



STEPHANY CARES HUBER

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO USO TÓPICO DE
HEPARINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS RECOBERTAS COM QUITOSANA EM
MODELO DE ÚLCERA DE PELE EM RATOS**

**Campinas
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

STEPHANY CARES HUBER

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO USO TÓPICO DE
HEPARINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS RECOBERTAS COM QUITOSANA EM
MODELO DE ÚLCERA DE PELE EM RATOS**

Orientadora: Prof. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA STÉPHANY
CARES HUBER E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. JOYCE MARIA
ANNICHINO-BIZZACCHI

Assinatura do Orientador

**Campinas
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

H862a Huber, Stephany Cares, 1988-
Avaliação da ação do uso tópico de heparina
encapsulada em nanopartículas poliméricas recobertas
com quitosana em modelo de úlcera de pele em ratos /
Stephany Cares Huber. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cicatrização. 2. Enoxaparina. 3. Quitosana. 4.
Nanotecnologia. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria,
1957-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the action of topical use of encapsulated heparin in
polymeric nanoparticles recovered by chitosan in rat skin ulcer model.

Palavras-chave em inglês:

Wound healing

Enoxaparin

Chitosan

Nanotechnology

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Andrea Monte Alto Costa

Data da defesa: 13-03-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

STEPHANY CARES HUBER

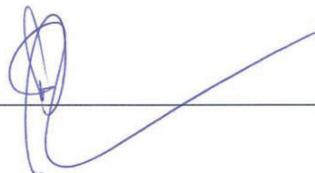
Orientadora PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINNO-BIZZACCHI

MEMBROS:

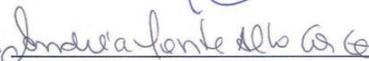
1. PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINNO-BIZZACCHI



2. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO



3. PROFA. DRA. ANDREA MONTE ALTO COSTA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 13 de março de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
toda minha família e meus amigos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gustavo e Blanca, pelo apoio e força para continuar sempre seguindo meus objetivos mantendo meu foco, apoiando-me em minhas decisões e me dando amor e carinho para seguir em frente.

À minha orientadora Dra Joyce e co-orientadora Dra Priscyla, pela disposição em me acolher, pela imensurável ajuda e principalmente pela confiança em mim depositada. Meus sinceros agradecimentos.

Ao laboratório de química biológica do Instituto de Química (IQ) da Unicamp, e ao Prof. Dr. Nelson Durán, pelo desenvolvimento das nanopartículas e pelo conhecimento adquirido em técnicas de nanotecnologia, e também pelas amizades lá encontradas.

Ao laboratório de reparo tecidual (LRT) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) pelo período de estágio que foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo e por me acolher de forma mais do que agradável.

À equipe de trabalho incluindo alunos, em especial Fernanda, Aline Urban, Aline Barnabé e Lucas, e funcionários do laboratório de hemostasia, em especial Devanira, que auxiliaram no desenvolvimento deste estudo e com experimentação animal.

A todos meus amigos, pela verdadeira amizade, pelo carinho, incentivo e otimismo para que tudo desse certo.

Àqueles que porventura a traição da memória tenha-me feito omitir e que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização de mais esse desafio.

A Deus por sempre ter-me oferecido motivos pelos quais agradecer.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP processo número 2010/17235-2 e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue/CNPq.

1- INTRODUÇÃO.....	29
1.1. A pele humana.....	30
1.2. Administração tópica de medicamentos.....	32
1.3. Úlceras e diabetes.....	33
1.4. Heparina.....	37
1.5. Sistemas de liberação controlada e nanopartículas poliméricas.....	40
1.6. Recobrimento das nanopartículas poliméricas com quitosana.....	42
1.7. Encapsulação da heparina.....	43
2- OBJETIVOS.....	46
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1. Preparação das nanopartículas poliméricas recobertas com quitosana na encapsulação da enoxaparina.....	49
3.2. Caracterização das partículas.....	49
3.2.1. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	49
3.2.2. Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas, potencial Zeta e estabilidade.....	50
3.2.3. Eficiência de encapsulação (EE).....	50
3.3. Ensaio <i>in vitro</i> – teste de citotoxicidade.....	51
3.4. Avaliação <i>in vivo</i>.....	52
3.4.1. Animais experimentais.....	52
3.4.2. Procedimentos com animais.....	53
3.4.3. Avaliação histológica e imunoistoquímica da pele.....	55
3.4.4. Avaliação da toxicidade.....	57
3.4.5. Análise da atividade anticoagulante.....	57

3.4.6. Análises bioquímicas.....	58
3.4.6.1. Dosagem de proteínas totais.....	58
3.4.6.2. Dosagem de TBARS.....	59
3.4.6.3. Dosagem de nitrito.....	60
3.4.6.4. Atividade da catalase.....	60
3.4.6.5. Dosagem de hidroxiprolina.....	61
3.5. Análise Estatística.....	62
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1. Preparação das nanopartículas poliméricas recobertas com quitosana na encapsulação da enoxaparina.....	65
4.2. Caracterização das partículas.....	65
4.2.1. Microscopia de Força Atômica.....	65
4.2.2. Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas, Potencial Zeta e estabilidade	66
4.2.3. Eficiência de encapsulação (EE).....	69
4.3. Ensaio <i>in vitro</i> – teste de citotoxicidade.....	70
4.4. Avaliação <i>in vivo</i>	72
4.4.1. Indução de diabetes.....	72
4.4.2. Avaliação macroscópica das úlceras.....	73
4.4.3. Avaliação histológica e imunoistoquímica da pele.....	78
4.4.3.1. Hematoxilina-eosina.....	78
4.4.3.2. Imunoistoquímica.....	84
4.4.4. Avaliação da toxicidade.....	90
4.4.5. Análise da atividade anticoagulante.....	91
4.4.6. Análises bioquímicas.....	91
5- CONCLUSÃO.....	102
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
7- ANEXOS.....	112
7.1. Certificado do Comitê de Ética.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

TGF-β	“Transforming Growth Factor beta” , fator de transformação do crescimento beta
TGF-α	“Transforming Growth Factor alpha”, fator de transformação do crescimento alfa
FGF	“Fibroblast Growth Factor”, fator de crescimento de fibroblastos
PDGF	“Platelet-derived Growth Factor”, fator de crescimento derivado das plaquetas
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
IFN-γ	“Interferon-gamma”, interferon gama
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
IL-6	Interleucina 6
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
kDa	kilo Dalton
TVP	Trombose venosa profunda
A/O/A	Água em óleo água
WSC	“Water Soluble Chitosan”, quitosana solúvel em água
WSC/CH	“Water Soluble Chitosan and heparin complex”, complexo quitosana solúvel em água e heparina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	“Vascular Endothelial Growth Factor”; fator de crescimento do endotélio vacular
Da	Dalton
PVA	Poli(álcool vinílico)
NaCl	Cloreto de sódio
AFM	Microscopia de força atômica
khz	kilo hertz

STZ	Estreptozotocina
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
KPE	Tampão fosfato de potássio
CAT	Catalase
MDA	Malondialdeído
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
NO	Óxido nítrico
NaNO₂	Nitrito de sódio
NO₂	Nitrito
EROS	Espécies reativas de oxigênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
OH-prolina	Hidroxiprolina
NIH	National Insitute of Health
MTT	(brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5 difeniltetrazólio])
PDI	Índice de polidispersidade
EE	Eficiência de Encapsulação
HE	Hematoxilina-eosina
WBC	“White Blood Cell”, célula branca sanguínea
RBC	“Red Blood Cell”, célula vermelha sanguínea
Hb	Hemoglobina
HCT	Hematócrito
Plt	Plaquetas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação dos componentes da pele.....	30
Figura 2- Rotas para a penetração cutânea de compostos.....	32
Figura 3- Estrutura da heparina de baixo peso molecular.....	38
Figura 4- Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas...	40
Figura 5- Estrutura da quitosana.....	42
Figura 6- Avaliação da contração da úlcera	54
Figura 7- Imagens de AFM das amostras de nanopartículas com enoxaparina e vazias.....	65
Figura 8- Gráfico de estabilidade das nanopartículas contendo enoxaparina.....	67
Figura 9- Gráfico do potencial Zeta das amostras de nanopartículas contendo enoxaparina nos diferentes dias testados.....	68
Figura 10- Gráfico de estabilidade das nanopartículas vazias.....	68
Figura 11- Gráfico do potencial Zeta das amostras de nanopartículas vazias nos diferentes dias testados.....	69
Figura 12- Curva de calibração da enoxaparina obtida pelo método colorimétrico Azure II.....	70
Figura 13- Gráfico de viabilidade em células 3T3 com marcador celular MTT de enoxaparina livre e encapsulada	71
Figura 14- Gráfico de viabilidade em células 3T3 com marcador celular MTT de nanopartículas vazias.....	71
Figura 15- Comparação de peso, glicemia, consumo de água e ração entre os animais normais e diabéticos durante os dias de experimento (10).....	72

Figura 16- Porcentagem do tamanho da úlcera dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento no dia 4.....	73
Figura 17- Porcentagem do tamanho da úlcera dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento nos dia 7.....	74
Figura 18- Porcentagem do tamanho da úlcera dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento no dia 10.....	75
Figura 19- Fotos de um animal normal do grupo controle tratado com gel puro.....	75
Figura 20- Fotos de um animal normal do grupo 1 tratado com gel com enoxaparina livre.....	76
Figura 21- Fotos de um animal normal do grupo 2 tratado com gel contendo nanopartículas vazias.....	77
Figura 22- Fotos de um animal normal do grupo 3 tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina.....	77
Figura 23- Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais normais tratados com gel puro (controle).....	79
Figura 24- Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais diabéticos tratados com gel puro (controle).....	79
Figura 25- Fotos das lâminas coradas com HE evidenciando os resultados dos animais normais tratados com gel contendo enoxaparina livre.....	80
Figura 26- Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais diabéticos tratados com gel contendo enoxaparina livre.....	80
Figura 27- Fotos das lâminas coradas com HE evidenciando os resultados dos animais do grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias.....	81
Figura 28- Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais normais tratados com gel contendo nanopartículas com enoxaparina.....	82

Figura 29- Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais diabéticos tratados com gel contendo nanopartículas com enoxaparina.....	82
Figura 30- Fotos dos controles (baço de rato) utilizados para imunistoquímica.....	84
Figura 31- Fotos dos controles (músculo estriado esquelético) utilizados para imunistoquímica.....	85
Figura 32- Fotos das lâminas de imunistoquímica evidenciando as marcações obtidas através dos anticorpos utilizados.....	86
Figura 33- Gráfico da quantidade de macrófagos (identificados por CD68) na área ulcerada no décimo dia, em animais normais e diabéticos.....	87
Figura 34- Gráfico da quantidade de vasos sanguíneos (identificados por α -actina de músculo liso) na área ulcerada, no décimo dia, em animais normais e diabéticos.....	88
Figura 35- Gráfico da quantidade de miofibroblastos (identificados por α -actina de músculo liso) na área ulcerada, no décimo dia, em animais normais e diabéticos.....	89
Figura 36- Curva de calibração da dosagem de proteínas obtida pelo método de Bradford.....	92
Figura 37- Curva de calibração da dosagem de TBARS obtida por método colorimétrico.....	93
Figura 38- Resultados da concentração de MDA encontradas no tecido crostoso dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento.....	94
Figura 39- Resultados da concentração de MDA encontrados no plasma dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento.....	94
Figura 40- Curva de calibração da dosagem de nitrito obtida pelo método colorimétrico.....	95
Figura 41- Resultados da concentração de nitrito tecidual dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento.....	96

Figura 42- Resultados da concentração de nitrito plasmático nos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento.....	97
Figura 43- Resultados da atividade da catalase nos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento.....	98
Figura 44- Curva de calibração da dosagem de hidroxiprolina obtida por método colorimétrico.....	99
Figura 45- Resultados da dosagem de hidroxiprolina nos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras e concentrações testadas para citotoxicidade.....	51
Tabela 2- Exemplo de diluição dos anticorpos.....	55
Tabela 3- Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial, Zeta das nanopartículas de PCL/quitosana/enoxaparina em 3 amostras.....	66
Tabela 4- Resultados das lâminas histológicas coradas com HE.....	83
Tabela 5- Resultados do hemograma dos animais.....	90
Tabela 6- Resultados da avaliação da função hepática e renal dos animais.....	91

RESUMO

As úlceras de pele constituem uma complicação de diversas doenças como diabetes, trombose venosa profunda, anemia falciforme, entre outras, e apresentam um elevado índice de incidência. O tratamento tópico de úlceras e outras feridas da pele é amplamente utilizado por não ser invasivo e permitir que os medicamentos absorvidos possam atuar na ausência de metabolização hepática. O uso de nanopartículas biocompatíveis e biodegradáveis como carreadores permite uma absorção adequada dos fármacos através da pele, ou a manutenção do fármaco no local de aplicação. O objetivo deste estudo foi a preparação de uma formulação farmacêutica nanoestruturada para a administração tópica de enoxaparina encapsulada em um sistema de liberação sustentada, recoberto com quitosana, visando o potencial biológico deste fármaco na cicatrização de úlceras cutâneas de ratos. Para isto foi padronizado um modelo de úlceras em ratos, que se mostrou reprodutível e adequado para a experimentação. As nanopartículas foram preparadas pelo método de dupla emulsão e evaporação de solvente. As partículas foram caracterizadas por técnicas microscópicas quanto à morfologia, por espectroscopia de correlação de fótons quanto ao tamanho e a polidispersidade, e potencial Zeta. A eficácia e efeitos tóxicos da formulação nanoestruturada aplicada topicamente em modelo de úlcera de pele em animais normais e diabéticos sobre a cicatrização foi avaliada por meio de análise macroscópica e microscópica (hematoxilina-eosina, imunoistoquímica), dosagem de marcadores de estresse oxidativo plasmático e tecidual, hemograma completo, perfis hepático e renal, e atividade anti-Xa. Por meio desse método foram produzidas nanopartículas com diâmetro médio de 493 nm, com índice de polidispersidade médio de 0,362 e com carga superficial positiva ($\zeta = + 23$ mV), com uma eficiência de encapsulação de 98% e estabilidade de 90 dias. As nanopartículas com e sem enoxaparina não apresentaram toxicidade *in vitro* quando testadas em células 3T3 (fibroblastos), e nos testes *in vivo* evidenciaram uma melhora da cicatrização. Nestes testes, a enoxaparina auxiliou na diminuição do tamanho da ferida, porém, houve um aumento na concentração dos marcadores de estresse oxidativo, e não houve alteração na atividade da catalase (antioxidante). A quitosana, conforme demonstrado em outros estudos, contribuiu para o processo cicatricial, apresentando os melhores resultados na cicatrização em comparação aos outros tratamentos deste estudo. O uso de enoxaparina em conjunto com a quitosana não mostrou um efeito sinérgico ou aditivo, porém apresentou um

efeito intermediário na cicatrização de úlceras de pele quando comparada à enoxaparina livre e nanopartículas vazias (melhor tratamento). Com esses resultados, o uso de nanopartículas com enoxaparina ou outro fármaco, recobertas de quitosana, deve ser comparado a tratamentos convencionais de feridas, podendo se constituir numa alternativa promissora para auxiliar no processo de cicatrização.

ABSTRACT

Skin ulcers are a complication of many diseases such as diabetes, deep vein thrombosis, sickle cell anemia, and others, and have a high incidence rate. Topical treatment of ulcers and other skin wounds is widely used because it is not invasive and enables the absorbed drugs to act in the absence of hepatic metabolism. The use of biocompatible and biodegradable nanoparticles as carriers enable adequate absorption of drugs through the skin or maintaining the drug in the application site. The objective of this study was to prepare a nanostructured pharmaceutical formulation for topical administration of enoxaparin encapsulated in a sustained release system, coated with chitosan, targeting the biological potential of this drug in wound healing in rats skin ulcers. For this purpose a reproducible model of wounds in rats, suitable for experimentation, was standardized. The nanoparticles were prepared using the method of double emulsion and solvent evaporation. The particles were characterized by microscopic techniques on the morphology, by photon correlation spectroscopy in size and polydispersity, and Zeta potential. The efficacy and toxicity of the nanostructured formulation topically applied to the skin ulcer model in normal and diabetic animals was evaluated by macroscopic and microscopic examination (hematoxylin and eosin, immunohistochemistry), serum markers of oxidative stress in plasma and tissue, complete blood count, hepatic and renal profiles, and anti-Xa activity. Using this method were produced nanoparticles with 493 nm average diameter, average polydispersity index 0.362 with positive surface charge ($\zeta = + 23$ mV), with an encapsulation efficiency of 98% and stability of 90 days. Nanoparticles with and without enoxaparin showed no toxicity when tested *in vitro* 3T3 cells (fibroblasts) and *in vivo* tests showed improved healing. In these tests, enoxaparin helped decrease the size of the wound, as compared to natural healing, but there was an increase in the concentration of oxidative stress markers, and no change in the activity of catalase (antioxidant). Chitosan, in accordance to other studies, contributed to the healing process, presenting the best healing results when compared to other treatments in this study. The use of enoxaparin and chitosan showed no synergistic or additive effect but showed an intermediary effect on the healing of skin ulcers, when compared to free enoxaparin and empty nanoparticles (best treatment). These results suggest that the use of nanoparticles with enoxaparin or other drug coated by chitosan, should be compared

to the conventional treatments of wounds and could constitute a promising alternative to help in the healing process.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. A pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, revestindo e delimitando o organismo, protegendo-o e interagindo com o meio exterior, correspondendo a 15% do peso corporal do homem (Azulay *et al.*, 2008; Foldari, 2000).

A pele é composta basicamente por três camadas interdependentes: epiderme, mais externa, derme, intermediária e hipoderme, mais profunda (figura 1), formando uma complexa barreira em consequência da sua estrutura anatômica e composição química (Azulay *et al.*, 2008; Guterres *et al.*, 2007).

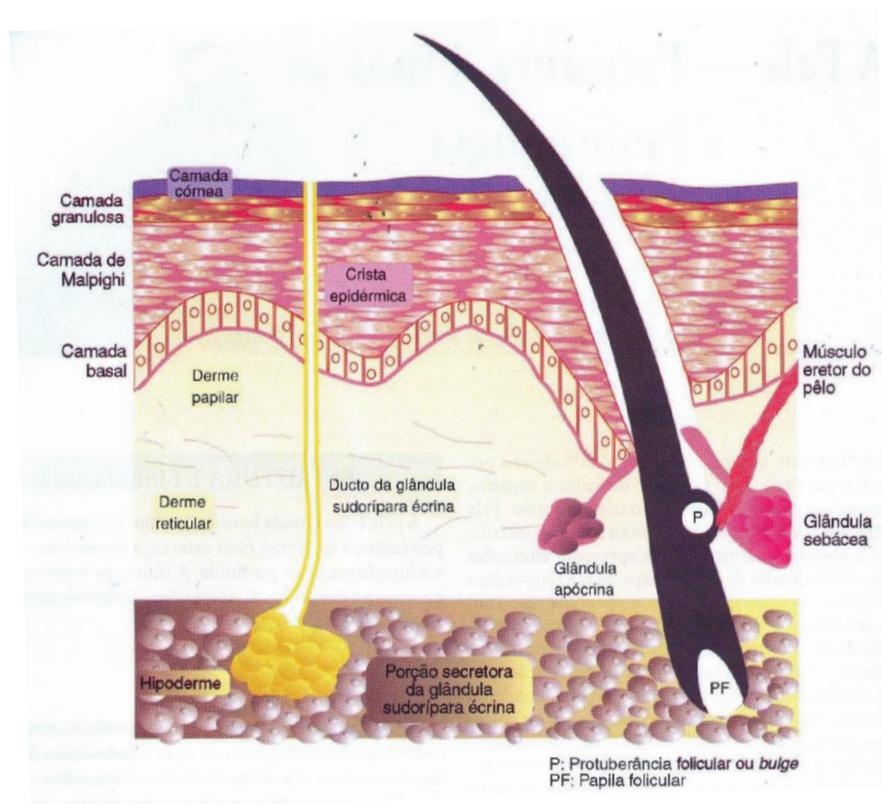


Figura 1: Representação dos componentes da pele (Azulay *et al.*, 2008).

A epiderme é constituída por: sistema ceratinocítico, onde estão presentes os queratinócitos, que são responsáveis pelo corpo da epiderme e de seus anexos (pelos, unhas e glândulas); sistema melânico, constituído por melanócitos; células de Langerhans, com função imunológica; células de Merkel, integradas ao sistema

nervoso, e células dendríticas indeterminadas, com função mal definida. Em relação ao sistema ceratinocítico, é importante mencionar que apresenta quatro camadas. A camada basal, a mais profunda, fornece células que posteriormente vão sofrendo modificações à medida que vão ascendendo em direção à superfície da pele. A próxima camada é a camada espinhosa ou de Malpighi. Essas células fornecidas passam um breve estágio onde apresentam o citoplasma mais basofílico e granuloso, formando assim a camada granulosa. E por fim, estas células transformam-se em anucleadas e planas, chamadas de corneócitos formando assim a camada córnea. Estas células são acidófilas e as mais largas do organismo, permitindo sua descamação e mobilidade sem provocar danos ao tecido. Além da proteção mecânica, a camada córnea previne o trânsito de água e substâncias solúveis, mantendo a homeostasia do indivíduo frente ao ambiente.

Em regiões palmoplantares, pode-se observar a camada lúcida, localizada antes da transformação da camada granulosa em córnea. Esta camada é homogênea e apresenta células achatadas e anucleadas, que não se coram pelos métodos de rotina (Azulay *et al.*, 2008).

Os queratinócitos participam ativamente de processos inflamatórios e imunológicos como células-alvo (ex.: psoríase, lúpus eritematoso), ou secretando citocinas e outros mediadores, além de sua função estrutural, já descrita (Azulay *et al.*, 2008).

A derme é uma camada de tecido conjuntivo, onde estão presentes vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas e anexos epidérmicos. Os capilares dérmicos suprem os folículos dos pêlos bem como as glândulas sudoríparas e sebáceas, e se conectam a circulação sistêmica, enquanto que os vasos do sistema linfático ajudam a drenar o excesso de fluido extracelular e antígenos. Sua elasticidade é atribuída às fibras protéicas, incluindo o colágeno e elastina imersos em glicosaminoglicanos (ácido

hialurônico, dermatan sulfato). Fibroblastos, macrófagos/histiócitos, células dendríticas e mastócitos são suas células residentes, enquanto linfócitos, plasmócitos e outros elementos celulares do sangue são encontrados em número variável e de forma transitória (Foldari, 2000; Azulay *et al.*, 2008).

A hipoderme ou panículo adiposo é a camada mais profunda da pele, e é formada por lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Os adipócitos são arredondados e grandes, contendo em seu citoplasma uma grande quantidade de lipídeos.

O uso de fármacos por via tópica é muito atrativo, pois além do tratamento de doenças cutâneas, não é invasivo, e permite que medicamentos absorvidos possam atuar na ausência de metabolização hepática (Prausnitz *et al.*, 2004). Por este motivo, a via de administração tópica tem sido muito investigada.

1.2. Administração tópica de medicamentos

A administração tópica de medicamentos é controlada por propriedades anatômicas da pele (ex. tipo de pele e atual condição), características dos fármacos (ex. lipofilicidade) e as características da formulação (ex. tamanho da partícula). Existem basicamente 2 formas de permeação dos fármacos no estrato córneo: a rota transepidérmica e a rota via poros. A figura 2 ilustra estas duas formas de permeação (Trommer e Neubert, 2006).

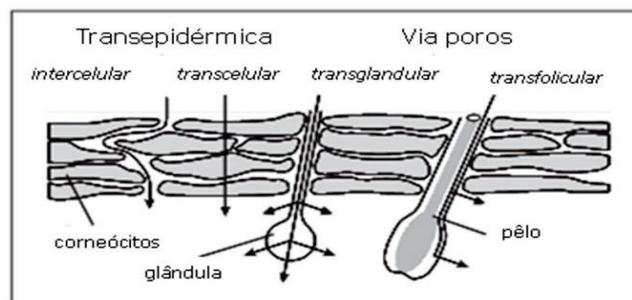


Figura 2: Rotas para a penetração cutânea de compostos (adaptado de Lippold 1984).

A permeação passiva de fármacos pela pele ocorre predominantemente pela rota intercelular e envolve a difusão de moléculas através da matriz lipídica existente entre os corneócitos. As rotas transglandular e transfolicular também contribuem para a penetração cutânea, normalmente em pequena porcentagem, com apenas 0,1% da permeação total, devido à sua pequena extensão, sendo insignificante para a maioria das formulações tópicas. No entanto, quando são utilizadas formulações micro e nanoparticuladas, estas rotas podem desempenhar importante papel (Alvarez-Roman *et al.*, 2004). As glândulas sebáceas são mais permeáveis que os corneócitos e os fármacos podem alcançar a derme através do folículo, passando pela glândula sebácea, ou penetrando no epitélio pela bainha folicular (Barry, 2001).

No estudo feito por Alvarez-Román *et al.* (2004) sobre a penetração de nanopartículas poliméricas em pele de porco, foi demonstrado através de microscopia confocal de varredura a *laser*, que a localização das nanopartículas é dependente do tamanho. As nanopartículas de menor diâmetro, em torno de 20 nm, ficaram acumuladas nas regiões foliculares, enquanto as nanopartículas maiores, em torno de 200 nm, foram encontradas nos “sulcos” da pele, e não houve evidência de absorção longe das regiões foliculares.

1.3. Úlceras e Diabetes

As úlceras são definidas como o rompimento da estrutura anatômica normal e a perda da função do tecido alterado. Já a cura das úlceras é um dinâmico e complexo processo, que resulta em sua restauração anatômica e funcional (Lazarus *et al.*, 1994).

A cura das úlceras normalmente ocorre de uma maneira eficiente caracterizada por quatro fases distintas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Na pele normal, este processo de cura é iniciado logo após a injúria. Inicialmente, ocorre um

breve período de vasoconstrição, seguido então de uma vasodilatação, acompanhada de um aumento da permeabilidade capilar. Diante desta maior permeabilidade, os componentes do sangue extravasam para o local da injúria, e as plaquetas ao entrar em contato com os elementos da matriz extracelular liberam citocinas e fatores da coagulação, caracterizando a fase de hemostasia, influenciando na infiltração de leucócitos pela liberação de fatores quimiotáticos.

A inflamação inicial ocorre com a migração dos neutrófilos ao local da injúria realizando a fagocitose de materiais estranhos, restos celulares e bactérias, sendo caracterizado por eritema, edema e dor. Esta migração cessa após alguns dias, em torno de 2-5 dias da injúria, se a ferida não estiver contaminada. Além do mais, os neutrófilos agem como quimioatrativos para outras células que estão envolvidas na fase inflamatória (MacKay e Miller, 2003). Aproximadamente 3 dias após a injúria, os macrófagos entram na área lesionada e continuam o processo de fagocitose em curso.

Os macrófagos apresentam várias funções incluindo a defesa do hospedeiro, promoção e resolução da inflamação, remoção das células apoptóticas, suporte para a proliferação celular (próxima fase da cicatrização) e restauração do tecido após a injúria. Eles promovem a síntese de numerosos fatores de crescimento como: TGF- β , TGF- α , FGF, PDGF e VEGF, os quais são responsáveis pela proliferação celular e a síntese de moléculas da matriz extracelular (Reinke e Sorg, 2012).

Já a fase proliferativa inicia-se com a migração de fibroblastos e a deposição de uma nova matriz extracelular sob o controle de citocinas regulatórias como IFN- γ e TGF- β , com a secreção de várias substâncias básicas necessárias para a cicatrização, incluindo proteoglicanos, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos, principalmente o colágeno e fibronectina. Esta quantidade de colágeno é o que determina a força de tensão da úlcera e representa a base para uma nova matriz de tecido conectivo para o

fechamento e restauração mecânica da úlcera com a formação do tecido de granulação e restauração da vasculatura (Digelmann e Evans, 2004; Reinke e Sorg, 2012).

O tecido de granulação é caracterizado por uma alta densidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares, e feixes de colágeno frouxamente organizados, devido à sua grande quantidade de componentes celulares é chamado de tecido de granulação. Também, como a angiogênese não está completamente finalizada ainda, este tecido é altamente vascular, por isso bem avermelhado (Reinke e Sorg, 2012).

A angiogênese é o termo utilizado para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, para reconectar a perfusão nutritiva. É um processo que envolve células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e a matriz extracelular. Os macrófagos produzem fatores de crescimento para estimular a angiogênese e a matriz extracelular é um reservatório de fatores pró-angiogênicos que são liberados durante a degradação proteolítica feita pelas células endoteliais, dissolvendo a lâmina basal, sendo estas, capazes de proliferar e migrar para a área da injúria. O primeiro passo para a formação de novos vasos, é a ligação dos fatores de crescimento aos receptores das células endoteliais de vasos existentes, ativando assim a cascata de sinalização intracelular. Os brotos recém-constituídos formam pequenos canais tubulares que se interligam com outros formando um “laço de vasos”. Posteriormente, os novos vasos se transformam em artérias e vênulas e ficam maduros pela estabilização de suas paredes através do recrutamento de perócitos e células musculares lisas. Finalmente, o fluxo sanguíneo completa o processo angiogênico (Morgan e Nigan, 2013; Reinke e Sorg, 2012).

Nesta fase, o número de fibroblastos maduros é reduzido pela diferenciação em miofibroblastos, a fim de promover a contração da ferida, diminuindo assim o seu tamanho, e por fim, terminam com consecutiva apoptose.

Os fibroblastos são responsáveis pela homeostase do tecido sob condições fisiológicas. Quando os tecidos sofrem injúria, os fibroblastos tornam-se ativos e se diferenciam em miofibroblastos, os quais produzem contrações e ativam a produção de proteínas da matriz extracelular para facilitar o fechamento da injúria. Os fibroblastos são células fusiformes, e amplamente distribuídos na maioria dos tecidos, em especial nos tecidos conectivos. A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos é um evento chave na formação do tecido conectivo da cicatrização.

Fenotipicamente, os miofibroblastos são células intermediárias entre fibroblastos e células de músculo liso. Eles iniciam seu aparecimento na fase inicial da formação do tecido de granulação e expressam α -actina de músculo liso, um marcador de diferenciação das células musculares lisas, que pode ser utilizado para sua identificação (Li e Wang, 2011).

Por fim, esta matriz é organizada, constituindo então, a fase de remodelamento, que ocorre do dia 21-1 ano após a injúria, onde ocorre a substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I (mais forte) e orientado em pequenos feixes paralelos. Ocorre apoptose das células do tecido de granulação, diminuição do processo angiogênico e fluxo sanguíneo e a atividade metabólica da lesão diminui e finalmente cessa (Reinke e Sorg, 2012).

Portanto, para o processo de cicatrização normal são necessários vários eventos celulares e marcadores biológicos. Porém, existem condições patológicas que resultam em fibrose e úlceras não-curadas. Neste caso, este eficiente processo é perdido, e as úlceras ficam cronicamente inflamadas, estado caracterizado pela infiltração excessiva de neutrófilos, associado às espécies reativas de oxigênio e enzimas destruídas (Diegelmann e Evans, 2004).

O diabetes é uma doença com alteração da homeostasia da glicose e persistente hiperglicemia, responsável pelo dano em células com um baixo *turn-over*, como os neurônios. Esta anormalidade é a causa de algumas das complicações tardias da manifestação do diabetes, como úlceras cutâneas e anormalidades vasculares, decorrentes da disfunção do sistema nervoso autônomo, resultando em estase vascular e baixa cicatrização (Mishra *et al.*, 2008). As úlceras de pé em diabéticos apresentam uma incidência de 15%. A neuropatia, a circulação pobre e a susceptibilidade a infecções contribuem para o desenvolvimento do pé diabético, caracterizado por deformidades, ulcerações e infecção. Por se tratar de uma doença sistêmica associada à estase local, é importante o processo de angiogênese na lesão, a fim de que o início do processo de cicatrização possa se desenvolver (Mohammad *et al.*, 2008).

1.4. Heparina

A heparina tem sido utilizada há décadas na prática clínica como anticoagulante, tanto no tratamento como na profilaxia da trombose. Muitos estudos sobre a heparina mostram seu papel na inibição da cascata de coagulação, mas dados mais recentes tem seu foco ampliado, incluindo suas ações anti-inflamatórias. Sua ação anti-inflamatória provém da intervenção nos passos-chave do recrutamento dos leucócitos da vasculatura para a área da injúria, pela capacidade de modular a IL-6, a qual tem um efeito regulatório sobre outras citocinas inflamatórias, pela inativação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , selectinas secretadas por leucócitos como CD-11b, integrinas como o CAM-1, e atenuação da ativação do complemento. Além disso, há um efeito angiogênico derivado da interação com o VEGF e com fatores de crescimento dos fibroblastos (Ravikumar *et al.*, 2006).

A HBPM, em torno de 3-9 kDa (figura 3), tem algumas vantagens sobre a heparina não fracionada, pela sua maior biodisponibilidade, maior vida-média, maior relação anti-Xa/anti-IIa, e menor desenvolvimento de plaquetopenia induzida pela heparina (Ravikumar *et al.*, 2006). A enoxaparina é uma heparina de baixo peso molecular empregada no tratamento da TVP, e foi utilizada no desenvolvimento deste projeto.

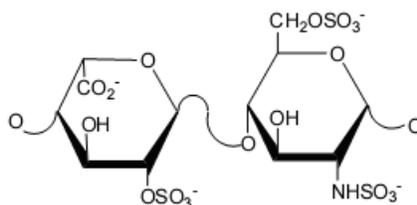


Figura 3: Estrutura da heparina de baixo peso molecular

Estudos mostraram que a HBPM é capaz de inibir a adesão de leucócitos polimorfonucleares às células endoteliais e diminuir a expressão de moléculas de adesão celular nas úlceras decorrentes da TVP. Em adição, a diminuição da resposta inflamatória inicial causada pela HBPM pode ser devido à menor invasão de macrófagos na injúria; há relatos de indução de apoptose de fibroblastos, importante processo na fase final da cicatrização, como um mecanismo homeostático a fim de manter a população celular esperada nos tecidos lesionados (Civelek *et al.*, 2007)

Devido a estas características, a HBPM pode ser utilizada no tratamento de úlceras crônicas de diferentes etiologias. Ravikumar *et al.* (2006) estudaram o uso da HBPM parenteral em pacientes com queimadura de 20 a 35% da superfície corporal. Os seus resultados mostraram que no grupo tratado com HBPM houve diminuição do edema e eritema em 5 dias, aumento da reepitelização, diminuição da IL-6 e reconstituição total do tecido em 28 dias, com diminuição dos sinais cicatriciais.

No estudo feito por Kus e Bienkiewicz (2006) foi observado o efeito da HPBM subcutânea em ratos após uma incisão de 4 cm no dorso. Estes animais foram divididos

em grupos controle e experimental, sendo tratados por 7 a 14 dias: o primeiro grupo recebia solução salina e o segundo recebia HPBM. No segundo grupo foi constatado o aumento da concentração de colágeno, mostrando assim o efeito positivo da HPBM no tratamento de feridas da pele.

Em outro estudo feito por Kweon *et al.* (2003) foi verificada a ação da quitosana solúvel em água (WSC) e do complexo heparina e quitosana solúvel em água (WSC/CH), como aceleradores do processo de cicatrização em ratos. Após uma incisão no dorso de 1,5 cm, os animais foram divididos em 3 grupos: controle (grupo 1), WSC (grupo 2) e complexo WSC/CH (grupo 3). Todos os grupos foram avaliados após 15 dias da lesão. O grupo controle tinha um ferimento com a margem bem definida e recoberta por uma crosta. O grupo 2 apresentou um ferimento de menor tamanho com diminuição da crosta e margens mal-definidas, aparentando uma regeneração a partir da margem. O grupo 3 mostrou uma lesão muito próxima da cura do ferimento. Os cortes histológicos mostraram que no grupo 3 houve a regeneração quase completa das estruturas dos anexos presentes em uma derme normal, enquanto que no grupo controle e no grupo 2 houve a ausência e diminuição do número de estruturas anexas na pele, respectivamente (Kweon *et al.*, 2003).

A aplicação subcutânea da heparina é limitada pela dor, inativação do fármaco em 12 a 24 horas, e riscos como sangramento, trombocitopenia, reações de hipersensibilidade e osteoporose. Devido a todos esses fatores, a HBPM aplicada topicamente, traz a possibilidade de diminuir os riscos observados por meio da aplicação subcutânea. Os efeitos observados do uso tópico de HBPM são: propriedades anti-inflamatórias, alívio da dor, proteção celular, neoangiogênese, reversão da estase, epitelização, restauração do colágeno e cicatrização da pele (Ravikumar *et al.*, 2006; Barreto *et al.* 2010).

A barreira de difusão localizada no estrato córneo previne a entrada de moléculas maiores que 350 Da, e, portanto, a penetração de HBPM é muito baixa, devido ao seu peso molecular maior (3-9 kDa), hidrofiliçidade e carga negativa (Song e Kim, 2006).

Isto pode ser minimizado através da encapsulação da heparina em nanopartículas poliméricas, promovendo uma penetração adequada deste composto na pele, e também a manutenção do princípio ativo no local da aplicação.

1.5. Sistemas de liberação controlada e nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas foram introduzidas no mercado cosmético em 1995 pela L'Oreal (MCT, 2010). Estas partículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (figura 4). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Schaffazick *et al.*, 2003).

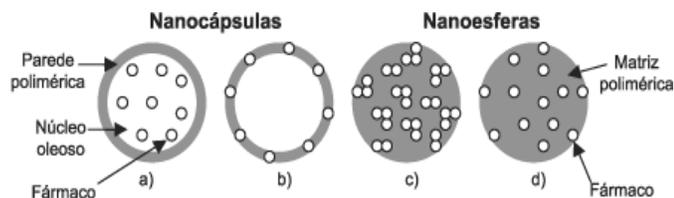


Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (Schaffazick *et al.*, 2003).

O uso de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos ou outras substâncias ativas é importante para alterar as propriedades físico-químicas, facilitando, por exemplo, sua penetração na pele. As nanopartículas poliméricas para uso biológico são preparadas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis. Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas. Um desses métodos é baseado na polimerização *in situ* de monômeros dispersos como o cianoacrilato de alquila. Outro método baseia-se na precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de éster acrílico ou metacrílico. Independentemente do método de preparação, os produtos finais são obtidos como suspensões coloidais aquosas (Schaffazick *et al.*, 2003).

As nanopartículas poliméricas têm a característica de liberação sustentada que vem atraindo a atenção dos pesquisadores por proporcionar uma alternativa atrativa para uma liberação por longo período de agentes terapêuticos. Os sistemas de liberação oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagens convencionais, tais como: 1) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; 2) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; 3) natureza e composição dos veículos, além de proteção contra mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (inativação prematura); 4) administração segura, minimizando ou abolindo reações inflamatórias locais; 5) diminuição do número de doses devido à liberação progressiva; 6) possibilidade de direcionamento a alvos específicos (Duran *et al.*, 2010).

Uma área que tem sido muito investigada é a aplicação tópica de nanopartículas, por aumentar o poder de penetração de fármacos ou moléculas bioativas. Além disso, foi claramente demonstrado que as nanopartículas poliméricas são capazes de modificar

a atividade dos fármacos, controlando sua liberação, aumentando sua adesividade ou tempo de permanência na pele. A penetração e o transporte das nanopartículas são dependentes da composição química, do mecanismo de encapsulação (que influencia na liberação do fármaco), do tamanho e viscosidade das formulações (Guterres *et al.*, 2007).

1.6. Recobrimento das nanopartículas poliméricas com quitosana

A quitosana (figura 5) é um copolímero constituído por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis. Este composto é obtido pela desacetilação da quitina, apresentando predominantemente unidades *D*-glicosamina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (Silva *et al.*, 2006).

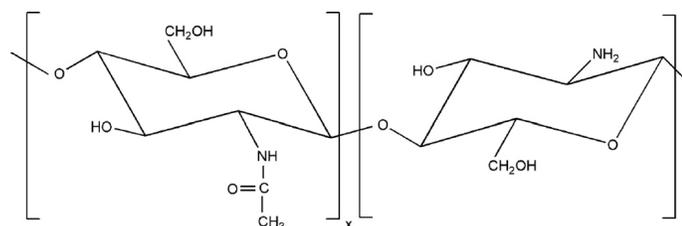


Figura 5: Estrutura da quitosana (Silva *et al.*, 2006).

Quitosana e quitina, bem como derivados da quitosana, são empregados em diversas áreas, como na agricultura e na indústria de alimentos, mas o interesse para a aplicação desses materiais tem aumentado especialmente na área farmacêutica e cosmética, e no desenvolvimento de biomateriais (Silva *et al.*, 2006).

Na área farmacêutica, a quitosana tem sido largamente utilizada em sistemas de transporte de fármacos (Lira *et al.*, 2007). Além de ser um polímero biocompatível,

biodegradável, atóxico e de baixo custo, a quitosana possui propriedades biológicas interessantes como atividade antimicrobiana, potente ação analgésica tópica e aceleração do processo de cicatrização (Silva *et al.*, 2006). Okamoto *et al.* (1992) relataram que a quitina e a quitosana promovem a reepitelização e regeneração da pele em feridas abertas. Outra propriedade muito importante para a área farmacêutica e cosmética da quitosana é a bioadesividade (Okamoto *et al.*, 1992). Devido às cargas positivas em pH fisiológico (grupos amino protonados), a quitosana tem a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente como pele e mucosas, aumentando a retenção do princípio ativo no local de aplicação (Berger *et al.*, 2004).

A quitosana apresenta um grande campo de aplicação e isto pode ser comprovado por diversos trabalhos publicados (Wu *et al.*, 2005; Grenha *et al.*, 2009). Tiyaboonchai (2003) mostrou a eficácia da quitosana encapsulada em nanopartículas para diferentes administrações: parenteral, oral, ocular e no uso de vacinas, demonstrando ser um carreador de fármaco bem eficaz. Nam *et al.* (2010) estudaram o efeito de nanopartículas de quitosana em células tumorais, as quais mostraram um potencial uso para o tratamento do câncer.

Neste estudo foram preparadas nanopartículas poliméricas com um recobrimento de quitosana num único passo, com o objetivo de melhorar o aspecto econômico do processo e as propriedades destas nanoestruturas (aumento de adesão à pele e efeito antimicrobiano) com a HBPM (enoxaparina), a fim de promover uma eficiente cicatrização de úlceras.

1.7. Encapsulação de heparina

A heparina pode ser encapsulada de diversas maneiras, e inicialmente foi encapsulada com o objetivo de prolongar sua atividade anticoagulante *in vivo*. Para esta

finalidade, a heparina foi encapsulada em lipossomas com diâmetro de 0,5-4,0 μm , e verificou-se um aumento significativo de aproximadamente 3 vezes na sua ação anticoagulante (Kim *et al.*, 1986).

Outro estudo que utilizou a encapsulação da HBPM em lipossomas com diâmetro de 81,4 a 167,1 nm objetivou aumentar sua penetração cutânea e demonstrou a presença da mesma nas camadas mais profundas da pele (Song e Kim, 2006). Javot *et al.* (2009) encapsularam a HBPM em micropartículas através do método de dupla emulsão. Estas partículas foram caracterizadas pelo tamanho, porcentagem de encapsulação, perfil de liberação químico e biológico, e atividade anti-Xa e anti-IIa; e os resultados demonstraram eficácia da encapsulação.

Yildiz *et al.* (2005) mostram a encapsulação através de microesferas, a fim de utilizá-las na administração nasal.

A heparina também tem sido preparada com polímeros biodegradáveis poli(ϵ -caprolactone) (PCL), PLA e PLGA e não biodegradáveis como Eudragit RS e RL para tratamentos locais (Yildiz *et al.*, 2005).

Recentemente, um estudo realizado no Laboratório de Pesquisa da Profa. Joyce Annichino-Bizzacchi em colaboração com o Prof. Nelson Durán e a pesquisadora Priscyla D. Marcato do Instituto de Química da UNICAMP, financiado pela FAPESP, demonstrou que as nanopartículas produzidas de PCL com HBPM, além de uma atividade anticoagulante *in vitro* e *in vivo*, também tem uma ação anti-trombótica *in vivo*. As nanopartículas foram preparadas com o polímero PCL, pelo método de dupla emulsão água/óleo/água (A/O/A) e evaporação de solvente, utilizando o poli(álcool vinílico) (PVA) como estabilizante. Através deste estudo prévio já se verificou a eficiência do uso das nanopartículas poliméricas com heparina, como anticoagulante e antitrombótico em modelo de TVP em ratos (Pazzini, 2010). Uma hipótese na

modificação destas nanopartículas com a adição de quitosana é associar os efeitos benéficos da quitosana e da enoxaparina no processo de cicatrização, para obtenção de um sistema de tratamento de úlceras mais eficiente. Dessa forma, o emprego dessas nanopartículas para o tratamento de úlceras pode contribuir para melhora da qualidade de vida dos pacientes acometidos por essa complicação, como os diabéticos, os com antecedente de TVP, os queimados, ou outras doenças, sendo de grande relevância na prática clínica.

2 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como **objetivo geral** a preparação de uma formulação farmacêutica de HBPM em sistemas de liberação sustentada para a administração tópica, visando o potencial biológico deste fármaco encapsulado em nanopartículas poliméricas recobertas com quitosana na cicatrização de úlceras cutâneas de ratos. Para este fim os **objetivos específicos** foram:

1. Preparar nanopartículas poliméricas de HBPM utilizando o polímero biodegradável PCL e recobri-las com quitosana;
2. Caracterizar as nanopartículas quanto ao diâmetro, potencial Zeta, morfologia, eficiência de encapsulação e estabilidade físico-química;
3. Avaliar a toxicidade da enoxaparina livre e encapsulada *in vitro* em cultura de fibroblastos (células 3T3);
4. Padronizar o método de indução de úlceras de pele em ratos no nosso laboratório;
5. Avaliar *in vivo* a ação sobre o processo de cicatrização das nanopartículas com e sem HBPM, no modelo de úlcera de pele em ratos normais e diabéticos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação das nanopartículas poliméricas recobertas com quitosana na encapsulação de enoxaparina

As nanopartículas foram preparadas com polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Aldrich) e recobertas com polímero natural quitosana (105 g/mol/ ~81% acetilação, Polymar). A HBPM utilizada foi a enoxaparina (Clexane[®] 60 mg/ 0,6 mL, 6000UI). A preparação das nanopartículas com enoxaparina foi realizada pela técnica modificada de dupla emulsão A/O/A, como descrito por Meng *et al.* (2003). Para isto, uma solução aquosa de enoxaparina contendo 0,5% de poli(álcool vinílico) (PVA) foi primeiramente emulsificada com uma fase orgânica de acetato de etila e PCL sob agitação mecânica, formando uma emulsão água em óleo. Posteriormente, esta emulsão foi transferida para uma fase aquosa contendo 1% de PVA, 0,9% de NaCl e quitosana (2 mg/mL) e homogeneizada sob agitação mecânica, formando a dupla emulsão A/O/A. Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado à temperatura de 28°C em um rotaevaporador (Marcato, 2006).

3.2. Caracterização das partículas

3.2.1. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As amostras de nanopartículas foram analisadas por AFM. Para isto, a dispersão de nanopartículas foi diluída em água deionizada, e uma gota dessa dispersão foi adicionada sobre mica fixada em um porta-amostra de latão. As imagens foram obtidas em um microscópio de força atômica (SPM-9600, Shimadzu), utilizando o modo dinâmico (modo intermitente). Foi utilizado cantilever comercial de silício e frequência de ressonância da ponta de 210–230 khz.

3.2.2. Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas, potencial Zeta e estabilidade

Como a quitosana é um polímero que tende a aumentar muito o índice de polidispersidade (PDI) e o tamanho das partículas, foram estudadas duas diferentes proporções dos polímeros PCL e quitosana: PCL 3:1 quitosana e PCL 3:0,5 quitosana com e sem enoxaparina (nanopartícula vazia). A partir desta divisão, foram preparadas no mínimo 3 formulações de cada, as quais foram acompanhadas para avaliar a estabilidade durante 100 dias. A dispersão de nanopartículas foi diluída com água e o diâmetro médio (Z-average) foi medido no Zeta Sizer Malvern®. A carga superficial (potencial Zeta) e índice de polidispersidade foi medido no mesmo equipamento. Para a estabilidade a dispersão de nanopartículas escolhida para a continuidade deste projeto foi armazenada à temperatura de 4°C, e semanalmente foi coletada uma alíquota e medido o tamanho, índice de polidispersidade e potencial Zeta.

3.2.3. Eficiência de encapsulação

A enoxaparina encapsulada em nanopartículas foi quantificada através do método colorimétrico Azure II modificado, como descrito por Lam *et al.* (1976). Para isto, uma solução de Azure II (0,05 mg/mL) em água foi preparada e, em seguida, 500 µL da solução de enoxaparina foi misturada com 4,5 mL da solução Azure II. Após 1 minuto, a absorbância desta mistura foi lida em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 500 nm, em triplicata. Para a quantificação da eficiência de encapsulação, a dispersão de nanopartículas foi centrifugada a 4000 x g em filtro Microcon Ultracel YM-100 (Millipore, corte de massa molar de 10.000 g/mol). O sobrenadante foi quantificado pelo método Azure II, e a concentração de enoxaparina foi determinada através de uma curva de calibração previamente construída.

3.3. Ensaio *in vitro* – teste de citotoxicidade

As linhagens celulares de fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3 foram adquiridas do NIH (National Institute of Health-Baltimore, USA).

As células BALB/c 3T3 foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 UI / mL de penicilina e 100 µg / mL de sulfato de espstreptomicina). As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² na densidade de 2 x 10⁴ células / mL e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ (REVCO – incubadora de CO₂), monitoradas a cada 24 horas em microscópio óptico (Eclipse TS100, Nilkon), verificando sua adesão às paredes das garrafas. As culturas foram repicadas periodicamente a cada 24 ou 48 horas. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 2 x 10⁴ células viáveis em placas de 96 cavidades, incubadas por aproximadamente 48 horas, até atingirem a semi-confluência. Quando esta fase foi atingida, as células foram submetidas ao ensaio de toxicidade intrínseca. O meio de cultura, presente em cada poço da placa, foi substituído pelas amostras diluídas em DMEM, conforme tabela abaixo (tabela 1), e em seguida, incubadas por 2 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (REVCO – incubadora de CO₂).

Tabela 1: Amostras e concentrações testadas para citotoxicidade

Amostra	Faixa de concentração testada
Enoxaparina Livre	0-100 µM
Enoxaparina Encapsulada	0-100 µM
Partícula vazia	0-400 µM

Após 2 horas, as células foram incubadas no meio descrito acrescido de 0,5 mg/mL de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] que tem coloração amarelada, por mais 3 horas. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente, e a cada poço da placa foram adicionados 0,1 mL de álcool etílico PA, para dissolução dos cristais de formazan (roxos)

produzidos pela redução do corante. Verificou-se a viabilidade celular através da leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm, sendo que quanto maior a intensidade do roxo, maior a viabilidade celular.

3.4. Avaliação *in vivo*

3.4.1. Animais experimentais

Todos os animais foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp, e mantidos em caixas, sob condição padronizada de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram utilizados 80 ratos machos Wistar com 6-8 semanas de idade, e todos os animais receberam dieta e água *ad libitum*. Durante o experimento, foram mantidos dois animais por caixa, separados com uma divisória de aço, evitando o contato entre eles. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas pelas leis brasileiras de experimentação animal, aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp (certificado número 2290-1).

Os animais foram inicialmente divididos em 2 grupos: grupo normal e grupo diabético. Posteriormente, os animais foram subdivididos em 4 grupos de tratamento, cada grupo contendo 20 animais (10 normais e 10 diabéticos), tratados uma vez ao dia, diariamente. O tratamento foi feito com gel de Natrosol (Pharma Terra), usado de forma isolada ou com a adição de outros elementos.

Os experimentos foram realizados por grupos isolados, e quando ocorria o sacrifício o próximo grupo de tratamento iniciava-se, subsequentemente.

Controle – gel puro

Grupo 1 – gel com enoxaparina livre (2 mg/g gel)

Grupo 2 – gel com nanopartículas vazias (2 mg/g gel)

Grupo 3 - gel com nanopartículas contendo enoxaparina (2 mg/g gel)

3.4.2. Procedimento com animais

A indução do diabetes tipo I foi feita com estreptozotocina (STZ). Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas para aplicação de STZ (58 mg/Kg) em veia caudal e, após a aplicação permaneceram por mais 2 horas sem dieta e água. Após 4 dias da aplicação de STZ foi feita a confirmação do diabetes (glicemia capilar > 250 mg/dL) (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Então, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (75 mg/kg) (Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil) intramuscular. Os animais foram colocados em decúbito ventral e, após tricotomia da região dorsal, foi feita uma lesão no tamanho de 1 cm² de formato quadricular com auxílio de uma pinça dente de rato e uma tesoura, na linha mediana da região dorsal. Os procedimentos de indução de úlcera de pele e de avaliação do processo cicatricial (avaliação macroscópica, bioquímica, e técnicas histológicas) foram definidos através de revisão da literatura, e orientação do grupo de pesquisa da Dra Andréa Monte-Alto-Costa, do Laboratório de Reparo Tecidual (LRT) do Departamento de Histologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Essa colaboração foi muito importante, visto a extensa experiência desse grupo na área de cicatrização em modelos animais, evidenciada por inúmeras publicações (Amadeu e Costa, 2006; Amadeu *et al.*, 2008; Romana-Souza *et al.*, 2008 e 2009).

Uma vez ao dia, nos grupos em que havia necessidade, o gel contendo as diferentes formulações foi aplicado na lesão, na quantidade suficiente para recobrir totalmente a mesma, sem nenhum outro material ou cobertura. Os animais do grupo controle

receberam apenas o gel puro. Foi estipulada através de testes de padronização a concentração de 2% do gel Natrosol (Pharma Terra). Quando foi utilizada a dispersão de nanopartículas, a concentração foi de 2 mg de enoxaparina / g de gel.

O acompanhamento macroscópico do processo de cicatrização das lesões foi feito pela avaliação da taxa de contração da úlcera. Para fazer as medidas, com o animal anestesiado com isoflurano, foi colocado um plástico transparente (celofane) sobre as úlceras dos animais e foram traçadas as margens da lesão nos dias 0, 4, 7 e 10. Este plástico foi escaneado e as lesões tratadas utilizando o Adobe Photoshop Cs3 Extended. Após o tratamento, o desenho das lesões foi analisado pelo software Image J, para cálculo da área. Esta área é corrigida em cm^2 e passada em porcentagem, através de regra de três: o dia 0 corresponde à 100% da área da lesão e o dia 4 (ou 7 ou 10) corresponde à X (Souza *et al.*, 2006; Nascimento e Costa, 2006). A figura 6 evidencia como foram feitas as medidas. A medida da contração da úlcera é feita através da delimitação da área não-reepitelizada (figura 6c). Estas medidas são expressas em porcentagem e desvio-padrão.

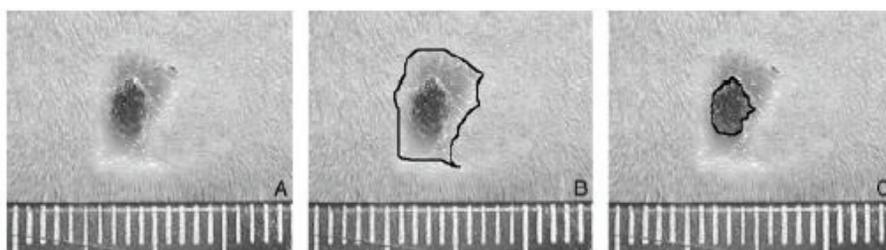


Figura 6: Avaliação da contração da úlcera com 14 dias de evolução. A) foto original da área ulcerada; B) área total da úlcera; C) área não-reepitelizada (Otranto *et al.*, 2010).

Após 10 dias da aplicação tópica do gel, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e foi extraída a pele e sangue para avaliação histológica, bioquímica e toxicidade.

3.4.3. Avaliação histológica e imunoistoquímica da pele

As amostras de tecido (área ulcerada) foram divididas em 3 partes para que se pudesse avaliar o processo de cicatrização. De cada grupo de tratamento, contendo 20 animais, a área ulcerada junto com a pele adjacente de 8 foi utilizada para análise histológica e imunoistoquímica, área crostosa de 6 foi utilizada para dosagens bioquímicas e de outros 6 a área crostosa foi utilizada para dosagem de hidroxiprolina. Para a coloração e imunoistoquímica, as amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 10% e, embebidos em parafina. Após a desidratação do tecido e impregnação com parafina, eles foram cortados na espessura de 4-6 μm e corados com HE.

A coloração de HE foi utilizada para verificar: a presença ou ausência de crosta, se a mesma apresentava-se espessa ou não espessa, se havia ou não grãos bacterianos, a reepitelização excipiente ou não excipiente, epiderme delgada ou espessa, e presença ou ausência de granuloma. A reepitelização excipiente caracteriza-se pela descontinuidade da epiderme quando visualizada nas lâminas.

Os cortes também foram colocados em lâminas silanizadas para a realização da imunoistoquímica, onde foi avaliada a quantidade de macrófagos, vasos e miofibroblastos na área da lesão. Para marcar macrófagos foi utilizado o anticorpo anti-CD68 monoclonal (Abicam) e para marcar vasos e miofibroblastos foi utilizado o anticorpo α -actina de músculo liso clone 1A4 (DBS). A imunoistoquímica foi realizada por meio da técnica de recuperação antigênica por calor, e contra corados com hematoxilina.

As lâminas foram colocadas na cubeta resistente ao calor com tampão citrato 3 em 1 pH=6,0 e posicionada no centro da panela de pressão contendo 500 mL de água destilada, onde ela atingiu 125°C por 30 segundos. Posteriormente, foi feita a lavagem

das lâminas com água destilada e com tampão de lavagem TBS Tween. As lâminas foram secas com papel higiênico ao redor dos cortes e foi circulado cada corte com uma caneta contendo tinta hidrofóbica e colocadas na câmara úmida onde foi aplicado o bloqueador de peroxidase endógena sobre os cortes e foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Durante esta incubação foi feita a diluição do anticorpo primário com diluente de anticorpo (Spring), de acordo com a tabela a seguir (tabela 2). Para cada corte, dependendo do tamanho são utilizados 100-150 μL da diluição do anticorpo, e a diluição do anticorpo também foi padronizada até achar um valor ideal de acordo com a indicação do fabricante.

Tabela 2: Exemplo de diluição dos anticorpos

Cortes e diluição	Diluente	Anticorpo
2 cortes (1:100)	200 μL	2 μL
2 cortes (1:200)	200 μL	1 μL

Após 20 minutos, as lâminas foram lavadas e secas, e foi adicionado o anticorpo primário diluído e incubado por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas, secas e foi aplicado o polímero Nichirei e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, após a lavagem e secagem das lâminas, foi aplicado o DAB previamente diluído por 6 minutos. Então, as lâminas foram lavadas e coradas com hematoxilina por 20 segundos, e novamente lavadas com água corrente para retirar o excesso de hematoxilina. Foi feita a desidratação das mesmas com a passagem na sequência de alcoóis e xilóis: álcool 50%, álcool 70%, álcool 100%, xilol I e xilol II e foram confeccionadas utilizando o meio de montagem entellan e lamínula.

As estruturas marcadas foram quantificadas através de grades utilizando um microscópio acoplado a um computador (Nikon). A quantificação foi feita em 20 campos, sendo 10 do tecido de granulação superficial e 10 do tecido de granulação

profundo, utilizando a objetiva de 40x para quantificação de macrófagos e miofibroblastos e 20x para vasos. Como controle positivo e negativo da reação foi utilizado, conforme a bula do anticorpo, baço de rato para macrófagos; e para vasos e miofibroblastos foi utilizado músculo estriado esquelético; sendo que o controle negativo não utilizou o anticorpo primário.

3.4.4. Avaliação da toxicidade

Estas análises foram feitas para avaliar se as formulações ocasionavam algum dano hepático, renal ou hematológico. Neste caso, particularmente a plaquetopenia induzida pela enoxaparina.

Preparo das amostras: com o animal anestesiado com isoflurano, foi coletado o sangue por punção cardíaca – que foi depositado em tubos secos e contendo anticoagulantes EDTA ou citrato. O soro obtido no tubo seco foi alíquotado e congelado a -80 °C e, posteriormente foi utilizado para análise de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia e creatinina. A AST e a ALT foram feitas utilizando o método cinético (Kit Larborlab). A uréia foi analisada através do método cinético-colorimétrico (Kit Laborclin), e a creatinina foi mensurada através do método cinético (Kit Laborlab). O hemograma completo foi feito na amostra de sangue com EDTA no equipamento Cell Dyn 1700 ABBOT.

3.4.5. Análise da atividade anticoagulante

O plasma citratado dos animais foi utilizado para analisar a atividade anti-Xa, a fim de verificar a atividade anticoagulante da enoxaparina e absorção pelo seu uso tópico (Kit IEL- equipamento TOP 500).

3.4.6. Análises bioquímicas

No décimo dia após a realização da úlcera, o tecido sobre a crosta (sem pele adjacente) foi retirado de 6 animais de cada grupo (3 normais e 3 diabéticos), congelado em nitrogênio líquido, e estocado em freezer a -80°C . Posteriormente, o tecido sobre a crosta foi macerado no agitador mecânico (Novatécnica) com tampão fosfato de potássio e EDTA (KPE), e o líquido macerado foi retirado e centrifugado a $230 \times g$ a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante do macerado do tecido sobre a crosta e o plasma dos animais foram utilizados para realizar análises bioquímicas, como dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976), avaliação do estresse oxidativo através dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) mensurada pela metodologia de Yagi (1987), e a dosagem de nitrito através da reação de Griess (Green *et al.*, 1982).

O sangue total foi centrifugado a $500 \times g$ e lavado três vezes com uma solução gelada de tampão fosfato $0,1\text{M}$ $\text{pH}=7,4$ e diluído 1:1 (v/v) com água destilada para provocar a hemólise, com posterior armazenamento a -80°C para análise da catalase (CAT), através da metodologia de Aebi (1984).

3.4.6.1. Dosagem de proteínas totais

As amostras e o padrão de albumina [$1,0 \text{ mg/mL}$] foram descongeladas no gelo. A curva padrão de albumina foi preparada, variando-se as concentrações de 0 a $10 \mu\text{g}$ de albumina/poço; foram transferidos $20 \mu\text{L}$ de cada concentração para cada cavidade da placa de 96 poços, sendo que cada concentração da curva e cada amostra foram realizadas em triplicata. As amostras foram diluídas em água destilada de acordo com o tipo: plasma ou macerado de tecido sobre a crosta. O plasma foi diluído 1:40 e o macerado de tecido sobre a crosta foi diluído 1:10, e adicionados $20 \mu\text{L}$ por cavidade. Após adição de $180 \mu\text{L}$ da solução de Bradford em todos os poços e homogeneização,

fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. A partir da curva padrão foram calculados os valores de proteínas presentes nas amostras. O resultado foi expresso em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.4.6.2. Dosagem de TBARS

Este é um método utilizado para avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsossomos. O MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo, lido em espectrofotômetro a 532 nm.

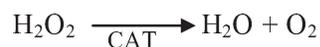
As amostras foram descongeladas e foi preparada a curva padrão de malondialdeído, variando de 0 a 100 μmol . Num eppendorf foi então colocado 200 μL do lisado do tecido ou 50 μL do plasma diluído em 150 μL de tampão KPE e foi adicionado 200 μL de ácido tricloroacético (10%) em cada eppendorf. Após centrifugação a 2200 g por 15 minutos, foram coletados 300 μL do sobrenadante em outro eppendorf, e adicionado 300 μL de TBA. Os eppendorfs foram furados na tampa e colocados em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Após este tempo eles foram deixados à temperatura ambiente para esfriar, e foram transferidos 150 μL de cada amostra e curva para um cavidade da placa de 96 poços, sendo que o teste foi feito em duplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm. A partir da curva padrão foram calculados os valores da concentração de MDA presentes nas amostras. Os resultados foram expressos em concentração de MDA (nM/mg de proteína).

3.4.6.3. Dosagem de nitrito

Dosagem indireta de óxido nítrico (NO). Inicialmente foram preparadas as soluções para a curva padrão feita com nitrito de sódio (NaNO₂), e a curva teve as concentrações variando de 0,1 a 100 µM/100 µL. As soluções 1 e 2 previamente preparadas foram descongeladas sobre a bancada. A solução 1 é de sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% e a solução 2 consiste em naftiletlenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5%. As amostras foram descongeladas em gelo. Pipetou-se 100 µL da amostra em cada cavidade da placa de 96 poços, sendo que esta análise foi feita em duplicata. Após adição de 50 µL da solução 1 em todos os poços da placa e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente no *shaker* lento, adicionou-se 50 µL da solução 2 em todos os poços da placa. Após homogenização, foi feita leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A partir da curva padrão foi calculada a concentração de nitrito presente na amostra, e os resultados expressos em µmol de NO₂/µg de proteína.

3.4.6.4. Atividade da catalase

O preparo da amostra inicia-se com a adição de 900 µL de tampão fosfato (pH 7,4) a 100 µL do hemolisado. Deste hemolisado já diluído, 1 µL foi adicionado ao meio básico da reação contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM. A medida da atividade da catalase (CAT) ocorre através da velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da enzima, provocando uma diminuição no valor da absorbância em 240 nm. A diferença na leitura das absorbâncias em um determinado intervalo de tempo (15 segundos) permite a determinação da velocidade da reação enzimática pela CAT:



O cálculo da atividade da catalase foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t).(a.b).(\log A1/A2)$, onde Δt é a variação do tempo de reação (15 s), a é o volume do hemolisado na cubeta, b é a concentração de hemoglobina da amostra em g/dL, $A1$ é o valor da absorbância no tempo zero ($t=0$) e $A2$ é o valor da absorbância no tempo final ($t=15$ s). A unidade final expressa-se em k/gHb/min.

3.4.6.5. Dosagem de hidroxiprolina

No décimo dia após a realização da úlcera, foi retirada de 6 animais de cada grupo de tratamento a área crostosa para dosagem de hidroxiprolina, seguindo o protocolo de Woessner (1961).

Inicialmente deve-se fazer a desidratação e retirada dos lipídeos da amostra. Para isto, no fragmento de pele com a crosta foram adicionados 2 mL de acetona PA por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, a acetona foi descartada e o fragmento de pele foi cortado em fragmentos de 1x1 mm, e foram adicionados 2 mL de acetona PA por mais 24 horas. A acetona foi descartada e foram adicionados 2 mL de uma mistura de clorofórmio-etanol (1:1) por 48 horas, trocando a mistura a cada 12 horas. Após este período, foi descartada a mistura, e as amostras foram secas em estufa a 60°C por 1 hora. Os fragmentos secos foram pesados e identificados para seguimento da análise.

Posteriormente, na etapa de hidrólise e neutralização, os fragmentos foram transferidos para um tubo de ensaio com rosca, e foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico (HCl) 6M aos tubos. Os tubos foram colocados em estufa entre 110-120°C por 18 horas. Após este período, foram adicionados 5,7 mL de água destilada aos tubos, e 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 6M ao tubo. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e centrifugados a 630 x g por 15 min, e o sobrenadante foi transferido para eppendorfs, e

congelado a -20 °C.

O padrão utilizado para esta análise foi uma solução de hidroxiprolina (2500 ng/ μ L), previamente preparada e congelada. Para o teste, as amostras e o padrão são descongelados sobre a bancada e é feita a curva padrão variando a concentração de hidroxiprolina de 0 a 10 ng. As amostras foram diluídas em água 1:10 e homogeneizadas no vórtex, foram transferidos 80 μ L das amostras para cada cavidade da placa de 96 poços, sendo que o teste foi feito em triplicata. Depois foram adicionados 40 μ L de cloramina T 0,05 M em todos os poços, e homogeneizados levemente no *shaker* por 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 40 μ L de ácido perclórico 3,15 M em todos os poços, e homogeneizados novamente no *shaker* por 5 minutos. Por fim, foram adicionados 40 μ L de 4-DABaldeído 20% em todos os poços, homogeneizados no *shaker*, e incubados em estufa a 60°C por 20 minutos. A placa foi resfriada em temperatura ambiente, e lida em espectrofotômetro a 550 nm. A partir da curva padrão foram calculados os valores da concentração de hidroxiprolina presentes nas amostras. Seus resultados foram expressos em ng hidroxiprolina/mg de tecido.

3.5. Análise Estatística

Análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas.

Para comparar os parâmetros em cada grupo entre os tratamentos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). Devido ao tamanho da amostra foi aplicada a transformação por postos (ranks) nas variáveis respostas.

Para verificar a relação entre o tamanho da úlcera final e a dosagem de colágeno foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Spearman. Este coeficiente varia de -1 a 1. Valores próximos dos extremos indicam correlação negativa ou positiva,

respectivamente e valores próximos de zero não indicam correlação.

Para comparar 2 variáveis numéricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p \leq 0,05$).

O programa computacional utilizado para as análises foi o SAS System for Window (Statistical Analysis System), versão 9.2. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação das nanopartículas poliméricas recobertas com quitosana na encapsulação de enoxaparina

O método de dupla emulsão A/O/A e evaporação do solvente foi escolhido em função da hidrofiliabilidade da enoxaparina. Este método foi padronizado para a encapsulação de enoxaparina em PCL. O recobrimento das nanopartículas de PCL por quitosana foi realizado para obter partículas mucoadesivas e para aumentar a eficiência de encapsulação da enoxaparina.

4.2. Caracterização das partículas

4.2.1. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As nanopartículas com e sem enoxaparina foram avaliadas por microscopia de força atômica como mostram as figuras a seguir (figuras 7 A e B). Nestas imagens é possível observar partículas esféricas e relativamente homogêneas. A encapsulação da enoxaparina não alterou a morfologia das partículas.

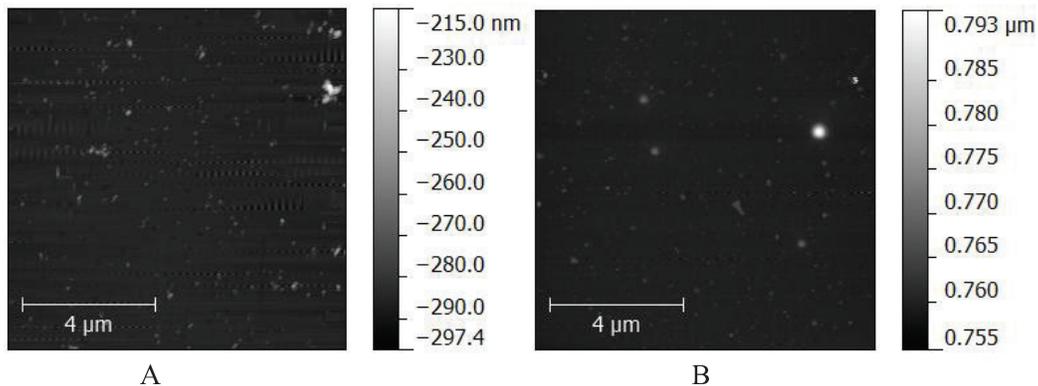


Figura 7: Imagens de AFM das amostras de nanopartículas com enoxaparina (A) e vazias (B).

4.2.2. Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas, potencial Zeta e estabilidade

Os valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade (PDI), potencial Zeta das formulações produzidas e seus respectivos desvios-padrão estão descritos na tabela seguinte (tabela 3).

Tabela 3: Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial Zeta das nanopartículas de PCL / quitosana / enoxaparina em 3 amostras.

Dispersão de partículas	Média do Diâmetro (nm)	Desvio-padrão Diâmetro	Média do Índice de PDI	Desvio-padrão PDI	Média do Potencial Zeta (mV)	Desvio-padrão Potencial Zeta
Nanopartícula vazia (PCL 3:1)	487,2	45,4	0,347	0,052	28,1	3,59
Nanopartícula vazia (PCL 3:0,5)	491,8	39,7	0,357	0,031	25,3	5,15
Nanopartícula com enoxaparina encapsulada (PCL 3:1)	539,4	25,0	0,417	0,037	24,4	4,25
Nanopartícula com enoxaparina encapsulada (PCL 3:0,5)	496,7	41,6	0,369	0,033	20,4	2,98

O índice de polidispersidade avalia a homogeneidade da dispersão, desta forma, quanto mais próximo do zero, mais homogênea é a dispersão. Os valores encontrados nas dispersões são considerados médios, mas já esperados em formulações contendo quitosana, por ser um polímero de cadeia aberta que fica na superfície da partícula, aumenta o seu tamanho, índice de polidispersidade e confere uma carga superficial positiva, evidenciando o recobrimento das partículas com o biopolímero.

Apesar dos valores mostrados não apresentarem uma variação significativa, foi escolhida a preparação contendo metade da quantidade de quitosana (PCL 3:0,5 quitosana) para a continuidade do projeto, pois apresentaram diâmetro menor e estabilidade durante 90 dias, conforme evidenciado nas figuras a seguir (figuras 8-11), onde se verifica a pequena variação do tamanho, potencial Zeta e PDI nas amostras durante os dias testados. Esta alta estabilidade das nanopartículas pode ser atribuída a quitosana já que, polímeros catiônicos, como a quitosana, possuem grande densidade e alto peso molecular, e agem como estabilizantes eletrostáticos e esféricos, prevenindo a agregação das partículas (Sun *et al.*, 2012).

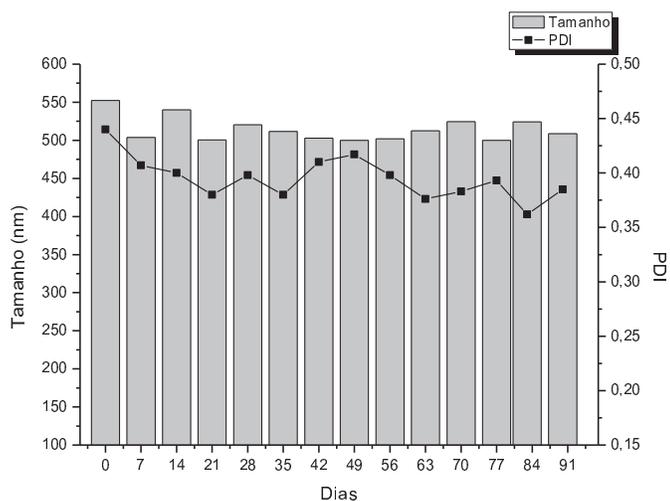


Figura 8: Gráfico de estabilidade das nanopartículas contendo enoxaparina.

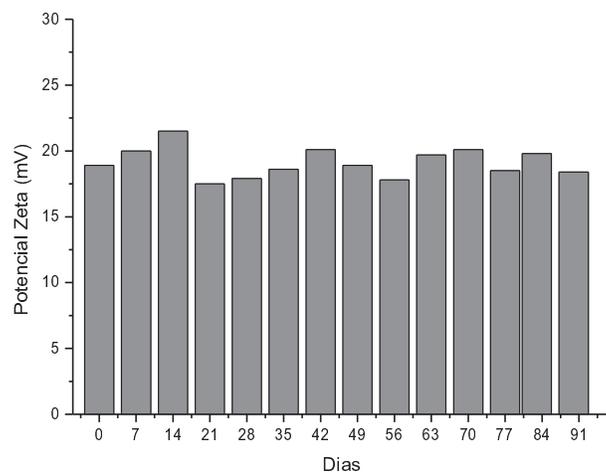


Figura 9: Gráfico do potencial Zeta das amostras de nanopartículas contendo enoxaparina nos diferentes dias testados.

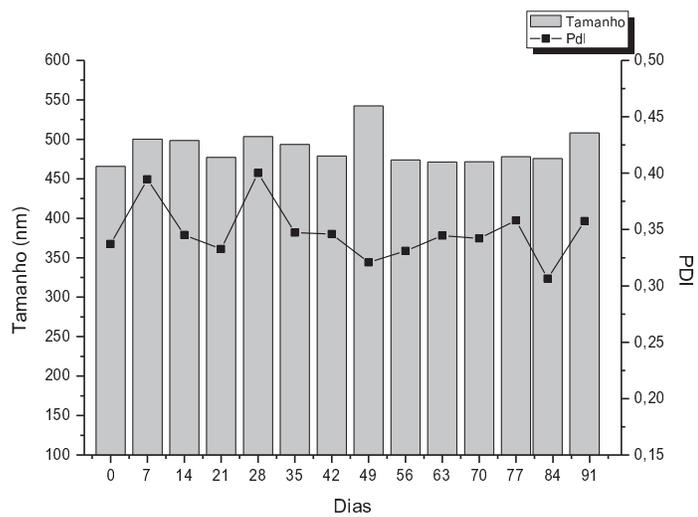


Figura 10: Gráfico de estabilidade das nanopartículas vazias.

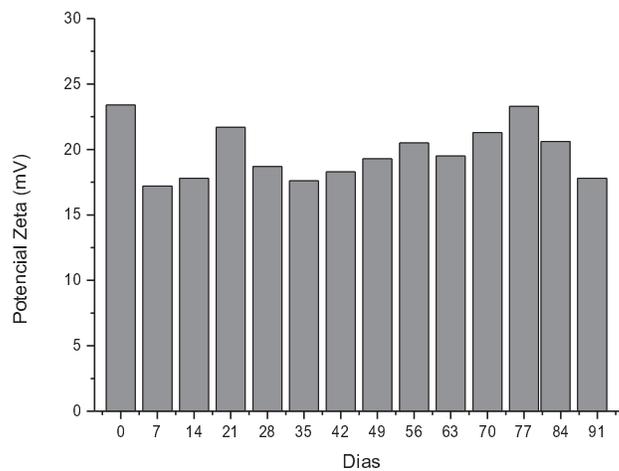


Figura 11: Gráfico do potencial Zeta das amostras de nanopartículas vazias nos diferentes dias testados.

4.2.3. Eficiência de encapsulação

Inicialmente, foi avaliado se os componentes da formulação de nanopartículas (PVA e NaCl) interfeririam no método analítico escolhido, isto é, se estes componentes apresentavam absorvância no comprimento de onda de 500 nm. Entretanto, estes componentes não apresentaram absorção neste comprimento de onda, demonstrando que o comprimento de onda escolhido para determinação da eficiência de encapsulação da enoxaparina foi adequado.

A curva de calibração da enoxaparina foi realizada pelo método colorimétrico Azure II, obtendo-se a curva demonstrada na figura 12, cuja equação da reta foi: $Y = 0,00172 + 0,02311 X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,999.

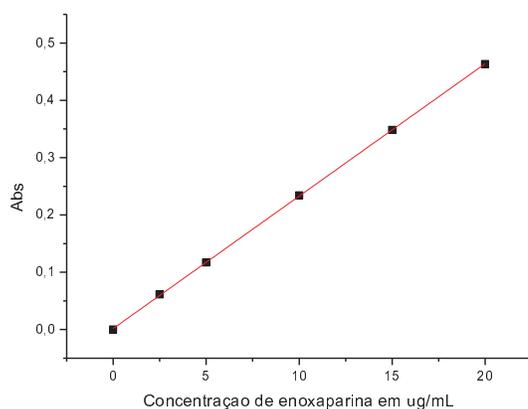


Figura 12: Curva de calibração da enoxaparina obtida pelo método colorimétrico Azure II.

A partir da curva de calibração construída foi calculada a eficiência de encapsulação (EE) das partículas preparadas. A EE foi acompanhada por até 48 horas, onde pode ocorrer uma variação significativa deste valor. Em todas as formulações preparadas a EE ficou em torno de 98%, não havendo variação deste valor nas primeiras 48 horas. Este valor elevado deve-se ao fato do método de dupla emulsão ser adequado para fármacos hidrofílicos, e também do uso do sal NaCl que aumenta a força iônica do meio alterando o gradiente osmótico e, portanto, diminuindo a migração da enoxaparina para a fase aquosa externa (Peltonen *et al.*, 2004). Além disso, uma alta EE foi obtida devido ao uso do biopolímero quitosana que, por apresentar um caráter hidrofílico, aumenta a interação enoxaparina-polímero.

4.3. Ensaio *in vitro* – teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade mostrou que a enoxaparina livre apresentou toxicidade em fibroblastos (3T3) quando avaliado por MTT (42,5% de toxicidade na concentração de 100 µM), como observado na figura 13. Entretanto, quando a enoxaparina foi encapsulada em nanopartículas, sua toxicidade diminuiu significativamente (5% de

toxicidade na concentração de 100 μM) ($p=0,0095$). Este resultado evidencia o efeito protetor da encapsulação do fármaco, permitindo obter formulações mais seguras.

A figura 14 mostra a viabilidade celular quando as células foram expostas as nanopartículas vazias. Nesta figura observa-se que as nanopartículas vazias não apresentaram toxicidade até a máxima concentração testada, demonstrando que são interessantes sistemas carreadores de fármacos.

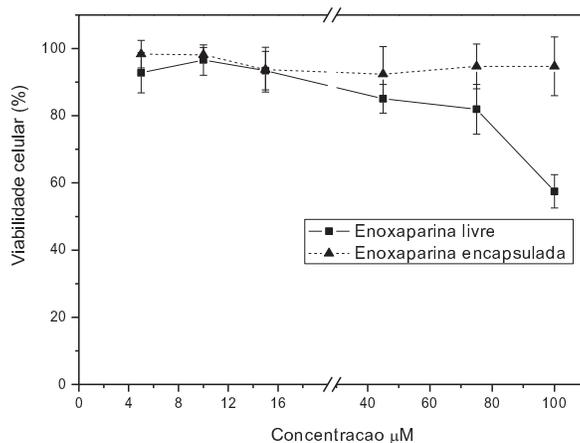


Figura 13: Gráfico de viabilidade em células 3T3 com marcador celular MTT de enoxaparina livre e encapsulada.

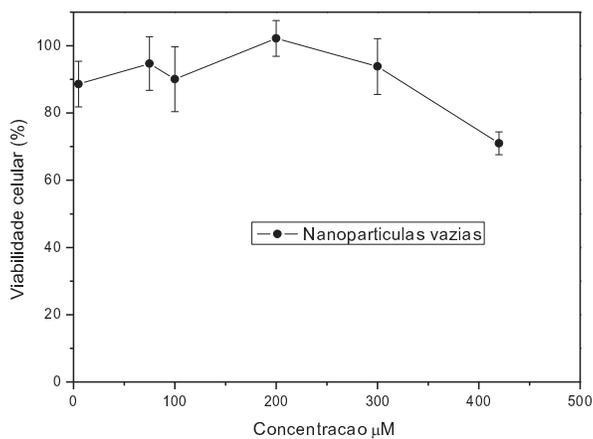


Figura 14: Gráfico de viabilidade em células 3T3 com marcador celular MTT de nanopartículas vazias.

4.4. Avaliação *in vivo*

4.4.1. Indução de diabetes

Para a indução do diabetes seguiu-se o modelo de Reagan-Shaw (2008). Todos os animais testados apresentaram a doença, que foi confirmada pela glicemia capilar após 4 dias da aplicação de estreptozotocina em veia caudal, sendo obtido um valor de glicemia acima de 250 mg/dL. A glicemia dos animais um dia antes da indução foi medida obtendo-se um valor médio de 134 mg/dL \pm 15,68. Verificou-se uma alteração significativa, com um valor médio de glicemia de 429 mg/dL \pm 67,89, após 4 dias da aplicação do fármaco. Para verificar se houve reversão do quadro de diabetes tipo I na dose aplicada durante o experimento (58 mg/kg) foram realizadas medidas de glicemia e peso dos animais a cada 3 ou 4 dias, até o final do experimento. Além disso, a quantidade de comida e água administrada aos animais foi controlada. Verificou-se que não houve a reversão do diabetes, sendo que os animais apresentaram uma glicemia bem elevada e os sinais de polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso ficaram evidentes. A figura 15 evidencia seus valores médios e desvios-padrão.

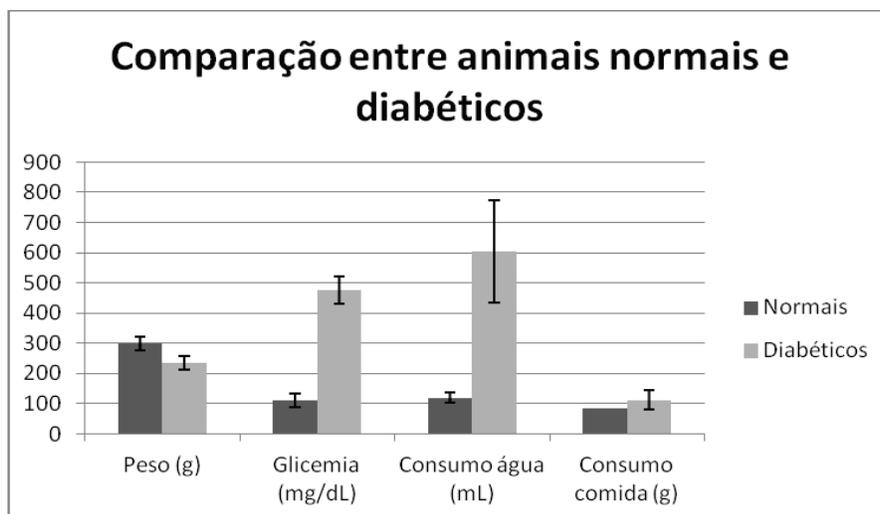


Figura 15: Comparação de peso, glicemia, consumo de água e ração entre os animais normais e diabéticos durante os dias do experimento (10).

4.4.2. Avaliação macroscópica das úlceras

A avaliação macroscópica feita no dia 4 através do teste ANOVA, mostrou que os animais que foram submetidos ao tratamento tiveram uma diminuição no tamanho da úlcera, sendo que o grupo controle tanto nos animais normais quanto diabéticos apresentaram o tamanho da úlcera significativamente maior (animais normais $p=0,0367$ e diabéticos $p=0,0033$) do que os animais tratados com gel contendo nanopartículas vazias (G2).

A figura 16 evidencia o tamanho da lesão nos diferentes grupos de tratamento entre animais normais e diabéticos no quarto dia após a realização das úlceras.

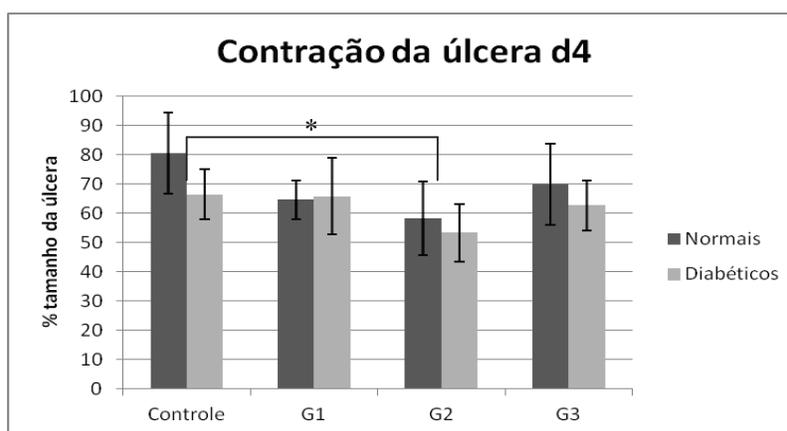


Figura 16: Porcentagem do tamanho da úlcera dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento no dia 4 (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina). O * evidencia diferença significativa entre os grupos.

A avaliação macroscópica feita no dia 7 evidenciou que os animais diabéticos apresentavam uma úlcera maior que os normais em quase todos os grupos de tratamento. Além disso, nos animais diabéticos, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2) apresentou o menor tamanho de úlcera, sendo significativo quando comparado ao grupo controle ($p=0,0003$) e grupo tratado com gel contendo enoxaparina livre (G1) ($p=0,0003$), conforme ilustrado na figura 17. Dentre os animais

normais não houve significância ($p=0,0783$).

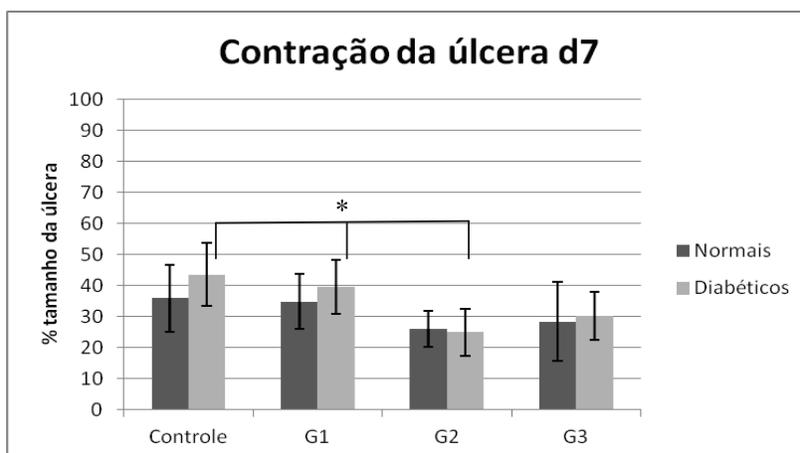


Figura 17: Porcentagem do tamanho da úlcera dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento no dia 7 (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina). O * evidencia diferença significativa entre os grupos.

A avaliação macroscópica do dia 10 evidenciou novamente que os animais diabéticos apresentavam úlceras maiores, e que o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2) apresentou o menor tamanho de úlcera, sendo que nos animais diabéticos, este valor foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($p= 0,0315$) e ao grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) ($p=0,0205$), conforme ilustrado na figura a seguir (figura 18). Em relação aos animais normais, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2) apresentou uma úlcera significativamente menor do que o grupo controle ($p=0,0433$) e do que o grupo tratado com gel contendo enoxaparina livre (G1) ($p=0,0145$). Além disso, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) apresentou uma úlcera significativamente menor do que o tratado com gel com enoxaparina livre (G1) ($p=0,0180$), isto está evidenciado na figura 18.

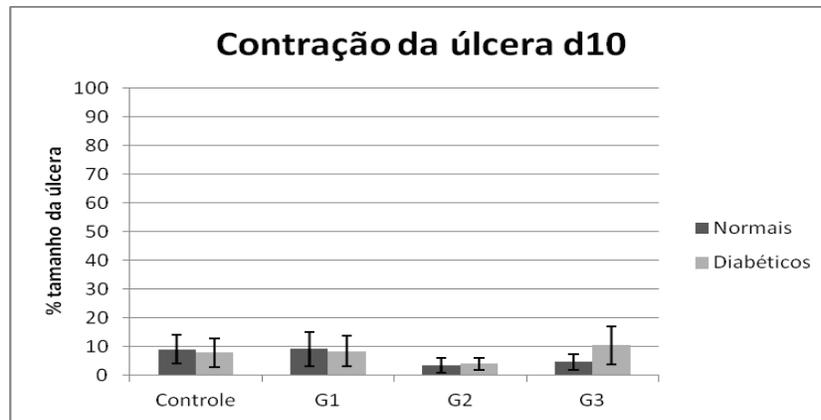


Figura 18: Porcentagem do tamanho da úlcera dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento no dia 10 (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

As figuras a seguir mostram o acompanhamento da diminuição do tamanho da úlcera em animais normais de todos os grupos de tratamento (figuras 19-22).

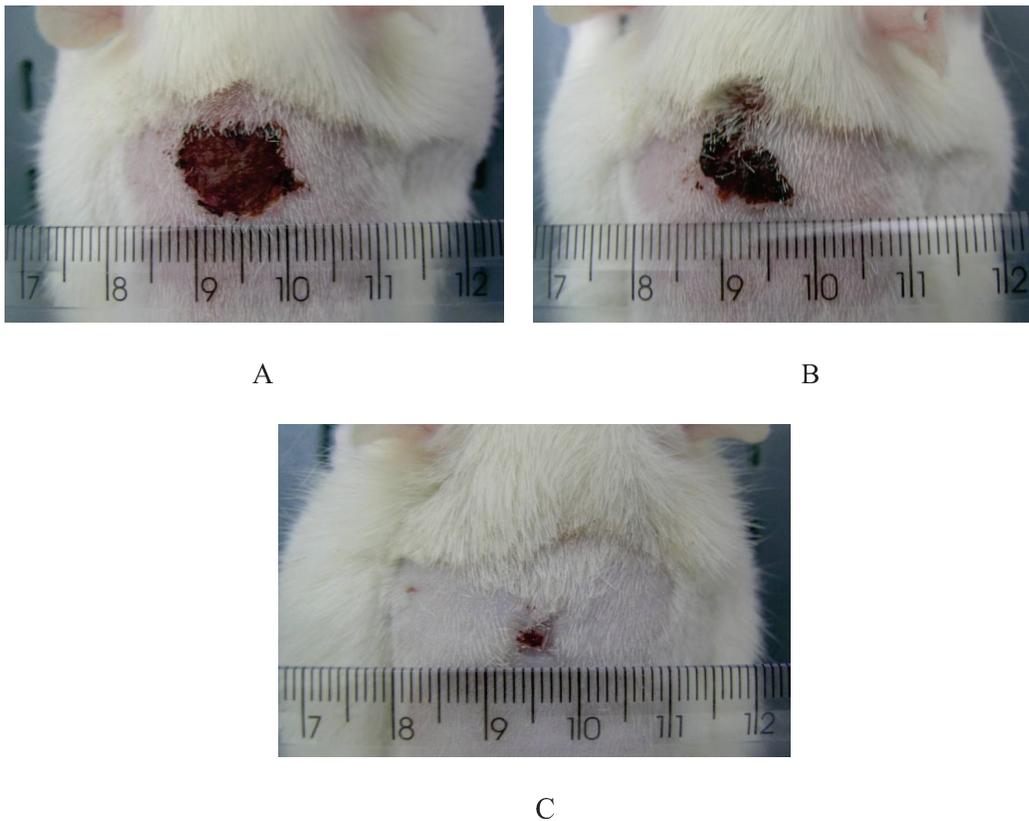
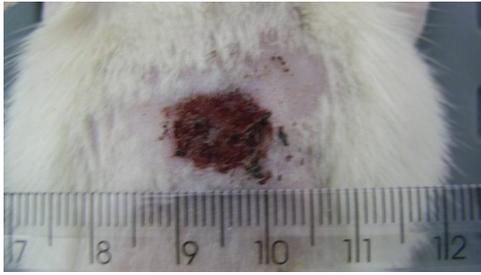
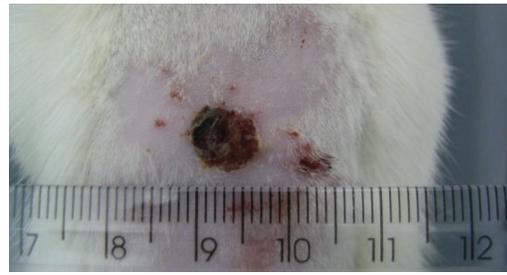


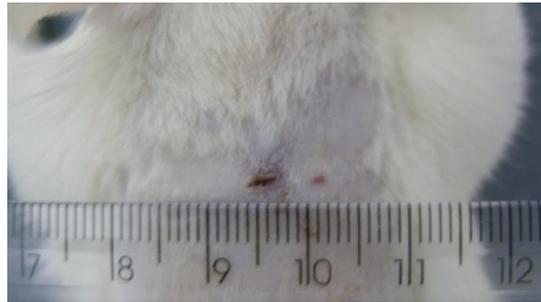
Figura 19: Fotos de um animal normal do grupo controle tratado com gel puro; A) 4 dias (d4); B) 7 dias (d7); C) 10 dias (d10) após a realização da úlcera.



A



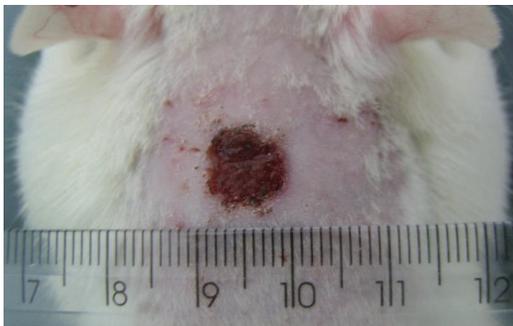
B



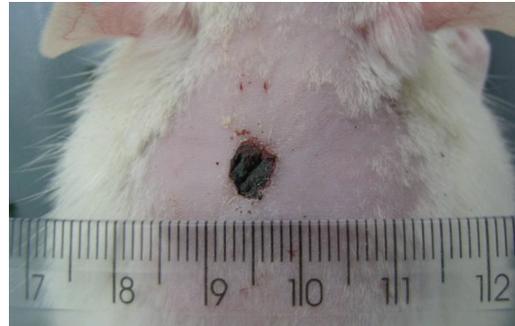
C

Figura 20: Fotos de um animal normal do grupo 1 tratado com gel com enoxaparina livre (2mg/g gel);

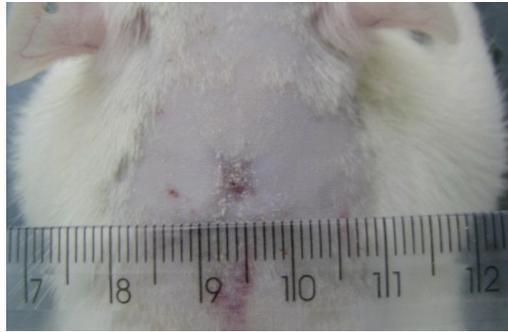
A) 4 dias (d4); B) 7 dias (d7); C) 10 dias (d10) após a realização da úlcera.



A



B

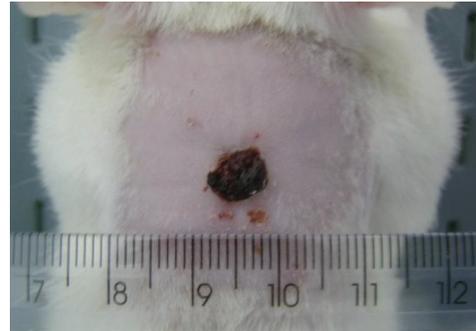


C

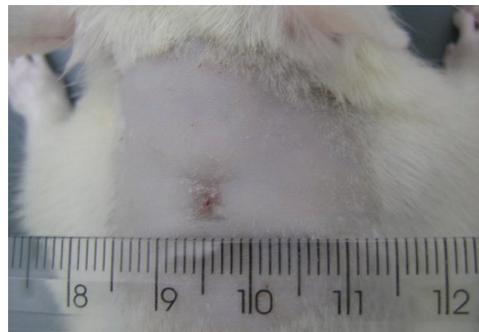
Figura 21: Fotos de um animal normal do grupo 2 tratado com gel contendo nanopartículas vazias (2mg/g gel); A) 4 dias (d4); B) 7 dias (d7); C) 10 dias (d10) após a realização da úlcera.



A



B



C

Figura 22: Fotos de um animal normal do grupo 3 tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (2mg/g gel); A) 4 dias (d4); B) 7 dias (d7); C) 10 dias (d10) após a realização da úlcera.

Analisando os resultados, pode-se perceber que os animais que foram submetidos ao tratamento obtiveram uma diminuição do tamanho da úlcera, visto que o grupo controle apresentou valores maiores do que os outros grupos de tratamento em todos os dias avaliados.

O menor tamanho da úlcera do grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias deve estar relacionado ao efeito bactericida e cicatricial da quitosana, presente nesta formulação.

Com relação à coagulação e cicatrização, apesar dos trabalhos na literatura citarem o fibrinogênio e fibrina como fundamentais na cicatrização (Laurens *et al.*, 2006), e criticarem o uso de anticoagulantes para o tratamento de feridas, neste trabalho não se verificou um efeito negativo do uso tópico de enoxaparina, mesmo após um aumento de 5 vezes da concentração inicial utilizada neste estudo em relação a avaliação macroscópica das úlceras. Por outro lado, também não foi verificado um efeito significativamente benéfico da enoxaparina livre ou encapsulada, quando comparado ao grupo controle.

4.4.3. Avaliação histológica e imunoistoquímica da pele

4.4.3.1. Hematoxilina-eosina

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina apresentaram os seguintes resultados:

A) Grupo controle – tratado com gel puro

A.1.) Animais normais: em todas as lâminas analisadas houve a presença de crosta, 75% não espessa, e com ausência de grãos bacterianos. Em 75% a reepitelização apresentou-se excipiente. Em 100% das lâminas a epiderme apresentou-se delgada e com ausência de granuloma.

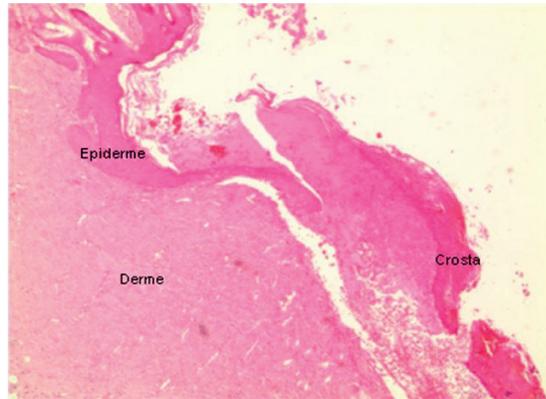


Figura 23: Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais normais tratados com gel puro (controle).

A.2.) Animais diabéticos: em todas as lâminas houve a presença de crosta, sendo 50% espessa, e com a presença de grãos bacterianos. A reepitelização apresentou-se excipiente em 75% das lâminas. Todas as lâminas apresentavam epiderme delgada e ausência de granuloma.

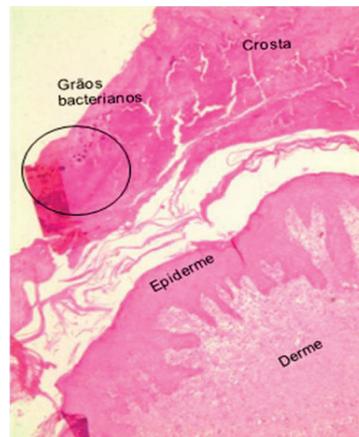


Figura 24: Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais diabéticos tratados com gel puro.

B) Grupo 1 – tratado com gel contendo enoxaparina livre (2 mg/g gel)

B.1) Animais normais: em 100% das lâminas analisadas houve a presença da crosta, em 75% a crosta apresentava-se espessa. Em 100% das lâminas houve a

presença de grãos bacterianos na crosta, epiderme delgada e granuloma. Em 75% observou-se reepitelização excipiente.

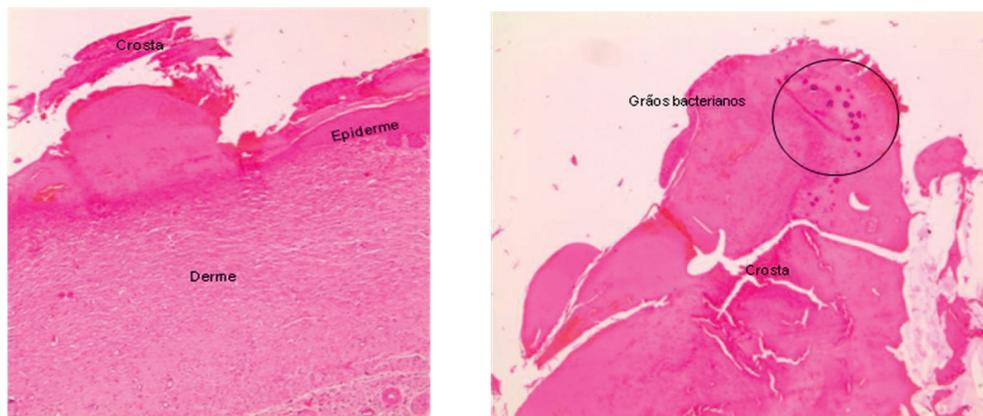


Figura 25: Fotos das lâminas coradas com HE evidenciando os resultados dos animais normais tratados com gel contendo enoxaparina livre (2mg/g gel).

B.2.) Animais diabéticos: em 100% das lâminas analisadas houve a presença de crosta não espessa, sendo que em 50% havia grãos bacterianos. A reepitelização apresentou-se excipiente nos animais em que a crosta não continha grãos bacterianos, e não excipiente nos animais que apresentavam grãos bacterianos na crosta. Observou-se epiderme delgada e a presença de granuloma em todas as lâminas.

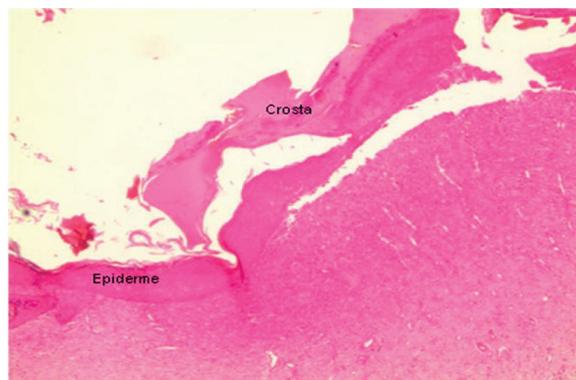


Figura 26: Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais diabéticos tratados com gel contendo enoxaparina livre (2mg/g gel).

Grupo 2 – tratado com gel contendo nanopartículas vazias (2mg/g gel)

C.1.) Animais normais e diabéticos: este foi o grupo mais homogêneo. Em todas

as lâminas verificou-se a presença de crosta não espessa (bem delgada), e ausência de grãos bacterianos. Em 75% das lâminas a reepitelização apresentou-se não excipiente (avançada). Em todas as lâminas a epiderme apresentou-se delgada, e com ausência de granuloma.

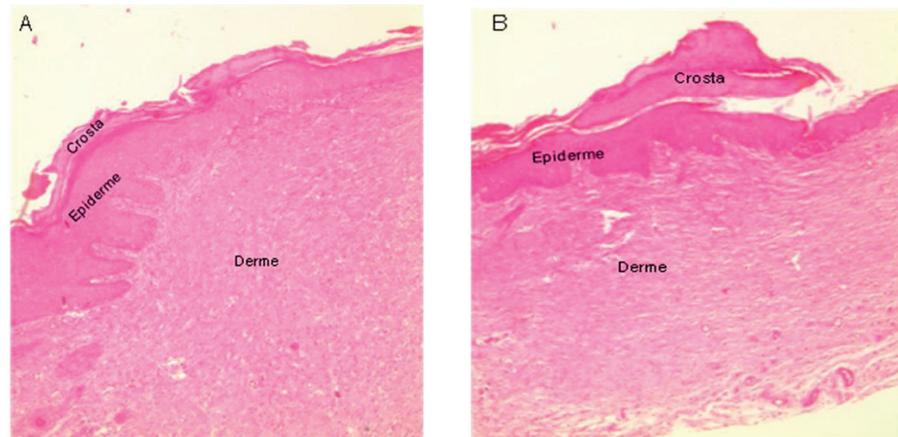


Figura 27: Fotos das lâminas coradas com HE evidenciando os resultados dos animais do grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (2mg/g gel); A) Normais; B) Diabéticos.

D) Grupo 3 – tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (2 mg/g gel)

D.1.) Animais normais: em todas as lâminas analisadas houve a presença de crosta, sendo 75% não espessa, com ausência de grãos bacterianos. Em todas as lâminas a reepitelização apresentou-se excipiente, epiderme delgada, e ausência de granuloma.

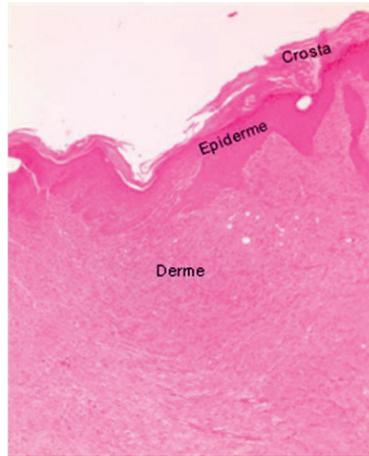


Figura 28: Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais normais tratados com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (2mg/g gel).

D.2.) Animais diabéticos: em todas as lâminas analisadas houve a presença de crosta, 75% não espessa, com presença de grãos bacterianos. Em 75% das lâminas a reepitelização apresentou-se excipiente. Em todas as lâminas a epiderme apresentou-se delgada, e com ausência de granuloma.

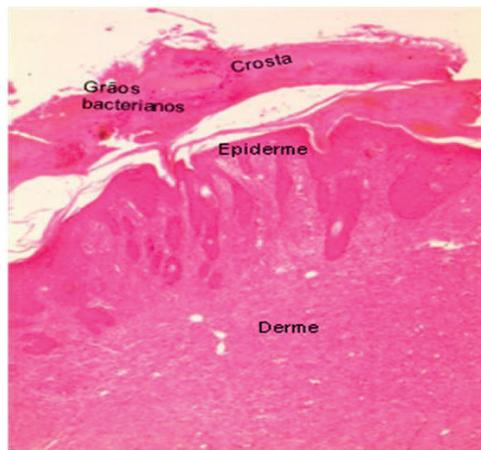


Figura 29: Foto da lâmina corada com HE evidenciando os resultados dos animais diabéticos tratados com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (2 mg/g gel).

Os resultados descritos anteriormente estão resumidos na tabela a seguir (tabela 4), sendo que os dados estão dispostos levando em consideração o que foi encontrado na maioria das lâminas (em porcentagem) de cada grupo analisado. Todos os animais apresentavam crosta e epiderme delgada. Os resultados observados com a adição da quitosana na superfície das nanopartículas vazias sugerem um efeito bactericida ou de prevenção de contaminação bacteriana. Este é um achado muito interessante, visto que a contaminação bacteriana pode dificultar ainda mais o processo de cicatrização, como comumente ocorre em úlceras cutâneas. Por outro lado, a enoxaparina presente nas nanopartículas, parece ter prejudicado esse efeito da quitosana.

Os achados histológicos deste estudo corroboram o efeito cicatricial da quitosana, já descrito no tratamento de feridas (Okamoto et al., 1992)

Tabela 4: Resultados das lâminas histológicas coradas com HE

Grupo	Animal	Crosta		Grãos bacterianos		Reepitelização		Granuloma	
		Espeça	Não espeça	+	-	Não excipiente	Excipiente	+	-
Controle	Normal		X		X			X	X
	Diabético	X	X	X				X	X
G1	Normal	X		X				X	X
	Diabético		X	X	X	X		X	X
G2	Normal		X		X	X			X
	Diabético		X		X	X			X
G3	Normal		X		X			X	X
	Diabético		X	X				X	X

“+” representa presença e “-” ausência (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

Não se pode fazer nenhuma hipótese de relação entre o tipo de alteração histológica presente na lâmina e a presença de um fator exclusivo, como por exemplo, quitosana, enoxaparina, gel, etc. Um dado interessante, é que os animais diabéticos apresentaram achados muito semelhantes aos observados nos animais normais. Talvez

o tempo de doença não tenha sido suficiente para promover alterações na microcirculação e sistema nervoso autônomo, que poderiam ter ocasionado diferenças entre os 2 grupos.

Em relação à presença de granuloma apenas no grupo 1, não podemos afirmar que esteja relacionado ao tipo de tratamento, pois o mesmo pode ter se formado em resposta a outros fatores presentes durante o período de experimentação, como a maravalha aderida à úlcera. Este fator não foi controlado, e portanto não se pode fazer uma correlação entre a presença do granuloma e resposta inflamatória à maravalha ou à enoxaparina.

4.4.3.2. Imunoistoquímica

As fotos apresentadas na figura 30 demonstram os controles positivo e negativo para macrófagos, identificados pelo anticorpo CD68, em baço de rato.

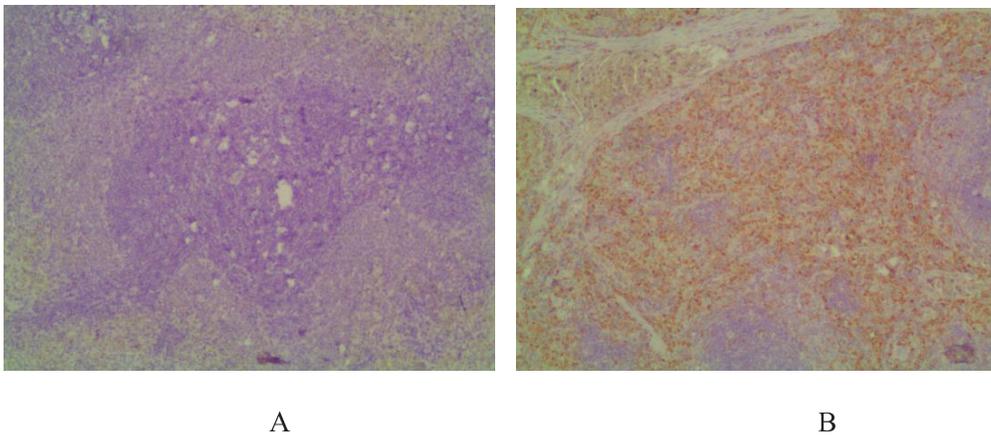
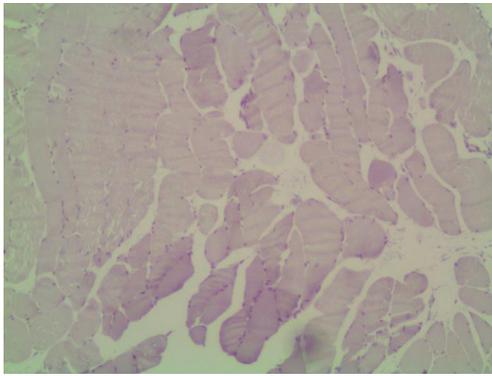
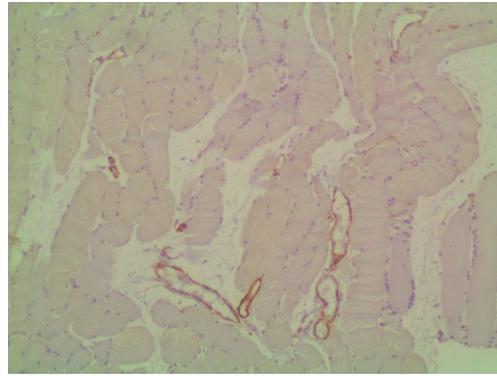


Figura 30: Fotos dos controles (baço de rato) utilizados para imunistoquímica x10; A) controle negativo; B) controle positivo.

A figura 31 demonstra os controles positivo e negativo para vasos e miofibroblastos, identificados pelo anticorpo α -actina de músculo liso, em músculo estriado esquelético.



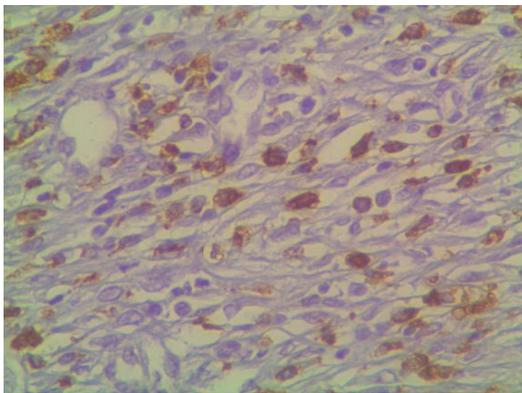
A



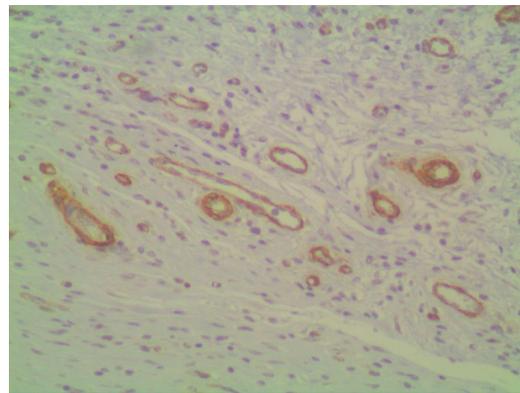
B

Figura 31: Fotos dos controles (músculo estriado esquelético) utilizados para imunistoquímica x10; A) controle negativo; B) controle positivo.

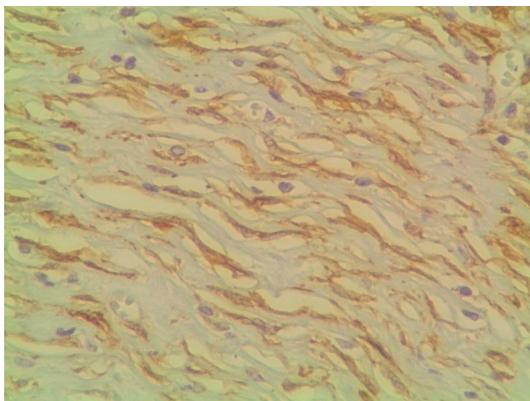
As imagens a seguir (figura 32) apresentam os macrófagos positivos identificados pelo anticorpo CD68, vasos e miofibroblastos identificados pelo anticorpo α -actina de músculo liso em maior aumento (40x).



A



B



C

Figura 32: Foto das lâminas de imunohistoquímica evidenciando as marcações obtidas através dos anticorpos utilizados x40; A) macrófagos marcados por CD68; B) vasos marcados por α -actina de músculo liso; C) miofibroblastos marcados por α -actina de músculo liso.

A quantificação de macrófagos pela imunohistoquímica demonstrou que os animais diabéticos apresentavam um maior número dessas células na área avaliada quando comparados aos normais, em quase todos os tipos de tratamento, com exceção do grupo tratado com gel contendo enoxaparina livre (2m/g gel) (figura 33). Outro achado foi a maior concentração de macrófagos no tecido de granulação superficial em relação ao tecido de granulação profundo.

Observou-se que o grupo tratado com enoxaparina livre (G1) apresentou o menor número de macrófagos na área avaliada. Em relação aos animais diabéticos, este grupo apresentou valores significativamente menores da quantidade de macrófagos quando comparados com o grupo controle e o grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) ($p < 0,0001$), e também quando comparado ao grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias ($p = 0,001$). Em relação aos animais normais, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias apresentou o maior número de macrófagos na área ulcerada, sendo este valor significativo quando comparado aos grupos tratados com gel com enoxaparina livre (G1) ($p = 0,0096$) e gel contendo

nanopartículas com enoxaparina (G3) ($p=0,0309$).

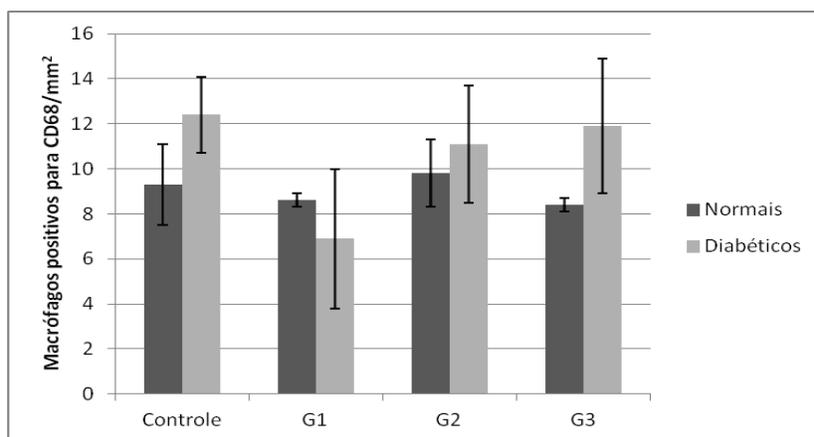


Figura 33: Gráfico da quantidade de macrófagos (identificados por CD68) na área da ulcerada, no décimo dia, em animais normais e diabéticos (Controle: gel puro; G1: gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

Estes resultados evidenciam o efeito anti-inflamatório da enoxaparina, oriundo do menor recrutamento destas células no local de injúria, e da intervenção no recrutamento de leucócitos da vasculatura para a área da injúria, como já descrito na literatura (Civelek *et al.*, 2007; Ravikumar *et al.*, 2006). Com estes achados, percebe-se que não houve uma relação entre o menor tamanho da úlcera e a quantidade de macrófagos, ou seja, a diminuição da resposta inflamatória não foi relacionada a uma melhor cicatrização em modelo de úlceras agudas, utilizadas neste estudo.

A quantificação de vasos sanguíneos pela imunoistoquímica evidenciou que os animais que receberam tratamento tiveram um aumento na quantidade de vasos sanguíneos, como representado na figura 34. Dentre os animais diabéticos, a análise estatística revelou que todos os grupos tratados apresentaram valores significativamente maiores do que o grupo controle: grupo tratado com enoxaparina livre (G1) ($p=0,0076$), grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) e vazias (G2) ($p<0,0001$). Em relação aos animais normais, o grupo

tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) apresentou valores significativamente elevados da quantidade de vasos sanguíneos quando comparados ao grupo controle ($p=0,0187$) e gel com nanopartículas vazias (G2) ($p=0,0281$), evidenciando que os animais tratados com enoxaparina tiveram uma tendência ao aumento na quantidade de vasos sanguíneos. Outro achado foi a maior concentração de vasos sanguíneos no tecido de granulação profundo em relação ao tecido de granulação superficial.

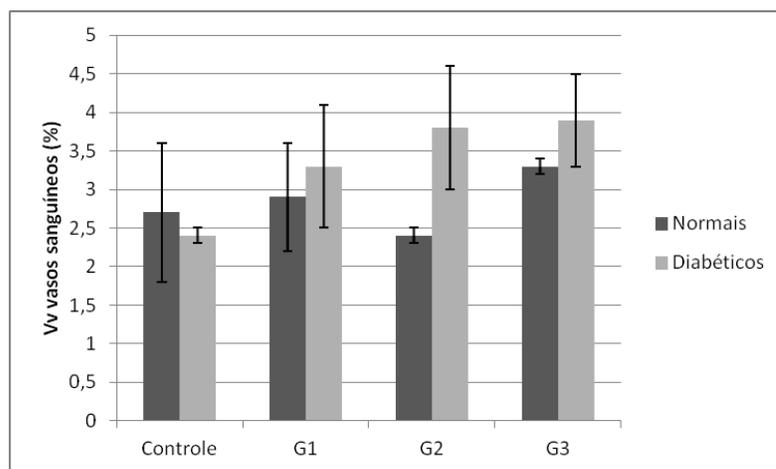


Figura 34: Gráfico da quantidade de vasos sanguíneos (identificados por α -actina de músculo liso) na área ulcerada, no décimo dia, em animais normais e diabéticos (Controle: gel puro; G1:gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

O maior número de vasos sanguíneos nos grupos tratados com enoxaparina pode ser devido à interação da enoxaparina com VEGF e também pelo seu efeito quimiotático sobre as células endoteliais, favorecendo assim a angiogênese (Ravikumar *et al.*, 2006).

A quantificação de miofibroblastos pela imunistoquímica evidenciou que os animais diabéticos apresentaram uma maior quantidade de miofibroblastos na área ulcerada, como ilustrado na figura a seguir (figura 35). Em relação aos animais

diabéticos, o grupo tratado com enoxaparina livre (G1) apresentou a maior quantidade de miofibroblastos, sendo significativo quando comparado ao grupo controle ($p=0,0184$), grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) e vazias (G2) ($p=0,0002$). Dentre os normais, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3) apresentou a menor quantidade de miofibroblastos, sendo este valor significativo quando comparado ao grupo controle ($p=0,0147$), grupo tratado com gel com enoxaparina (G1) ($p=0,0089$) e gel com nanopartículas vazias ($p=0,0079$). Outro achado foi a maior concentração de miofibroblastos no tecido de granulação superficial em relação ao tecido de granulação profundo.

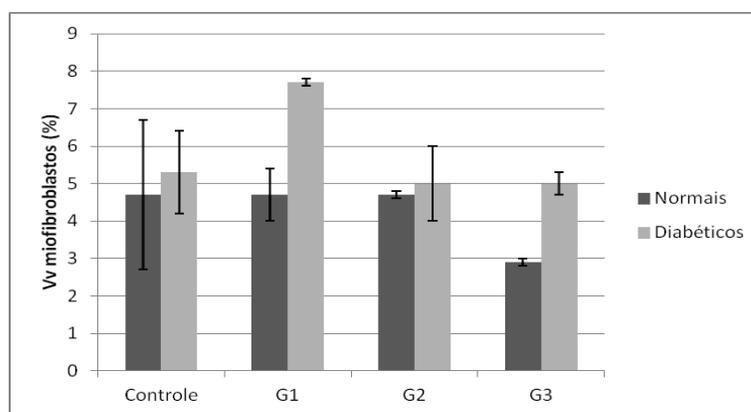


Figura 35: Gráfico da quantidade de miofibroblastos (identificados por α -actina de músculo liso) na área ulcerada, no décimo dia, em animais normais e diabéticos (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

Com estes resultados, percebe-se que não houve uma relação de maior quantidade de miofibroblastos com menor tamanho de úlcera, ou melhor cicatrização, até o dia avaliado (décimo dia após a injúria), pois o grupo tratado com gel com enoxaparina (G1) que teve um valor levemente aumentado de miofibroblastos não apresentou o menor tamanho de úlcera. Estes resultados sugerem que apesar da

importância dos miofibroblastos no processo cicatricial, o seu aumento não está necessariamente associado a uma cicatrização mais eficiente.

4.4.4. Avaliação da toxicidade

Todos os parâmetros do hemograma estavam dentro da normalidade, de acordo com Melo *et al.* (2012), evidenciando que não houve efeitos tóxico ou colaterais com o uso das diversas formulações. Esses resultados foram semelhantes quando avaliados nos diferentes grupos de estudo. A enoxaparina poderia induzir plaquetopenia, mas isto foi descartado com esses resultados. Outra possibilidade é que a enoxaparina e/ou nanopartículas não tenham sido absorvidas, e por isso não se observaram efeitos tóxicos. Os valores expressos em média e desvio-padrão estão representados na tabela 5.

Tabela 5: Resultados do hemograma dos animais

	WBC (k/μL)	RBC (M/μL)	Hb (g/dL)	HCT (%)	Plt (k/μL)
Média	5.23	7.02	13.70	39.10	555.03
DP	1.87	0.62	1.06	3.34	63.80

Nenhuma das formulações estudadas ocasionou toxicidade hepática ou renal, avaliadas neste projeto pelos valores de ALT, AST, e uréia e creatinina, respectivamente (Melo *et al.*, 2012). Da mesma forma, não se observou diferenças nesses parâmetros quando os animais foram separados de acordo com os grupos de estudo. A tabela 6 evidencia os valores expressos em média e desvio-padrão, que estavam dentro da normalidade. Portanto, esses resultados sugerem que essas formulações não são hepatotóxicas ou nefrotóxicas, dentro desse período de análise; ou que os efeitos tóxicos não foram observados porque as diversas formulações não alcançaram a corrente sanguínea.

Tabela 6: Resultados da avaliação da função hepática e renal dos animais

	ALT (U/L)	AST (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (U/L)
Média	45.5	135.9	51.5	0.45
DP	3.5	15.3	3.6	0.03

4.4.5. Análise da atividade anticoagulante

Para verificar se houve absorção sistêmica da enoxaparina livre ou encapsulada nas nanopartículas após a sua aplicação tópica, avaliou-se a atividade anti-Xa no plasma dos animais. Este método é amplamente utilizado em estudos *in vivo* com enoxaparina. Como não se detectou atividade anti-Xa plasmática, uma primeira possibilidade é que a enoxaparina não foi absorvida. Outra hipótese é que a enoxaparina possa ter sido absorvida, mas que não apresente atividade anticoagulante, ou que a quantidade absorvida tenha sido muito pequena, não sendo possível a detecção de sua atividade anti-Xa no plasma dos animais. O emprego de uma técnica de avaliação quantitativa de enoxaparina no plasma pode elucidar essas hipóteses.

4.4.6. Análises bioquímicas

- Dosagem de proteínas totais

A curva de calibração das proteínas foi realizada pelo método de Bradford, e está representada na figura a seguir (figura 36). A equação da reta foi $Y = 0,007 + 0,0021 X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,990.

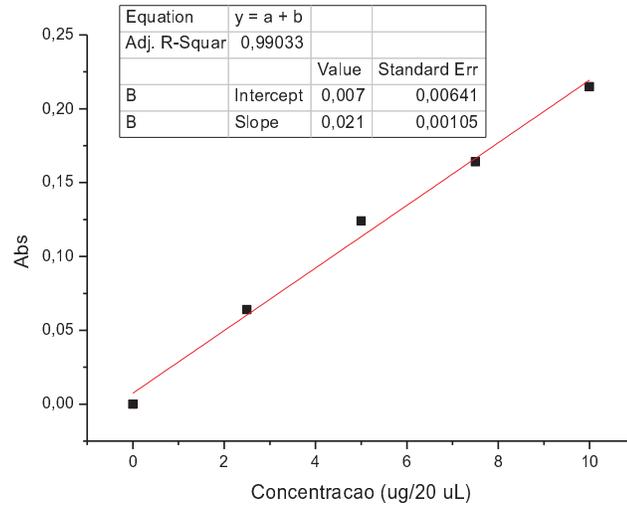


Figura 36: Curva de calibração da dosagem de proteínas obtida pelo método de Bradford.

A partir da curva de calibração foram calculados os valores da concentração de proteínas tanto plasmática quanto tecidual, nos animais dos diferentes grupos de tratamento. Esta dosagem foi feita para determinar o valor de outras dosagens que são calculadas a partir da quantidade de proteínas presentes na amostra.

- Dosagem de TBARS

A curva de calibração da dosagem de TBARS foi realizada por método colorimétrico, e está representada na figura a seguir (figura 37). A equação da reta foi $Y = 0,0407 + 0,0249 X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,996.

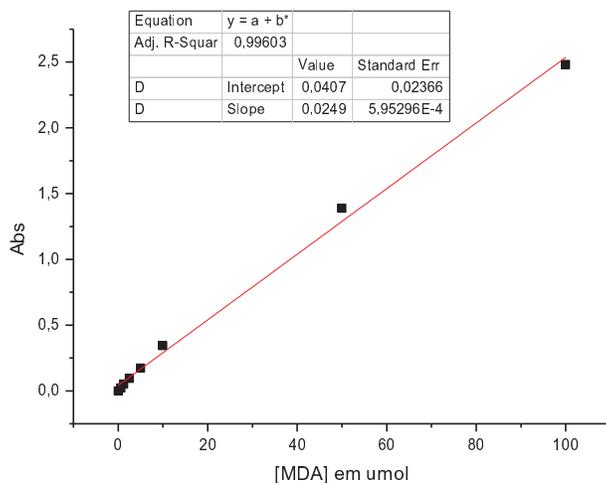


Figura 37: Curva de calibração da dosagem de TBARS obtida por método colorimétrico.

A partir da curva de calibração foram calculados os valores da concentração de malondialdeído (MDA), que é um dos subprodutos da lipoperoxidação, reativo ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico. Esta dosagem foi feita no plasma e no tecido crostoso dos animais nos diferentes grupos de tratamento.

Com relação à dosagem de TBARS tecidual, tanto os animais normais quanto os diabéticos dos grupos tratados com enoxaparina livre e encapsulada, G1 e G3 respectivamente, apresentaram um valor mais elevado do que os outros animais de outros grupos de tratamento. Contudo, este aumento não foi significativo quando analisado estatisticamente (diabéticos $p=0,0953$ e normais $p=0,1100$). Os valores estão evidenciados na figura que se segue (figura 38).

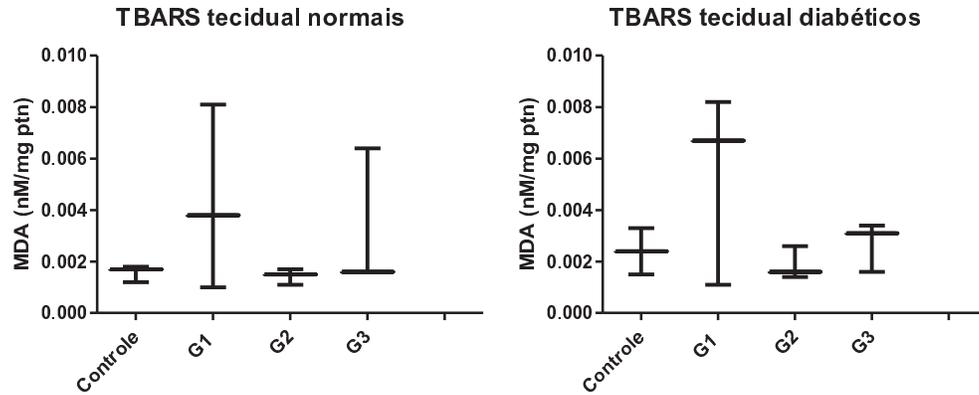


Figura 38: Resultados da concentração de MDA encontradas no tecido crostoso dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento (Controle: gel puro; G1: gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

A figura 39 apresenta os valores de TBARS plasmático nos grupos normal e diabético, de acordo com o tipo de formulação utilizada.

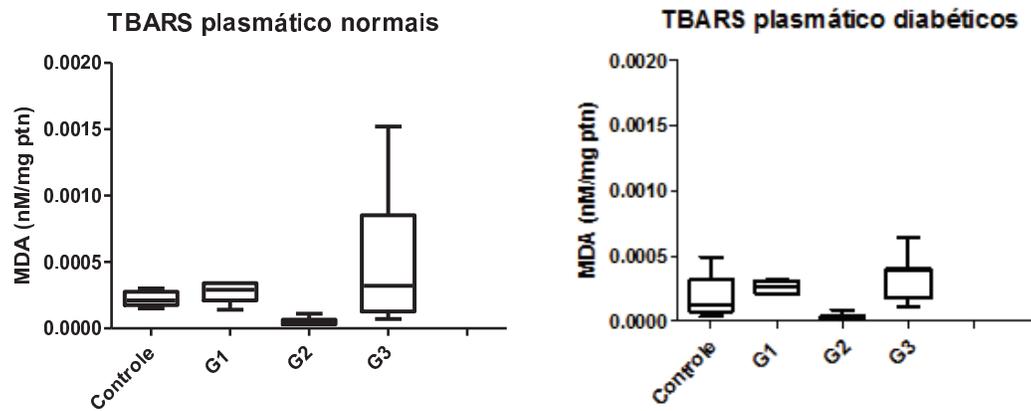


Gráfico 39: Resultados da concentração de MDA encontrados no plasma dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento (Controle: gel puro; G1: gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias e G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

Analisando os gráficos, percebe-se que o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2), foi o que apresentou a menor concentração plasmática de TBARS, quando comparado a todos os outros grupos de tratamento, normais ou

diabéticos. Este valor diminuído foi considerado significativo ($p < 0,0001$) quando comparado a todos os outros grupos de tratamento, incluindo o controle. Esse achado sugere que as nanopartículas vazias apresentam algum efeito protetor, que se perde quando são incorporados outros elementos ao gel de tratamento. Talvez o efeito bactericida da quitosana possa ser o responsável por esse achado, pois o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias não apresentou nenhuma contaminação bacteriana quando analisado por HE; já os outros grupos apresentaram bactérias, quando visualizados microscopicamente.

- Dosagem de nitrito

A curva de calibração da dosagem de nitrito foi realizada por método colorimétrico, e está representada na figura abaixo (figura 40). A equação da reta foi $Y = 0,01047 + 0,0123 X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,999.

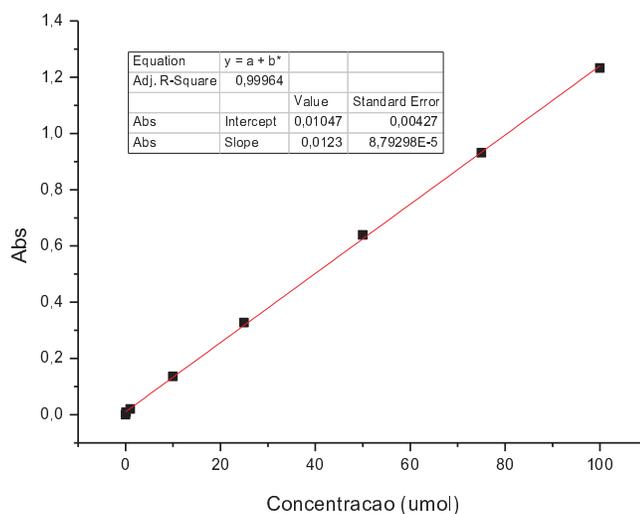


Figura 40: Curva de calibração da dosagem de nitrito obtida por método colorimétrico.

A dosagem de nitrito tecidual apresentou valores maiores nos animais diabéticos do que nos normais. Em relação aos animais diabéticos, os grupos tratados com

enoxaparina livre (G1) ou encapsulada (G3) apresentaram valores significativamente maiores ($p=0,0066$) do que o grupo controle e do que o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2). Quando analisados os animais normais, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias apresentou o menor valor de nitrito tecidual e este valor foi significativo ($p=0,0267$) quando comparado ao grupo tratado com gel contendo nanopartículas com enoxaparina (G3), conforme evidenciado na figura a seguir (figura 41).

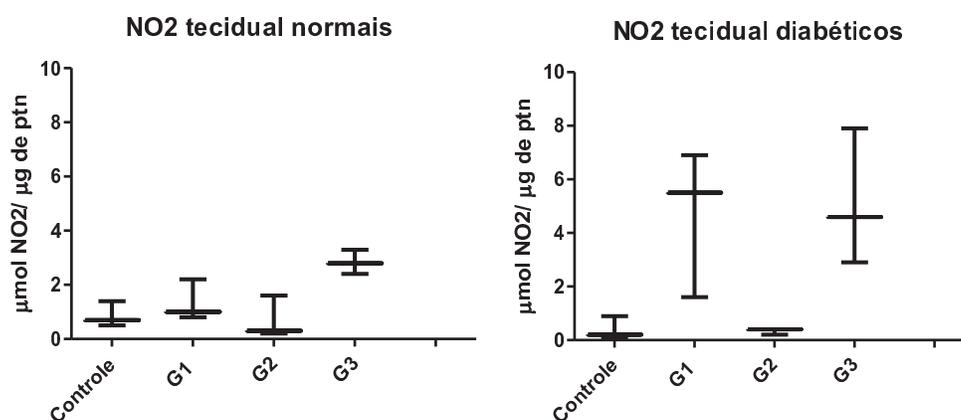


Figura 41: Resultados da concentração de nitrito tecidual dos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias; G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

A dosagem plasmática evidenciou que os animais diabéticos apresentavam valores maiores do que os animais normais, conforme verificado na figura a seguir (figura 42). Em relação aos animais diabéticos, igualmente à dosagem de nitrito tecidual, os grupos tratados com enoxaparina livre (G1) e encapsulada (G3) apresentaram dosagens significativamente maiores ($p<0,0001$) do que os grupos controle e tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2). Dentre os animais normais, o grupo tratado com gel contendo nanopartículas vazias (G2) apresentou valores significativamente menores ($p=0,0001$) da quantidade de nitrito plasmático do

que todos os outros grupos de tratamento, inclusive do controle.

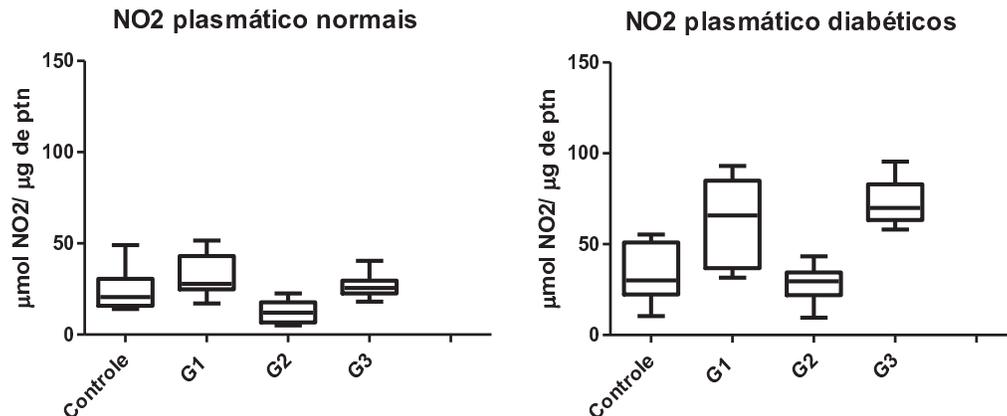


Figura 42: Resultados da concentração de nitrito plasmático nos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento (Controle: gel puro; G1: Gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias; G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

As dosagens aumentadas dos marcadores de estresse oxidativo, TBARS e nitrito, nos animais diabéticos em relação aos normais pode ser devido à auto-oxidação da glicose, à formação de produtos finais de glicação avançada e às mudanças no conteúdo e atividade no sistema de defesa antioxidante do tecido, presentes nessa doença (Silva *et al.*, 2011).

Com relação ao tratamento, verificam-se valores aumentados de TBARS e nitrito, nos grupos tratados com enoxaparina. Bryan *et al.* (2012), referem que a cicatrização é afetada de acordo com a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS), uma vez que a supressão de EROS pode resultar em infecção, e sua elevação pode resultar na destruição do tecido estromal saudável. Portanto, o aumento desses marcadores observados neste estudo pode ser uma tentativa de eliminação bacteriana na úlcera, contribuindo para sua cicatrização. O aumento desses marcadores no plasma dos animais pode ser um reflexo do aumento tecidual.

- Atividade da catalase

Os resultados de atividade da catalase apresentaram valores semelhantes entre os animais normais e diabéticos, e não tiveram influência do tratamento, evidenciando que o sistema antioxidante manteve-se estável. Os resultados estão expressos na figura seguinte (figura 43). Estes resultados não foram significativos quando analisados estatisticamente (diabéticos $p=0,1907$ e normais $p=0,8899$).

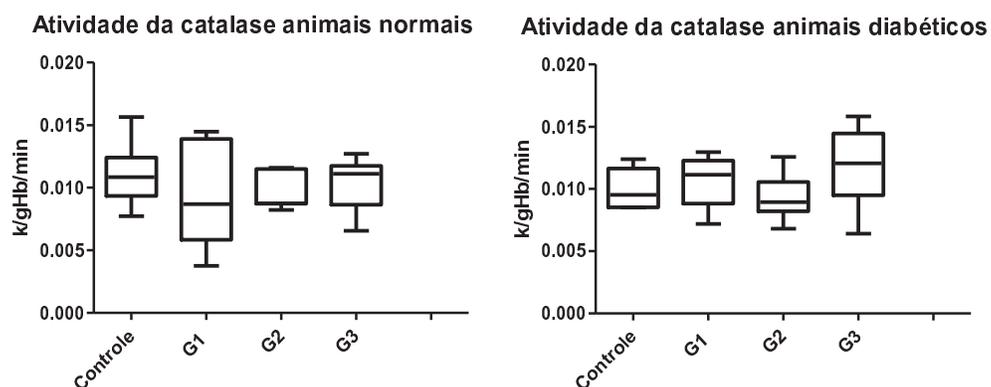


Figura 43: Resultados da atividade da catalase nos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento (Controle: gel puro; G1: gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias; G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

- Hidroxirolina

A curva de calibração da dosagem de hidroxiprolina foi realizada por método colorimétrico, e está representada na figura a seguir (figura 44). A equação da reta foi $Y= 0,0216 + 0,0755 X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,993.

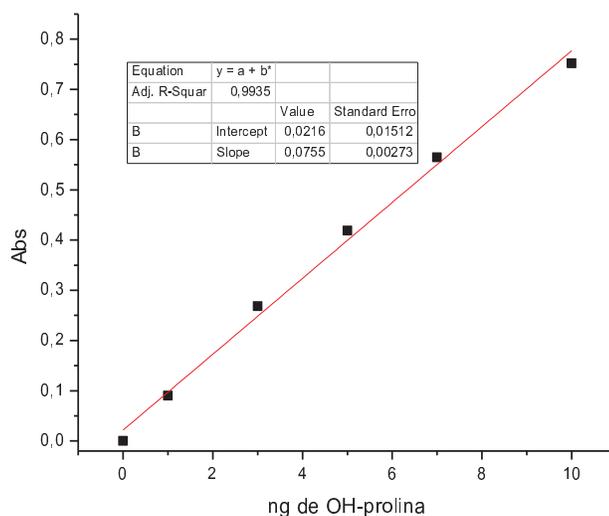


Figura 44: Curva de calibração da dosagem hidroxiprolina obtida por método colorimétrico.

Os resultados da dosagem de hidroxiprolina (OH-prolina), que representam a concentração de colágeno no tecido crostoso foram semelhantes, sem diferença significativa entre os tratamentos empregados em animais diabéticos ($p=0,0953$) ou normais ($p=0,1100$). Os valores de hidroxiprolina estão apresentados na figura a seguir (figura 45).

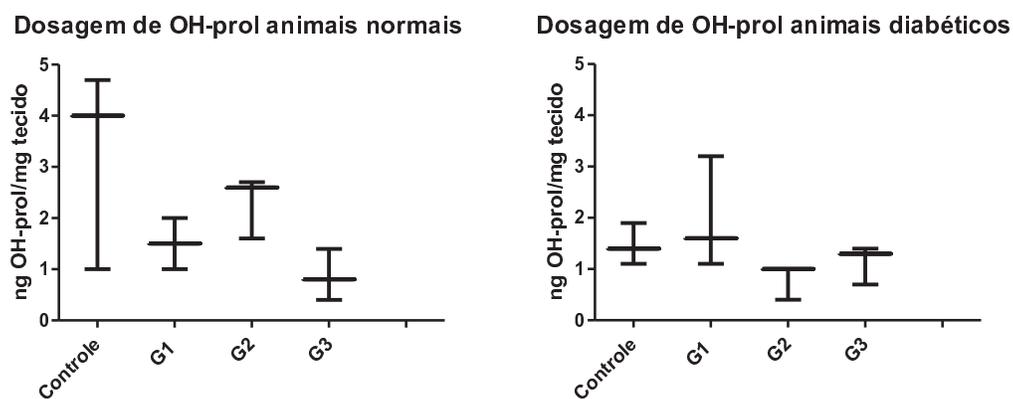


Figura 45: Resultados da dosagem de hidroxiprolina nos animais normais e diabéticos dos diferentes grupos de tratamento (Controle: gel puro; G1: gel com enoxaparina livre; G2: gel contendo nanopartículas vazias; G3: gel contendo nanopartículas com enoxaparina).

Não se verificou correlação entre a quantidade de colágeno e o tamanho da úlcera. Isto evidencia que a cicatrização é um processo multifatorial, e que o resultado final vai depender da interação entre os mesmos.

A cicatrização envolve diversos processos, e a somatória de todos culmina com um efeito favorável ou não. A utilização da heparina como adjuvante na cicatrização tem sido debatida, uma vez que há discordância entre os resultados relatados na literatura. Apesar de alguns autores referirem aumento do colágeno e da epitelização, e diminuição do processo inflamatório com o uso da heparina é importante ressaltar que isso não significa obrigatoriamente uma melhor cicatrização, no que se refere a tempo e tamanho de lesão (Kus e Bienkiewicz, 2006; Civelek *et al.*, 2007).

Os resultados deste estudo não mostraram aumento de colágeno durante o processo de cicatrização das úlceras com a utilização da enoxaparina por via tópica. Por outro lado observou-se diminuição de macrófagos. Em relação ao tamanho das úlceras, o grupo com enoxaparina livre mostrou maior área, quando comparado ao tratamento com enoxaparina encapsulada ou apenas nanopartículas.

Uma possibilidade é que a liberação de enoxaparina encapsulada seja pequena, atuando minimamente no processo cicatricial. Outra hipótese é que a enoxaparina encapsulada pode perder pelo menos em parte sua atividade durante o período de encapsulamento e liberação, ou mesmo não seja liberada totalmente.

Um outro achado foi o aumento de marcadores de estresse oxidativo no grupo tratado com enoxaparina encapsulada, ou no grupo diabético tratado com enoxaparina livre. Esses achados evidenciam que nem sempre há uma correlação entre esses marcadores e a evolução da cicatrização, uma vez que esses grupos de animais apresentaram um tempo de cicatrização menor que o grupo controle, em que esses parâmetros eram menores.

De uma forma global, nossos resultados sugerem que apesar da enoxaparina livre ter um efeito superior ao grupo controle no processo de cicatrização, a adição de nanopartículas mostrou os melhores resultados, tanto macro como microscopicamente.

As nanopartículas empregadas contém a quitosana, já descrita como um importante adjuvante no processo cicatricial. Os resultados observados evidenciam a quitosana como associada à melhor cicatrização macro e microscópica, ou pelos métodos bioquímicos empregados neste estudo.

O único estudo que avaliou o uso de heparina por via tópica em modelo animal de úlcera, tendo pomada como veículo, tem como crítica a inclusão de apenas 2 animais por grupo, e somente ter feito a avaliação macroscópica e histológica por HE (Kweon *et al.*, 2003). Apesar de nossos resultados mostrarem que a adição de quitosana à enoxaparina favoreceu a cicatrização, diminuindo o tamanho da lesão, a quitosana isolada foi mais benéfica, diferentemente desse estudo (2003).

Também é importante salientar que este modelo é considerado um modelo agudo de úlceras, e talvez o efeito da enoxaparina nas úlceras consideradas *non-healing* possa ser diferente.

5- CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que através do método de dupla emulsão A/O/A e evaporação do solvente foi possível o encapsulamento eficiente de enoxaparina em nanopartículas recobertas com quitosana.

As nanopartículas mostraram-se estáveis, relativamente homogêneas e com carga superficial positiva, evidenciando o recobrimento das partículas com a quitosana. As nanopartículas produzidas não apresentaram citotoxicidade em modelo de cultura de fibroblastos, mas demonstraram aumento do estresse oxidativo em modelos animais. Por outro lado, não ocasionaram nefrotoxicidade, hepatotoxicidade ou alterações hematológicas em modelos *in vivo*.

O modelo de úlcera em ratos foi padronizado e mostrou-se reprodutível para experimentação.

Neste modelo de úlcera, a enoxaparina livre ou encapsulada teve um efeito superior sobre o processo cicatricial em comparação ao grupo controle.

As nanopartículas vazias foram as que mais contribuíram para um processo cicatricial eficiente, evidenciando que a quitosana deve ter um importante papel na cicatrização.

Em comparação à enoxaparina livre e às nanopartículas vazias, a enoxaparina encapsulada teve um efeito intermediário sobre a cicatrização, que pode ser interpretado como um efeito favorável da quitosana sobre o efeito da enoxaparina.

Com esses resultados, o uso de nanopartículas com enoxaparina ou outro fármaco, recobertas de quitosana, deve ser comparado a tratamentos convencionais de úlceras, podendo se constituir numa alternativa promissora para auxiliar no processo de cicatrização.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.

Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* 2004; 99 (1): 53-62.

Amadeu TP, Costa AM. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol* 2006; 33 (7): 465-73.

Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Monte-Alto-Costa A. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. *J Surg Res* 2008; 149 (1): 84-93.

Azulay RD, Azulay DR, Azulay-Abulahia L. *Dermatologia*, 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008; 1-15.

Barreto MGP, Costa MGNF, Serra MCVF, Afiune JB, Praxedes HEP, Pagani E. Estudo comparativo entre tratamento convencional e tratamento com heparina tópica para a analgesia de queimaduras. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2010; 56 (1): 51-55.

Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14 (2): 101-14.

Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57 (1): 19-34.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Bryan N, Ahswin H, Smart N, Bayon Y, Wohlert S, Hunt JA. Reactive oxygen species (ROS)--a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and

wound healing. *Eur Cell Mater* 2012; 24: 249-65.

Civelek A, Ak K, Kurtkaya O, Tekeli A, Isbir S, Nargileci E, et al. Effect of a low molecular weight heparin molecule, dalteparin, on cellular apoptosis and inflammatory process in an incisional wound-healing model. *Surg Today* 2007; 37 (5): 406-11.

Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 9: 283-9.

Durán N, Marcato PD, Teixeira Z. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: conceitos básicos. Disponível em <<http://www.cienciaviva.org.br>>. Acesso em julho de 2010.

Foldari M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharmaceutical Sciences & Technology Today* 2000; 3: 417-25.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126 (1): 131-8.

Grenha A, Gomes ME, Rodrigues M, Santo VE, Mano JF, Neves NM, Reis RL. Development of new chitosan/carragenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009; 1-8.

Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* 2007; 2: 147-57.

Javot L, Lecompte T, Rabiskova M, Maincent P. Encapsulation of low molecular weight heparins: influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. *J Control Release* 2009; 139 (1): 8-14.

Kim TD, Sakon M, Kawasaki T, Kambayashi J, Ohshiro T, Mori T. Studies on

liposome-encapsulated heparin. *Thromb Res* 1986; 43 (6): 603-12.

Kus E, Bienkiewicz A. Subcutaneous low molecular weight heparin administration promotes wound healing in rats. *Pathophysiology* 2006; 13 (2): 81-4.

Kweon DK, Song SB, Park YY. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials* 2003; 24 (9): 1595-601.

Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69 (2): 570-7.

Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (5): 932-9.

Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol* 1994; 130 (4): 489-93.

Li B, Wang JHC. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *Journal of Tissue Viability* 2011; 20: 108-120.

Lippold BC. Eine Einne Einfuehrung Zu den Wichtigsten Arzneiformen. *Biopharmazie*. 1984; 14 (5): 99-131.

Lira AAM, Nanclares DMA, Neto AF, Marchetti JM. Drug-polymer interaction in the all-trans retinoic acid release from chitosan microparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2007; 87: 899-903.

MacKay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Altern Med Rev* 2003; 8 (4): 359-77.

Marcato PD. Preparação e caracterização de micro e nanopartículas poliméricas contendo estreptomicina. Campinas 2006 (Dissertação-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

MCT. Ministério da Ciência e Tecnologia. Nanotecnologia. Áreas Nano. Cosméticos e Saúde. No exterior. Disponível em: http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/4761/No_Exterior.html. Acesso em agosto de 2010.

Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. Scientia Plena 2012; 8(4): 1-6.

Meng FT, Ma GH, Qiu W, Su ZG. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. J Control Release 2003; 91 (3): 407-16.

Mishra M, Kumar H, Tripathi K. Diabetic delayed wound healing and the role of silver nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2008; 3 (2): 49-54.

Mohammad G, Pandley HP, Tripathi K. Diabetic wound healing and its angiogenesis with special reference to nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2008; 3 (4): 203-08.

Morgan C, Nigam Y. Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the wound healing of chronic wounds. Angiogenesis 2013. *in press*.

Nam T, Park S, Lee SY, Park K, Choi K, Song IC, et al. Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual-modality optical/MR cancer imaging. Bioconjug Chem 2010; 21

(4): 578-82.

Nascimento AP, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr* 2006; 96 (6): 1069-77.

Okamoto Y, Minami S, Matsubashi A. Application of chitin and chitosan in small animals. Elsevier 1992; 70-78.

Otranto MB, Nascimento A P, Monte-Alto-Costa A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. *Wound Repair Regeneration*. 2010; 18: 629-36.

Pazzini C. Preparação e caracterização de nanopartículas com heparina e sua avaliação em modelo animal de trombose venosa. Campinas 2010 (Dissertação-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

Peltonen L, Aitta J, Hyvonen S, Karjalainen M, Hirvonen J. Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l)lactide nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 2004; 5 (1): E16.

Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3 (2): 115-24.

Ravikumar T, Shanmugasundaram N, Jayaraman V, Ramakrishnan KM, Babu M. Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing. *Ann Burns Fire Disasters* 2006; 19 (3): 123-9.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J* 2008; 22 (3): 659-61.

Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research* 2012; 49: 35-43.

Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Low-dose propranolol improves cutaneous wound healing of burn-injured rats. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122 (6): 1690-9.

Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 611 (1-3): 77-84.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova* 2003; 26(5): 726-37.

Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova* 2006; 29: 776-85.

Silva M, Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2011; 55(1): 46-53.

Song YK, Kim CK. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. *Biomaterials* 2006; 27 (2): 271-80.

Souza BR, Santos JS, Costa AM. Blockade of beta1- and beta2-adrenoceptors delays wound contraction and re-epithelialization in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33 (5-6): 421-30.

Sun W, Tian W, Zhang Y, He J, Mao S, Fang L. Effect of novel stabilizers--cationic polymers on the particle size and physical stability of poorly soluble drug nanocrystals. *Nanomedicine* 2012; 8(4): 460-7.

Tiyaboonchai W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal* 2003; 11 (3): 51-66.

Trommer H, Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19 (2): 106-21.

Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93: 440-7.

Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int J Pharm* 2005; 295 (1-2): 235-45.

Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids* 1987; 45 (2-4): 337-51.

Yildiz A, Okyar A, Baktir G, Araman A, Ozsoy Y. Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly(lactic acid). *Farmaco* 2005; 60 (11-12): 919-24.

7- ANEXOS

ANEXO 1



UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

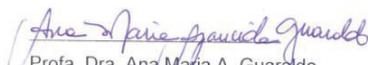
CERTIFICADO

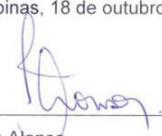
Certificamos que o Protocolo nº 2290-1, sobre "Avaliação da ação do uso tópico de heparina encapsulada em nanopartículas poliméricas recobertas com quitosana em modelo de úlcera animal de pele em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi / Stephany Cares Huber, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 18 de outubro de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2290-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 18, 2010.

Campinas, 18 de outubro de 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>