALMINEN, J. P.; KARONEN, M.; LEMPA, K.; LIIMATAINEN, J.; SINKKONEN, J.; LUKKARINEN, M.; PIHLAJA, K. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, n. 2, p. 170–180, 2005.

SAMI, D. G.; HEIBA, H. H.; ABDELLATIF, A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. **Wound Medicine**, v. 24, n. 1, p. 8–17, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.12.001>>.

SANTOS, J. S. dos; VIEIRA, A. B. D.; KAMADA, I. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. **Revista Brasileira de Enfermagem**,

v. 62, n. 3, p. 457–462, jun. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71672009000300020&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672009000300020&lng=pt&tlng=pt)>.

SCHAFFER, S.; HALLIWELL, B. Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. **Genes and Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2012.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; PRANTL, L.; KARRER, S.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Oxygen in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 2, p. 257–268, 15 abr. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2010.09804.x>>.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567–579, set. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095528630600266X>>.

SHARP, L.; FINNILÄ, K.; JOHANSSON, H.; ABRAHAMSSON, M.; HATSCHEK, T.; BERGENMAR, M. No differences between Calendula cream and aqueous cream in the prevention of acute radiation skin reactions - Results from a randomised blinded trial. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 17, n. 4, p. 429–435, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejon.2012.11.003>>.

SILVA, R. D. R.; MELO, É. M. de. A ATUAL TEORIADACOAGULAÇÃO BASEADA EM SUPERFÍCIES CELULARES. **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 2, n. 1, p. 79–92, 2016.

SIMPSON, E. L. Atopic dermatitis: A review of topical treatment options. **Current Medical Research and Opinion**, v. 26, n. 3, p. 633–640, 2010.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>>.

SOMMERLING, J. H.; DE MATOS, M. B. C.; HILDEBRANDT, E.; DESSY, A.; KOK, R. J.; NIRSCHL, H.; LENEWEIT, G. Instability Mechanisms of Water-in-Oil Nanoemulsions with Phospholipids: Temporal and Morphological Structures. **Langmuir**, v. 34, n. 2, p. 572–584, 2018.

SØNSTEVOLD, T.; JOHANNESSEN, C. A.; STUHR, L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. **Radiation Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13014-015-0432-6>>.

SPANHOLTZ, T. A.; THEODOROU, P.; AMINI, P.; SPILKER, G. Severe Burn Injuries. **Deutsches Arzteblatt**, v. 106, n. 38, p. 607–613, 2009.

STAMM, A.; REIMERS, K.; STRAUSS, S.; VOGT, P.; SCHEPER, T.; PEPELANOVA, I. In vitro wound healing assays – state of the art. **BioNanoMaterials**, v. 17, n. 1–2, p. 79–87, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/biomat.2016.17.issue-1-2/bnm-2016-0002/bnm-2016-0002.xml>>.

SZYMCZYK, K.; ZDZIENNICKA, A.; JAŃCZUK, B. Adsorption and Aggregation Properties of Some Polysorbates at Different Temperatures. **Journal of Solution Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 1824–1840, 26 nov. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10953-018-0823-z>>.

THIELEMAN A. M.; I, O.; SANDOVAL, M. A.; H., C. Determinación de la eficacia de una crema con aceite de Rosa Mosqueta en la atenuación de arrugas Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Santiago Universidad de Chile, , 1993.

TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 33–41, maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>>.

TEIXEIRA, G. F. D.; VIEIRA-NETO, A. E.; DA COSTA, F. N.; E SILVA, A. R. A.; CAMPOS, A. R. Antinociceptive effect of (-)- $\alpha$ -bisabolol in nanocapsules. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 946–950, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.024>>.

UCHECHI, O.; OGBONNA, J. D. N.; ATTAMA, A. A. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014. p. 193–235.

UEDA, C. T.; SHAH, V. P.; DERDZINSKI, K.; EWING, G.; FLYNN, G.; MAIBACH, H.; MARQUES, M.; RYTTING, H.; SHAW, S.; THAKKER, K.; YACOBI, A. Topical and TransdeUEDA, Clarence T. et al. Topical and Transdermal Drug Products. **Pharmacopeial Forum**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 750–764, 2009. rmal Drug Products. **Pharmacopeial Forum**, v. 35, n. 3, p. 750–764, 2009.

VAN HOOGEVEST, P.; FAHR, A. Phospholipids in Cosmetic Carriers. In: **Nanocosmetics**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 95–140.

WAGNER, H.; KOSTKAB, K.-H.; LEHRA, C.-M.; SCHAEFER, U. F. pH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 57–65, jan. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964110200125X>>.

WANG, J.; WAN, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 235–244, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.008>>.

WANG, X.; JIANG, Y.; WANG, Y. W.; HUANG, M. T.; HO, C. T.; HUANG, Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 419–424, 2008.

XU, W.; JONG HONG, S.; JIA, S.; ZHAO, Y.; GALIANO, R. D.; MUSTOE, T. A. Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 4, p. 584–599, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2011.184>>.

YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 13–24, fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12260>>.

ZHAO, R.; LIANG, H.; CLARKE, E.; JACKSON, C.; XUE, M. Inflammation in Chronic Wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2085, 11 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2085>>.