

### UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Viviane Ferre de Souza

### Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas de Ácido Hialurônico com Encapsulação do Extrato Bruto Vegetal da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot para Aplicações Farmacêuticas e Cosméticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena A. Santana

### Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Micro and Nanoparticle Encapsulation with Crude Extract Vegetable Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot for Pharmaceutical and Cosmetic Applications.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, na área de concentração de: Processos Biotecnológicos.

Doctorate thesis presented to the Chemical Engineering Schol of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Biotechnologies Process.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VIVIANE FERRE DE SOUZA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA MARIA HELENA ANDRADE SANTANA.

1At Am Tana



Viviane Ferre de Souza

Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas de Ácido Hialurônico com Encapsulação do Extrato Bruto Vegetal da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot para Aplicações Farmacêuticas e Cosméticas.

Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Micro and Nanoparticle Encapsulation with Crude Extract Vegetable Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot for Pharmaceutical and Cosmetic Applications.



### UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Viviane Ferre de Souza

### Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas de Ácido Hialurônico com Encapsulação do Extrato Bruto Vegetal da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot para Aplicações Farmacêuticas e Cosméticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena A. Santana

### Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Micro and Nanoparticle Encapsulation with Crude Extract Vegetable Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot for Pharmaceutical and Cosmetic Applications.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, na área de concentração de: Processos Biotecnológicos.

Doctorate thesis presented to the Chemical Engineering Schol of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Biotechnologies Process.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VIVIANE FERRE DE SOUZA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA MARIA HELENA ANDRADE SANTANA.

1At Ann Sana

CAMPINAS, 2012

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -UNICAMP

So89p	Ferre-Souza, Viviane Preparação e caracterização de micro e nanopartículas de ácido hialurônico com encapsulação do extrato bruto vegetal da <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot para aplicações farmacêuticas e cosméticas / Viviane Ferre de SouzaCampinas, SP: [s.n.], 2012.
	Orientador: Maria Helena Andrade Santana. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Neovascularização. 2. Cicatrização de feridas. 3. Nanotecnologia. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

 Título em Inglês: Preparation and characterization of hyaluronic acid micro and nanoparticle encapsulation with crude extract vegetable *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot for pharmaceutical and cosmetic applications
Palavras-chave em Inglês: Neovascularization, Healing of wounds, Nanotechnology
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
Titulação: Doutora em Engenharia Química
Banca examinadora: Mary Ann Foglio, João Ernesto de Carvalho, Izaltina Silva Jardim Cavalli, João José Lachat
Data da defesa: 03-05-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado defendida por <u>Viviane Ferre de Souza</u> e aprovada em: <u>03</u> de <u>Maio</u> de <u>2012</u> pela banca examinadora constituída pelos doutores:

101

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana FEQ-UNICAMP

Profa. Dra. Mary Ann Foglio CPQBA - UNICAMP

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho CPQBA - UNICAMP

Profa. Dra. Izaltina Silva Jardim Cavalli IFSC - USP

Prof. Dr. João José Lachat FMRP-USP

Unicamp – Campinas – SP 2012

DEDICATÓRIA

#### DEDICATÓRIA

A Deus, pela dádiva da vida, pela saúde, proteção, pelo perdão. Por poder estar aqui hoje, completando mais uma importante fase de transição em minha vida.

Aos meus pais, Mara e Edmilson, pela educação, disciplina, atenção, amor, fazendo com que eu me tornasse uma pessoa responsável, determinada e honesta. Por mais que as palavras nem sempre sejam ditas, é impossível esconder o sentimento, amo vocês.

Aos meus avós, Elisa e Nelson, por desempenharem um duplo papel na minha vida, são avós e pais; grande parte do que sou devo a vocês que me criaram e educaram em uma fase difícil, onde foram literalmente meus pais, sempre de braços abertos para o que fosse preciso. Amo vocês.

Ao meu irmão Vitor, que mesmo com nossas diferenças e a distância constante está ao meu lado sempre que preciso. Amo você.

Π

# AGRADECIMENTOS

#### AGRADECIMENTOS

A profa. Maria Helena Andrade Santana, pela pesquisadora competente que é, pelo carinho, e principalmente pela oportunidade e confiança oferecida para que eu pudesse dar continuidade a minha carreira como pesquisadora.

A profa. Mary Ann Foglio, minha co-orientadora não oficial, que com sua alegria, prestatividade e carinho me permitiu trabalhar para enriquecer não só este trabalho como minha maneira de pensar.

Ao prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela confiança, carinho e acolhida durante todo o tempo que me utilizei de seu espaço físico para viabilizar os ensaios in vitro e in vivo.

Aos profs. Ana Lúcia Tasca G. Ruiz, Lucimara de La torre e Rodney Alexandre Rodrigues pela companhia, conversas e sugestões ao longo dessa jornada.

Ao prof. Hernandes F. Carvalho por abrir as portas de seu laboratório na etapa final deste trabalho para que eu pudesse enriquecer meu conhecimento e aprender novas técnicas.

Ao técnico de laboratório Gilson Jr, pelo apoio técnico, psicológico, companheirismo, amizade, respeito, prestatividade, pelos momentos de alegria e

IV

de tristeza compartilhados, enfim, pelo suporte básico necessário para enfrentar essa jornada num ambiente de rotina.

Aos técnicos de outros laboratórios pelos quais passei durante esse período de pesquisa, Ana P., Ilza, Kelly, Adilson e principalmente a Sirlene, por todo apoio técnico, respeito, parceria e prestatividade.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp Rosa, Regina, Márcia, Aline e Marcos pela cordialidade e paciência.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp Ricardo, Lídia, Laura, Luís, Celso e Célio pela receptividade e prestatividade.

Aos amigos do laboratório LDPB, aos que já se foram e aos que continuam na luta, Amanda, Andréa, Beatriz, Danilo, Daniel, Silas, Carol S., Carol C., Rafaela, Amós, Tiago, Rafael, Renata, Felipe, Gabriela, Mariana, Patrícia, Aline, André, Fernanda, Micaela, Júlia e Reinaldo pelo apoio, companheirismo, baladas (é claro!), e das muitas, mas muitas risadas; vou sentir falta de todos, formamos um time, com seus jogadores em vários times diferentes, mas ainda um time.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia e de Fitoquímica do CPQBA, Karin, Rosana, Paula M., Giovanna F., Giovanna L., Débora, Larissa R., Larisa S., Humberto, Thiago, Fabrício, Patrícia, Leila, Leilane, Johnny, Núbia, Rogério, Paula e Katiri, pelo carinho com que me receberam, a amizade indescritível, por sempre estarem dispostos a ajudar, e claro, pelas saídas e comemorações básicas e pelos jogos de mímica "incomparáveis".

Aos colegas do Instituto de Biologia da Unicamp, Danilo, Umar, Gustavo, Augusto, Guilherme, Silvia, Fabiana, Thaíse, Milena e Juliana pela convivência agradabilíssima nesses dois últimos meses de batalha e pela ajuda imensurável.

Aos amigos, distantes, mas muito queridos, Mariana, Cacau, Tati S., Cíntia, Fran, Isabela (Bela), Tatiana, Renata (Rezona), Fernanda, Rúbia e Rebeca, por tudo que uma verdadeira amizade pode representar e todo apoio incondicional.

Aos amigos e colegas adquiridos indiretamente ao longo dessa caminhada, Sara, Ivan, Edgar, Aloísia, Cláudia, Gabriela, Ted, Danyelle, Guto, por compartilharem momentos decisivos em minha caminhada.

À família GGU, Lívia (Pilha), Danilo, Stella, Gabriel, Paulo (PH), Maurício, Marília, Mônica, Fernanda, Thaís (Thatão), Tamiris, Ana Li, Ana Lu, Verônica, Hugo, Alessandro, Carlão, Fernanda G., Diogo, Carla, Bia, Pedro, Mallet, André, Lufe, Andréi, Letícia, Alex, Nanny e Beto, por todos os momentos, alegrias e emoções em que fomos agraciados de poder compartilhar. Uma vez GGU, sempre GGU!! Aos coordenadores do GGU, Lari, Marquinho e Bete, pelo treinamento físico e principalmente por priorizar o nosso bem estar e a qualidade de vida em qualquer uma das atividades físicas realizadas.

Aos amigos "importados" Carol, Svend, Ilknur, Caroline, Anja, Franzie, Cris, Folke e Luise por compartilharem momentos únicos ao meu lado e mostrarem que a distância e o idioma não separam uma amizade.

Aos novos membros da minha segunda família, Felipe, Mateus, Manuella, Vitória, Cláudio, Izolina, Sandra, Cícero, Sônia, Kiko, Simone, Paulo, Thiago e Lucas, por me receberem em suas famílias de braços abertos e pelo carinho.

As amigas-irmãs que recebi em forma de benção, Michelle, Vanessa e Gabriela, pelo apoio incondicional. Amo vocês.

Aos meus familiares Alexandre, Alessandra, Felipe, Lucas, Enzo, Nelson, Marli, Dinho, Maria, Izabel, Cristiane, Wilson (in memorian), André, Cauã e Bruna por existiram em minha vida e confiarem em meu potencial.

Ao CNPq e a FAPESP, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

E por fim, a cada um que eu possa ter esquecido, mas que tenha colaborado para essa jornada mesmo que com um simples sorriso, ou por apenas não ter me atrapalhado.

O meu muito obrigada a todos.



"Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas; só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada será por acaso."

Henfil

"Uma descoberta não consiste em ver o que todo mundo não viu, mas em pensar o que ninguém ainda pensou."

Albert Ezent-Gyorgy

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto." Thomas Huxley

## RESUMO

#### RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo natural composto de unidades dissacarídeas alternadas entre o N-acetil-D-glicosamina e o ácido D-glicurônico que desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade tecidual, facilitando a adesão e diferenciação de células durante a inflamação, e o reparo de feridas com formação de vasos sanguíneos. A espécie vegetal Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot é encontrada em quase todo o Brasil e são atribuídos a ela propriedades terapêuticas para enfermidades da pele. Técnicas de micro e nanoencapsulação são empregadas através de processos químicos, físicos ou fisico-químicos visando o aumento das interações com tecidos, pelo aumento da área superficial. Neste trabalho, foi proposto o estudo de variáveis operacionais para a produção de micro e nanopartículas de AH através do método de emulsão a/o reticuladas com dihidrazida adípica (ADH), com encapsulação do extrato vegetal da Arrabidaea chica para avaliação da atividade angiogênica e cicatrizante. Os resultados obtidos mostraram que a formação e propriedades físico-químicas das partículas de AH produzidas por emulsificação são diretamente relacionadas com a velocidade de agitação, ao pH e a razão do reticulante e do extrato bruto com o AH. Ensaios in vitro em fibroblastos humanos tanto com as partículas vazias como com o extrato da A. chica não apresentaram toxicidade celular, e ensaios in vivo realizados em CAM, tegumento do dorso de camundongos e dorso de ratos evidenciaram o efeito angiogênico das micro e nanopartículas formadas com indução da formação de novos vasos sanguíneos, imprescindível para o processo de cicatrização. Concluímos assim que a encapsulação beneficiou e potencializou a atividade cicatrizante do extrato bruto da A. chica contribuindo para o desenvolvimento de novas formulações para aplicações farmacêuticas e cosméticas.

**Palavras-chave:** micro e nanopartículas de ácido hialurônico, angiogênese, cicatrização, *Arrabidaea chica*, formulações farmacêuticas e cosméticas.

XII

## ABSTRACT

#### ABSTRACT

The hyaluronic acid (HA) is a natural polysaccharide composed of alternating units dissacarídeas between the N-acetyl-D-glucosamine and Dglucuronic acid. HA plays a key role in the maintenance of tissue integrity, facilitating adhesion and cell differentiation during inflammation, wound repair, and with the formation of blood vessels. The vegetable species Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot is found throughout Brazil and it is assigned therapeutic properties for skin diseases. The Micro and nanoencapsulation of active compounds tend to increase their efficiency of action for providing protection and greater interaction with tissues due to its high surface area. In this work we studied the influence of operational variables for the production of micro and nanoparticles of HA through of w / o emulsification and crosslinking with adipic dihydrazide (ADH). The Arrabidaea chica vegetable extract was encapsulated in HA micro and nanoparticles and the angiogenic activity and healing evaluated. The results showed that the formation and physicochemical properties of HA particles produced by emulsification are directly related to the stirring still, pH and both ratios ADH and crude extract with AH. *In vitro* assays in human fibroblast cells with empty or encapsulating the A. Chica extract showed no cellular toxicity. In vivo assays performed in CAM, mouse back tegument and mice demonstrated the angiogenic effect of micro and nanoparticles formed with induction of the formation of new blood vessels essential to the healing process. From these results we conclude that the encapsulation benefited and enhanced the healing activity of the crude extract of A. chica contributing to the development of new formulations for pharmaceutical and cosmetic applications

**Keywords:** hyaluronic acid micro and nanoparticles, angiogenesis, wound healing, *Arrabidaea chica*, pharmaceutical and cosmetics formulations.

## Sumário

### Sumário

I. INTRODUÇÃO	Pg. 1
I.1. Objetivo e Metas	Pg. 4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pg. 5
II. 1. Tegumento.	Pg. 6
II. 2. Cicatrização	Pg. 8
II.2.1. Fase inflamatória.	Pg. 9
II.2.2. Fase Proliferativa.	_ Pg. 10
II.2.2.1. Permeabilidade Vascular.	_ Pg. 11
II.2.2.2. Angiogênese.	_ Pg. 12
II.2.2.3. Fatores de crescimento.	_ Pg. 13
II.2.2.3.1. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	_ Pg. 14
II.2.2.3.2. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	_ Pg. 15
II.2.2.3.3. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).	_ Pg. 16
II.2.2.3.4. Fator de crescimento transformante β (TGF-β).	_ Pg. 17
II.2.2.3.5. Fator de crescimento epidérmico (EGF)	_ Pg. 18
II.2.2.3.6. Angiopoietinas 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2)	_ Pg. 19
II.2.3. Fase de Remodelagem	_ Pg. 19
II. 3. Matrizes poliméricas.	_ Pg. 20
II. 3.1. Polímeros biodegradáveis.	_ Pg. 21
II. 3.2. Ácido hialurônico	_ Pg. 22
II. 3.2.1. Modificação química do ácido hialurônico	_ Pg. 26
II. 3.2.2. Aplicações biológicas do AH	_ Pg. 29
II. 3.2.3. Ácido Hialurônico em Cicatrização	Pg. 30
II. 3.2.4. Mercado do AH	_ Pg. 31
II. 4. Liberação controlada.	_ Pg. 32
II. 4.1. Micro e nanoencapsulação.	_ Pg. 33
II. 5. Emulsões.	_ Pg. 35
II. 5.1. Emulsões água em óleo (a/o)	Pg. 35
II. 6. Arrabidaea chica	Pg. 36

III. MATERIAL E MÉTODOS	Pg. 42
III.1. Obtenção do material vegetal.	Pg. 43
III.1. 2. Secagem e moagem do material vegetal	Pg. 44
III.1. 3. Preparo dos Extratos Vegetais	Pg. 44
III.1.4. Monitoramento de parâmetros do processo extrativo.	Pg. 46
III.1.5. Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia	
Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	Pg. 46
III.1.5.1. Condições cromatográficas.	Pg. 46
III.2. Micro e nanopartículas de ácido hialurônico.	Pg. 47
III.2.1. Obtenção das micro e nanopartículas.	Pg. 47
III.2.2. Influência de variáveis operacionais.	Pg. 50
III.2.2.1. pH	Pg. 51
III.2.2.2. Velocidade de agitação.	Pg. 51
III.2.2.3. Proporção reticulante : AH	Pg. 51
III.2.2.4. Recirculação	Pg. 52
III.2.3. Influência da proporção de extrato da <i>A. chica</i> : AH na	
obtenção de micro e nanopartículas.	Pg. 52
III.2.4.Caracterização das partículas	Pg. 53
III.2.4.1. Micropartículas	Pg. 53
III.2.4.1.1. Análise morfológica.	Pg. 53
III.2.4.1.2. Análise de tamanho	Pg. 53
III.2.4.2. Nanopartículas	Pg. 54
III.2.5. Potencial Zeta.	Pg. 54
III.2.6. Rendimentos	Pg. 54
III.2.6.1. Rendimentos das partículas obtidas.	Pg. 54
III.2.6.2. Eficiência de encapsulação de A. chica nas micro e	
nanopartículas	Pg. 55
III.2.7. Quantificação das perdas durante o processo.	Pg. 56
III.3. Ensaio in vitro da estimulação do crescimento celular	
em fibroblastos humanos.	Pg. 57

III.4. Ensaios <i>in vivo</i>	Pg. 59
III.4.1. Ensaio de angiogênese	Pg. 59
III.4.1.1. Membrana corioalantóide (MCA).	Pg. 59
III.4.1.2. Tegumento dorsal de camundongos.	Pg. 62
III.4.1.2.1. Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos do	
tegumento do dorso de camundongos.	Pg. 66
III.4.1.2.2. Análise histológica do tegumento do dorso de	
camundongos	Pg. 66
III.4.1.2.3. Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos do	
tegumento do dorso de camundongos.	Pg. 67
III.4.2. Ensaio de cicatrização	Pg. 67
III.4.2.1. Análise de hidroxiprolina.	Pg. 69
III.5. Análises estatísticas dos dados	Pg. 69
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Pg. 70
IV.1. Obtenção do extrato bruto da Arrabidaea chica.	Pg. 71
IV.2. Produção de micro e nanopartículas de AH.	Pg. 72
IV.2.1. Influência de variáveis operacionais	Pg. 73
IV.2.1.1. pH	Pg. 73
IV.2.1.2. Velocidade de agitação.	Pg. 73
IV.2.1.3. Proporção reticulante : AH	Pg. 75
IV.2.1.4. Recirculação	Pg. 76
IV.2.2. Produção das partículas de AH contendo o extrato	
bruto da Arrabidaea chica.	Pg. 76
IV.2.2.1. Proporção Ativo : AH	Pg. 77
IV.2.3.Caracterização das partículas	Pg. 79
IV.2.3.1. Diâmetro médio das micro e nanopartículas na ausência	
de um ativo	Pg. 79
IV.2.3.2. Potencial Zeta das nanopartículas na ausência de um	
ativo.	Pg. 82
IV.2.3.3. Diâmetro médio das micro e nanopartículas contendo o	
extrato ativo da Arrabidaea chica.	Pg. 82

IV.2.3.4. Potencial Zeta das nanopartículas contendo o ativo	
(Arrabidaea chica)	Pg. 84
IV.2.4. Rendimento das partículas.	Pg. 85
IV.2.4.1. Micro e Nanopartículas na ausência de um ativo	Pg. 85
IV.2.4.2. Micro e Nanopartículas contendo o extrato bruto da A.	
chica	Pg. 86
IV.2.5. Quantificação das perdas durante o processo.	Pg. 88
IV.2.5.1. Quantificação das perdas durante o processo na	
preparação das partículas na ausência de um ativo.	Pg. 88
IV.2.5.2. Quantificação das perdas durante o processo na	
preparação das partículas contendo o ativo da <i>A. chica</i> .	Pg. 88
IV.2.6. Eficiência de encapsulação do extrato da A. <i>chica</i> nas	
micro e nanopartículas de AH.	Pa. 89
IV.261 Corregemente de extrete de <u>A</u> objec/ma de miero e	5
nanonartículas de AH	Da 00
	i y. 50
IV. 3. Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade em cultura de	
fibroblastos humanos	Pg. 91
IV. 4. Ensaio de angiogênese <i>in vivo</i>	Pg. 93
IV. 4.1. Ensaio de angiogênese em MCA.	Pg. 93
IV.4.1.1. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos em CAM	
e análise estatística dos dados.	Pg. 94
IV.4.2. Ensaio de angiogênese no tegumento do dorso de	
camundongos.	Pg. 96
IV.4.2.2. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos no	
tegumento do dorso de camundongos e análise estatística dos	
dados	Pg. 100

IV.4.2.3. Contagem microscópica dos vasos sanguíneos nos	
cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos e	
análise estatística dos dados	Pg. 104
IV.5. Ensaio de Cicatrização <i>in vivo</i> .	Pg. 106
IV.5.1. Ensaio da Hidroxiprolina	Pg. 110
V. CONCLUSÕES	Pg. 112
VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.	Pg. 116
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pg. 118
ANEXOS.	Pg. 143
Anexo I – Folha de aprovação do Comitê de Ética	
Experimental em Animais.	Pg. 144
Anexo II – Protocolo de depósito de Patente.	Pg. 145

# LISTA DE FIGURAS

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Anatomia do tegumento	Pg 6
Figura 2. Processo de angiogênese	Pg 13
Figura 3. Estrutura molecular do ácido hialurônico	_ Pg 24
Figura 4. Grupos alvos para a modificação química do ácido hialurôn	ico
	Pg 26
Figura 5. Crosslinking do ácido hialurônico	Pg 28
Figura 6. Arrabidaea chica	Pg 37
Figura 7. Estrututra das antocianinas e deoxiantocianidinas isoladas	das
folhas de A. chica	Pg 39
Figura 8: Estruturas da molécula de antocianina e das antocianidina	
s mais freqüentes.	Pg 40
Figura 9: Armazenagem das folhas de A. chica.	Pg 44
Figura 10: Esquema representativo do preparo do extrato vegetal	Pg 45
Figura 11. Representação esquemática da produção das micro e	
nanopartículas.	Pg 49
Figura 12. Esquema da colocação das amostras na placa de 96 poço	os.Pg 58
Figura 13. Esquema da metodologia em membrana corioalantóide.	Pg 61
Figura 14. Representação da aplicação subcutânea e retirada do teg	ument
o do dorso de camundongos	_ Pg 63
Figura 15. Esquema de retirada do tegumento intacto e cicatrizado d	0
rato	Pg 68
Figura 16: Avaliação do teor de pigmentos do extrato bruto de	
A.chica	Pg 71
Figura 17. Eletromicrografia da estrutura em esponja resultante da	
preparação das micro e nanopartículas de AH na ausência de	
material encapsulado, segundo protocolo de Yun et al (2004)	
adaptado por Kubo (2005).	_Pg 72
Figura 18. Eletromicrografia da influência do pH na preparação das	-
partículas de AH, com adição de HCI em excesso	_Pg 73

Figura 19. Eletromicrografia da influência da velocidade de agitação	1
na estruturação das partículas de AH reticuladas com dihidrazida	
adípica	_Pg 74
Figura 20. Eletromicrografia da avaliação da proporção ADH : AH	Pg 75
Figura 21. Eletromicrografia da influência da recirculação externa da	a mistura
na formação das partículas de AH	Pg 76
Figura 22. Eletromicrografia das estruturas obtidas na preparação	
das partículas de AH contendo o ativo Arrabidaea chica	_ Pg 77
Figura 23. Eletromicrografia da avaliação da proporção Ativo	
(A. chica):AH	_Pg 78
Figura 24. Análise do diâmetro médio das micropartículas	_ Pg 79
Figura 25. Influência da velocidade de agitação na primeira e segui	nda
Etapa da reparação no diâmetro médio das micropartículas.	_ Pg 80
Figura 26. Diâmetro médio das nanopartículas separadas por centri	fugação,
em função da velocidade de agitação	_Pg 81
Figura 27. Diâmetro médio das micropartículas formadas em função	da
proporção AH : A. chica	_ Pg 83
Figura 28. Diâmetro médio das nanopartículas formadas em função	da
proporção AH : A. chica	_ Pg 84
Figura 29. Potencial Zeta das nanopartículas obtidas	_Pg 85
Figura 30. Perfil de indução do crescimento celular em fibroblastos	
humanos	_Pg 92
Figura 31. Fotografias da membrana coriolantóide (CAM) mostrando	ра
atividade angiogênica das amostras ensaiadas	_Pg 94
Figura 32. Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos na	
membrana coriolantóide (CAM).	_Pg 95
Figura 33. Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mos	strando
a atividade angiogênica dos grupos controles	_Pg 97
Figura 34. Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mos	strando
a atividade angiogênica das concentrações de A. chica.	_Pg 98

Figura 35. Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mo	ostrando
a atividade angiogênica das partículas contendo o extrato bruto da	
A. chica.	Pg 99
Figura 36. Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos no te	egumento
do dorso de camundongos nos grupos controles e nas concentração	ões do
extrato.	_Pg 101
Figura 37. Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos no te	egumento
do dorso de camundongos das partículas contendo o extrato bruto	da
A. chica	_Pg 103
Figura 38. Cortes histológicos do tegumento do dorso de	
camundongos	_Pg 105
Figura 39. Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos nos	
cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.	_Pg 106
<i>Figura 40.</i> Fotografias das feridas no dorso de ratos.	Pg 108
Figura 41. Área da ferida no tegumento do dorso de ratos.	_Pg 109
Figura 42. Área cicatrizada da ferida (%)	_Pg 109
Figura 43. Quantidade de hidroxiprolina no tecido cicatrizado de ra	tos.
	_Pg 110

## LISTA DE TABELAS

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças constitutivas dos extratos brutos provenientes do	)
Paraná (Ac 03) e do Amazonas (Ac 06)	_ Pg 43
Tabela 2: Condições operacionais do spray dryer para secagem do ex	<i>ctrato</i>
vegetal	_ Pg 45
Tabela 3: Programa de gradiente de fase móvel para análises por CLA	4 <i>E.</i>
	_Pg 47
Tabela 4- Condições cromatográficas utilizadas para análise das	
antocianinas presentes na A. chica	Pg 47
<b>Tabela 5.</b> Alterações químicas e físicas na preparação das micro e	
nanoesferas de AH: velocidade de agitação, quantidade de reticulante	,
pH e recirculação	_Pg 50
<b>Tabela 6.</b> Razão ADH : AH em massa e mol, em cada reação de	
reticulação	_Pg 51
Tabela 7. Alterações na quantidade de extrato vegetal da A. chica	
adicionado na preparação das micro e nanopartículas de AH	_Pg 52
Tabela 8. Potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento	Pg 82
<b>Tabela 9.</b> Rendimento de micro e nanopartículas de AH.	Pg 86
Tabela 10. Rendimento das micro e nanopartículas de AH contendo a	tivo.
	Pg 87
Tabela 11. Quantificação das perdas durante o processo de obtenção	das
micro e nanopartículas contendo o ativo da A. chica	Pg 89
Tabela 12. Eficiência de encapsulação do extrato ativo da A. chica na	S
Micro e nanopartículas	Pg 90
Tabela 13. Carregamento do extrato ativo da A. chica/mg de micro e	
nanopartículas	Pg 91
Tabela 14. Pvalues das amostras no ensaio de cicatrização.	Pg 107

## LISTA DE ABREVIATURAS

XXVII

#### LISTA DE ABREVIATURAS

aa – aminoácidos

- Ac 03 e 06 Acessos 03 e 06
- A. chica Arrabidaea chica
- Acdesc Arrabidaea chica encontrada no descarte
- Acencap Arrabidaea chica encapsulada
- Aci Arrabidaea chica adicionada inicialmente
- Ac/mg<sub>part</sub> Quantidade de *A. chica* por 1 mg de partícula
- Ac/5mg<sub>part</sub> Quantidade de *A. chica* por 5 mg de partícula.
- ADH Dihidrazida adípica
- AH Ácido hialurônico
- **Ang (1 e 2)** Angiopoetina (1 e 2)
- CD44 Receptores de superfície celular
- CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência
- COOH Grupo ácido carboxílico

 $\mathbf{cm}$  – centímetros

- CPMA Coleção de plantas medicinais e aromáticas
- CPQBA Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
- DAD Detector de arranjo de diodos
- DDS Sistemas de liberação de fármacos
- DMEM Meio Dulbecco's Modified Eagle Médium
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- ECM Matriz extra celular
- EDCI Carbodiimida: 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)
- Eencap Eficiência de encapsulação
- EGF Fator de crescimento epitelial
- EGFR Receptor de EGF
- Eq Equação
- FBS Soro fetal bovino
- FGF Fator de crescimento de fibroblastos

- FGFR Receptor de FGF
- g (itálico) Gravidade
- g (sem itálico) Gramas
- GAG-Glicosaminoglicano
- HA Ácido hialurônico
- HAS Sintase transmembrana de ácido hialurônico
- HB-EGF Fator de crescimento epidérmico ligado à heparina
- HCI Ácido clorídrico
- HER Receptor de HB-EGF
- HMW-HA Ácido hialurônico de alta massa molar
- HNa Hialuronato de sódio
- $\mathbf{h}$  Hora
- IL 10 Interleucina 10
- IPA Álcool isopropílico
- KDa Kilodaltons
- Kg Kilogramas
- KV Kilo Volts
- mA Mili Amper
- MCA Membrana corioalantóide
- MEV Microscópio eletrônico de varredura
- $\mu g/\mu L$  Microgramas/microlitros
- $\mu g/mL Microgramas/mililitros$
- m<sub>desc.AH/ADH/A. chica</sub> Massa dos descarte (massa AH, ADH e A. chica).
- **m**<sub>i</sub> Massa inicial
- $m_f$  Massa final
- mfmicro Massa final micropartículas
- m<sub>fnano</sub> Massa final nanopartículas
- mmicro Massa micropartículas
- mnano Massa nanopartículas
- mtf Massa total final
- $m_{ti}$  Massa total inicial

- µm Micrômetro
- mL Mililitros
- mL/h Mililitros/hora
- **mM** Milimolar
- N<sub>2</sub> Nitrogênio líquido
- NH<sub>2</sub> Amino
- nm Nanômetro
- °C Graus centígrados
- o-AH Oligossacarídeos de ácido hialurônico
- OH Grupo álcool
- **pA** Pico Amper
- **PA** Ativador de plasminogênio
- p/v Peso/volume
- PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PLGA Ácido poli-láctico glicol
- PLGF Fator de crescimento placentário
- PVC Policloreto de vinila
- $\mathbf{R}$  Rendimento
- R<sub>micro</sub> Rendimento de micropartículas
- Rnano Rendimento de nanopartículas

Rtotal - Rendimento total de partículas

**rhBBPDGF**– Fator de crescimento derivado de plaquetas BB humano recombinante

- rhVEGF Fator de crescimento endotelial vascular recombinante humano
- SC Extrato córneo
- **TGF-** $\beta$  Fator de crescimento transformante  $\beta$
- $\textbf{TGF-}\alpha$  Fator de crescimento transformante  $\alpha$
- **TGF-** $\beta$ **R** Receptor de TGF- $\beta$

**Tie2** - receptores transmembrânicos tipo tirosina quinase restritos às células endoteliais

**TNF-** $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$ 

U\$ - Dólar

**UV** – Ultra violeta

 $\mathbf{V} - \text{Volts}$ 

v/v-Volume/volume

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – Receptor de VEGF

 $\label{eq:VPF-Fator} \textbf{VPF}-\textbf{Fator} \ \textbf{de} \ permeabilidade \ vascular$
# I. INTRODUÇÃO

#### I. Introdução.

Os avanços na ciência de polímeros e tecnologias para suas aplicações em diversas áreas, incluindo a micro e nanotecnologia, têm promovido o desenvolvimento de partículas coloidais utilizando polímeros sintéticos ou naturais para aplicações em produtos farmacêuticos, cosméticos e biomateriais *(Gaffney, 2010; Fronza et al., 2007)*.

A combinação de biomateriais, células e moléculas bioativas podem facilitar a recuperação de tecidos doentes ou lesionados *(Chen & Mooney, 2003)*, oferecendo um potencial para o desenvolvimento de tecidos autólogos para o reparo de defeitos primários, indiferentemente se o defeito acontecer em um órgão sólido, tecidos moles ou tecido ósseo *(King & Patrick, 2000)*.

O desenvolvimento de novos biomateriais com enfoque no processo cicatricial, vem acelerando ao longo dos anos, incluindo a aplicação na engenharia tecidual *(Cai et al, 2005)*.

O ácido hialurônico (AH) é um polímero natural, que tem sido usado amplamente em aplicações clínicas, devido às suas diferenciadas propriedades reológicas (viscosidade e viscoelasticidade), físico-quimicas (alta capacidade de hidratação) e biológicas (receptores em células CD44). As aplicações incluem cirurgia ocular, viscossuplementação e cicatrização de feridas (*Garg & Hales, 2004; Rosier & O'keef, 2000*), e mais recentemente também o carreamento de fármacos (*Yun et al, 2004*).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal vem aumentando significativamente ao longo dos anos, em particular, o interesse nas investigações de extratos vegetais que auxiliem no processo cicatricial, principalmente de úlceras diabéticas e aquelas provocadas pelo efeito colateral do uso de alguns medicamentos *(Newman, 2008)* e quimioterápicos *(Cragg & Newman, 2009)*.

A espécie vegetal *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot é encontrada em quase todo o Brasil e muito comum na Floresta Amazônica. São atribuídos à *A. chica* propriedades terapêuticas para enfermidades da pele. Estudos

desenvolvidos no CPQBA-UNICAMP comprovaram que o extrato bruto de *A. chica* induz a proliferação de fibroblastos *in vitro* e estimula a síntese de colágeno *in vivo* e *in vitro* além de apresentar moderada capacidade antioxidante e atividade antiulcerogênica (*Jorge et al., 2008*).

Sistemas de liberação de fármacos (DDS) capazes de promoverem a liberação sustentada de fármacos e/ou o seu direcionamento específico, reduzirem doses, frequencia de administração e portanto efeitos colaterais, têm trazido grande impacto em terapias de diversas doenças. Micro e nanopartículas constituem uma parte importante desses DDS, que em virtude do seu tamanho reduzido e elevada área superficial, possuem propriedades eficientes de carreamento de compostos bioativos e de interação com tecidos. (*Vasir et al., 2003, Lasic, 1993*).

Atualmente, as aplicações cutâneas das micro e nanopartículas têm sido exploradas, envolvendo polímeros naturais, sintéticos e lipossomas. A associação de fármacos à essas partículas tem melhorado a sua eficiência de ação em relação à forma livre, trazendo benefícios para o tratamento de doenças como a leishmaniose cutânea, e constituindo também a mais nova geração de cosméticos funcionais (*Beck et al., 2011; Baroli, 2010; Guterres et al., 2007*).

Dentro deste contexto, neste trabalho foi estudada a produção e caracterização de micro e nanopartículas de AH. Essas partículas encapsularam um extrato vegetal de *Arrabidaea chica* fornecido pelo setor de fitoquímica do CPQBA-UNICAMP. As partículas vazias e contendo o extrato vegetal foram caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas tais como: tamanho, distribuição e grau de intumescimento, capacidade de encapsulação do bioativo e liberação sustentada, e quanto às suas propriedades cicatrizantes, em ensaios *in vitro* em cultura de células de fibroblastos humanos e ensaios *in vivo* de angiogenicidade (com membrana corioalantóide e tegumento do dorso de camundongos) e de cicatrização em ratos.

# I.1. Objetivo e Metas.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de nano e micropartículas poliméricas constituídas de ácido hialurônico e encapsulação de extrato vegetal da *Arrabidaea chica* para aplicações em cicatrização.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as seguintes metas:

# 1. Preparação das micro e nanopartículas:

- Preparação e caracterização de partículas vazias de ácido hialurônico reticuladas quimicamente com diidrazida adípica;
- Encapsulação de extrato vegetal de Arrabidaea chica nas partículas com propriedades físico-químicas mais promissoras;

# 2. Estudos *in vitro*:

Ensaios *in vitro* da capacidade de indução do crescimento celular em fibroblastos humanos;

# 3. Estudos in vivo:

- Ensaios *in vivo* da capacidade indutora da angiogênese em membrana corioalantóide e no tegumento do dorso de camundongos.
- Ensaios *in vivo* de cicatrização de feridas em ratos.
- Ensaios da capacidade indutora da produção de colágeno.

# II. Revisão bibliográfica.

# II. Revisão bibliográfica.

# II. 1. Tegumento.

O tegumento é o maior órgão do corpo, correspondendo a 16 % do peso de um indivíduo, que serve como barreira de agentes externos. É constituído por três camadas denominadas epiderme, derme e hipoderme, ou tecido subcutâneo (*Figura 1*).



*Figura 1. Anatomia do tegumento.* Camadas constituintes do tegumento: epiderme, derme e hipoderme. *Fonte: Fitzpatrick et al., 1999.* 

A epiderme é a camada mais externa constituída por tecido epitelial tendo como principais tipos celulares os melanócitos (produção de melanina), as células de Langerhans (funções imunológicas), os queranócitos (camada estratificada) e células de Merkel (percepção sensorial). Sob a epiderme, localiza-se a derme que é constituída por tecido conjuntivo. Esse tecido conjuntivo é firme, flexível e elástico, além de nutrir e sustentar a epiderme devido à presença de vasos sanguíneos, terminações nervosas e vasos linfáticos. Apresenta apêndices dérmicos como unhas, cabelos e glândulas (*Junqueira & Carneiro, 1999*).O tecido conjuntivo é composto por diversos tipos celulares incluindo, células cartilaginosas, células ósseas e fibroblastos, os quais são especializados na secreção da matriz extracelular rica em fibras de colágeno e fibra elástica, responsáveis pela arquitetura estrutural do corpo. As células do tecido adiposo e as musculares lisas também fazem parte das células do tecido conjuntivo (*Alberts et al., 2004*). A terceira e última camada do tegumento é a hipoderme ou tecido subcutâneo que constitui uma camada de tecido conjuntivo frouxo (*Junqueira & Carneiro, 1999*).

Entre as múltiplas e complexas funções da pele em mamíferos, uma das maiores é a prevenção da invasão do organismo por ameaças do meio ambiente atuando como uma barreira defensiva (*Prow et al., 2011*).

A pele envolve mecanismos de defesa que fornecem barreira física, imunológica, metabólica e protetora UV para impedir o ataque de microorganismos, produtos químicos tóxicos, radiação UV e partículas (incluindo nanopartículas). Por outro lado, a pele pode ser usada como porta de entrada para substâncias terapêuticas como drogas e vacinas se o mecanismo que confere as propriedades de barreira for explorado e entendido *(Roberts et al., 2008)*.

Uma de suas defesas é o seu pH ácido da superfície (pH 4,2-5,6). Essa superfície ácida é descrita como manto ácido, que possui inúmeras funções como defesa antimicrobial, manutenção da permeabilidade da barreira por efeitos na organização lipídica extracelular e processamento, na preservação da integridade e coesão ideais dos corneócitos, regulação por enzimas proteolíticas sensíveis ao pH e restrição da inflamação por inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (*Prow et al., 2011*).

Outra defesa é o extrato córneo (SC) que representa a principal barreira física da pele, de modo que para a permeação de uma substância através da pele, a difusão pelo extrato córneo é uma etapa limitante. Reciprocamente, o SC é também a maior barreira para a difusão de água para fora da pele. O transporte de substâncias através do SC ocorre principalmente por difusão passiva e com base

em dois compartimentos de tijolos e estrutura de argamassa do SC, interrompido por apêndices, pode ocorrer por três vias possíveis: transcelular, intercelular e apêndices (*Roberts et al., 2002*).

Agentes químicos, físicos, microbiológicos e mecânicos podem causar lesões teciduais. A perda da integridade de extensas porções de pele pode levar a grande disfunção ou mesmo morte (*Balbino et al, 2005*).

## II. 2. Cicatrização.

Com o rompimento da integridade tecidual nos animais vertebrados, logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma seqüência de eventos moleculares que objetivam restaurar o tecido injuriado. Após o nascimento, o organismo falha em seu objetivo final de neoformar o tecido lesado, ocorrendo então, o reparo com a formação de uma cicatriz fibrótica. Apenas durante a fase fetal, o reparo de lesões se dá sem a formação de cicatriz, ocorrendo uma verdadeira restauração do tecido, por um processo de neoformação tecidual *(Mcallion & Ferguson, 1996)*.

A cicatrização de uma ferida requer uma integração orquestrada dos complexos eventos biológicos e moleculares de migração celular, proliferação celular, e deposição de matriz extracelular (ECM). Respostas celulares a mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas devem ser apropriadas e precisas. Em injúrias cutâneas agudas, o reparo é rápido, já em lesões crônicas, como úlceras diabéticas, a cicatrização é mais lenta *(Falanga, 2005)*.

Os diferentes tecidos possuem células competentes para a regeneração, mas essa capacidade varia com o tipo da lesão (tamanho; causa), idade do indivíduo e tipo celular (*Chen & Mooney, 2003*).

O processo cicatricial inicia-se a partir de uma injúria que desencadeia uma cascata complexa e organizada de eventos celulares e moleculares que pode ser dividida em três fases distintas e superpostas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelagem. Cada uma dessas fases envolve a produção e secreção de

substâncias com atividade sinalizadora e estimuladora no processo, como as citocinas e fatores de crescimento (Madri et al., 1996).

Apesar da concomitância das fases da cicatrização, a seqüência de eventos ocorre a partir da lesão de vasos sanguíneos, extravasamento de sangue e de seus constituintes celulares, principalmente plaquetas *(Clark, 1996).* 

A angiogênese é um processo essencial para a cicatrização. Vários reguladores como fatores de crescimento, quimiocinas, enzimas angiogênicas e moléculas de adesão induzem esse processo. O fator de crescimento mais conhecido na indução do processo é o VEGF, mas até agora o único autorizado a ser utilizado clinicamente e úlceras de pé diabético é o PDGF (*Bennett et al., 2003*).

#### II.2.1. Fase inflamatória.

Lesões teciduais severas causam rompimento do vaso sanguíneo com extravasamento de constituintes sanguíneos. Imediatamente após a lesão, a resposta inflamatória é crítica para parar o fluxo sangüíneo no local da lesão e preencher o déficit tecidual (*Branski et al, 2006*). A coagulação a e agregação plaquetária geram um coágulo rico em fibrina, favorecendo o restabelecimento da hemostasia do vaso sanguíneo, formando uma matriz provisória para a migração celular. Plaquetas facilitam a formação do tampão e secretam mediadores múltiplos, incluindo fatores de crescimento. Neutrófilos e monócitos são recrutados do local da lesão para combater contaminantes e facilitar o debridamento tecidual (*Clark, 1996*). No tecido, os monócitos são ativados e transformam-se em macrófagos que liberam fatores que iniciam a formação do tecido de granulação; sendo, provavelmente, as principais células envolvidas no controle do processo de reparo (*Singer & Clark, 1999; Arnold & West, 1991*).

As plaquetas também ativam a cascata da coagulação, onde a trombina induz a degranulação plaquetária liberando fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- $\beta \in \alpha$  (TGF- $\beta \in TGF-\alpha$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF), além de glicoproteínas adesivas como a

fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (Arnold & West, 1991).

A liberação dos fatores provenientes das plaquetas é o principal estímulo para a ativação dos macrófagos, seguida da fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, que também contribuem para esta ativação (*Beezhold & Personius, 1992*).

Os macrófagos também produzem fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF-β, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação *(Singer & Clark, 1999).* 

Em adição às funções de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, as células inflamatórias produzem fatores de crescimento que preparam a ferida para a fase proliferativa, mediando a fase inicial da resposta inflamatória para a fase precoce do reparo, quando fibroblastos e células endoteliais serão recrutados.

#### II.2.2. Fase Proliferativa.

O aumento da permeabilidade microvascular é o primeiro estágio deste processo, apresentando-se como etapa importante, que permite, através do extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares, a formação de uma matriz extracelular provisória necessária à migração e proliferação das células endoteliais (*Dvorak et.al., 1999*).

Horas após a lesão, inicia-se a reepitelização através das células epiteliais que sofrem diferenciação e proliferação. Fibroblastos migram para a área lesionada entre 48 e 72 horas depois da lesão (*Vanlis & Kalssebeek, 1973*). Quatro dias após a lesão ocorre a formação do tecido de granulação que consiste de macrófagos, fibroblastos, tecido conectivo frouxo e uma alta densidade de miofibroblastos, tipo celular transicional com propriedades de fibroblastos e células musculares lisas; sendo responsáveis pela contração da ferida, necessária para

manter a continuidade tecidual, reduzir o tamanho da lesão, e facilitar a cicatrização (*Branski et al, 2006*).

Os macrófagos suprem a liberação de citocinas necessárias para estimular fibroplasia e angiogênese, fibroblastos constroem uma nova matriz para a infiltração celular, e os vasos sanguíneos levam oxigênio e nutrientes necessários para o metabolismo celular *(Clark, 1995)*.

Ocorre então um processo conhecido como angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), causando alteração no fenótipo de células endoteliais. Células lesionadas liberam fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) estimulando a liberação de ativador de plasminogênio (PA) e pró-colagenase pelas células endoteliais. A colagenase é ativada por plasmina e plasminogênio, degradando a membrana basal abaixo das células endoteliais estimuladas, que projetam pseudópodes através dessa membrana, migrando para o espaço do tecido conectivo (*Clark, 1996*).

É necessária a reconstituição do epitélio como uma barreira funcional (impermeável à água) a ser formada no local da ferida (Hackham & Ford, 2002).

# II.2.2.1. Permeabilidade Vascular.

O aumento da permeabilidade ocorre em decorrência da liberação de diversos fatores de crescimento no local da lesão. Os mecanismos básicos da regulação da permeabilidade vascular, principalmente causada pelos fatores de crescimento não estão completamente elucidados. A função e o mecanismo pelos quais estes fatores de crescimento exercem seu efeito são objetos de estudos de grande interesse, e seus caminhos metabólicos estão sendo elucidados.

Na angiogênese patológica, o aumento da permeabilidade vascular à água e macromoléculas apresenta importante função no processo, sendo responsável direto pela formação do edema. Este aumento da permeabilidade capilar parece ter um menor efeito durante a angiogênese fisiológica, porém, causa danos consideráveis em determinadas patologias (*Vaquero et al, 2000; Pettersson et al., 2000*).

#### II.2.2.2. Angiogênese.

Vasos sanguíneos surgiram ao longo da evolução para carregar oxigênio para órgãos distantes. Em animais primitivos, como o verme *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, o oxigênio é capaz de se difundir através do seu pequeno corpo para todas as células. Em outras espécies, que se desenvolveram com a evolução, uma cadeia vascular distribui oxigênio no sangue para células distantes *(Carmeliet, 2005).* 

Angiogênese é resultado de processos seqüenciais iniciados com a ativação de células endoteliais, migração para brotamento de novos vasos, e maturação desses vasos circundados por células musculares lisas e pericitos (*Hirschi et al, 2002*).

A formação de vasos sanguíneos é um processo complexo, requer um balanço finamente harmônico entre numerosos sinais estimulatórios e inibitórios, como integrinas, angiopoietinas, quimiocinas, moléculas juncionais, sensores de oxigênio, inibidores endógenos e muitos outros.

Durante a fase de angiogênese, o plexo vascular expande-se progressivamente por meio do brotamento de vasos e remodelagem em uma cadeia vascular fortemente organizada e estereotipada de grandes vasos ramificados em outros menores (*Figura 2*) (*Carmeliet, 2005*).

Novos microvasos tornam-se maduros quando túbulos contínuos ligam-se por anastomose um ao outro e uma nova membrana basal é formada (*Peattie et al, 2004*).



*Figura 2.* Processo de angiogênese. Expansão do plexo com proliferação e migração de células, brotamento de vasos sanguíneos e remodelagem. *Fonte:* disponível em www.lucentins.com.

Depois do nascimento, o processo angiogênico só ocorre em eventos específicos, como no desenvolvimento do corpo lúteo, no endométrio uterino da fêmea preparando-a para a reprodução, no desenvolvimento da placenta durante a gravidez, na cicatrização de feridas cutâneas e na regeneração óssea *(Cai et al, 2005).* 

O processo de angiogênese não produz malignidade, mas promove o progresso e metástase do tumor (*Carmeliet, 2005*).

# II.2.2.3. Fatores de crescimento.

Secretados por diversos tipos celulares para transmitir sinais que controlam a migração celular, diferenciação e proliferação, através da ligação desses fatores a receptores de superfície celular. Esses sinais são transferidos através do receptor de membrana e amplificados por fosforilação, modificando a expressão gênica (*Chen & Mooney, 2003*).

São liberados através de sinalização imediata ou são embutidos na matriz extra-celular e liberados com a degradação da mesma por proteólise.

Os fatores de crescimento são conhecidos como moduladores do processo de cicatrização de feridas por diversos aspectos: são sintetizados por células estimuladas necessárias para o reparo tecidual; são encontrados no fluído de feridas agudas, e crônicas em menor concentração; a utilização de anticorpos contra os fatores de crescimento inibe a cicatrização; a adição desses fatores acelera o processo normal de reparo (*Draye et al, 1998*).

Fatores de papel importante no processo de angiogênese: fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF) e angiopoietinas-1 e 2 (Ang-1 e Ang-2) *(Chen & Mooney, 2003).* 

## II.2.2.3.1. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF).

A família dos FGFs compreendem 22 membros de pequenos polipeptídeos com estrutura homóloga, e um núcleo central de 140 aminoácidos. FGF1 (FGF ácido) e FGF2 (FGF básico) são fatores angiogênicos (*Folkman & Shing, 1992; Ornitz & Itoh, 2001*). Apresentam-se como polipeptídeos de cadeia simples com cerca de 18 KDa, e não glicosilados. Transmitem seus sinais através de quatro receptores de FGF de alta afinidade, proteínas quinases transmembrânicos (FGFR-1 ao FGFR-4), os quais se ligam à FGFs distintos, com diferentes afinidades. Uma das características do FGF1 e FGF2 é que eles interagem fortemente com moléculas semelhantes a proteoglicanas, como o sulfato de heparana, presentes na matriz extracelular (*Folkman et.al., 1988; Pimentel, 2001*), o que estabiliza os FGFs frente a desnaturação térmica e proteolítica, além de limitar sua difusividade (*Werner & Grose, 2003*). Desta forma, estas moléculas atuam como um reservatório para fatores pró-angiogênicos.

A maioria dos membros da família FGF possui um amplo espectro mitogênico, estimulando a proliferação de várias células de origem mesodérmica, ectodérmica e também, endodérmica (*Werner, 1998*).

Agem sobre as células endoteliais de forma parácrina, quando liberados a partir da matriz extracelular, ou de forma autócrina, quando liberados pelas próprias células endoteliais, promovendo a proliferação e diferenciação celular *(Schweigerer et al, 1987)*.

Durante a formação do tecido de granulação, FGF2 promove a migração celular através de receptores de superfície para integrinas, os quais são responsáveis por mediar a ligação das células endoteliais à matriz extracelular *(Sepp et al, 1994)*.

#### II.2.2.3.2. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

O VEGF é uma molécula potente de transdução de sinal (pró-angiogênica) que atua especificamente nas células endoteliais vasculares, sinalizando-as para sofrer proliferação, migração e diferenciação para dentro de novos vasos sanguíneos (*Gu et al,2004*).

VEGF é uma glicoproteína homodimérica ligante de heparina de 45 kDa, mitogênica para células endoteliais (*Ferrara et al, 1991*). É requerido para o crescimento e diferenciação de células endoteliais, e quimiotático para monócitos, atraindo-os para locais de inflamação e tumores (*Byrne et al, 2005*).

Possui características peculiares que o difere de outros ligantes de heparina, como o NH<sub>2</sub> terminal precedido por uma seqüência de sinal típica, podendo ser secretado por células intactas, e sítios de ligação incluindo receptores de ligação tirosina quinases (*Takeshita et al, 1994*).

VEGF é mediador da via de sinalização através de alta afinidade por receptor tirosina quinase que possui estrutura e função similares à família do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sugerindo que as sub-famílias de receptores para VEGF e PDGF estão evolutivamente ligadas (*Neufeld et al, 1999*).

A família gênica do VEGF consiste de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fator de crescimento placentário (PLGF). VEGF-A está envolvido principalmente na angiogênese enquanto VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos na linfangiogênese (*Byrne et al, 2005*).

O fator de crescimento endotelial vascular recombinante humano (rhVEGF) é uma proteína homodimérica que tem 165 aa por monômero; existe na forma glicosilada e não glicosilada *(Goolcharran et al, 2000)*. O dímero é ligado por três pontes dissulfito e é essencial para a atividade biológica do VEGF *(Potgens et al, 1994)*.

#### II.2.2.3.3. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

O PDGF compreende uma família de proteínas homo e heterodiméricas, incluindo PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD (Heldin et al, 2002). Exercem suas funções por meio da ligação a três diferentes receptores de atividade tirosina quinase transmembrânicos, os quais são homo ou heterodímeros de cadeias  $\alpha \in \beta$ . O PDGF foi o primeiro fator de crescimento a apresentar-se como quimiotático de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e fibroblastos. Aumenta a proliferação dos fibroblastos e produção da matriz extracelular, estimula fibroblastos a contraírem as matrizes de colágeno e induzirem o fenótipo miofibroblástico destas células; sendo o primeiro fator de crescimento a ser aprovado para o tratamento de úlceras humanas (Nagai & Embil, 2002; Mandracchia et al, 2001).

Logo após a injúria, o PDGF é liberado em grandes quantidades a partir da degranulação plaquetária (*Ross et al, 1974*). Os padrões de expressão de PDGF e seu receptor sugerem uma ação de forma parácrina, onde os ligantes são predominantemente expressos na epiderme, enquanto os receptores são encontrados na derme e no tecido de granulação. A expressão dos PDGFs e de seus receptores também se encontra reduzida nas feridas de difícil cicatrização, como em camundongos diabéticos ou tratados com glicocorticóides (*Beer et al, 1997*). Vale ressaltar, no entanto, que o aumento da produção do PDGF pode estar envolvido na patogênese de cicatrizes hipertróficas e formação de quelóides, como sugerido pelo potente efeito do PDGF sobre a proliferação de fibroblastos e produção da matriz extracelular por estas células (*Niessen et al, 2001*).

## II.2.2.3.4. Fator de crescimento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ).

O TGF- $\beta$  é um dos mais importantes mediadores da cicatrização devido aos seus efeitos multipotentes. Apresenta-se como o principal modulador da angiogênese durante a cicatrização, por regular a proliferação celular, migração, formação do tubo capilar e deposição da matriz extracelular. Três isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) são expressas em mamíferos, possuindo uma seqüência de aminoácidos com alta homologia. São sintetizadas como precursores, e usualmente secretadas como uma proteína complexa ligada ao TGF- $\beta$ , da qual é removida extracelularmente via clivagem proteolítica. Cada isoforma possue seu receptor específico: TGF- $\beta$ RI (receptor de TGF- $\beta$  I), TGF- $\beta$ RII (receptor de TGF- $\beta$ II) e TGF- $\beta$ RIII (receptor de TGF- $\beta$  III). Os receptores TGF- $\beta$ RI e TGF- $\beta$ RII, apresentam atividade de serinas-treoninas quinases, enquanto o TGF- $\beta$ RIII, parece ser um receptor não sinalizante (*Roberts, 1998*).

As isoformas do TGF- $\beta$  possuem sua expressão regulada de forma distinta em diferentes tipos celulares, e em vários estágios do desenvolvimento celular, o que parece sugerir funções biológicas distintas *(Kingsley, 1994)*. O TGF- $\beta$ III protege as células da apoptose induzida *(Li et al, 1999)*. In vitro, estes fatores de crescimento apresentam-se como estimuladores da mitose de fibroblastos, mas por outro lado, inibem a proliferação de muitas outras células, incluindo queratinócitos. Além disso, os TGF- $\beta$ s são potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas *(Massagué, 1990)*.

Imediatamente após a ocorrência da lesão, grandes quantidades de TGFβI são liberadas pelas plaquetas agindo como quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos *(Assoian et al, 1983).* Estes tipos celulares também servem para aumentar o nível de TGF-βI dentro da ferida. São secretadas as formas ativas e as formas latentes que, por sua vez, são seqüestradas dentro da matriz, de onde são liberadas no decorrer do processo pela ação de enzimas proteolíticas. Esta combinação de liberação celular e liberação a partir de um estoque temporário na matriz da ferida suprem todo o processo de reparo de TGF- $\beta$  (*Roberts & Sporn, 1996*). Outra função importante dos TGF- $\beta$ s é a estimulação da reepitelização e formação do tecido de granulação. Apesar deste fator de crescimento inibir a proliferação dos queratinócitos, ele induz a expressão de integrinas necessárias à migração destas células que cruzam a matriz provisória da lesão, rica em fibronectina (*Gailit et al, 1994; Zambruno et al, 1995*).

#### II.2.2.3.5. Fator de crescimento epidérmico (EGF).

O EGF compreende uma família de mitógenos contendo diversos membros, incluindo EGF, TGF- $\alpha$ , fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF), anfiregulina, epiregulina, betacelulina, neuregulina, e a mais recente descoberta, o "epigen", assim como proteínas codificadas pelo vírus Vaccinia e outros poxivírus (*Strachan et al., 2001; Tsahar et al., 1998*). Todos estes fatores exercem suas funções através da ligação a quatro diferentes receptores de alta afinidade: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4. Quando unidos aos seus ligantes, estes receptores formam homo ou heterodímeros (*Yarden, 2001*). A superexpressão destes receptores, em particular do HER2 apresenta um papel importante na gênese tumoral. Uma série de experimentos e estudos clínicos apresentaram um efeito positivo do EGF, TGF- $\alpha$  e HB-EGF no processo de cicatrização de feridas, sugerindo que os fatores de crescimento endógenos também estão envolvidos no processo (*Greenhalgh, 1996; Schultz et al, 1987; Steed, 1998*).

O HB-EGF é mitogênico para fibroblastos e queratinócitos, sugerindo uma importante função na reepitelização e formação do tecido de granulação (*Marikovsky et al, 1996*). O TGF- $\alpha$  é expresso em macrófagos na lesão, além de eosinófilos e queratinócitos epidérmicos localizados no centro da ferida (*Werner & Grose, 2003*).

## II.2.2.3.6. Angiopoietinas 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2).

As angiopoetinas (Ang-1 à Ang-4) têm sido apresentadas como fatores de crescimento específicos para células endoteliais, agindo como associados importantes do VEGF. Ligam-se a receptores transmembrânicos tipo tirosina quinase, chamados Tie2 (restritos às células endoteliais). Porém, enquanto as Ang-1 e Ang-4 foram identificadas como ativadores destes receptores, Ang-2 e Ang-3 parecem bloquear a sua atividade na maioria das circunstâncias estudadas *(Werner & Grose, 2003).* 

A Ang-1 está envolvida nas interações normais entre as células endoteliais e seu suporte subjacente, os pericitos, auxiliando na manutenção da estabilidade vascular (*Suri et al, 1996*). Além disso, foi demonstrado que Ang-1 protege as células endoteliais da apoptose (*Papapetropoulos et al, 2000*) e induz a migração e germinação, levando à formação estrutural tubular do vaso (*Hayes et al, 1999*). Ang-1 leva a formação de vasos sangüíneos maduros, não apresentando hiperpermeabilidade (*Suri et al, 1998*). Enquanto a Ang-1 é expressa constitutivamente em adultos, Ang-2 é altamente produzida em locais de angiogênese ativa, sugerindo uma provável função na desestabilização dos vasos pré-existentes, o que leva a um estado de maior plasticidade (*Maison-Pierre et al, 1997*).

#### II.2.3. Fase de Remodelagem.

É uma fase marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno tipos I, II e VI, na transição do tecido de granulação para a cicatriz madura *(Gabbiani et al., 1972)*.

Fibroblastos tranformam-se em miofibroblastos promovendo a contração da ferida, enquanto as células da epiderme restabelecem a barreira natural.

Ocorre uma reorganização da matriz extracelular, que passa de uma matriz provisória inicial constituída de um tampão de fibrina com suas proteínas

associadas, para após sua degradação por proteólise, dar lugar à matriz definitiva, rica em fibronectina e ácido hialurônico *(Clark, 1996)*. Em uma fase mais tardia, o tecido de granulação comporta-se como um tecido contrátil responsivo à agonistas que estimulam o músculo liso *(Gabbiani et al., 1972)*.

Uma cicatriz precoce (entre um e três meses) é geralmente grosseira e dura. Em contraste, uma cicatriz mais madura é tipicamente mais fina e flexível. Essa observação tem grande importância na elasticidade tecidual. A diferença entre uma cicatriz matura e imatura se devem, em parte, a reorganização das fibras de colágeno (*Branski et al., 2006*).

Por volta da terceira semana, as feridas ganham cerca de 20% da sua resistência final *(Clark, 1996)*.

Com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, mais colágeno é depositado, cruzado e organizado, e a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida por meio de processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos de morte celular desconhecidos, levando a uma cicatriz relativamente acelular *(Arnold & West, 1991).* 

A deposição de colágeno e remodelação continua até doze meses após a lesão (*Ehrlich, 2000*).

#### II. 3. Matrizes poliméricas.

Matrizes poliméricas de liberação controlada são capazes de promover o reparo tecidual e em conjunto com nano e micropartículas, possibilitando a entrega de fármacos para células sem induzir resposta imune do organismo (*Gaffney et al., 2010; Rossam, 2011*).

A cicatrização de feridas é a primeira área potencial de terapia, já que por volta de dois milhões de pessoas sofrem queimaduras por ano, sendo que treze mil necessitam de enxerto de pele, e mais de oitenta mil possuem úlceras de pé diabético *(Chen & Mooney, 2003)*.

Matrizes poliméricas têm um papel central no campo da engenharia tecidual, direcionando processos celulares baseados nas propriedades estruturais

e bioquímicas. Os materiais utilizados para a sua fabricação podem determinar algumas propriedades físicas, como biocompatibilidade, biodegradação e estabilidade mecânica (*Segura et al, 2005*).

A produção das matrizes poliméricas pode ser obtida em diversas apresentações: hidrogéis, membranas, micro e nanoesferas.

A matriz ideal para liberação de drogas deve ser inerte, biocompatível, mecanicamente resistente, capaz de carregar cargas de fármacos adequadas, de simples administração e remoção, fácil de fabricar e esterilizar, e de baixo custo.

Hidrogéis são materiais de alta afinidade por água, que se tornam atraentes por possuirem estruturas similares à matriz extracelular da maioria dos tecidos, podem ser processados em condições relativamente brandas, podem ser aplicados de uma maneira minimamente invasiva, servindo como matriz extracelular sintética (*Drury & Mooney, 2003*). Exemplos de hidrogéis amplamente utilizados: agar, alginato, quitosana e ácido hialurônico.

#### II. 3.1. Polímeros biodegradáveis.

Os biomateriais podem ser derivados de polímeros tanto naturais (principalmente da matriz extracelular) quanto sintéticos. Como exemplos de polímeros naturais temos o ácido hialurônico (AH), protamina, polissacarídeos da goma do cajueiro; já o ácido poli-láctico glicol (PLGA), policarbonato, policloreto de vinila (PVC), são polímeros sintéticos. Os polímeros naturais são modificados para apresentar grupos funcionais capazes de realizar ligações covalentes, ou formarem malhas, esponjas, fibras, hidrogéis e microesferas (*Cai et al, 2005*).

A possibilidade do uso de polímeros biodegradáveis como carregador de drogas despertou a atenção de vários cientistas quando suturas reabsorvíveis foram introduzidas no mercado, há duas décadas atrás. Desde então, pesquisas em diversas áreas do conhecimento vêm esforçando-se para projetar polímeros biodegradáveis com mecanismos de degradação e propriedades mecânicas desejáveis (*Brannon-Peppas, 1995*).

Polímeros biodegradáveis possuem vantagens sobre outros carreadores por não necessitarem de remoção cirúrgica após a completa distribuição do fármaco e ainda podem direcionar a liberação da droga diretamente para a circulação sistêmica (*Brannon-Peppas, 1995*).

A estrutura do polímero é o principal fator que afeta a bioadesividade. É essencial que o polímero seja capaz de estabelecer íntimo contato com a mucosa expandindo-se e absorvendo água. A habilidade dos polímeros em absorver água depende da abertura da cadeia do polímero e da porcentagem de grupos modificados na molécula (*Leung & Robinson, 1990*).

Diversos trabalhos sugerem que a interação do polímero com a superfície biológica inicia-se primeiramente através da interação eletrostática seguida por mecanismos de entrelaçamento das cadeias do polímero, forças de Van der Waals e outros fatores (*Tur & Ching, 1998*).

Polímeros como o ácido hialurônico, com numerosos grupos hidrofílicos funcionais (carboxil e hidroxil), formam pontes de hidrogênio com glicoproteínas do muco durante o processo de bioadesão *(Leung & Robinson, 1988)*.

Bioadesão é um termo simples que pode ser descrito como a ligação de uma macromolécula sintética ou biológica a um tecido biológico. Uma ponte adesiva pode ser formada com a camada celular epitelial, com a camada mucosa contínua ou com uma combinação das duas (*Vasir te al., 2003*).

AH torna-se uma molécula atraente para a produção de novos polímeros biocompatíveis e biodegradáveis com aplicação na liberação de fármacos, engenharia tecidual e viscosuplementação, pois pode sofrer alterações nas suas propriedades físicoquímicas, mas conservando suas características principais de ser biocompatível e biodegradável (*Prestwich, 2001*).

#### II. 3.2. Ácido hialurônico.

O ácido hialurônico (AH) foi descoberto no humor vítreo de bovinos por Meyer e Palmer em 1934 (apud *Brown & Jones, 2005). In vivo*, em pH fisiológico, existe na forma poliônica (hialuronato de sódio), não em sua forma ácida protonada (*Brown & Jones, 2005*), porém, ambos são descritos como hialuronato/ácido hialurônico; sendo que a sua quantidade total estimada no corpo humano de um indivíduo de 70 kg é de 15 g (*Laurent, 1970; Soltes et al., 2005*), sendo que 5 g somente na pele (*Brown & Jones, 2005*). Já a estrutura precisa do HA foi determinada por Weissman e Meyer em 1954 (*Laurent, 1970*).

AH (Acido hialurônico, hialuronato, hialuronato de sódio) é um polissacarídeo linear, de ocorrência natural, composto de 2000-25000 *(Gaffney et al., 2010)* unidades dissacarídicas alternadas e repetitivas formadas por ligações  $\beta$ -1,4 ácido-D-glicurônico ( $\beta$ -1,3) N-acetil-D-glicosamina (Tokita, 1997; Drury & Mooney, 2003; Kogan et al., 2006) (*Figura 3*).

A estrutura primária do AH consiste dessas repetições, com mais de cinco pontes de hidrogênio entre cada dois dissacarídeos vizinhos. A estrutura secundária é formada como uma hélice de fita dupla por uma rotação de  $180^{\circ}$  de cada unidade dissacarídea, comparada aquelas à frente e atrás da cadeia. A estrutura terciária, folha- $\beta$  é energeticamente estabilizada pela presença de pontes de hidrogênio intermoleculares. As interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio em parceria com a repulsão eletrostática contrária possibilitam um grande número de moléculas para agregar formando matrizes de AH (*Brown & Jones, 2005*). Suas cadeias são semi-flexíveis, altamente hidratadas sugerindo seu papel como molécula de preenchimento de espaço, mas não unicamente com uma função estrutural, mas também como regulador do comportamento celular (*Genasetti et al., 2008*).

A massa molar do AH é altamente dependente da sua origem *(Brown & Jones, 2005).* Possui uma escala de ocorrência natural de tamanho molecular de 100 e 10000 kDa ( $10^2$ - $10^4$  kDa); está presente em todos os tecidos conectivos e é o maior constituinte da ECM *(Knudson & Knudson, 2001).* É o maior polímero dos tecidos conjuntivos, encontrado em alta concentração no fluído sinovial de junções (3-4mg/mL), fluído vítreo do olho (0,1-0,4mg/g), cartilagem, cordão umbilical, em oócitos de matriz extra celular durante a ovuloção (~0,5mg/mL), cérebro (35-115 µg/g<sup>-1</sup>) *(Segura et al, 2005; Genasetti et al., 2008; Gaffney et al., 2010).* 



*Figura 3.* Estrutura molecular do ácido hialurônico. Composto de repetições dissacarídicas de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina. *Fonte:* adaptação de fonte disponível em <u>www.talbotcentral.ucr.edu</u>.

Em mamíferos a síntese do AH ocorre na superfície citoplasmática da membrana plasmática através de uma AH sintase transmembrana (HAS), que possui três isoformas homólogas: HAS1, HAS2, HAS 3, as quais sintetizam o AH com taxas catalíticas diferentes resultando em diferentes tamanhos de polímeros *(Itano et al., 2004a; Itano et al., 2004b; Genasetti et al., 2008; Gaffney et al., 2010).* 

O refinamento do processo de isolamento tem resultado na viabilidade comercial de diversos tamanhos, num máximo de 5000 kDa (Brown & Jones, 2005).

AH é encontrado em quantidades variadas em todos os tecidos de animais adultos, em frutas (caju), em bactérias (gram negativas) e em grande quantidade na crista das aves (*Shiedlin et al. 2004*); é o mais simples glicosaminoglicano (GAG), sendo o único não-sulfatado presente na matriz extracelular de vertebrados (*Peattie et al, 2004*). É especialmente prevalente durante a cicatrização de feridas e no fluido sinovial das articulações (*Drury & Mooney, 2003*). Na ECM de tecidos conectivos, forma um suporte por ligar outras GAGs e proteoglicanos, que são mantidos através de interações específicas HA-proteína (*Peattie et al, 2004*). AH interage com outras macromoléculas e participa na regulação de células (migração celular, diferenciação e adesão) durante

processos morfogenéticos e patológicos (Huang et al, 2003). É degradado pela enzima hialuronidase (tipos 1 e 2) (*Radin et al., 1971*), uma endoglicosidase que possui a habilidade de clivar as ligações  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3 das cadeias de sua molécula degradando-o em oligossacarídeos ou grandes fragmentos de AH. (*Gonçalves, 2007; Genasetti et al., 2008; Golshani et al., 2008*).

AH produzido comercialmente é isolado tanto de materiais ou estruturas de origem animal (fluído sinovial, cordão umbilical, pele, crista de galo) quanto de bactérias (fermentação ou isolamento direto) (*Brown & Jones, 2005*).

A abundância de grupos carboxila (COOH) promove a adesão do AH através da formação de pontes de hidrogênio com componentes do substrato biológico (*Pritchard et al, 1996*).

Em solução, AH assume uma configuração helicoidal endurecida unida por pontes de hidrogênio (*Hoekstra, 1999*). A alta viscosidade em solução aquosa fornece ao AH propriedades fisicoquímicas e biológicas únicas que preservam a hidratação tecidual, regulam a permeabilidade tecidual através de exclusão estérica e permite a lubrificação articular (*Peattie et al, 2004*).

AH solúvel tem sido usado em aplicações clínicas (*Rosier & O'keef, 2000*), entretanto, suas propriedades mecânicas pobres, degradação rápida e depuração *in vivo*, limitam sua aplicação clínica direta. Estima-se que a meia vida do AH na pele seja de 1 dia, 1-1,5 hora nos olhos, 1-3 semanas nas cartilagens e 70 dias no humor vítreo. Sua degradação ocorre nos lisossomos que contém as hialuronidases (HYALs) e outras enzimas de degradação (*Gaffney et al., 2010*).

Para melhorar as propriedades mecânicas, grau de degradação e depuração, AH pode ser modificado quimicamente por ligações covalentes cruzadas tornando-o menos solúvel. A modificação química típica de AH envolve grupos ácidos carboxílicos e/ou grupos álcoois da cadeia principal (*Figura 4*).



*Figura 4.* Grupos alvos para a modificação química do ácido hialurônico. Grupos (OH e/ou COOH). *Fonte:* adaptado de *PRESTWICH, 2001.* 

O grupo ácido carboxílico pode ser modificado por esterificação e ligação cruzada com diidrazida. *(Segura et al, 2004).* 

## II. 3.2.1. Modificação química do ácido hialurônico.

Ligações covalentes de hidrazida adípica (ADH), a grupos ácidos carboxílicos do AH sob condições suaves resulta na disponibilidade de hidrazidas pendentes amino funcionais ao logo da cadeia de AH (*Figura 5*). As hidrazidas reativas podem ser modificadas posteriormente por ligação a fármacos ou ligação cruzada (*Prestwich et al, 1998*).

A funcionalização do hialuronato com diidrazidas acontece preferencialmente em condições moderadas, incluindo pH de 2 a 8; o ideal é que esteja entre 3 e 5 (*Dehazya & Lu, 2005*).

Uma variedade de mono, di e polifuncional hidrazidas são sintetizadas para modificar as propriedades fisicoquímicas do AH. Suas moléculas são nucleofílicas no pH 3,0 - 4,75, conduzindo para uma ligação eficiente com os ácidos carboxílicos do ácido glicurônico do AH (*Prestwich et al, 1998*).

O processo de reticulação do AH envolve os seguintes passos: mixtura do hialuronato a um reticulante homobifuncional e um agente reticulante (facilitador

da reação), diminuição do pH para permitir a funcionalização e reticulação do AH, elevação do pH da suspensão depois que a reação é finalizada, e um emulsificador antes, durante, ou depois da funcionalização do AH *(Dehazya & Lu, 2005).* 

O reticulante se refere a uma molécula com dois grupos reativos, que podem articular para que moléculas ou regiões de uma molécula possam formar ligações covalentes com dois grupos funcionais diferentes da molécula. Moléculas reticulantes homobifuncionais possuem dois grupos reativos funcionais iguais (*Dehazya & Lu, 2005*).

Os grupos carboxilato do AH podem ser utilizados para a conjugação direta com drogas ou para a preparação de micro e nanopartículas para a entrega de drogas (*Kogan et al., 2003; Hu et al., 2006*).





A elevada área superficial e as propriedades bioadesivas das micro e nanoesferas proporcionam uma absorção eficiente e aumentam a

biodisponibilidade do fármaco, prolongando a sua liberação e reduzindo sua freqüência de administração (*Vasir et al., 2003*).

Agentes farmacológicos e cosméticos encapsulados possuem vantagens sobre os não encapsulados: aumento da biodisponibilidade, proteção contra degradação, liberação sustentada (lenta) *(Dehazya & Lu, 2005).* 

#### II.3.2.2. Aplicações biológicas do AH.

O AH é um glicosaminoglicano onipresente que possui diversos papéis biológicos em vertebrados. Isso inclui atuar como componente estrutural vital dos tecidos conectivos, fornecer lubrificação para membrana sinovial, formação de matrizes hidratadas soltas que permitem a migração e divisão celular, ativação e adesão de células imunes, e um papel na sinalização intracelular *(Swann et al., 1974; Tammi et al., 2002; Turley et al., 2002; Toole et al., 2006*).

A sua atividade depende da ligação à receptores celulares da classe das hialaderinas, como os CD44 (*Gaffney et al., 2010*).

Os receptores CD44 são expressos na maioria das células de origem neuroectodermal, sendo uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, em uma forma não-funcional que necessita de ativação para ser capaz de promover ligação e atividade. A ligação do AH a esses receptores ativa uma via de sinais nas células.

Na pele o AH desempenha um papel de captador/limpador de radicais livres produzidos pelos raios ultravioletas do sol. O AH umidifica e restabelece a elasticidade, atuando ainda como efeito anti-rugas, tudo sem a ocorrência de efeitos colaterais (*Brown & Jones, 2005*).

Em cartilagens funciona como elemento estrutural fundamental na matriz, formando um centro de agregação para agrecans, um grande proteoglicano de sulfato de condroitina que mantém sua montagem molecular na matriz devido as interações específicas AH-proteína (*Kogan et al., 2006*).

No fluído sinovial fornece lubrificação necessária para articulações e serve como absorvedor de impactos, reduzindo o atrito na movimentação óssea e diminuindo o desgaste das articulações. Em condições inflamatórias de artrite, como a osteoartrite ou artrite reumatóide, AH de alto peso molecular é degradado por espécies reativas de oxigênio, o que reduz sua viscosidade e prejudica suas propriedades de lubrificação e absorção de impactos levando a deterioração dos movimentos articulares e dor (*Kogan et al., 2006*).

O AH é conhecido ainda por ligar e modular a interação entre fibronectina e colágeno, e agregar proteoglicanos (*West et al., 1985*).

Agora o AH é reconhecido com papel importante na embriogênesis, transdução de sinais e motilidade celular, além da associação com a invasividade e metástase tumoral (*Kogan et al., 2006*).

Devido suas características, o AH têm assumido diversas aplicações biomédicas (*Kogan et al., 2006*), tais como:

 visco cirurgia: proteção de tecidos delicados e promoção de espaço em procedimentos cirúrgicos, como em cirurgias oftálmicas;

- aumento do visco: no preenchimento e aumento dos espaços teciduais, como na pele, músculos do esfíncter, tecidos vocais e faríngeos;

 visco separação: na separação de superfícies de tecidos conectivos traumatizados por procedimentos cirúrgicos ou lesões, a fim de evitar adesão e formação excessiva de cicatriz;

- visco suplementação: para substituir ou complementar fluidos teciduais, como a substituição de fluido sinovial em artrite dolorosa, e para aliviar a dor;

- visco proteção: proteção de tecidos saudáveis, feridos ou lesionados de agentes ambientais nocivos, e promover a cicatrização dessas superfícies.

#### II. 3.2.3. Ácido Hialurônico em Cicatrização.

AH desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade tecidual, facilitando a adesão e diferenciação de células durante a inflamação, reparo de feridas, e desenvolvimento embrionário. Reconhece-se de longa data,

que o AH tem sido implicado na formação de vasos sanguíneos (West et al., 1985; Slevin et al., 2007 e 2002). Em modelos animais (rato e hamster), quando aplicado topicamente acelera a cicatrização de feridas dermais e diminui a fibrose e formação de cicatrizes (Gao et al., 2010).

Angiogênese é um passo fundamental para processos biológicos como desenvolvimento embrionário e cicatrização. Moléculas angiogênicas е antiangiogênicas são liberadas por células acessórias controlando а migração, proliferação, diferenciação neovascularização, morfogênica em capilares, e a concomitante remodelação da ECM (Genasetti et al., 2008).

AH de alta massa molar (HMW-HA) inibem a proliferação de células endoteliais, pois regiões avasculares são ricas em HMW-HA e a expressão dessa forma de AH em áreas vasculares normais resultam na diminuição da vascularização (*Marsano et al., 2007; Smith et al., 2008*); além de estimular a granulação, deposição de colágeno e proliferação de fibroblasto. Em contraste, AH de baixa massa molar ou oligossacrídeos (o-AH) estimulam a proliferação celular, formação do tubo endotelial, estimulação da neovascularização em membrana corioalantóide (CAM) e produção de colágeno pelas células endoteliais, acelerando o fechamento de feridas (*West et al., 1985; Slevin et al., 2002; Rooney et al., 1993*).

O fechamento rápido de feridas proporcionado pelo tratamento com o-AH pode aumentar a formação de cicatriz, tornando inferior a qualidade da cicatrização. Já o tratamento com HMW-HA beneficia a qualidade da cicatrização impedindo o depósito de colágeno e diminuindo a cicatriz formada (Buchanan et al., 2009; David-Raoudi et al., 2008).

#### II. 3.2.4. Mercado do AH.

O mercado atual do AH em todo mundo foi estimado em mais de U\$1 bilhão na última década (*Widner et al, 2005; Chong et al, 2005*).

Alguns produtos comercias com AH e suas aplicações:

- Healon® (massa molar 2,5 MDa), derivado da crista de galo, é usado em viscocirurgia de implantes oculares, como protetor viscoelástico do endotélio córneo durante o transplante de córnea (Kogan et al., 2006).

- Hyaff 11p50 com 50 % de esterificação é um polímero hidrofílico (solubilidade em água de 60mg/mL), que pode ser processado como gel, muito parecido com o ácido hialurônico nativo, mas com uma resistência muito maior a ação da hialuronidase. Esse material tem sido usado como malhas e esponjas para crescimento de cultura de fibroblasto humano, cultura de condrócitos e células mesenquimais derivadas da medula óssea para o reparo de cartilagem e defeitos ósseos (*Esposito et al., 2005*).

- Hyalgan® (Fidia, Itália), Artz® (Seikagaku, Japão), Osthovisc® (Anika, USA): produtos destinados ao tratamento da osteoartrite (*Brown & Jones, 2005*).

- Restylane®, reposição de volume perdido pela pele suavizando linha de expressão e rugas.

## II. 4. Liberação controlada.

O conceito de liberação controlada de fármacos tem sido utilizado tradicionalmente para se obter uma taxa de liberação específica ou marcação espacial de um ingrediente ativo (*Vasir et al., 2003*).

Ocorre quando um polímero (natural ou sintético) é adequadamente combinado com um fármaco ou bioativo, liberando-o de maneira diferenciada em relação à sua forma livre. A liberação do agente ativo deve ser constante e cíclico por um longo período. O uso de veículos poliméricos para a liberação de bioativos possibilita o controle dessa distribuição por local e tempo determinados *(Chen & Mooney, 2003)*.

A tecnologia de carreamento oferece uma aproximação inteligente para a liberação controlada pela encapsulação de fármacos em uma partícula carreadora como microesferas, nanopartículas, lipossomas, etc, que modulam as características de liberação e absorção do fármaco (*Vasir et al., 2003*).

O conceito de encapsulação surgiu da idealização do modelo celular em que a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e a saída de material na célula (*Azeredo, 2005*). De modo semelhante, a encapsulação consiste em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico, que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (material encapsulado) e evitando a sua exposição inadequada (*Favaro-Trindade et al, 2008; Wiechers, 2008*). A encapsulação engloba tanto a formação de cápsulas (sistema do tipo reservatório) quanto de esferas (sistema matricial), genericamente chamadas de partículas (*Azeredo, 2005; Suave et al, 2006; Favaro-Trindade et al, 2008; Wiechers, 2008*).

Existem três mecanismos primários pelos quais agentes ativos podem ser liberados em um sistema de distribuição: difusão (ocorre quando o fármaco ou bioativo passa através do polímero que forma a matriz de distribuição controlada, através dos poros ou das cadeias do polímero), degradação da matriz (ocorre quando o fármaco passa da matriz do polímero para o meio externo), e expansão seguida de difusão (intumescimento do sistema) *(Suave et al., 2006; Brannon-Peppas, 1997)*.

As principais estruturas utilizadas para encapsulação de ativos são os lipossomas, as ciclodextrinas, as micro e nanopartículas poliméricas e as nanopartículas lipídicas.

A fase inicial da liberação geralmente é mais rápida que a terminal, com uma possível utilidade funcional de promover uma dose inicial, minimizando qualquer administração tardia do fármaco ou material a ser liberado do sistema *(Lim et al, 2000).* Quando o sistema entra em equilíbrio a liberação torna-se constante.

#### II. 4.1. Micro e nanoencapsulação.

O termo microesferas diz respeito a partículas esféricas com diâmetro em torno de 1 – 500  $\mu$ m; podem ser sólidas ou porosas e podem encapsular

substâncias farmacologicamente ativas, agentes cosméticos, biopolímeros, ou fatores de crescimento. Uma microesfera pode conter qualquer substância, preferencialmente, lipofílicas quando preparadas com técnica de emulsão óleo em água, e hidrofílicas quando preparadas com técnica de emulsão água em óleo *(Dehazya & Lu, 2005).* Microesferas constituem uma parte importante dos DDS particulados em virtude do seu tamanho reduzido e características carreadoras eficientes.

O termo nanoesferas compreeende partículas de tamanho sub celular e micrométrico, em sua grande maioria, na faixa entre 1 e 100 nm. O seu tamanho reduzido permite a administração por qualquer via, a passagem por diversas barreiras fisiológicas como a mucosa intestinal e barreira hemato-encefálica, internalização celular, e habilidade para reverter a resistência a múltiplas drogas de células tumorais, podendo ainda atravessar facilmente a membrana celular, distribuir-se em todo o citosol e se localizar na região perinuclear – sem nenhum efeito tóxico (*Pitarresi et al., 2007; Teskac, 2010*).

Micro e nanopartículas biodegradáveis possuem um dos maiores alcances de utilidade na liberação controlada de qualquer formulação já estudada; podem ser utilizadas em formulações injetáveis, formulações orais, sistemas bioadesivos, e como principal componente da liberação controlada em implantes e filmes tanto degradáveis quanto não degradáveis (*Brannon-Peppas, 1995*).

Técnicas de micro e nanoencapsulação são empregadas através de processos químicos, físicos ou fisico-químicos. Os métodos químicos usados são: polimerização interfacial e inclusão molecular. Entre os métodos físicos, estão: extrusão estacionária, bocal submerso, extrusão centrífuga, spray drying, disco rotativo, pan coating, supensão por ar, spray cooling, leito fluidizado, co-cristalização e liofilização. Já os métodos físico-químicos, são: coacervação simples e complexa e emulsificação (*Azeredo, 2005; Suave et al, 2006; Dobre et al, 2008; Favaro-Trindade et al, 2008; Wiechers, 2008*).

#### II. 5. Emulsões.

As emulsões são dispersões de duas fases líquidas imiscíveis entre si, usualmente água e óleo, estabilizados pela presença de agentes emulsificantes, localizados na interface óleo/água (*Lyssant, 1974; Rosen, 1989; Meyers, 1999*).

Os agentes emulsificantes, designados surfactantes ou tensoativos, são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma outra hidrofílica com propriedade de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e a água, constituindo papel fundamental na estabilização de emulsões. Entretanto estes compostos não conseguem diminuir essa tensão a ponto de contrariar totalmente a energia livre de superfície provocada pelo aumento da área interfacial. Desta forma as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e, no desenvolvimento tecnológico, procura-se utilizar de meios que possam retardar pelo maior tempo possível a separação das fases (*Holmberg et al, 2003; Oliveira et al., 2004; Santos et al, 2007*).

A instabilidade do sistema faz com que as emulsões não se formem espontaneamente, consequentemente sendo necessária a entrada de energia a partir de equipamentos mecânicos ou então a partir de potencial químico dos componentes para a sua formação (*Tadros et al, 2004; Solans et al, 2005; Anton, et al, 2008*).

#### II. 5.1. Emulsões água em óleo (a/o).

Nas emulsões do tipo água/óleo a porção hidrofílica das moléculas da emulsão é dissolvida nas gotas de água dispersas e a parte hidrofóbica descarregada orienta-se para a fase oleosa.

Estudiosos postulam que em emulsões a/o formadas com sucesso, isto é, que apresentam razoável estabilidade, algum tipo de interação interfacial deve existir, quer seja ela eletrostática, quer seja através de pontes de hidrogênio. Em contrapartida outros afirmam que elas são estabilizadas por filmes neutros monomoleculares de emulsificantes ou filmes poliméricos. Um consenso é que algum tipo de formação de complexo – incluindo ligação de H, hidratação e associação molecular – é necessário à estabilização (*Oliveira, 2004; Anton, 2008; Frange & Garcia, 2009*).

A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes: capacidade de adsorção nas interfaces e a tendência de associação para formarem estruturas organizadas, sendo adequados para uma ampla gama de aplicações.

Span e Tween são tensoativos não-iônicos amplamente utilizados na estabilização de emulsões onde o Span é um mono/oleato de sorbitano lipofílico formado por ésteres de sorbitan derivados da reação de sorbitol com ácidos graxos cuja cabeça polar reduzida oferece um melhor recobrimento da porção aquosa da emulsão (*Lyssant, 1974; Rosen, 1989; Meyers, 199*9).

A medida da afinidade de um tensoativo para óleo ou água pode ser identificada através do sistema HLB, ou Balanço Hidrofílico/Lipofílico, valor este que pode ser calculado ou estimado experimentalmente. O sistema HLB foi desenvolvido para predizer o comportamento de tensoativos não-iônicos. No sistema HLB, cada emulsificante recebe um valor numérico que expressa a relação entre o grupo hidrofílico e o grupo lipofílico. Um tensoativo de caráter lipofílico tem um número HLB baixo (HLB 3 – 6) sendo mais adequados para emulsões água em óleo, enquanto que um tensoativo hidrofílico tem um número HLB alto (HLB 8 – 18) sendo mais usados em emulsões óleo em água (*Griffin, 1949; Anthony et al, 1996; Leonel, 2008*).

#### II. 6. Arrabidaea chica.

A Arrabidaea chica (Humb. and Bonpl.) é uma trepadeira (Figura 6) de ocorrência na América Tropical, membro da família Bignoniaceae a qual abrange 120 gêneros e 800 espécies, e se distribui pela América tropical desde o sul do México até o Brasil central (*Devia et al., 2002*). No Brasil, as plantas dessa família são encontradas desde a Floresta Amazônica, Cerrado e Mata Atlântica.
Popularmente *A.chica* é conhecida como pariri (no Pará), crajiru (no Amazonas), carajuru, carajiru, puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz (*Von-Poser, 2000; Correa, 1931; Van den Berg, 1993*).

No nordeste do Brasil, as folhas da *A. chica* são usadas por Índios como tintura para pintar o corpo em rituais, para proteger a pele dos raios solares e repelir insetos devido aos pigmentos carajurina e carajurona (Corrêa, 1926; Chapman *et al,* 1927; Zorn *et al,* 2001). As folhas submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.) fornecem um corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos preparam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra ataque de insetos.



*Figura 6. Arrabidaea chica*. **A:** Plantação de *A. chica*; **B:** Folhas bi ou trilobuladas. *Fonte: disponível em www.plantamed.com.br.* 

Na medicina popular, as folhas dessa espécie são usadas na preparação de chás com propriedades adstringentes para o tratamento de diarréia, anemia, leucemia, icterícia, albuminuria. Há ainda relatos de eficácia antiinflamatória *(Oliveira et al., 2009)*, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária *(Hofling et al., 2010; Barbosa et al., 2008)*, e contra cânceres de boca, útero e leucemia *(Kalil Filho et al., 2000)*. Quando aplicada topicamente, são atribuídos à espécie *A. chica* 

propriedades terapêuticas para enfermidades da pele como psoríase, feridas e úlceras (*Takemura et al., 1995*).

O extrato bruto de *A. chica* induz ainda a proliferação de fibroblastos *in vitro* e estimula a síntese de colágeno *in vivo* e *in vitro* além de apresentar moderada capacidade antioxidante e atividade antiulcerogênica, diminuindo a área lesionada (*Jorge et al., 2008*), caracterizando sua atividade no processo cicatricial.

O primeiro estudo fitoquímico das folhas de *A. chica* relata o isolamento de 3-deoxiantocianidina, carajurina *(Chapman et al., 1927)*. Estudos posteriores, propuseram que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita a *A. chica*, resultando no isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'-di-hidroxi-5-metaxiflavona (1) e 6,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) (2) (*Scogin,1980; Takemura et al,1995; Harborne & Willians, 2001*), e de novas agliconas destacando-se três deoxiantocianidina ou pigmentos, a 6,7,4'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium (3) e a 6,7,3',4'-tetrahidoxi-5-metoxi-flavilium (4) (*Figura 7*), provenientes das partes aéreas da *A. chica* juntamente com a conhecida 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium ((5) carajurina) *(Williams & Grayer, 2004)*.



*Figura* 7 . *Estrututra das antocianinas e deoxiantocianidinas isoladas das folhas de A. chica. Antocianinas:* 7,4'-di-hidroxi-5-metoxiflavona (1); 6,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) (2); deoxiantocianidinas: 6,7,4'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium (3), 6,7,3',4'tetrahidoxi-5-metoxi-flavilium (4) e: 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (5).

Este gênero é fonte de antocianinas, flavonóides e taninos (Harborne, 1967; Takemura, 1995; Zorn et al., 2001; Alcerito, 2002; Devia et al., 2002; Pauletti et al., 2003).

As antocianinas são corantes naturais pertencentes à família dos compostos fenólicos, da qual também fazem parte os flavonóides e fenilpropanóides. Estes compostos favorecem a ação cicatrizante do extrato bruto de *A. chica* (Taffarello, 2008; Jorge, 2008). Em sua composição molecular, as antocianinas possuem um esqueleto básico do tipo  $C_3C_6C_3$  e a mesma origem biossintética, mas diferem dos demais por apresentarem coloração intensa, um maior grau de oxidação (Harborne, 1967) e por serem glicosiladas. As antocianinas são raramente isoladas e identificadas devido à sua grande instabilidade.

A molécula de antocianina contém o íon flavílium ou 2-fenilbenzopirílium (6), e um açúcar, podendo conter ainda um ácido alifático ou aromático. A antocianina, após perda de açúcar por hidrólise ácida, é chamada antocianidina ou aglicona.

As antocianidinas mais frequentes na natureza são perlagonidina (7), cianidina (8), peonidina (9), petunidina (10) e malvidina (11) (Figura 8). Os açúcares mais encontrados nas antocianinas são glicose, ramnose, galactose e arabinose (Mazza & Miniati, 1993). Estes acúcares ocorrem como monoglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente na glicona nas posições 3, 5 e 7 (Oliveira, 2001). As antocianinas desempenham importante papel nas interações de insetos com plantas para a polinização e dispersão de sementes. Também apresentam um papel importante nas interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores.



*Figura 8: Estruturas da molécula de antocianina e das antocianidinas mais freqüentes. Antocianina* com íon flavílium e molécula de açúcar (6) e as antocianidinas: perlagonidina (7), cianidina (8), peonidina (9), petunidina (10) e malvidina (11).

Estudos apontam o alto poder antioxidante das antocianinas para combater doenças metabólicas e suas complicações (Kong *et al.* 2003; Tsuda *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007). O poder antioxidante de antocianinas isoladas de Mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) bem como a estabilidade frente a condições adversas de pH, temperatura, luz, além do contato com diferentes aditivos, foi demonstrada por Wang *et al.* (2010).

Estresse térmico, alterações de pH, presença de oxigênio e tempo de estocagem tem sido reportados como fatores que aceleram a degradação das antocianinas (Lee & Cho, 2012; Frank *et al.* 2012). A influência da pressão e da temperatura na estabilidade de antocianinas foi avaliada durante um processo de emulsificação. Observou-se que o estresse mecânico, mesmo empregando altas pressões, não causa degradação das moléculas, sendo que a degradação de antocianinas em processos de emulsificação está relacionada a altas temperaturas (Frank *et al.* 2012).

Formulações cosméticas ou farmacêuticas têm empregado extratos de Carajiru como componentes de protetores solares ou produtos para cuidados da pele: em produtos de maquiagem, como antioxidante inibindo formação de rugas e melhorando a tonicidade da pele ou como agente antiinflamatório. Os extratos da planta também são utilizados como material corante em formulações cosméticas (*Xavier, 2003*). O extrato de Carajiru é utilizado popularmente juntamente com extratos de outras plantas no tratamento de pele, antienvelhecimento, tratamento de cabelos, e cavidade oral (*Chiyoko, 2001*), assim como antifúngico e antimicrobiano (*Barata et al., 2006*).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente. Em particular, crescem também as investigações de extratos vegetais que auxiliem no processo cicatricial, principalmente de úlceras de diabéticos e aquelas provocadas pelo efeito colateral do uso de alguns medicamentos e também quimioterápicos. A avaliação da ação desses extratos é feita nas três etapas do processo cicatrizante *(Newman, 2008; Cragg & Newman, 2009).* 

# III. MATERIAL E MÉTODOS

# **III. MATERIAL E MÉTODOS.**

#### III.1. Obtenção do material vegetal.

As folhas de *A. chica* (Humb & Bonpl) Verlot, foram coletadas no Banco de Germoplasma, (acesso 03 e 06 – *Tabela 1*), do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, localizado no município de Paulínia (22º 45' 00"Sul e 47º10'21"Oeste). A coleta foi realizada no mês de abril de 2010. Folhas das porções inferior, média e superior foram coletadas, procurando-se obter uma amostra representativa das diferentes partes da planta. O material vegetal (exsicata 1865) foi identificado e classificado pela curadora Dra. Glyn Mara Figueira da coleção de plantas medicinais e aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)-Unicamp.

	Tabela 1: Diferenças	constitutivas dos	s extratos bruto	s provenientes d	o Paraná	(Ac 03) (	e do
Amazoi	nas (Ac 06).						

Compost	Antocianidinas		Compost	Antocianinas	
os	Ac 03	Ac 06	os	Ac 03	Ac 06
(MW)			(MW)		
271	+	+	447	+	+
285	-	++	449	+	-
287	++	+	463	++	++
299	-	+++	479	+	-
301	++	+	535	+	+
303	+	+	593	-	+
317	+	+	595	-	+

\*Presença (+) ou ausência (-) de antocianidinas e antocianinas nos extratos e seus pesos molares.

#### III.1. 2. Secagem e moagem do material vegetal.

As folhas coletadas foram secas em estufa ventilada (marca Fabbe), à 40°C durante 48 horas, e moídas no moinho tipo martelo (marca Stephen, modelo UM 40) com peneira de 40 mesh. O material seco e moído foi embalado (*Figura 9*) para o armazenamento. Empregou-se uma embalagem composta por um filme interno de polipropileno revestido por uma camada de alumínio opaco, com a finalidade de proteger o extrato de agentes externos como luz, oxigênio e umidade.



*Figura 9: Armazenagem das folhas de A. chica.* Embalagem com folhas de *A. chica* secas e moídas, empregando-se sistema de empacotamento à vácuo e protegido da luz.

# III.1. 3. Preparo dos Extratos Vegetais.

A metodologia do processo de extração seguiu o protocolo descrito por Oliveira (2001). Um modelo esquemático, representativo do preparo dos extratos vegetais, está ilustrado na *Figura 10*.

Para o processo extrativo de maceração dinâmica, adicionaram-se às folhas moídas uma mistura de etanol/ ácido cítrico 0,3%, na proporção de 1:5 (v/v). Foram realizadas três extrações de 2 horas cada, em coluna de aço inox (escala piloto). Os extratos foram filtrados e o solvente eliminado, sob vácuo em rotaevaporadores Buchi (modelo R-215). A neutralização foi realizada com NH<sub>4</sub>OH até pH 6. Para secagem, empregou-se o atomizador *spray dryer* Buchi B-290, nas

condições operacionais detalhadas na tabela 2. Todo processo de extração foi realizado sob proteção da luz, devido a fotossensibilidade da amostra.

Os estudos do extrato foram realizados na Divisão de Fitoquímica do CPQBA-Unicamp, sob supervisão da Profa. Dra. Mary Ann Foglio.



*Figura 10: Esquema representativo do preparo do extrato vegetal.* **A.** folhas secas de *A. chica*; **B.** moagem com gelo seco; **C.** solvente extrator: etanol + ácido cítrico 0,3%, 1:5 (v.v); **D.** maceração dinâmica em agitador oscilatório; **E.** rotaevaporador Buchi RE 215 para eliminação do solvente a vácuo; **F.** *spray dryer* Buchi B-290 para secagem do extrato.



Tabela 2: Condições operacionais do spray dryer para secagem do extrato vegetal.

#### III. 1. 4. Monitoramento de parâmetros do processo extrativo.

Com a finalidade de aperfeiçoar o processo de extração, alguns parâmetros foram monitorados, como a influência do gás empregado no processo de secagem e a comparação das produções em escala piloto ou laboratorial.

Para comparar a produção do extrato em planta piloto ou laboratorial, empregaram-se as mesmas condições em ambos os processos (maceração dinâmica descrita anteriormente), modificando apenas o local da extração. Na planta piloto foi utilizada coluna em aço inox com agitação mecânica e na laboratorial, erlenmeyers em agitador oscilatório. Foi utilizado para cada processo 1 kg de material vegetal.

No processo de secagem em *spray dryer*, avaliou-se a presença de nitrogênio ou sua ausência (secagem na presença de oxigênio).

# III.1.5. Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As alíquotas do extrato foram dissolvidas em solvente apropriado, grau CLAE, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodos (DAD). As condições para análise foram otimizadas a partir de metodologia sugerida por Wen *et al.* (2005).

#### III.1.5.1. Condições cromatográficas.

As análises foram realizadas por CLAE (Shimadzu) acoplada a detector de UV com arranjo de diodos (Shimadzu). As condições do gradiente de fase móvel e cromatográficas utilizadas estão descritas na tabelas 3 e 4.

Tempo (min)	Solvente H₂O +H₃PO₄ pH 2,0 <u>+</u> 0,10 (%A)	Solvente Metanol (%B)
0 - 5,0	55	45
5 - 20	10	90
20 - 30	0	100
30 - 45	55	45

Tabela 3: Programa de gradiente de fase móvel para análises por CLAE.

**Tabela 4**- Condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianinas presentes na *A. chica.* 

Equipamentos e acessórios	Especificação
Bomba Shimadzu	LC 10atm
Coluna	- C18 Gemine- Phenomenex 5μm 110A°
	- (250mm x 4,6 mm x 5μm)
Volume de injeção	20µL
Vazão de fluxo	1 mL/min
Detector Shimadzu M10AVP	UV-DAD
Fase móvel	Gradiente: H <sub>2</sub> O/ Metanol
Comprimento de onda	λ=470nm
Forno CTO-10ASVP	35°C
Software	Class VP -5
Tempo de retenção	Pig1= 7,0 7,5; pig 2= 10,0-10,8min; pig 3= 17,0-17,9 min

# III.2. Micro e nanopartículas de ácido hialurônico.

# III.2.1. Obtenção das micro e nanopartículas.

As partículas tanto na ausência quanto na presença de um composto ativo foram obtidas por emulsificação água /óleo, com Span 80 (monooleato de sorbitan/ SIGMA/St. Louis; USA) como tensoativo seguida de da reticulação química do ácido hialurônico com diidrazida do ácido adípico, segundo protocolo de Yun et al (2004) adaptado por Kubo (2005) (*Figura11A*).

Inicialmente adicionou-se 80 mL óleo mineral (VETEC/Rio de Janeiro; BRA) e 1 mL agente emulsificante Span 80 a um béquer de 250 mL. A mistura foi emulsificada a 1000 rpm, utilizando agitador mecânico tipo caules, com impelidor de pá dentada (Digital TE-039/1 TECNAL). Em seguida 100 mg do agente reticulante dihidrazida adípica (ADH) (SIGMA/St. Louis; USA) dissolvida em 10 mL HA 0,5% (50 mg, 1,24.10<sup>-4</sup> mol) foram adicionados, e mantidos sob agitação durante 30 minutos, formando a emulsão de água em óleo (A/O). Transcorrido os 30 minutos, ocorreu a adição de 120 mg do catalisador 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDCI) (SIGMA/St. Louis; USA) dissolvidos em 2 mL de água Mili-Q à emulsão e agitação por mais 30 minutos. O pH da primeira reação de reticulação química foi ajustado através da adição 0,2 mL HCI 0,1 mol/L, e a reação ocorreu em agitação constante por 24 horas. As partículas formadas foram recuperadas da fase oleosa através da lavagem da emulsão com 150 mL de álcool isopropílico (IPA) e agitação em agitador orbital a 200 rpm por 20 min. A separação das fases (água/óleo) foi realizada com funil de separação. A porção aquosa, contendo as partículas, foi então centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm (287,28 g) e o sobrenadante descartado.

A resuspensão das microesferas foi realizada com 100 mg de ADH e 120 mg EDCI dissolvidos em 100 mL de IPA 90% sob agitação de 200 rpm (5,11 g). Para a segunda reação de reticulação adicionou-se 0,2 mL HCI 0,1 mol/L, e agitação constante por mais 24 horas.

A coleta das partículas foi realizada por centrifugação 5 minutos a 1500 rpm e adição de IPA 90%, repetindo-se o processo por três vezes. O material foi então ressuspendido em 10 mL de água destilada, congelado em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido e liofilizado.

A adição do extrato vegetal da *Arrabidaea chica* foi feita em um primeiro momento, juntamente à fase aquosa (100 mg dihidrazida adípica (ADH) dissolvida em 10 mL HNa 0,5% (50 mg, 1,24.10<sup>-4</sup> mol)), na formação da emulsão de água em óleo (A/O). Num segundo momento, foi adicionado após a formação da emulsão. Essa diferença pontual foi realizada para que se estabelecesse um momento ideal para adição do extrato (*Figura 11 B e C*).



*Figura 11.* Representação esquemática da produção das micro e nanopartículas. A. Produção das micro e nanopartículas de ácido hialurônico por reticulação química na ausência de um composto ativo; Produção das micro e nanopartículas de ácido hialurônico por reticulação química com adição do extrato bruto da *Arrabidaea chica* em dois momentos pontuais: **B.** juntamente à fase aquosa e **C.** após a formação da emulsão. Foi utilizado para todo o processo agitador Mecânico Digital TE-039/1 TECNAL.

# III.2.2. Influência de variáveis operacionais.

O processo de emulsificação para a produção das partículas de AH, foi estudado com relação à influencia das variáveis operacionais, tais como velocidade de agitação, pH, proporção entre AH e reticulante, e recirculação da dispersão (*Tabela 5*).

**Tabela 5. Tabela 5.** Condições utilizadas no estudo da influência das variáveis operacionais na produção de partículas deAH. Variáveis estudadas: velocidade de agitação, pH, proporção AH:reticulante e recirculação da dispersão.

Condiçao 1
Protocolo inicial, segundo a literatura, com 0,2 mL HCl 0,1 N (Kubo, 2005).
Condição 2
Agitação de 1700 rpm (primeira e segunda reação de reticulação). 1 mL HCl 0,1 N.
100 mg de Reticulante.
Condição 3
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 200 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCl 0,1 N.
100 mg de Reticulante.
Condição 4
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 1000 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCl 0,1 N. 100 mg de
Reticulante.
Condição 5
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 100 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCl 0,1 N.
100 mg de Reticulante.
Condição 6
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 1000 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCI 0,1 N. 50 mg de Reticulante.
Condição 7
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 1000 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCl 0,1 N. 150 mg de
Reticulante.
Condição 8
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 1000 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCI 0,1 N. 200 mg de
Reticulante.
Condição 9
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 1000 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCl 0,1 N. 100 mg de
Reticulante na primeira reação de reticulação e 50 mg na segunda reação de reticulação.
Condição 10
Agitação de 1500 rpm (primeira reticulação) e 1000 rpm (segunda reticulação). 1 mL HCl 0,1 N. 100 mg de
Reticulante. Processo realizado com recirculação.

#### III.2.2.1. pH.

No protocolo de *Yun et al (2004)* adaptado por *Kubo (2005)*, a quantidade de HCI adicionada era de 0,2 mL. Nas condições do presente trabalho, essa quantidade foi aumentada para 1 mL, para contornar as limitações de transferência de massa, e garantir no interior da partícula, o pH na faixa ótima da reticulação (3.0-4.75), conforme descrito por *(Prestwich et al, 1998).* 

#### III.2.2.2. Velocidade de agitação.

A influência da velocidade de agitação foi estudada com o emprego de diferentes velocidades para garantir a qualidade da mistura, redução e homogeneização do tamanho das partículas. Para isso, cinco velocidades de agitação foram aplicadas: 100 rpm, 200 rpm, 1000 rpm, 1500 rpm e 1700rpm. A eficiência de mistura foi melhorada com a utilização de chicanas.

# III.2.2.3. Proporção reticulante : AH.

Foram estudadas quatro proporções do agente reticulante ADH com relação ao AH, detalhadas na *tabela 6* em massa e mol.

D
Proporçao em moi
5,74.10 <sup>-4</sup> mol
5 : 1
2,87.10 <sup>-4</sup> mol
2:1
8,61.10 <sup>-4</sup> mol
8:1
11,48.10 <sup>-4</sup> mol
11 : 1

Tabela 6. Razão ADH : AH em massa e mol, em cada reação de reticulação.

# III.2.2.4. Recirculação.

A recirculação da dispersão no sistema foi realizada com vazão de 40 mL/min utilizando bomba peristáltica. Partindo da parede, a mistura foi bombeada para o centro do reator, para garantir que toda a mistura entrasse em contato com o impelidor.

# III.2.3. Influência da proporção de extrato da *A. chica*: AH na obtenção de micro e nanopartículas.

A capacidade das partículas de AH encapsularem o extrato de *A. chica* :foi estudada em 10 diferentes condições, variando-se as velocidades de agitação nas duas etapas do processo, conforme detalhado na *tabela 7*.

Condição 1	Condição 2
Agitação de 1500 e 200 rpm.	Agitação de 1500 e 1000 rpm.
Adição de 100 mg <i>A. chica</i> .	Adição de 100 mg <i>A. chica</i> .
Proporção 1 : 2 (AH <i>: A. chica</i> ).	Proporção 1 : 2 (AH <i>: A. chica</i> ).
Condição 3	Condição 4
Agitação de 1500 e 200 rpm.	Agitação de 1500 e 1000 rpm.
Adição de 50 mg <i>A. chica</i> .	Adição de 50 mg <i>A. chica</i> .
Proporção 1 : 1 (AH <i>: A. chica</i> ).	Proporção 1 : 1 (AH <i>: A. chica</i> ).
Condição 5	Condição 6
Agitação de 1500 e 200 rpm.	Agitação de 1500 e 1000 rpm.
Adição de 37,5 mg <i>A. chica</i> .	Adição de 37,5 mg <i>A. chica</i> .
Proporção 1 : 0,75 (AH <i>: A. chica</i> ).	Proporção 1 : 0,75 (AH <i>: A. chica</i> ).
Condição 7	Condição 8
Agitação de 1500 e 200 rpm.	Agitação de 1500 e 1000 rpm.
Adição de 25 mg <i>A. chica</i> .	Adição de 25 mg <i>A. chica</i> .
Proporção 1 : 0,5 (AH <i>: A. chica</i> ).	Proporção 1 : 0,5 (AH <i>: A. chica</i> ).
Condição 9	Condição 10
Agitação de 1500 e 200 rpm.	Agitação de 1500 e 1000 rpm.
Adição de 12,5 mg <i>A. chica</i> .	Adição de 12,5 mg <i>A. chica</i> .
Proporção 1 : 0,25 (AH <i>: A. chica</i> ).	Proporção 1 : 0,25 (AH <i>: A. chica</i> ).

**Tabela 7.** Condições usadas no estudo da encapsulação do extrato de *A. Chica* em partículas de ácido hialurônico.

#### III.2.4.Caracterização das partículas.

A caracterização das partículas foi realizada após centrifugação a 10000 rpm/12768*g* durante 15 minutos, onde o sobrenadante (contendo nanopartículas) foi separado do pellet formado (contendo micropartículas).

#### III.2.4.1. Micropartículas.

A caracterização das micropartículas de HA foi realizada morfologicamente (aspecto e forma) e dimensionalmente (tamanho).

#### III.2.4.1.1. Análise morfológica.

As análises de aspecto e forma foram realizadas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV).

As amostras foram aplicadas nos *stubs* (suporte para amostras) do microscópio eletrônico de varredura Leo modelo Leo440i (*Carl Zeiss*), previamente recobertas com fita adesiva dupla face (fixação do material).

Os *stubs* foram colocados no *Sputter coater SC 762-polaron* para a metalização do material com uma liga ouro-paladium. Foi aplicado vácuo para retirada do ar e algum possível interferente. Acrescentou-se argônio para quebrar o vácuo e fazer o meio aplicando-se corrente para ionização durante 3 minutos.

As amostras, após metalização, foram observadas no *MEV* (potência – 5 KV e corrente – 50 pA) e fotografadas digitalmente.

#### III.2.4.1.2. Análise de tamanho.

A análise do tamanho das micropartículas foi inicialmente realizada em equipamento analisador de tamanho de partículas, por difração a laser, *Master Sizer S.*, modelo S-MAM 5005 – *Malvern*.

Faixa de análise: 0,05 a 900 µm;

Unidade: suspensão da amostra.

Posteriormente, foi utilizado software *Image Tool* para a análise, onde foi realizada a contagem de 30 partículas em cada fotomicrografia observada.

# III.2.4.2. Nanopartículas.

As nanopartículas foram caracterizadas apenas quanto ao tamanho.

A análise do tamanho das nanopartículas foi realizada por dispersão de luz em equipamento *Zetasizer Nano Series-ZS*, com ângulo fixo de 173º. As análises foram realizadas em triplicata.

# III.2.5. Potencial Zeta.

A análise do potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento (Potencial Zeta) das nanopartículas foi realizada em equipamento *Zetasizer Nano Series-ZS*, com ângulo fixo de 173º.

Análises realizadas em triplicata.

# III.2.6. Rendimentos.

# III.2.6.1. Rendimentos das partículas obtidas.

O rendimento (R) da produção das partículas foi avaliado através da massa final (m<sub>f</sub>) de partículas obtida, dividida pela massa inicial (m<sub>i</sub>) de AH adicionada no processo, conforme *equação 1*:

$$\begin{array}{c}
\hline
R = \underline{M_{f}} X 100 \\
\hline
M_{i}
\end{array}$$
Eq. 1

A proporção relativa entre micro e nanopartículas foi determinada centrifugando a preparação obtida por 15 minutos a 10000 rpm/12768 g e separando o sobrenadante contendo as nanopartículas do pellet formado, contendo as micropartículas. Os rendimentos foram calculados pelas *Eq. 2 e 3*.



# III.2.6.2. Eficiência de encapsulação de *A. chica* nas micro e nanopartículas.

A quantidade de extrato bruto da *A. chica* ( $Ac_{encap.}$ ) encapsulado nas nano e micropartículas foi calculada através da massa inicial de *A. chica* adiconada ( $Ac_i$ ) ao preparo, menos a massa de *A. chica* encontrada nos descartes ( $Ac_{desc.}$ ), conforme *Eq. 4:* 

$$\mathbf{Ac}_{encap.} = Ac_i - Ac_{desc.}$$
Eq. 4

Essa determinação mássica foi realizada através da leitura espectrofotométrica dos descartes em água, comprimento de onda de 480 λ.

A eficiência da encapsulação (**E**<sub>encap</sub>.) do extrato bruto da *A. chica* nas nano e micropartículas foi determinada pela *Eq. 5*:

$$E_{encap.} = \underline{Ac_{encap.}} \times 100$$
$$Ac_i$$
Eq. 5

O carregamento do extrato da *A. chica*/mg de micro e nanopartículas de AH foi avaliado para determinar a quantidade exata de ativo nos ensaios *"in vivo"* da atividade angiogênica segundo *Eq. 6* e 7.



#### III.2.7. Quantificação das perdas durante o processo.

Para a determinação das perdas durante o processo de obtenção das partículas, todos os descartes de lavagem foram coletados e quantificados.

O primeiro descarte coletado do processo foi o da fase de separação das partículas da fase oleosa através de funil de separação. A fase oleosa foi descartada e a fase aquosa, obtida após descarte de centrifugação, foi centrifugada a 2000 rpm/510,72 *g* por 5 min.

O próximo descarte do processo foi o da fase de coleta das partículas, obtido através da lavagem das mesmas, onde os descartes foram centrifugados a 2000 rpm/510,72 g por 5 min. Após a centrifugação, a massa obtida no primeiro descarte da fase aquosa juntamente com a massa obtida no segundo descarte de fase aquosa, foram secadas em estufa a 100<sup>°</sup> C e pesadas.

A massa total obtida dos descartes foi subtraída da massa total adicionada para se obter a quantidade perdida durante todo o processo de produção das partículas de AH.

# III.3. Ensaio *in vitro* da estimulação do crescimento celular em fibroblastos humanos.

A avaliação da atividade indutora do crescimento celular foi realizada segundo *Mensah et al. (2001)*, com pequenas modificações, para a avaliação não só dessa capacidade como da toxicidade dos compostos. Os fibroblastos utilizados são fibroblastos humanos primários confluentes e foram doados pela *Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda, Campinas – Brazil.* 

As células (fibroblastos) foram tripsinizadas e ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) / 10 % soro fetal bovino (FBS) / gentamicina 0,1 % e diluídas na mesma mistura para obter uma suspensão padrão de 3.10<sup>4</sup> células / mL. As células foram semeadas em uma placa de 96 compartimentos e mantidas a 37 °C em incubadora umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> atmosfera. O meio foi repassado depois de 24 h com DMEM / 0,3 % FBS e após 48 h, diluições seriadas das amostras (AH livre, partículas vazias de AH nas condições de preparo de 1500 e 200/1000, extratos brutos da Arrabidaea chica proveniente de dois estados Brasileiros: Paraná (acesso 03) e Amazonas (acesso 06) e do controle foram adicionadas ao meio proporcionando uma concentração final nos pocinhos (compartimentos) entre 0,25 e 250 µg/mL (Figura 12). DMEM / 0,3 % FBS foram usados como manutenção do controle. As células foram encubadas por 72 h, o meio descartado e as células deixadas em meio livre (DMEM / 10 % FBS) por 24 h antes do ensaio MTT (Mosmann, 1983) para verificar a viabilidade celular. Após encubação, a leitura espectrofotométrica foi realizada a 540 nm. Uma placa T0 fixada no dia de adição das amostras também foi preparada como controle da quantidade total de células no momento de adição das amostras (100%). Considerando fibroblastos não tratados crescendo em

DMEM / 0,3 % FBS como 100 % de viabilidade, uma concentração efetiva (EC<sub>50</sub>) foi calculada por regressão não-linear para expressar a concentração para aumentar a viabilidade celular em 50 %.

Com os valores de absorbância, calculou-se a porcentagem de crescimento celular para cada uma das concentrações testadas, considerando-se:

Crescimento Celular (%) =  $100 \times [(T_A - T_0)/(T_1 - T_0)]$ 

Onde:

T<sub>A</sub> = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra;

T<sub>1</sub> = absorbância da suspensão celular sem tratamento;

 $T_0$  = absorbância do controle de células na placa  $T_0$ .

Esta metodologia empregada na cultura de células constitui metodologia de rotina no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-Unicamp.



*Figura 12. Esquema da colocação das amostras na placa de 96 poços.* Branco das amostras (margens superiores e inferiores da placa); controle de céluas (segunda fileira de B a G); meio de cultura (primeira fileira e letras A e H da segunda fileira); colocação das amostras: 1 (cor azul - B a D – fileiras 3 a 6); 2 (cor laranja - B a D – fileiras 7 a 10); 3 (cor verde - E a G – fileiras 3 a 6); 4 (cor roxa - E a G – fileiras 7 a 10) e 5 (cor amarela - B a G – fileiras 11 e 12). A intensidade de cada coloração (mais escuro ao mais claro) corresponde às diluições das amostras (250; 25; 2,5 e 0,25 µg/mL).

#### III.4. Ensaios in vivo.

Os ensaios *in vivo* foram realizados no intuito de avaliar a capacidade de indução da formação de novos vasos sanguíneos e da indução da cicatrização dos compostos estudados: o polímero AH, o veículo em micro em nanopartículas, e o ativo extrato bruto da *A. chica*.

#### III.4.1. Ensaio de angiogênese.

#### III.4.1.1. Membrana corioalantóide (MCA).

O material, previamente liofilizado, obtido a partir da reticulação química do ácido hialurônico e o extrato vegetal da *A. chica*, foram dissolvidos em salina estéril, filtrado e esterilizado em Filtros Millex<sup>®</sup> 0,22 μm. Esta solução foi armazenada em recipientes estéreis à -20°C, até o momento de sua utilização.

Utilizou-se de papel de filtro Whatmman (cortado na forma de discos circulares com 0,5 cm de diâmetro e esterilizado), como veículo na deposição do material de estudo.

Para se estudar a atividade angiogênica apresentada pelo material foi utilizado o teste na MCA de embriões de galinha conforme descrito por *Wilting et.al.* (1991/1992).

Os ovos de galinha (*Gallus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos junto à Empresa Yamaguishi (Campinas – SP), foram incubados em estufa automática produzida pela Brasmatic Ind. e Com. LTDA, com controle de temperatura (38 °C) e umidade (65%), deslocados lateralmente a cada 15 minutos, durante os 5 primeiros dias de incubação, conforme esquematizado na *Figura 13*. Ao final deste prazo, os ovos foram submetidos à abertura circular (1,0 cm de diâmetro) em sua base maior, onde está localizada a câmara de ar, com auxílio de uma microretífica marca Dremel.

Após a realização da abertura, utilizando-se de seringa e salina estéreis, depositou-se uma gota de salina (NaCl 0,9% p/v) de forma a auxiliar na retirada da membrana da casca, expondo a MCA já vascularizada. A abertura, então, foi vedada com fita adesiva transparente e o ovo novamente incubado, porém, sem agitação periódica e com a base furada voltada para cima.

Ao final do 13° dia de incubação, os discos de papel de filtro, veiculando 3 μL da solução a ser testada em cada grupo, ou água destilada (controle negativo), foram depositados diretamente sobre a membrana de forma cuidadosa e estéril. Os ovos voltaram à incubação até o 16° dia, quando foram retirados da incubadora. Em seguida, as MCAs (membrana transparente, vascularizada, que separa o embrião do meio externo) foram fixadas em solução de formol a 10 % por 5 min, retiradas do embrião e fotografadas com auxílio de uma vídeo câmera CCD-Iris Sony modelo DXC-107 A, adaptada a um microesterioscópio da marca Taylor Hobson com um aumento de 10 X e conectada a um computador equipado com uma placa de aquisição de imagens marca PIXEL VIEW, utilizando-se do software "Pixel View Station v4.29 TV" para captura da imagem.



*Figura 13.* Esquema da metodologia em membrana corioalantóide. A. Incubação dos ovos em estufa automática; B. abertura do ovo em sua base maior; C. exposição da membrana corioalantóide com salina; D. vedação da câmara de ar com fita adesiva transparente; E. disco de papel de filtro veículando o material a ser testado; F. retirada da membrana corioalantóide do ovo; G. aspecto da MCA no 16º dia de incubação após retirada do ovo.

Grupos de estudo:

Controle A – 3  $\mu$ L salina estéril (8 ovos).

**Controle B**  $- 3 \mu$ L AH livre a 0,5% (8 ovos).

**Controle C** – 3  $\mu$ L suspensão de micropartículas vazias condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 1 mg/mL salina estéril (8 ovos).

**Controle D** – 3 µL suspensão de micropartículas vazias condição de preparo de 1500 e 1000 rpm; 1 mg/mL salina estéril (8 ovos).

**Experimental A** – 3 μL suspensão do extrato de *A. chica*; 1 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

**Experimental B** – 3  $\mu$ L suspensão do extrato de *A. chica*; 5 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

**Experimental C** – 3 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 10 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

**Experimental D** – 3 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 25 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

**Experimental E** – 3 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 50 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

**Experimental F** – 3  $\mu$ L suspensão do extrato de *A. chica*; 100 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

**Experimental G** – 3 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 500 mg extrato/ml salina estéril (8 ovos).

### III.4.1.2. Tegumento dorsal de camundongos.

O método avalia o processo de angiogênese, pela injeção subcutânea das amostras no tegumento dorsal de camundongos previamente anestesiados e depilados segundo *Chung et al* (2006) e por análise histológica.

Os animais, camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* (4-6 semanas de idade) adquiridos no Biotério Central da Universidade de Campinas – CEMIB, previamente anestesiados (Ketamina [3,5 g/mL]: 400  $\mu$ L / 20 g animal – administração subcutânea) foram depilados na região dorsal (costas) onde foi realizada a marcação de um quadrante com tinta Nanquim. No quadrante foram injetados 40  $\mu$ L de cada amostra de seu respectivo grupo subcutâneamente

(*Figura 14A e B*). Após uma semana, foi realizado o sacrifício do animal por deslocamento cervical; retirada do tegumento dorsal (*Figura 14C*) para análise macroscópica através da obtenção de fotografias sobre um fundo branco, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados, com auxílio de uma vídeo câmera CCD-Iris Sony modelo DXC-107 A, e após fixação em formol 10%, o material foi processado para análise histológica e quantificação dos vasos sanguíneos.



*Figura 14.* Representação da aplicação subcutânea e retirada do tegumento do dorso de camundongos. A: Delimitação do local de aplicação das amostras; B. região subcutânea de aplicação das amostras no dorso de camundongos; C: retirada do tegumento do dorso. *Fonte:* B. disponível em: www.medaille.edu.

#### Grupos de estudo:

Controle A – 40 µL salina estéril (10 camundongos).

**Controle B** – 40  $\mu$ L AH livre a 0,5% (10 camundongos).

**Controle C** – 40 μL suspensão de micropartículas vazias condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Controle D** – 40 μL suspensão de micropartículas vazias condição de preparo de 1500 e 1000 rpm; 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Controle E** – 40 µL suspensão de nanopartículas vazias condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Controle F** – 40 µL suspensão de nanopartículas vazias condição de preparo de 1500 e 1000 rpm; 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental A** – 40 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 1 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental B** – 40  $\mu$ L suspensão do extrato de *A. chica*; 5 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental C** – 40 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 10 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental D** – 40 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 25 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental E** – 40 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 50 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental F** – 40 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 100 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental G** – 40 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 500 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental H** – 40  $\mu$ L suspensão do extrato de *A. chica*; 1000 mg extrato/ml salina estéril (10 camundongos).

**Experimental I** – 40 μL suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 1: 1 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental J** – 40 μL suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 1: 1 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental K** – 40 µL suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 1000 rpm; 1: 1 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental L** – 40  $\mu$ L suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 1000 rpm; 1: 1 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental M** – 40 μL suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 1: 0,75 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental N** – 40 μL suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 1: 0,75 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental O** – 40 µL suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de preparo de 1500 e 200 rpm; 1: 0,5 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental P** – 40 μL suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 1000 rpm; 1: 0,5 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental Q** – 40 μL suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 1000 rpm; 1: 0,5 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental R** – 40  $\mu$ L suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 200 rpm; 1: 0,25 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental S** – 40 μL suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 200 rpm; 1: 0,25 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

**Experimental T** – 40 μL suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 1000 rpm; 1: 0,25 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (10 camundongos).

# III.4.1.2.1. Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos do tegumento do dorso de camundongos.

As imagens digitalizadas das peles do dorso dos camundongos foram processadas pelo programa *Corel Photo Paint 11* de forma que a saturação, brilho e contraste permitissem uma melhor resolução dos vasos sanguíneos. A análise das imagens foi realizada por dois observadores através da contagem visual de vasos sanguíneos totais.

# III.4.1.2.2. Análise histológica do tegumento do dorso de camundongos.

As regiões do tegumento do dorso dos camundongos, onde foram realizadas as injeções subcutâneas das amostras, foram retiradas por dissecação, fixadas em formol a 10 % e fotografadas contra um fundo branco. Em seguida foram desidratadas (n= 4 animais), infiltradas, incluídas em historesina e seccionadas a 5 µm de espessura em micrótomo rotatório Spencer.

Os cortes histológicos obtidos foram corados com Hematoxilina/Eosina (HE), segundo técnica clássica padronizada (Anexo B), e observados em microscópio de luz Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) onde 10 campos visuais dos cortes histológicos de cada animal foram quantificados.

A aquisição das imagens foi realizada através de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments Inc.), acoplada ao microscópio.

O tratamento, inclusão, corte, coloração e análise dos tecidos foram realizados no laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp, com a supervisão do prof. Dr. Hernandes F. Carvalho.

# III.4.1.2.3. Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos do tegumento do dorso de camundongos.

As lâminas histológicas obtidas como descrito no item anterior, foram também utilizadas para a realização da contagem dos vasos sanguíneos do tegumento dos camundongos dos diversos grupos estudados.

As contagens do número de vasos sanguíneos totais foram realizadas visualmente com o auxílio de um microscópio de luz modelo BR044 *(Carl Zeiss),* com objetiva de 40 X e ocular de grande campo de 8 X, equipada com um retículo quadriculado onde 10 campos foram quantificados.

#### III.4.2. Ensaio de cicatrização.

O ensaio de cicatrização foi desenvolvido de acordo com *Panchatcharam et al* (2006). Ratos Wistar pesando entre 250-300g (adquiridos no Biotério Central da Universidade de Campinas – CEMIB), foram divididos em 3 grupos de 5 animais cada, denominados grupos I (salina, 0,9%), II (alantoína, 100mg/mL) e III (*A. chica*, 100mg/mL).

Após anestesia (Ketamina [3,5 g/mL]: 400  $\mu$ L / 20 g animal – administração subcutânea), as costas dos animais foram tricotomizadas e esterilizada com 70% EtOH (*Figura 15 A*). Úlceras cutâneas medindo, em média, 1,5X1,5 cm foram excisionadas e tratadas topicamente durante 10 dias com aplicações de 200 $\mu$ L/úlcera de cada amostra, e protegidas com curativos específicos. As úlceras cutâneas foram analisadas todos os dias medindo-se a área de contração e foi calculada a porcentagem de redução da área inicial da lesão.

No 11° dia os animais foram sacrificados por inalação de éter. O tecido da região da lesão de cada animal foi retirado para análise histopatologica e para determinação do total de colágeno pelo ensaio de hidroxiprolina (*Figura 15 B*). Oito milimetros foram puncionados da área cicatrizada e homogeneizados em 2 ml de solução de tampão fosfato (pH 6,0) e conservado a 4º C, por uma noite. Em seguida, 1mL do homogenato foi hidrolizado com 0,5mL de HCl 6N, por 5 horas a

120º C, sob refluxo. As amostras hidrolizadas foram congeladas para posterior avaliação no ensaio de hidroxiprolina descrito a seguir.



*Figura 15. Esquema de retirada do tegumento intacto e cicatrizado do rato.* A. Tricotomização e retirada do tegumento do dorso de ratos (área média de 2,25 cm<sup>2</sup>); **B.** retirada do tegumento do dorso de ratos após cicatrização da ferida.

Grupos de estudo:

**Controle A** – 200 µL salina estéril (6 ratos).

**Controle B** – 200  $\mu$ L AH livre a 0,5% (6 ratos).

**Experimental A** – 200 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 1 mg extrato/ml salina estéril (6 ratos).

**Experimental B** – 200 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 5 mg extrato/ml salina estéril (6 ratos).

**Experimental C** – 200 µL suspensão do extrato de *A. chica*; 10 mg extrato/ml salina estéril (6 ratos).

**Experimental D**– 200 μL suspensão de micropartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 200 rpm; 1: 0,5 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (6 ratos).

**Experimental E** – 200 μL suspensão de nanopartículas acrescidas do extrato bruto da *A. chica* (condição de prepararo de 1500 e 1000 rpm; 1: 0,5 - AH:extrato); 5 mg/mL salina estéril (6 ratos).

#### III.4.2.1. Análise de hidroxiprolina.

Método para avaliação da indução de produção de colágeno. O ensaio foi desenvolvido de acordo com *Woessner* (1961) modificado por Gawronska-Kozak et al (2006) onde 20 µL de cada amostra hidrolizada foram adicionadas em uma placa de 96 compartimentos e incubadas por 20 minutos, a temperatura ambiente, com 50 µL/compartimento de solução de cloramina T (282 mg cloramina T, 2 mL n-propanol, 2 ml de água destilada, e 16 mL tampão acetato citrato). Após esse período, 50 µL/compartimento de solução de Erlich [2.5 g 4-(dimetilamino)-benzaldeído, 9,3 ml n-propanol, e 3,9 mL de 70% de ácido perclórico] foram adicionados e a mistura foi incubada por 15 min a 65º C. Mediu-se a absorbância a 550nm em um leitor de microplaca (VERSA Max, Molecular Devices). Uma curva de calibração de hidroxiprolina (0 a 10 µg/mL) foi preparada e os resultados foram expressos em µg/mL de hidroxiprolina.

#### III.5. Análises estatísticas dos dados.

Os dados obtidos com a quantificação macro e microscópica dos ensaios *in vivo* de angiogênese, assim como os dados obtidos através dos ensaios *in vivo* de cicatrização foram analisados utilizando estatística descritiva básica e análise de variância (ANOVA), e avaliados pelo método de Duncan, com a finalidade de caracterizar as variáveis estudadas. O nível de significância escolhido foi igual ou inferior a 5 %.

As análises foram realizadas com o auxílio do Software *StatSoft Electronic Statistics Textbook* (Software Basic Statistic, Inc.).

# IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

#### IV.1. Obtenção do extrato bruto da Arrabidaea chica.

O extrato bruto de *A. chica* (EB) foi obtido com rendimento 25,9% (para cada 75 g de planta seca, obtinha-se 19,4 g de EB). A análise do EB por CLAE revelou a presença de tres pigmentos: 6,7,3',4'-tetrahidoxi-5-metoxi-flavilium, 6,7,3'-trihidroxi-5-metoxiflavilium) e (carajurina) - 6,7-dihidroxi-5,4'- dimetoxiflavilium, cuja distribuição seguiu o mesmo padrão descrito por *Jorge,* 2008. A *Figura 16* mostra a concentração relativa desses pigmentos no EB de *A. chica.* 



*Figura 16: Avaliação do teor de pigmentos do extrato bruto de A. chica.* Obtenção dos pigmentos por CLAE–DAD: pigmento 1 - 6,7,3',4'-tetrahidoxi-5-metoxi-flavilium, pigmento 2 - 6,7,3'- trihidroxi-5-metoxiflavilium) e pigmento 3 (carajurina) - 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

# IV.2. Produção de micro e nanopartículas de AH.

As micro e nanopartículas de AH foram obtidas através da reticulação química do ácido hialurônico com diidrazida adípica, como detalhado em material e métodos (item III.1.1).

Os estudos realizados pelos autores citados anteriormente, descrevem somente a formação das partículas na presença de proteína (*Kubo, 2005*) e DNA (*Yun et al., 2004*). Não há relatos sobre a formação das partículas na ausência de um material encapsulado, sugerindo a sua participação na estruturação da matriz particulada. *Ferre-Souza (2007)* identificou a formação de estrutura na forma de esponja para o AH na ausência de material encapsulado. A *Figura 17* obtida neste trabalho comprova a estrutura em esponja anteriormente observada na literatura.



Figura 17. Eletromicrografia da estrutura em esponja resultante da preparação das micro e nanopartículas de AH na ausência de material encapsulado, segundo protocolo de Yun et al (2004) adaptado por Kubo (2005). Aumento no negativo: 5000 x.

Visando a estruturação do AH na forma de micro e nanopartículas, independente de qualquer material encapsulado, foi estudada a influência de variáveis operacionais tomando como base o protocolo descrito por *Yun et al., 2004 e Kubo, 2005.*
### IV.2.1. Influência de variáveis operacionais.

#### IV.2.1.1. pH.

A adição de HCl 0,1 N em excesso no meio reacional , 1 mL , aparentemente contornou as limitações de transferencia de massa garantindo o pH ótimo de reticulação no interior da partícula. Essa condição tornou possível a obtenção de algumas partículas, como mostra a *Figura 18*, e não apenas da estrutura em esponja obtida anteriormente (*Figura 17*).



Figura 18. Eletromicrografia da influência do pH na preparação das partículas de AH, com adição de HCI em excesso. Formação de algumas partículas de geometria esférica. Aumento no negativo: 2000 x.

Como o aumento da quantidade de ácido mostrou-se positiva, a mesma foi empregada em todas as condições de preparo subseqüentes.

#### IV.2.1.2. Velocidade de agitação.

A influência da velocidade de agitação foi estudada nas duas etapas da preparação das partículas de AH.

Os resultados experimentais mostram que a utilização de altas velocidades (1700 rpm) nas duas etapas da preparação (*Figura 19 A*), e velocidades muito

amenas (100 rpm na segunda etapa de preparação – *Figura 19 B*), não foram favoráveis à formação das partículas. As estruturas aparecem interligadas, com ausência de delimitação da geometria que caracteriza as partículas ou envoltas por um gel.

O emprego de velocidades intermediárias em ambas as etapas de reticulação permitiu que as cadeias de AH pudessem reagir livremente com o reticulante para a formação das partículas, como apresentado nas *Figuras 19 C* e *19D* para agitação de 1500 rpm na primeira etapa de reticulação e 200/1000 rpm na segunda etapa de reticulação respectivamente.



*Figura 19.* Eletromicrografia da influência da velocidade de agitação na estruturação das partículas de AH reticuladas com dihidrazida adípica. (A) 1700 rpm nas duas etapas; (B) 1500 rpm (primeira etapa) 100 rpm (segunda etapa); (C) 1500 rpm (primeira etapa) 200 rpm (segunda etapa) e (D) 1500 rpm (primeira etapa) e 1000 rpm (segunda etapa). Aumentos no negativo: A e D 10000 x; B 2000 x e C 5000 x.

A partir destes resultados, a condição de 1500 e 1000 rpm foi adotada nos

estudos subsequentes.

### IV.2.1.3. Proporção reticulante : AH.

Foram estudadas cinco proporções molares do agente reticulante ADH com relação ao AH, 2:1; 11:1; 5:1 e 2:1, como detalhado em material e métodos (item III.2.2.3). Essas proporções foram utilizadas nas duas etapas de reticulação.

A *Figura 20* mostra os resultados obtidos, onde se observa que apenas a proporção 2:1 em ambas as reações de reticulação foi adequada para a produção das partículas; esta relação coincide com a relação descrita anteriormente por *Yun et al., 2004 e Kubo, 2005,* demonstrando que constitui uma relação otimizada para a preparação das partículas de AH reticuladas com ADH.



*Figura 20.* Eletromicrografia da avaliação da proporção ADH : AH. Relações molares das preparações: A. 2:1; B. 8:1; C. 11:1; e D. 5:1 com 2:1 (primeira e segunda reação de reticulação, respectivamente). Aumento no negativo: A e B. 2000 x; C e D. 5000 x.

#### IV.2.1.4. Recirculação.

A recirculação externa da dispersão em ambas as etapas de reação teve por objetivo produzir uma melhor homogeneização da mistura na região próxima ao impelidor, permitindo assim que todas as partículas fossem submetidas a um mesmo nível de cisalhamento. Os resultados mostram que a recirculação com vazão de 40 mL/min não beneficiou a formação das partículas, como mostrado na *Figura 21*.



*Figura 21.* Eletromicrografia da influência da recirculação externa da mistura na formação das partículas de AH. Aumento no negativo: 5000 x.

A ausência da delimitação da geometria das partículas pode ter sido causada por impedimento da formação da emulsão na primeira fase da preparação.

### IV.2.2. Produção das partículas de AH contendo o extrato bruto da Arrabidaea chica.

Na produção das partículas contendo o ativo, o extrato vegetal da *Arrabidaea chica,* é possível verificar que não houve a formação de partículas delimitadas pela forma esférica esperada e sim uma coalescência das partículas (*Figura 22 A*). Quando o ativo foi adicionado num segundo momento, após a formação da emulsão, foi possível a obtenção de partículas com geometria esférica, apesar da formação de uma massa (Figura 22 B).



*Figura 22.* Eletromicrografia das estruturas obtidas na preparação das partículas de AH contendo o ativo Arrabidaea chica. A. adição do ativo junto à fase aquosa, B. adição do ativo após a formação da emulsão. Aumento no negativo: 5000 x.

Essa diferença pontual pode ter sido influenciada por uma reação do ativo com o AH ou o ADH, quando adicionado à fase aquosa, atrapalhando a reação de reticulação e formação das partículas.

Por esse motivo foi padronizada a adição do ativo após a formação da emulsão.

### IV.2.2.1. Proporção Ativo : AH.

As cinco proporções de ativo estudadas (1:2, 1:1; 1:0,75; 1:0,5 e 1:0,25) todas as proporção na condição de preparo de 1500 e 200 rpm apresentaram formação eficiente de partículas esféricas, enquanto que na condição de preparo de 1500 e 1000 rpm, apenas as concentrações de 1:2, 1:1 e 1:0,5 foram capazes de uma formação eficiente de partículas, enquanto as outras proporções conseguiram apenas a formação de aglomerados ou formação escassa de partículas esféricas, como apresentado na *Figura 23*.



*Figura 23.* Eletromicrografia da avaliação da proporção Ativo (*A. chica*) : AH. Relações mássicas das preparações:  $A_1 e A_2$ . 2:1;  $B_1 e B_2$ . 1:1;  $C_1 e C_2$ . 0,75:1;  $D_1 e D_2$ . 0,5:1 e  $E_1$  $e E_2$ . 0,25:1. Os números 1 e 2 correspondem as condições de preparo: 1500/200 rpm e 1500/1000 rpm, respectivamente. Aumento no negativo:  $A_1$  10000 x;  $C_2$  1000 x;  $D_1$  3000 x;  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $C_1$ ,  $D_2$ ,  $E_1 e E_2$  5000 x.

IV.2.3.Caracterização das partículas.

IV.2.3.1. Diâmetro médio das micro e nanopartículas na ausência de um ativo.

As micropartículas vazias produzidas, nas condições de preparo 1500 e 200/1000 rpm, foram observadas e caracterizadas quanto ao diâmetro médio e polidispersidade.

A análise do tamanho das partículas foi realizada à partir de centrifugação para separação das partículas micro e nano.

A análise obtida (*Figura 24*) mostra a presença de micropartículas com diâmetro médio de 65 μm. Isto evidencia a presença de agregados na amostra, os quais não foram identificados nas fotomicrografias obtidas da *Figura 19*, cujo diâmetro apresentado não ultrapassa 10 μm.



*Figura 24.* Análise do diâmetro médio das micropartículas. Presença de agregados devido ao diâmetro médio aumentado.

A agregação das partículas vem sendo relatada como um problema reincidente nas preparações de micropartículas de AH (*Hu et al., 2006*).

Devido à impossibilidade de realizar uma medida de diâmetro médio fiel à amostra com o equipamento de difração a laser, mesmo após a aplicação de

ultrasom, na tentativa de desfazer os agregados, optou-se por realizar a análise com o auxílio de um software, *Image Tool,* onde foi realizada a contagem de 30 partículas em cada fotomicrografia observada.

Os resultados da *Figura 25* mostram que a preparação a 1500 e 200rpm, produziu partículas com diâmetro médio de 4,19  $\mu$ m (desvio padrão - 2,33  $\mu$ m), e a condição de 1500 e 1000 rpm reduziu o diâmetro médio e desvio padrão para 3,36  $\mu$ m (desvio padrão - 1,89  $\mu$ m).



*Figura 25.* Influência da velocidade de agitação na primeira e segunda etapa da reparação no diâmetro médio das micropartículas. Partículas com diâmetro médio de 4,19 μm e 3,36 μm (desvio padrão de 2,33 μm e 1,89 μm). As barras verticais representam o desvio padrão da média. N=3.

O diâmetro médio das micropartículas formadas apresenta características para a administração farmacológica e cosmética, já que micro e nanopartículas menores que 6-7µm de diâmetro possuem um dos maiores alcances de utilidade na liberação controlada podendo ser efetivamente fagocitadas por macrófagos

permitindo a distribuição de fármacos ou bioativos intracelularmente (Brannon-Peppas, 1995).

Com a finalidade de identificar melhor as várias populações, as preparações foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. A fração sedimentada, correspondente às micropartículas foi separada do sobrenadante que continha as nanopartículas.

Os resultados obtidos, apresentados na *Figura 26*, mostram que as nanopartículas obtidas na condição de preparo com 1500 e 200 rpm apresentaram diâmetro médio de 203,7 nm em intensidade e 119,27 nm em número, com índice de polidispersidade de 0,341. Na condição de preparo com 1500 e 1000 rpm o diâmetro médio encontrado foi de 582,8 nm em intensidade e 523,95 nm em número, com índice de polidispersidade de 0,102.



*Figura 26.* Diâmetro médio das nanopartículas separadas por centrifugação, em função da velocidade de agitação. Medida das partículas em intensidade e número (\*). Desvio padrão de 43,93 nm e 18,5 nm em intensidade 58,48 nm e 51,27 nm em número. As barras verticais representam o desvio padrão da média. N=3.

Desses resultados conclui-se que a baixa velocidade de agitação na segunda etapa de reação favoreceu a reticulação e a produção de partículas da ordem de 200 nm. A maior velocidade na segunda etapa desfavoreceu a reticulação, produzindo partículas muito maiores, da ordem de 500 nm. Em ambos os casos, pode-se verificar uma boa reprodutibilidade das preparações.

#### IV.2.3.2. Potencial Zeta das nanopartículas na ausência de um ativo.

Na análise do potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento (Potencial Zeta) das nanopartículas, realizada em equipamento Zetasizer Nano Series-ZS, a condição de preparo de 1500/200 rpm, apresentou um potencial Zeta de + 40 mV, o que confere maior estabilidade às partículas dessa amostra, quando comparadas à condição de preparo de 1500/1000 rpm, onde o potencial Zeta mostrou-se reduzido, +15,2 mV (*Tabela 8*). Esses dados revelam ainda que o tensoativo se manteve na superfície das partículas, escondendo a carga negativa da molécula de AH.

Condições de preparo	Potencial Zeta			
1500/200 rpm	+ 40 mV			
1500/1000 rpm	+15.2 mV			

Tabela 8. Potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento.

1500/1000 rpm

### IV.1.3.3. Diâmetro médio das micro e nanopartículas contendo o extrato ativo da Arrabidaea chica.

Os resultados obtidos mostram que não foi possível a obtenção de micropartículas na condição de preparo de 1500/1000 rpm nas proporções de 1:0,75 e 1:0,25 (AH : *A. chica*), sendo que as outras proporções (1:2, 1:1 e 1:0,5) dessa condição de preparo e todas as proporções AH : A. chica na condição de preparo de 1500/200 rpm foram capazes de uma formação eficiente de partículas,

como demonstrado na *Figura 27*, onde o diâmetro médio das partículas é de 2 – 6  $\mu$ m e desvio padrão de 0,6 – 1,7  $\mu$ m.

Nos resultados obtidos, não foi possível a obtenção de nanopartículas em ambas as condições de preparo (1500 e 200/1000 rpm) das proporções AH : *A. chica* de 1:0,5 e 1:0,75, enquanto que em todas as outras proporções ensaiadas foi possível a obtenção de nanopartículas com diâmetro médio de 202 – 598 nm, com desvio padrão de 4 – 51 nm (*Figura 28*).

Tanto na obtenção das nanopartículas vazias como na obtenção das nanopartículas com o ativo *A. chica*, a baixa velocidade de agitação na segunda etapa de reação favoreceu a produção de partículas com diâmetro médio inferior àquelas preparadas com velocidade de agitação maior na segunda etapa de reação. A maior velocidade na segunda etapa desfavoreceu a reticulação, produzindo partículas muito maiores, quando comparadas com a mesma proporção AH : *A. chica* ensaiada. Em ambos os casos, pode-se verificar uma boa reprodutibilidade das preparações.



Figura 27. Diâmetro médio das micropartículas formadas em função da proporção AH :

A. chica. Proporções ensaiadas: 1:2, 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25. Condições de preparo: 1500 e 200\*/1000\*\*.
As barras verticais representam o desvio padrão da média. N=3.



*Figura 28. Diâmetro médio das nanopartículas formadas em função da proporção AH : A. chica.* Proporções ensaiadas: 1:2, 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25. Condições de preparo: 1500 e 200 rpm\*/ 1500 e 1000 rpm\*\*. As barras verticais representam o desvio padrão da média. N=3.

# IV.2.3.4. Potencial Zeta das nanopartículas contendo o ativo (*Arrabidaea chica*).

Na análise do potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento (Potencial Zeta) das nanopartículas contendo ativo, as partículas apresentaram um potencial Zeta de +27,2 a +50 mV (*Figura 29*), o que confere maior estabilidade às partículas contendo o ativo do que às partículas vazias que apresentaram valores de Potencial Zeta entre +15,2 e +40 mV.

Assim como nas partículas vazias, os dados revelam que mesmo com a incorporação do ativo, o tensoativo continua recobrindo as partículas, conferindolhes um Potencial positivo.



*Figura 29. Potencial Zeta das nanopartículas obtidas.* Proporções avaliadas: 1:2, 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25. Condições de preparo: 1500 e 200 rpm\*/ 1500 e 1000 rpm\*\*.

As partículas obtidas na proporção 1:2 (AH : *A. chica*), mesmo apresentando a formação de nano e micropartículas não foi testada e quantificada nos ensaios subsequentes por se tratar de uma concentração excessiva de ativo que tende a desestabilizar a partícula.

#### IV.2.4. Rendimento das partículas.

#### IV.2.4.1. Micro e Nanopartículas na ausência de um ativo.

Os resultados da *tabela 9* mostram o rendimento das partículas vazias, onde houve um maior rendimento de nanopartículas (60,8%) na condição de preparo com *1500 e 200 rpm*, enquanto que o maior rendimento de micropartículas (73 %) foi obtido na condição de preparo com *1500 e 1000 rpm*.

Tabela 9. Rendimento de micro e nanopartículas de AH.

	1500 e 200	1500 e 1000
	rpm	rpm
M <sub>i</sub> adicionada	50 mg	50 mg
M <sub>micro</sub> obtidas	19,6 mg	36,5 mg
Rendimento de micropartículas *	39,2 %	73 %
M <sub>nano</sub> obtidas	30,4 mg	13,5 mg
Rendimento de nanopartículas *	60,8 %	27 %

*M*<sub>micro</sub> = massa de micropartículas; *M*<sub>nano</sub> = massa de nanopartículas.

\*O rendimento foi analisado sem levar em consideração desperdícios durante as lavagens do processo.

O maior cisalhamento na segunda reação de reticulação favoreceu a formação de micropartículas e o baixo cisalhamento a formação de nanopartículas.

Esses resultados mostram claramente duas condições úteis para a produção de partículas de AH. Para aplicações que requerem partículas capazes de permeação celular, utiliza-se a condição de preparo com *1500 e 200 rpm*, com predominância de nanopartículas, e para aplicações onde a distribuição de um composto não necessita de mecanismos de permeação, podendo ocorrer pela fagocitose da partícula, utiliza-se a condição de preparo com *1500 e 1000 rpm*, com predominância de micropartículas.

### IV.2.4.2. Micro e Nanopartículas contendo o extrato bruto da A. chica.

Já na obtenção das partículas contendo o ativo, o rendimento das nanopartículas (R<sub>nano</sub>) obtidas foi avaliado através da massa total de partículas

obtidas ( $m_{fmicro +} m_{fnano =} m_{tf}$ ), dividido pela massa total de AH, ADH e *Arrabidaea chica* adicionados no processo inicialmente, desconsiderando as perdas durante as lavagens para retirada do óleo da superfície das partículas. Os resultados encontram-se na *tabela 10*.

Cond	lição de	m <sub>ti</sub>			m <sub>tf</sub>	<b>R</b> <sub>micro</sub>	<b>R</b> <sub>nano</sub>	<b>R</b> <sub>total</sub>
pro	eparo	(mg)	m <sub>fmicro</sub> (mg)	m <sub>fnano</sub> (mg)	(mg)			
1:1	200 rpm	300	59	3,1	62,1	19,7 %	1 %	20,7 %
	1000 rpm	200	92	2,2	94,2	30,7 %	0,7 %	31,4 %
1:0,75	200 rpm	287 5	81	9,1	90,1	28,2 %	3,2 %	31,4 %
	1000 rpm	207,5						
1:0,5	200 rpm	275	141		141	51,3 %		51,3 %
	1000 rpm	215	170	10	180	61,9 %	3,6 %	65,5 %
1:0,25	200 rpm	262.5	60	2	62	22,9 %	0,8 %	23,7 %
	1000 rpm	202,3		1,8	1,8		0,7%	0,7%

Tabela 10. Rendimento das micro e nanopartículas de AH contendo ativo.

 $m_{ti}$  = massa total inicial;  $m_{fmicro}$ = massa final de micropartículas;  $m_{fnano}$ = massa final de nanopartículas;  $m_{tf}$  = masa total final;  $R_{micro}$ = rendimento de micropartículas;  $R_{nano}$  = rendimento de nanopartículas;  $R_{total}$  = rendimento total de partículas.

Os dados mostram o rendimento das partículas contendo ativo, onde o rendimento de micropartículas foi de  $\sim 20 - 62$  % e das nanopartículas foi de 0,7 - 3,6%.

Rendimentos dessa ordem são característicos de emulsão água /óleo, devido às perdas na remoção do óleo.

#### IV.2.5. Quantificação das perdas durante o processo.

IV.2.5.1. Quantificação das perdas durante o processo na preparação das partículas na ausência de um ativo.

Para a determinação das perdas durante o processo de obtenção das partículas, todos os descartes de lavagem das preparações das partículas vazias foram coletados e quantificados, como descrito no Item III.2.7.

Nos descartes da fase aquosa (considerando os descartes da fase de separação de fases A/O e da fase de coleta das partículas), após centrifugação (2000 rpm/510,72*g* por 5 min), foi observada a presença de massa, mas com grande quantidade de óleo ainda. Novas centrifugações foram realizadas na tentativa de separar e retirar totalmente o óleo da fase aquosa. Mesmo depois de repetidas centrifugações, até mesmo com aumento da velocidade de rotação (3200 rpm/1603 *g*), o óleo ainda constituía um fator limitante da análise. O próximo passo então foi a filtragem em papel de filtro.

Após a secagem da fase aquosa, verificou-se ainda a presença de óleo. A massa foi então ressuspensa em 100 mL de IPA, filtrada e secada em estufa. A massa obtida foi pesada, apresentando em média 122 mg, permitindo estimar o valor de perda do processo em aproximadamente 50 %, considerando a adição inicial de massa de 250 mg (*50 mg da AH + 200 mg ADH*), destacando uma grande perda durante o processo, o que precisa ser otimizada.

# IV.2.5.2. Quantificação das perdas durante o processo na preparação das partículas contendo o ativo da *A. chica*.

Para a determinação das perdas durante o processo de obtenção das partículas contendo o extrato ativo da *A. chica*, todos os descartes de lavagem das

preparações das partículas foram coletados e quantificados, como descrito no Item III.2.7.

Os resultados encontram-se detalhados na *tabela 11*, onde é possível verificar uma grande perda, acima de 50 %, durante a produção das micro e nanopartículas contendo o ativo da *A. chica*, assim como na produção das partículas vazias, o que também precisa ser otimizado.

Conc pro	lição de eparo	m <sub>ti</sub> (mg)	m <sub>tf</sub> (mg)	m <sub>desc.AH/ADH/ A. chica</sub> (mg)	m <sub>desc.AH/ADH/ A. chica</sub> (%)
1:1	200 rpm	300	62,1	237,9	79,3
	1000 rpm		94,2	205,8	68,6
1:0,75	200 rpm	287 5	90,1	197,4	68,6
	1000 rpm	207,5			
1:0,5	200 rpm	275	141	132,6	48,7
	1000 rpm	213	180	95	35,5
1:0,25	200 rpm	262.5	62	200,5	76,3
	1000 rpm	202,5	1,8	139,7	99,3 *

*Tabela 11.* Quantificação das perdas durante o processo de obtenção das micro e nanopartículas contendo o ativo da A. chica.

 $m_{ti}$  = massa total inicial;  $m_{tf}$  = masa total final;  $m_{desc.AH/ADH/A. chica}$  = massa dos descarte (massa AH, ADH e A. chica).

\*Números fundamentados na não formação de partículas e não exatamente na massa encontrada no descarte.

# IV.2.6. Eficiência de encapsulação do extrato da *A. chica* nas micro e nanopartículas de AH.

A eficiência de encapsulação ( $E_{encap.}$ ) do extrato bruto da *A. chica* nas nano e micropartículas mostrou-se eficiente e elevado, como mostrado na *tabela 12.* 

Condição de		Ac <sub>i</sub> Ac <sub>encap</sub> .		Ac <sub>encap</sub> .
pr	eparo	(mg)	(mg)	(%)
1:1	200 rpm	50	34,49	68,97
	1000 rpm		34,06	68,13
1:0,75	200 rpm	37.5	27,11	72,3
	1000 rpm	- · ,-		
1:0,5	200 rpm	25	22,79	91,16
	1000 rpm	23	15,02	60,1
1:0,25	200 rpm	12.5	6,33	50,63
	1000 rpm	12,5	5,06	40,48

Tabela 12. Eficiência de encapsulação do extrato ativo da A. chica nas micro e nanopartículas.

Ac<sub>i</sub> = quantidade inicial de A. chica; Ac<sub>encap.</sub> = quantidade encapsulada de A. chica.

# IV.2.6.1. Carregamento do extrato da *A. chica*/mg de micro e nanopartículas de AH.

O carregamento do extrato da *A. chica*/mg de micro e nanopartículas de AH se faz necessário para avaliar a quantidade exata de ativo nos ensaios *"in vivo"* da atividade angiogênica.

A *Tabela 13* esboça os resultados que variam de 0,1 - 2,8 mg de ativo para cada mg de partícula, seja ela micro ou nanopartícula.

A quantidade de 5 mg de partículas é a utilizada nos testes in vivo.

Condição de preparo		Ac <sub>i</sub> (mg)	Ac <sub>encap.</sub> (mg)	m <sub>tf</sub> (mg)	Ac/mg <sub>part</sub> (mg)
1:1	200 rpm	50	34,49	62,1	0,55
	1000 rpm		34,06	94,2	0,36
1:0,75	200 rpm	37,5	27,11	90,1	0,3
	1000 rpm				
1:0,5	200 rpm	25	22,79	141	0,16
	1000 rpm		15,02	180	0,08
1:0,25	200 rpm	12.5	6,33	62	0,1
	1000 rpm	12,0	5,06	1,8*	2,8*

*Tabela 13.* Carregamento do extrato ativo da *A. chica/*mg de micro e nanopartículas.

Ac<sub>i</sub> = quantidade inicial de A. chica; Ac<sub>encap.</sub> = quantidade encapsulada de A. chica; m<sub>tf</sub> = masa total final; Ac/mg<sub>part</sub> = quantidade de A. chica por 1 mg de partícula. \*Números correspondem à formação apenas de nanopartículas.

# IV. 3. Ensaio *in vitro* da indução do crescimento celular em cultura de fibroblastos humanos.

Os resultados de indução de crescimento celular estão apresentados na *Figura 30*, onde ácido hialurônico livre, em sua maior concentração, desacelerou o crescimento celular, evento já esperado devido sua característica ácida.

Alterações estruturais na sua molécula, como o processo de reticulação química utilizado na preparação das partículas de ácido hialurônico, alteram essa característica de desaceleração. Quando reticulado, na condição de preparo de 1500 e 200 rpm, passa a não interferir no crescimento celular. Já na condição de preparo de 1500 e 1000 rpm, o ácido hialurônico reticulado perde sua atividade inibitória, assumindo perfil semelhante à alantoína, com característica indutora do crescimento celular, consequentemente auxiliando no processo de cicatrização e caracterizando um veículo ativo.

O composto ativo a ser encapsulado (extrato da *Arrabidaea chica*) nas partículas de ácido hialurônico, quando diluído, tanto do Ac03 quanto do Ac06, apresentou um perfil indutor semelhante. Já em maiores concentrações, o extrato do Ac06 apresentou uma indução superior a 100%, e o extrato do Ac03 apresentou a maior capacidade indutora do crescimento celular, podendo induzir em até 200 % esse crescimento, sendo o escolhido para os ensaios *"in vivo"*.



*Figura 30. Perfil de indução do crescimento celular em fibroblastos humanos.* Características indutora (*A.chica* Ac03 e Ac06, e partículas vazias na condição de preparo 1500 e 1000 rpm) e citostática (AH livre e partículas "vazias" na condição de preparo 1500 e 200 rpm) das amostras frente ao controle positivo (alantoína).

Sendo assim, podemos sugerir que a reticulação do ácido hialurônico em ambas as condição de preparo, e o extrato da *Arrabidaea chica* tanto do ac03 quanto do ac06 apresentam potencial na preparação das partículas encapsulando o extrato e utilização nos ensaios de cicatrização.

#### IV. 4. Ensaio de angiogênese in vivo.

#### IV. 4.1. Ensaio de angiogênese em MCA.

Os materiais a serem testados, micropartículas de ácido hialurônico vazias nas duas condições de agitação (1500 e 200/1000) foram dissolvidos na proporção de 5,0 mg do material, previamente liofilizado, para cada mL de salina estéril, segundo descrito em material e métodos, e as sete diluições do extrato bruto da *A. chica* diluídas de acordo com a respectiva concentração a ser testada (1, 5, 10, 25, 50, 100 e 500 mg/mL de salina). Desta forma, 3 µL de cada solução foram aplicados sobre a MCA, através dos discos de papel de filtro (n = 8) e os resultados são apresentados nas fotografias obtidas da MCA (*Figura 31*), as quais apresentaram um aumento na vascularização, tanto no controle com o AH livre e as microesferas vazias quanto nas concentrações de *A. chica* ensaiadas, quando comparadas ao controle negativo (salina estéril).

Além do aumento na vascularização, é possível visualizar o aumento no calibre dos vasos sanguíneos (indicado pelas setas) ou expansão do plexo vascular *(Carmeliet, 2005)*, evento que acontece para o brotamento de novos vasos a partir desses vasos mais calibrosos.

Como este teste preliminar de angiogênese avalia a capacidade apenas de indução do processo angiogênico, apenas as micropartículas vazias foram testadas.



*Figura 31.* Fotografias da membrana coriolantóide (MCA) mostrando a atividade angiogênica das amostras ensaiadas. A:Controle negativo absoluto (salina); **B**: AH livre a 0,5 %; **C**: micropartículas de AH vazias na condição de preparo de 1500/200 rpm; **D**: micropartículas de AH vazias na condição de preparo de 1500/1000 rpm; **E**: Atividade da solução 1mg *A. chica* / mL salina; **F**: Atividade da solução 5 mg *A. chica* / mL salina; **G**: Atividade da solução 10 mg *A. chica* / mL salina; **H**: Atividade da solução 25 mg *A. chica* / mL salina; **I**: Atividade da solução 50 mg *A. chica* / mL salina; **J**: Atividade da solução 100 mg *A. chica* / mL salina e **K**: Atividade da solução 500 mg *A. chica* / mL salina. Em cada ensaio foram utilizados 40μL de cada solução (n = 8). As setas indicam a formação de vasos sanguíneos calibrosos.

# IV.4.1.1. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos em MCA e análise estatística dos dados.

Através da contagem macroscópica dos vasos sanguíneos, a capacidade de indução da angiogênese pelas partículas vazias de AH e pelo extrato bruto da *A. chica* foi avaliada quantitativamente, onde o aumento no número de vasos

sanguíneos foi significante nas duas condições de micropartículas ensaiadas e em quase todas as diluições do extrato bruto, exceto nas mais diluídas 1 e 5 mg/mL (*Figura 32*).

Pvalues:

- 0,00151 (micropartículas da condição 1500/200 rpm),
- 0,01639 (micropartículas da condição 1500/1000 rpm),
- 0,000079 (A. chica 10mg/mL),
- 0,000331 (A. chica 25 mg/mL),
- 0,002089 (A. chica 50 mg/mL),
- 0,000141 (A. chica 100 m/mL) e
- 0,002433 (A. chica 500 mg/mL).



*Figura 32.* Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos na membrana coriolantóide (MCA). Grupos avaliados: Controle negativo absoluto (salina); AH livre a 0,5 %; micro e nanopartículas de AH vazias na condição de preparo de 1500/200\* rpm; micro e nanopartículas de AH vazias na condição de preparo de 1500/1000\*\* rpm; extrato bruto da *A. chica* : 1 mg/mL, 5 mg/mL; 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL; 100 mg/mL e 500 mg/mL . <sup>#</sup> p<0,001, <sup>##</sup> p<0,01 e <sup>###</sup>p<0,05. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

#### IV.4.2. Ensaio de angiogênese no tegumento do dorso de camundongos.

Os materiais a serem testados subcutâneamente, micro e nanopartículas de ácido hialurônico vazias e contendo o extrato bruto da *A. chica* nas duas condições de agitação (1500 e 200/1000) foram dissolvidos na proporção de 5,0 mg do material, previamente liofilizado, para cada mL de salina estéril, segundo descrito em material e métodos, e as oito diluições do extrato bruto da *A. chica* diluídas de acordo com a respectiva concentração a ser testada (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500 e 1000 mg/mL de salina). Desta forma, 40  $\mu$ L de cada solução foram subcutaneamente no dorso de camundongos (n = 10) e os resultados são apresentados nas fotografias obtidas do tegumento do dorso de camundongos as quais apresentaram um aumento na vascularização, tanto no controle com as micro e nanopartículas vazias (*Figura 33*), quanto nas concentrações de *A. chica* livre (*Figura 34*) e nas micro e nanopartículas contendo *A. chica (Figura 35)*, quando comparadas ao controle negativo (salina estéril).

Visto que a maior capacidade indutora da angiogênese em CAM aconteceu nas maiores concentrações de extrato bruto da *A. chica*, a concentração de 1000 mg/mL foi adicionada ao ensaio do tegumento do dorso.

Um achado importante na indução angiogênica subcutânea, é que ao contrário do encontrado em CAM, apenas as menores concentrações do extrato bruto (1, 5, 10, 25 e 50 mg/mL salina) apresentaram um aumento na vascularização, enquanto que as maiores concentrações ficaram acumuladas no tecido subcutâneo.



*33.* Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mostrando a atividade angiogênica dos grupos controles. A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>: controle absoluto negativo (salina), B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: AH livre a 0,5 %; C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>.: nanopartículas de AH na condição de preparo de 1500/200 rpm; D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>: nanopartículas de AH na condição de preparo de 1500/200 rpm; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>: micropartículas de AH na condição de preparo de 1500/200 rpm; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>: micropartículas de AH na condição de preparo de 1500/200 rpm; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>: micropartículas de AH na condição de preparo de 1500/1000 rpm. Em cada grupo experimental foi aplicada 40 µL de cada solução (n = 10). Os números correspondem ao tipo de tratamento nas fotografias: 1 brilho e contraste, e 2 negativo.



*Figura 34.* Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mostrando a atividade angiogênica das concentrações de *A. chica*. A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>:Controle negativo absoluto (salina); extrato bruto da *A. chica* : B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: 1 mg/mL; C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>: 5 mg/mL; D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>: 10 mg/mL; E<sub>1</sub> e E <sub>2</sub>: 25 mg/mL; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>: 50 mg/mL; G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>: 100 mg/mL ; H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>: 500 mg/mL e I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>: 1000 mg/mL . Em cada grupo experimental foi aplicada 40  $\mu$ L de cada solução (n = 10). Os números 1 e 2 que acompanham as figuras correspondem ao tipo de tratamento realizado nas fotografias para auxiliar a contagem de vasos sanguíneos: brilho e contraste, e negativo (respectivamente). Os números correspondem ao tipo de tratamento nas fotografias: 1 brilho e contraste, e 2 negativo. As setas evidenciam um acúmulo do extrato no tecido subcutâneo.



35. Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mostrando a atividade angiogênica das partículas contendo o extrato bruto da A. chica. A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>: controle absoluto

negativo (salina); micropartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:0,25 ( $B_1 e B_2$ ), 1:0,5 ( $E_1 e E_2$ ), 1:0,75 ( $H_1 e H_2$ ) e 1:1 ( $J_1 e J_2$ ); micropartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:0,5 ( $F_1 e F_2$ ) e 1:1 ( $K_1 e K_2$ ); nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:0,5 ( $F_1 e F_2$ ) e 1:1 ( $K_1 e K_2$ ); nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,25 ( $C_1 e C_2$ ), 1:0,75 ( $I_1 e I_2$ ) e 1:1 ( $L_1 e L_2$ ), e nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,25 ( $C_1 e C_2$ ), 1:0,75 ( $I_1 e I_2$ ) e 1:1 ( $L_1 e L_2$ ), e nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,25 ( $D_1 e D_2$ ), 1:0,5 ( $G_1 e G_2$ ) e 1:1 ( $M_1 e M_2$ ). Em cada grupo experimental foi aplicada 40 µL de cada solução (n = 10). Os números correspondem ao tipo de tratamento nas fotografias: 1 brilho e contraste, e 2 negativo.

# IV.4.2.2. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos e análise estatística dos dados.

Quando avaliada quantitativamente a capacidade de indução da angiogênese caracterizada pelo aumento no número de vasos foi significante para o AH livre (*Pvalue: 0,00617*) e para as nanopartículas vazias de ambas as condições de preparo 1500 e 200/1000 (*Pvalues: 0,000054 e 0,000033*) (*Figura 36*).

Nos ensaios com o extrato bruto da *A. chica* livre, apenas três das diluições avaliadas apresentaram um aumento significativo no número de vasos sanguíneos: 5, 10 e 25 mg/mL salina. *Pvalues: 0,000049, 0,044081* e *0,00003* respectivamente (*Figura 36*).



*Figura 36.* Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos nos grupos controles e nas concentrações do extrato. Grupos avaliados: Controle negativo absoluto (salina); AH livre a 0,5 %; micro e nanopartículas de AH na ausência do extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo de 1500/200\* rpm; micro e nanopartículas de AH na ausência do extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo de 1500/200\* rpm; micro de 1500/1000\*\* rpm; extrato bruto da *A. chica* : 1 mg/mL, 5 mg/mL; 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL; 100 mg/mL, 500 mg/mL e 1000 mg/mL. <sup>#</sup> p<0,001, <sup>##</sup> p<0,01 e <sup>###</sup>p<0,05. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

As nano e micropartículas contendo o extrato bruto da *A. chica* apresentaram um aumento significativo em todas as condições e proporções avaliadas, exceto nas micropartículas de ambas as condições de preparo (1500 e 200 rpm e 1500 e 1000 rpm) da proporção 1:1(AH:*A. chica*). *Pvalues (Figura 37):* 

- 0,000162 (micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: A. chica 1:0,75),

- 0,000032 (micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: A. chica 1:0,5),

- 0,026198 (micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporções AH: A. chica 1:0,5),

- 0,030502 (micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: A. chica 1:0,25),

- 0,000026 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: A. chica 1:1),

- 0,000031 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporção AH: A. chica 1:1),

- 0,000021 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: A. chica 1:0,75),

- 0,000017 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/1000\*\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5),

- 0,000021 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\*\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,25) e

- 0,000018 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/1000\*\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,25).



*Figura 37.* Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos das partículas contendo o extrato bruto da *A. chica.* Grupos avaliados: Controle negativo absoluto (salina); nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75 e 1:0,25; nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75 e 1:0,25; nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,25; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1, 1:0,75, 1:0,5 e 1:0,20/200\* rpm e proporções AH: *A. chica* 1:1 e 1:0,5. #p<0,001, ## p<0,01 e ###p<0,05. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

A diferença observada entre os dois testes de avaliação da capacidade indutora da angiogênese pelo extrato bruto da *A. chica* (CAM e Tegumento), provavelmente deve-se ao modelo de liberação do extrato. No modelo de CAM, as amostras são veiculadas através de um papel de filtro necessitando serem transferidas do veículo para sua atuação na membrana, o que favorece a atividade de extratos mais concentrados, em um curto período de tempo. Já no modelo subcutâneo do tegumento do dorso de camundongos, as amostras são veiculadas diretamente e livremente no tecido subcutâneo (hipoderme) que constitui uma camada de tecido conjuntivo frouxo *(Junqueira & Carneiro, 1999)* facilitando a

103

atuação de pequenas concentrações do extrato, visto que as taxas de difusão são regidas em grande parte por propriedades fisicoquímicas como volume ou solubilidade (*Prow et al., 2011*), dificultando a atuação de grandes concentrações do extrato. A pouca solubilidade do extrato no tecido conjuntivo pode ser visualizada nas *Figuras 34 G*<sub>1,2</sub>,  $H_{1,2}$  *e I*<sub>1,2</sub>, onde é possível verificar o acúmulo do extrato no tecido subcutâneo, indicado pelas setas pretas dessas figuras.

### IV.4.2.3. Contagem microscópica dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos e análise estatística dos dados.

Os grupos incluídos em historesina e seccionados para a confecção das lâminas histológicas correspondem aos grupos dentre os de melhor desempenho da atividade angiogênica avaliada macroscopicamente no tegumento do dorso de camundongos. Sendo eles: *A. chica* livre 5mg/mL, nanopartículas de ácido hialurônico na ausência do extrato bruto da *A. chica* e condição de preparo de 1500 e 200rpm, micropartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200 rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5 e nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200 rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5 e nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000 rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5 (n = 4 animais e n=10 campos visuais).

Apesar da diminuição da integridade do tecido (*Figura 38*) ocasionada pela manipulação excessiva para retirada de pêlos, os campos visuais analisados evidenciaram um aumento significativo no número de vasos sanguíneos frente ao controle negativo (salina estéril) corroborando com a contagem macroscópica (*Figuras 36 e 37*) dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos.



*Figura 38.* Cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos. Grupos avaliados: A: Controle negativo absoluto (salina); B: *A. chica* 5 mg/mL; C: nanopartículas na ausência do extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo de 1500/200\* rpm; D: nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\*\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5 e E: micropartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm; D: nanopartículas de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5. As setas indicam vasos sanguíneos.

Os resultados mostraram ainda a maior capacidade indutora da angiogênese nas nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000 rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5 em comparação com todos os outros grupos analisados. *Pvalues* (*Figura 39*):

- 0,000089 (A. chica 5 mg/mL),

- 0,000171 (nanopartículas na ausência do extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm),

- 0,000062 (micropartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: A. chica 1:0,5) e

- 0,000037 (nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da A. chica na condição de preparo 1500/1000\* rpm e proporção AH: A. chica 1:0,5).



*Figura 39.* Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos. Grupos avaliados: Controle negativo absoluto (salina); *A. chica* 5 mg/mL; nanopartículas na ausência do extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo de 1500/200\* rpm; micropartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5; nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/200\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5; nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\*\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5; manopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* na condição de preparo 1500/1000\*\* rpm e proporção AH: *A. chica* 1:0,5; #p <0,001. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

#### IV.5. Ensaio de Cicatrização in vivo.

O principal objetivo do processo cicatricial é o fechamento da ferida ou ulceração no menor tempo possível, com o mínimo de dor e desconforto do paciente (*MacKay & Miller, 2003*).

Sendo assim, os resultados obtidos no ensaio de cicatrização no tegumento do dorso de ratos para o extrato bruto da *A. chica* livre e encapsulado em micro e nanopartículas de AH demonstraram um potencial cicatrizante significante (*Pvalues - Tabela 14*) devido ao fechamento rápido, a partir do segundo dia de tratamento (*Figura 40 e 41*), e eficiente da ferida, superior a 90% de área reduzida da ferida (*Figura 42*), quando comparados com o controle negativo salina. Foi possível verificar ainda que a encapsulação do extrato em micro e nanopartículas de AH conferiu maior atividade cicatrizante, já que o AH atua como coadjuvante no

processo cicatricial e a sua modificação química em nano e micropartículas permite a passagem e liberação do extrato por diversas barreiras fisiológicas e internalização celular, proporcionando uma absorção eficiente e aumentando a sua biodisponibilidade, protegendo-o da degradação enzimática, prolongando a liberação e reduzindo sua freqüência de administração (*Vasir et al., 2003; Pitarresi et al., 2007; Teskac, 2010*).

	<i>A.chica</i> (10 mg)	<i>A.chica</i> (25 mg)	Microp. AH + A. chica	Nanop. AH + A. chica
1ºdia			0,01242	
			p < 0,05	
2⁰dia			0,000465	
2ºdia			p < 0,001	0.015047
Jula			p < 0.01	p < 0.05
4⁰dia			0,000393	0,014621
			p < 0,001	p < 0,05
5⁰dia	0,008888	0,031053	0,000081	0,010494
	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,05
6⁰dia		0,032848	0,00089	0,004881
		p < 0,05	p < 0,001	p < 0,01
7⁰dia		0,031442	0,000075	0,00073
		p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001
8ºdia	0,000107	0,004208	0,000027	0,000022
	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
9⁰dia	0,027352		0,006985	0,003839
	p < 0,05		p < 0,01	p < 0,01
10⁰dia	0,011131	0,022220	0,000146	0,000330
	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001

Tabela 14. Pvalues das amostras no ensaio de cicatrização.



*Figura 40. Fotografias das feridas no dorso de ratos.* Grupos avaliados: **A.** Salina; **B.** AH 0,5 %; **C.** A. chica 5 mg/mL; **D.** A. chica 10 mg/mL; **E.** A. chica 25 mg/mL; **F.** Micropartículas de AH + A. chica (1:0,5) (1500 e 200 rpm) e **G.** Nanopartículas de AH + A. chica (1:0,5) (1500 e 1000 rpm). Os números correspondem ao dia de tratamento: **1** (1<sup>o</sup> dia); **2** (3<sup>o</sup> dia); **3** (5<sup>o</sup> dia); **4** ( 8<sup>o</sup> dia) e **5** (10<sup>o</sup> dia).


*Figura 41.* Área da ferida no tegumento do dorso de ratos. Grupos avaliados: Controle negativo absoluto (salina); All livre 5 mg/mL; *Arrabidaea chica* 5 mg/mL; *Arrabidaea chica* 10 mg/mL; *Arrabidaea chica* 25 mg/mL; Microp. AH + A. chica - 1:0,5 (1500 e 1000 rpm) 5 mg/mL e Nanop. AH + A. chica - 1:0,5 (1500 e 200 rpm) 5 mg/mL. Os grupos avaliados receberam 200  $\mu$ L de tratamento diariamente. # p< 0,001; ## p < 0,01 e ### p< 0,05.



*Figura 42. Área cicatrizada da ferida (%).* Contração da ferida após dez dias de tratamento.

#### IV.4.1. Ensaio da Hidroxiprolina.

Para o ensaio da capacidade indutora da produção de colágeno (hidroxiprolina) foram analisados os hidrolisados dos tegumentos dos dorsos dos ratos com maior índice de cicatrização ou fechamento da ferida, sendo eles: Arrabidaea chica 10 mg/mL; nanopartículas de AH + *A. chica* - 1:0,5 (1500 e 200 rpm) 5 mg/mL e micropartículas de AH + *A. chica* - 1:0,5 (1500 e 1000 rpm) 5 mg/mL. Dentre todos os grupos avaliados, nenhum deles apresentou diferença na quantidade de hidroxiprolina nos tecidos cicatrizados quando comparados ao controle negativo absoluto salina (*Figura 43*).



*Figura 43. Quantidade de hidroxiprolina no tecido cicatrizado de ratos.* Grupos avaliados: controle negativo absoluto salina; *A. chica* 10 mg/mL; nanopartículas de AH + *A. chica* - 1:0,5 (1500 e 200 rpm) 5 mg/mL e micropartículas de AH + *A. chica* - 1:0,5 (1500 e 1000 rpm) 5 mg/mL. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Esses dados sugerem que a atividade cicatrizante tanto do extrato bruto da *A. chica* livre quanto encapsulado em micro e nanopartículas de AH deve-se à capacidade de estimulação do crescimento celular em fibroblastos (*Figura 30*), responsáveis pela contração da ferida e da indução do processo de angiogênese (*Figuras 32, 36 e 37*), responsável pela oxigenação e nutrição do tecido, ambos necessários para manter a continuidade tecidual, reduzir o tamanho da lesão, e facilitar a cicatrização (*Branski et al, 2006; Clark, 1995; Carmeliet, 2005*).

Podemos sugerir ainda que a maior atividade proporcionada pelo extrato bruto da *A. chica* livre e encapsulado em micro e nanopartículas de AH ocorre na segunda fase de cicatrização ou fase de proliferação (*Vanlis & Kalssebeek, 1973; Dvorak et.al., 1999*).

# V. CONCLUSÕES

## V. CONCLUSÕES.

Através dos resultados obtidos, podemos concluir de forma geral que as micro e nanopartículas de ácido hialurônico contendo o extrato bruto da *A. chica* produzidas neste trabalho, beneficiaram a angiogênese e cicatrização contribuindo assim para o desenvolvimento de novas formulações para aplicações farmacêuticas e cosméticas.

Como conclusões específicas têm-se:

- A formação e propriedades físico-químicas das partículas de AH produzidas por emulsificação são diretamente relacionadas com as variáveis operacionais. O processo de emulsificação produziu nano e micropartículas, cujo melhor rendimento foi 73%, com velocidade de agitação 1500 e 1000 rpm, razão ADH:AH 2:1, pH ajustado com 1 mL de HCI (0,1N), para 250 mL de meio reacional;
- O aumento da velocidade de agitação na segunda reação de reticulação aumentou o diâmetro das nanopartículas formadas. A velocidade de agitação de 200 rpm na segunda reação de reticulação favoreceu a formação de nanopartículas vazias. A velocidade de agitação de 1000 rpm na segunda reação de reticulação favoreceu a formação de micropartículas vazias;
- As micropartículas vazias apresentaram diâmetro médio de 4,19 μm e 3,36 μm, com características adequadas para a administração farmacológica e cosmética devido ao tamanho reduzido; as nanopartículas vazias obtidas apresentaram diâmetro médio de 119,27 nm e 523,95 nm;

- As micropartículas encapsulando o extrato bruto da *A. chica* apresentaram diâmetro médio de 2 – 6 μm, conservando as características para a administração farmacológica e cosmética devido ao tamanho reduzido;
- As nanopartículas contendo ativo da *A. chica* obtidas apresentaram diâmetro médio de 202 598 nm;
- As nanopartículas contendo A. chica apresentaram –se mais estáveis, com potencial zeta de +27,2 a +50 mV comparadas às partículas vazias que apresentaram valores de potencial zeta entre +15,2 e +40 mV;
- O rendimento tanto das partículas vazias quanto das contendo o ativo foi baixo, devido as grandes perdas durante as lavagens do processo para a retirada da fase oleosa, revelando a necessidade de se melhorar o processo de separação das partículas da fase oleosa;
- Apesar do baixo rendimento das partículas, a encapsulação de extrato bruto da *A. chica* mostrou-se eficiente, com eficiências acima de 40%;
- O crescimento celular em fibroblastos humanos, tanto as partículas vazias como o extrato da *A. chica* não apresentaram toxicidade celular, onde o extrato originário do Paraná apresentou características indutoras do crescimento celular superiores ao controle positivo alantoína;
- Ensaios *in vivo* realizados em CAM evidenciaram o efeito angiogênico das micropartículas vazias de AH e das diluições mais concentradas do extrato bruto;

- Ensaios *in vivo* realizados no tegumento do dorso de camundongos evidenciaram o efeito angiogênico das nanopartículas vazias de AH, de todas as micro e nanopartículas de AH contendo o extrato bruto da *A. chica* exceto nas micropartículas cuja proporção *AH:A. chica* foi de 1:1, e ao contrário do encontrado em CAM, apenas nas diluições menos concentradas do extrato bruto foi possível verificar o aumento dos vasos sanguíneos;
- A análise microscópica dos cortes histológicos confirmou a atividade indutora da angiogênese evidenciada na contagem macroscópica dos vasos sanguíneos do tegumento do dorso de camundongos;
- No ensaio de cicatrização de ferida no tegumento do dorso de ratos tanto a *A. chica* livre quanto encapsulada em micro e nanopartículas de AH demonstraram um potencial cicatrizante expressivo devido ao fechamento rápido e eficiente da ferida, superior a 80% de área reduzida da ferida;
- O ensaio da capacidade indutora da produção de colágeno (hidroxiprolina) mostrou que tanto a tanto a *A. chica* livre quanto encapsulada em micro e nanopartículas de AH não apresentaram diferença na quantidade de hidroxiprolina nos tecidos cicatrizados quando comparados ao controle negativo absoluto salina;
- Pode-se inferir que a atividade cicatrizante tanto do extrato bruto da *A. chica* livre quanto encapsulado em micro e nanopartículas de AH deve-se à capacidade de estimulação do crescimento celular em fibroblastos e da indução do processo de angiogênese, ambos os eventos ocorrendo na segunda fase de cicatrização ou fase de proliferação.

VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

# VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.

Para a continuidade desta pesquisa seguem algumas sugestões para próximos trabalhos:

- Retirada da fase oleosa na produção das partículas de AH para excluir as etapas de lavagens e conseqüentemente a perda de partículas durante o processo;
- Estudo mais detalhado da atividade do ac03 do extrato bruto da A. chica;
- Realização de ensaios de liberação do ativo das partículas;
- Identificação e seleção de formulações para aplicações específicas farmacêuticas e cosméticas em processos de cicatrização, em função das propriedades físico-químicas das partículas.

# VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Biologia Molecular da célula. 4° edição, Artmed, Porto Alegre, 1300-1303, 2004.

ALCERITO, T, BARBO, F E, NEGRI, G, SANTOS, D Y A C, MEDA, C I,YOUNG, M C M, CHÁVEZ, D, BLATT,C T T. Foliar epicuticular wax of Arrabidaea brachypoda: flavonoids and antifungal activity. Biochemical and Systematics Ecology. 30: 677-683, 2002.

ANTON N, BENOIT J P, SAULNIER P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. Journal of Controlled Release, 128:185–199, 2008.

ANTHONY, M S, POTTER, S M, SCHONFELD, G, SCOTT, L W, WILLIAMS, C L. Soy protein and health: discovering a role for soy protein in the fight against coronary heart disease. St. Louis: Protein Technologies International, 24 p, 1996.

ARNOLD F, WEST D C. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther*, 52: 407-422, 1991.

ASSOIAN R K, KOMORIYA A, MEYERS, C A, MILLER, D M, SPORN, M B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and chacacterization. *J Biol Chem*, 258: 7155-7160, 1983.

AZEREDO H M C. Encapsulação: aplicação à Tecnologa de Alimentos. *Alim. Nutr,* 16:89-97, 2005.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., CURI, R. 2005. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 41: 27-51.

BARATA, L.E.S.; SCHIOZER, A. L.; BRAGA, A. M. P.; SCHREIBER, A. Z.; FERNANDES, L. L.; Extratos Fitoterápicos à Base de *Arrabidaea chica* Para Emprego Como Antifúngico e Antibacteriano e Composições Fitoterápicas à Base de Extratos Fitoterápicos de *Arrabidaea chica* Para Emprego Como Antifúngico e Antibacteriano. Patente de Invenção, PI0600943-3. Patente Unicamp, Depósito: 23/02/2006, INPI, BRASIL, 02/2006.

BARBOSA, W. L. R., PINTO, L. N., QUIGNARD, E., VIEIRA, J. M. S., SILVA Jr., J. O. C., ALBUQUERQUE, S. Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18, 544-548, 2008.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? J. Pharm. Sci.; 99; 21–50, 2010.

BECK R, GUTERRES S, POHLMANN A. Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care. Porto Alegre, Springer, 2011.

BENNETT, S.P., GRIFfiTHS, G.D., SCHOR, A.M., LEESE, G.P., SCHOR, S.L., 2003. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. Br. J. Surg. 90, 133–146.

BEER H D, LONGAKER M T, WERNER S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol*, 109: 132-138, 1997.

BEEZHOLD D H, PERSONIUS C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *J Leukoc Biol*, 51: 59-64, 1992.

BRANNON-PEPPAS L. Polymers in controlled drug delivery. *Med Plast Biomat,* 4: 34-45, 1997.

BRANNON-PEPPAS L. Recente advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int J Pharmaceut,* 116: 1-9, 1995.

BRANSKI R C, VERDOLINI K, SANDULACHE V, ROSEN C A, HEBDA P A. Vocal fold wound healing: a review for clinicians. *J Voice*, 20: 432-442, 2006.

BROWN M B, JONES S A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol,* 19: 308-318, 2005.

BUCHANAN, E.P., LONGAKER, M.T., Lorenz, H.P., 2009. Fetal skin wound healing. Adv. Clin. Chem. 48, 137–161.

BYRNE A M, BOUCHIER-HAYES D J, HARMEY J H. Angionenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*, 9: 777-794, 2005.

CAI S, LIU Y, SHU X Z, PRESTWICH G D. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic firoblast growth factor. *Biomaterials*, 26: 6054-6067, 2005.

CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438: 932-936, 2005.

CHAPMAN, E., PERKIN, A. G., ROBINSON, R. The colouring matters of carajura. *Journal Of The Chemical Society*, 3015-3041, 1927.

CHEN R R & MOONEY D J. Polymeric Growth Factor Delivery Strategies for Tissue Engineering. *Pharmaceut Res*, 20: 1103-1112, 2003.

121

CHIYOKO, U. Composition for external use. Patente: JP2001122763-A, 2001.

CHONG, B F, BLANK, L M, MCLAUGHLIN, R, NIELSEN, L .Microbial hyaluronic acid production. Appl Microbiol Biotechnol 66:341–351, 2005.

CHUNG H J, KIM H K, YOON J J, PARK T G. Heparin Immobilized Porous PLGA Microspheres for Angiogenic Growth Factor delivery. *Pharmaceut Res*, 23: 1835-1841, 2006.

CLARK R. Wound repair: Overview and general considerations. *In: Clark R. The molecular and cellular biology of wound repair.* 2<sup>a</sup>ed; New York, *Plenum Press,* 1996, p. 3-50.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas. Vol. II. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas I; Imprensa Nacional: Rio De Janeiro, 31-39, 1926.

CRAGG, M.G. & NEWMAN, D. J., 2009. Nature a Vital Source of Leads for Anticancer Drug Development. Phytochemistry Review 8: 313-331.

DAVID-RAOUDI, M., TRANCHEPAIN, F., DESCHREVEL, B., VINCENT, J.C., BOGDANOWICZ, P., BOUMEDIENE, K., PUJOL, J.P., 2008. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. Wound Repair Regen. 16, 274–287.

DEHAZYA, P., LU, C. Sodium hyaluronate microspheres. Patent US 2005/6969531. 2005.

DEVIA B, LLABRES G, WOUTERS J, DUPONT L, ESCRIBANO-BAILON M T, PASCUAL-TERESA S, ANGENOT L, TITS M. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves *of Arrabidaea chica*. Phytochem. Anal, 13: 114-120, 2002.

DOBRE T, STROUESCU M, STOICA A, DRAGHICI E, ANTOHE N. Inulin Extraction and Encapsulation. Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara), 53(67): 215-217, 2008.

DRAYE J, DELAEY B, VOORDE A V, BULCKE A V D, BOGDANOV B, SCHACHT E. In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials,* 19: 99-107, 1998.

DRURY J L, MOONEY D J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24: 4337-4354, 2003.

DVORAK H F, NAGY J A, FENG D, BROWN L F, DVORAK A M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol,* 237: 97-132, 1999.

EHRLICH H P. Collagen considerations in scarring and regenerative repair. In: LONGAKER, M. T. Scarless Wound Healing. New York; *Marcel Dekker*, 2000, p. 99-113.

ESPOSITO, E., MENEGATTI, E., CORTESI, R. Hyaluronan-based microspheres as tool for drug delivery: a comparative study. International Journal of Pharmaceutics, 288: 35-49, 2005.

FALANGA V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet,* 366:1736-1743, 2005.

FAVARO-TRINDADE C S, PINHO S C, ROCHA G A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz. J. Food Technol.*, 11: 103-112, 2008.

FERRARA N, HOUCK K A, JAKEMAN L B, WINER J, LEUNG D W. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*, 47: 211-218, 1991.

FERRE-SOUZA, V. Liberação controlada do fator de crescimento angiogênico extraído do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, encapsulado em microesferas de ácido hialurônico para utilização na terapia angiogênica e engenharia tecidual. Ribeirão Preto, 2007.123 f. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

FITZPATRICK, T B, FREEDBERG, I M, EISEN, A Z, WOLFF, K, AUSTEN, F, GOLDSMITH, L A, KATZ, S I. Dermatologia in General Medicine. 5<sup>a</sup> edição, 1999.

FOLKMAN J, SHING T. Angiogenesis. J Biol Chem, 267: 10931-34, 1992.

FRANGE R C C, GARCIA M T J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. Rev Ciênc Farm Básica Apl., 30(3):263-271, 2009.

FRANK, K, KOHLER, K, SCHUCHMANN, H P. Stability of anthocyanins in high pressure homogenization. *Food Chemistry*, 130: 716-719, 2012.

FRONZA T, GUTERRES S S, POHLMANN A R, TEIXEIRA H F. Nanocosméticos: em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios. UFGRS, 61, 2007.

GABBIANI G, HIRSCHEL B J, RYAN G B, STATKOV P R, MAJNO G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med*, 135: 719-734, 1972.

GAFFNEY, J., MATOU-NASRI, S., GRAU-OLIVARES, M. And SLEVIN, M. Therapeutic applications of hyaluronan. Molecular BioSystems, 6, pg. 437-443, 2010.

GAILIT J, WELCH M P, CLARK R A. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*, 103: 21-27, 1994.

GAO, F., LIU, Y., HE, Y., YANG, C., WANG, Y., SHI, X., WEI, G. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. Matrix Biology, 29, 107 – 116, 2010.

GARG H G, HALES C A. Chemistry and biology of hyaluronan. Boston: Elsevier, 2004.

GAWRONSKA-KOZAK, B, BOGACKI, M, RIM, J, MONROE, W T, MANUEL, J A. Scarless skin repair in immunodeficient mice. The International Journal of Tissue Repair and Regeneration, 14:3, 265-276, 2006.

GENASETTI, A.; VIGETTI, D.; VIOLA, M.; KAROUSOU, E.;MORETTO, P.; RIZZI, M.; BARTOLINI, B.; CLERICI, M.; PALLOTTI, F.; LUCA, G.; PASSI, A. Hyaluronan and humam endothelial cell behavior. Connective Tissue Research; 49; 120-123; 2008.

GOLSHANI, R, LOPEZ, L, ESTRELLA, V, KRAMER, M, IIDA, N, LOKESHWAR, V B. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. Cancer Res.; 68(2): 483-91, 2008. GONÇALVES S B. Extração, purificação e estudos sobre a formação de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina. Rio de Janeiro, 2007, 182f. (Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

GREENHALGH D G. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma*, 41: 159-167, 1996.

GU F, AMSDEN B, NEUFELD R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *J Control Release*, 96: 463-472, 2004.

GUO H H, LING W H, WANGQ. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L.) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods For Human Nutrition*, 62 (1): 1-6, 2007.

GUTERRES S S, ALVES M P, POHLMANN A R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights,* 2: 147 – 157, 2007.

HACKHAM, D J & FORD, H R. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. Surg Infect (Larchmt); 3(1),23–35, 2002.

HARBORNE J B, WILLIAMS C. A. Anthocyanins and other flavonoids. Natural Product Report, 18: 310–333, 2001.

HARBORNE J B. Comparative Biochemistry of the flavonoids – VI. Flavonoid Patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. Phytochemistry, 6: 1643-1651, 1967.

HARRIS C S, BURT A J, SALEEM A, LE P M, MARTINEAU L C, HADDAD P S, BENNETT S A, ARNASON J T. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of Vaccinium angustifolium. *Phytochemical Analysis*, 18 (2): 161-169, 2007.

HAYES A J, HUANG W Q, MALLAH J, YANG D, LIPPMAN M E, LI L Y. Angiopoetin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res*, 58: 224-237, 1999.

HELDIN C H, ERIKSSON U, OSTMAN A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys*, 398: 284-290, 2002.

HIRSCHI K K, SKALAK T C, PEIRCE S M, LITTLE C D. Vascular assembly in natural and engineered tissues. *Ann NY Acad Sci*, 961: 223-242, 2002.

HOEKSTRA D. Hyaluronan-modified surfaces for medical devices. *Med Dev Diagn Ind*, 48-58, 1999.

HÖFLING J F, ANIBAL P C, OBANDO-PEREDA G A, PEIXOTO I A T, FURLETTI V F, FOGLIO M A, GONÇALVES R B. Antimicrobial potential of some plant extracts against Candida species. Braz. J. Biol., 70 (4): 1065-1068, 2010.

HOLMBERG K, JONSSON B, KROMBERG B, LINDMAN B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2nd edition, John Wiley & Sons Ltd., 562, 2003.

HU, Z., XIA, X., TANG, L. Processes for Synthesis Oil and Surfactant-free Hyaluronic Acid Nanoparticles and Microparticles. Patent US 2006/0040892, 2006.

HUANG L, CHENG Y Y, KOO P L, LEE K M, QIN L, CHENG J C Y, KUMTA S M. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mat Res*, 66 A: 880-884, 2003.

127

ITANO, N, ATSUMI, F, SAWAI, T. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Sci USA, 99, 3609-3614, 2002.

ITANO, N, SAWAI, T, ATSUMI, F. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. J Biol Chem, 279, 18679-18687, 2002.

JORGE, M. P. Atividade cicatrizante do extrato bruto de Arrabidaea chica Verlot. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

JORGE, M. P., MANDJAROF, C., RUIZA, A. L. T. G., FERNANDES, A. T., RODRIGUES, R. A. F., SOUSA, I. M. O., FOGLIO, M. A., CARVALHO, E. Evaluation of wound healing properties of Arrabidaea chica Verlot extract. Journal of Ethnopharmacology, 118, 361–366, 2008.

JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO J. (1999). Histologia Básica. 9° edição, Guanabara Koogan, 72-97.

KALIL FILHO A N, COSTA KALIL G P, REIS LUZ A I. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Comunicado Técnico EMBRAPA, 50: 1-4, 2000.

KING T W, PATRICK C W J. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique. *J Biomed Mat Res*, 51: 383-390, 2000. KINGSLEY D M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8: 133-146, 1994.

KNUDSON C B, KNUDSON W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*, 12: 69-78, 2001.

KOGAN, G, SOLTÉS, L, STERN, R, GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol. Lett, 2-10, 2006.

KONG J M., KHANG N K, CHIA L S, CHIA T F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacology Singapore*, 24 (1): 7-21, 2003.

KUBO T M O. Preparação e caracterização de micropartículas de hialuronato de sódio para encapsulação e liberação controlada de proteínas para aplicação nasal.
2005. Campinas, 2005, 105 f. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química de Campinas, Universidade de Campinas).

LASIC D. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam, Elsevier, 1993.

LAURENT T C. Structure of hyaluronic acid. In: BALAZS E A. Chemistry and the molecular biology of the intracellular matrix. London, *Academic Press*, 1970, p. 703-732.

LEE J H, CHO K M. Changes occurring in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. *Food Chemistry*, 131: 161-169, 2012.

LEUNG H S, ROBINSON J R. The contribution of anionic polymers structural features to mucoadhesion. *J Control Release*, 5: 187-194, 1990.

LI J, FOITZIK K, CALAUTTI E, BADEN H, DOETSCHMAN T, DOTTO G P. TGFbeta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 274: 4213-4219, 1999.

LIM S T, MARTIN G P, BERRY D J, BROWN M B. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *J Control Release*, 66: 281-292, 2000.

LYSSANT K. Emulsions and Emulsions Technology; Surfactant Science Series. Volume 6, New York, 1974, capítulos 1, 2 e 13.

MACKAY, D & MILLER, A L. Nutritional support for wound healing. Altern Med Rev. 8: (4), 359–377, 2003.

MADRI J M, SANKAR S, ROMANIC A M. Angiogenesis. In: CLARK, RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2ed. N.Y., Plenum Press, 355-371, 1996.

MAISON-PIERRE P C, SURI C, JONES P F, BARTUNKOVA S, WIEGAND S J, RADZIEJEWSKI C, COMPTON D, McCLAIN J, ALDRICH T H, PAPADOPOULOS N, DALY T J, DAVIS S, SATO T N, YANCOPOULOS G D. Angiopoientin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277: 55-60, 1997.

MANDRACCHIA V J, SANDERS S M, FRERICHS J A. The use of becaplermin (rhPDGF-BB) gel for chronic nonhealing ulcers. A retrospective analysis. *Clin Podiatr Med Surg*, 18: 189-209, 2001.

MARIKOVSKY M, VOGT P, ERIKSSON E, RUBIN J S, TAYLOR W G, JOACHIM S, KLAGSBRUN M. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol*, 106: 616-621, 1996.

MARSANO, A., MILLWARD-SADLER, S.J., SALTER, D.M., ADESIDA, A., HARDINGHAM, T., TOGNANA, E., KON, E., CHIARI-GRISAR, C., NEHRER, S., JAKOB, S.M., MARTIN, I., 2007. Differential cartilaginous tissue formation by human synovial membrane, fat pad, meniscus cells and articular chondrocytes. Osteoarthr. Cartil. 15, 48–58.

MASSAGUÉ J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 597-641, 1990.

MAVIOSO C., 2003. Noções Basicas sobre feridas e cicatrização. http://www.gaif.net/feridasecicatriz.pdf, acessado em Outubro de 2009.

MAZZA, G & MINIATI, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton-Florida (USA): CRC Press. 1993.

MENSAH, A.Y., SAMPSON, J., HOUGHTON, P.J., HYLANDS, P.J., WESTBROOK, J., DUNN, M., HUGHES, M.A., CHERRY, G.W. Effects of Buddleja globosa leaf and its constituents relevant towound healing. Journal of Ethnopharmacology 77, 219–226, 2001.

MEYERS D. Surfaces, Interfaces and Colloids: Principle and Applications. Second Edition, Wiley-VCH, Myers, capítulo 11, 1999.

MCALLION R L, FERGUSON M W J. Fetal wound healing and the development of antiscarring therapies for adult wound healing. In: CLARK, RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair.* 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996. p. 561-590.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55–63, 1983.

NAGAI M K, EMBIL J M. Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert Opin Biol Ther*, 2: 211-218, 2002.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? Journal of Medicinal Chemistry. 51: 2589-2599, 2008.

NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and it receptors. *FASEB J*, 13: 9-22, 1999.

NIESSEN F B, ANDRIESSEN M P, SCHALKWIJK J, VISSER L, TIMENS W. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol*, 194: 207-216, 2001.

OLIVEIRA, D. P. C.; BORRAS, M. R. L.; FERREIRA, L. C. L.; LÓPEZ-LOZANO, J. L. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verl. on the self-induced inflammatory process from venoms amazonians snakes. Rev. bras. farmacogn., 19, no.2b, pg ,2009.

OLIVEIRA A G, SCARPA M V, CORREA M A, CERA L F R, FORARIZ T P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quím Nova*, 7(1): 131-8, 2004.

ORNITZ D M, ITOH N. Fibroblast growth factors. Genome Biol, 2: 1-12, 2001.

PANCHATCHARAM M, MIRIYALA S, GAYATHRI V S, LAGUNA L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem*, 290 (1-2): 87-96, 2006.

PAPAPETROPOULOS A, FULTON D, MAHBOUBI K, KALB R G, O'CONNOR D S, LI F, ALTIERI D C, SESSA W C. Angiopoietinin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem*, 275: 9102-9105, 2000.

PAULETTI P M, CASTRO-GAMBOA I, SILVA D H S, YOUNG M C M, TOMAZELA D M, EBERLIN M N, BOLZANI V S. New antioxidant C-Glucosylxanthones from stems of *Arrabidaea samydoides*. Journal of Natural Products, 66: 1384-1387, 2003.

PEATTIE R A, NAYATE A P, FIRPO M A, SHELBY J, FISHER R J, PRESTWICH G D. Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants. *Biomaterials*, 25: 2789-2798, 2004.

PETTERSSON A, NAGY J A, BROWN L F, SUNDBERG C, MORGAN E, JUNGLES S, CARTER R, KRIEGER J E, MANSEAU E J, HARVEY V S, ECKELHOEFER I A, FENG D, DVORAK A M, MULLIGAN R C, DVORAK H F. Heterogeneity of the Angiogenic Response Induced in Different Normal Adult Tissues by Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor. *Lab Invest*, 80: 99-115, 2000.

PIMENTEL E. R., 2001. Matriz Extracelular.In: A Célula, 1ª edição, Editora Manole, Brasil, p.217-234.

PIMENTEL E. C., 2002. Fitoterapia, disponível em URL: http://www.campinas.sp.gov.br/saude/programas/saude\_fitoterapia.htm consultado em dezembro de 2010.

133

PITARRESI, G., CRAPARO, E. F., PALUMBO, F. S., CARLISI, B. and GIAMMONA, G. Composite nanoparticles base don hyaluronic acid chemically cross-linked with  $\alpha$ , $\beta$ -polyaspartylhydrazide. Biomacromolecules, 8, pg. 1890-1898, 2007.

POTGENS A J, LUBSEN N H, ALTENA M C V, VERMEULEN R, BAKKER A, SCHOENMAKERS J G, RUITHER D J, WALL R M. Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J Biol Chem*, 269: 32879-32885, 1994.

PRESTWICH G D. Biomaterials from chemically-modified. *Glycoforum;* 2001. disponível em: /http//:www.glycoforum.gr.jp. Acesso em: 02 maio 2006.

PRESTWICH G D, MARECAK D M, MARECEK J F, VERCRUYSSE K P, ZIEBELL M R. Controled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release*, 53: 93-103, 1998.

PRICE, R.D., BERRY, M.G., NAVSARIA, H.A., 2007. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. J. Plastic Reconstr. Aesthet. Surg. 60, 1110–1119.

PRITCHARD K, LANSLEY A B, MARTIN G P, HELLIWELL M, MARRIOTT C, BENEDETTI L M. Evaluation of the bioadhesive properties of hyaluronan derivatives: detachment weight and mucociliary transport rate studies. *Internat J Pharmaceut*, 129: 137-145, 1996.

PROW, T W, GRICE, J E, LIN, L L, FAYE, R, BUTLER, M, BECKER, W, WURM, E M T, YOONG, C, ROBERTSON, T A, SOYER, H P, ROBERTS, M S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 63, 470-491, 2011.

RADIN, E.L AND PAUL, I.L. A consolidated concept of joint lubrification. J Bone Jt Surg, 54 A, 607, 1971.

ROBERTS, M.S., WALTERS, K.A. Human skin morphology anddermal absorption, in: M.S. Roberts, K.A. Walters (Eds.), Dermal Absorption and Toxicity Assessment, Informa Healthcare, New York, 2008, pp. 1–15.

ROBERTS, M.S., CROSS, S.E., PELLETT, M.A. Skin transport, in: K.A. Walters (Ed.), Dermatological and Transdermal Formulations, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 2002, pp. 89–195.

ROBERTS A B. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, 24: 111-119, 1998.

ROBERTS A B, SPORN M B. Transforming growth factor-β. In: CLARK, RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996. p. 275-308.

ROONEY, P., WANG, M., KUMAR, P., KUMAR, S., 1993. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagen by endothelial cells. J. Cell Sci. 105, 213–218.

ROSEN M J. Surfactants and Interfacial Phenomena. Second Edition, John Wiley & Sons, Canada, capítulo 8, 1989.

ROSIER R N, O'KEEF R J. Hyaluronic acid therapy. *Instr Course Lect,* 49: 495-502, 2000.

ROSS R, GLOMSET J, KARIYA B, HARKER L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth mescle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71: 1207-1210, 1974.

ROSSAM M R. Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas Lipídicas Sólidas para Aplicação em Cosméticos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, abril, 2011.

SANTOS F K G, ALVES J V A, DANTAS T N C, NETO A A D, DUTRA Jr T V, NETO E L B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 40 PDPETRO, Campinas, 2007.

SCHULTZ G S, WHITE M, MITCHELL R, BROWN G, LYNCH J, TWARDZIK D R, TODARO G J. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factoralpha and vaccinia growth factor. *Science*, 235: 350-352, 1987.

SCHWEIGERER L, NEUFELD G, FRIEDMAN J, ABRAHAM J A, FIDDES J C, GOSPODAROWICZ D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*, 325: 257-259, 1987.

SCOGIN R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. Biochemical and Systematics Ecology, 8: 273-276, 1980.

SEGURA T, ANDERSON B C, CHUNG P H, WEBBER R E, SHULL K R, SHEA L D. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials*, 26: 359-371, 2005.

SEPP N T, LI L J, LEE K H, BROWN E J, CAUGHMAN S W, LAWLEY T J, SWERLICK R A. Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 103: 295-299, 1994. SHIEDLIN, A, BIGELOW, R, CHRISTOPHER, W, ARBASI, S, YANG, L, MAIER, R.V, WAINWRIGHT, N, CHILDS, A, MILLER R.J. Evaluation of hyaluronan from different sources: Streptococcus zooepidemicus, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. Biomacromolecules, 5, 2122 – 2127, 2004.

SINGER A J, CLARK R. Cutaneous wound healing. *New England J Med*, 341: 738-746, 1999.

SLEVIN,M., KRUPINSKI, J., GAFFNEY, J., MATOU, S., WEST, D., DELISSER, H., SAVANI, R.C., KUMAR, S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. Matrix Biol. 26, 58–68, 2007.

SLEVIN, M., KUMAR, S., GAFFNEY, J..Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. J. Biol. Chem. 277, 41046–41059, 2002.

SMITH, M.M., CAKE, M.A., GHOSH1, P., SCHIAVINATO, A., READ, R.A., LITTLE, C.B., 2008. Significant synovial pathology in a meniscectomy model of osteoarthritis: modification by intra-articular hyaluronan therapy. Rheumatol. 47, 1172–1178.

SOLANS C, IZQUIERDO P, NOLLA J, AZEMAR N, GARCIA-CELMA M J. Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10: 102-110, 2005.

SOLTÉS, L, STANKOVSKA, M, KOGAN, G, GEMEMER, P, STERN, R. Contribution of oxidative-reductive reactions to high-molecular-weight hyaluronan catabolism. Verlag Helvetica Chimica Acta, 11-14, 2005.

STEED D L. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg*, 25: 397-405, 1998.

STRACHAN L, MURISON J G, PRESTIDGE R L, SLEEMAN M A, WATSON J D, KUMBLE K D. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem*, 276: 18265-18271, 2001.

SUAVE J, DALL'AGNOL E C, PEZZIN A P T, SILVA D A K, MEIER M M, SOLDI V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, 7: 12-20, dezembro, 2006.

SURI C, MCCLAIN J, THURSTON G, MCDONALD D M, ZHOU H, OLDMIXON E H, SATO T N, YANCOPOULOS G D. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282: 468-471, 1998.

SWANN, D. A., RADIN, E. L., NAZIMIEC, M., WEISSER, P. A., CURRAN, N. And LEWINNEK, G. Role of hyaluronic acid in joint lubrification. Ann. Rheum. Dis., 33, pg. 318-326, 1974.

TADROS T, IZQUIERDO P, ESQUENA J, SOLANS C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109: 303-318, 2004.

TAFFARELLO, D. Extratos de Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica. São Paulo, 2008. 43 f. (Dissertação de Mestrado – Instituto Butantan/IPT – USP).

TAKEMURA O S, IINUMA M, TOSA H, MIGUEL O G, MOREIRA E A, NOZAWA Y A. flavone from leaves of Arrabidaea chica f. Cuprea. Phytochemistry, 38: 1299-1300, 1995.

TAKESHITA S, ZHENG L P, BROGI E, KEARNEY M, PU L, BUNTING S, FERRARA N, SYMES J F, ISNER J M. Therapeutic angiogenesis: A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augmente revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 9: 662-670, 1994.

TAMMI, M. I., DAY, A. J., AND TURLEY, E. A. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. J. Biol. Chem. 277, 4581–4584, 2002.

TESKAC, K & KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticlesmediated cell uptake of resveratrol, Int. J. Pharm. 390, 61–69, 2010.

TOKITA Y, OHSHIMA K, OKAMOTO A. Degradation of hyaluronic acid during freeze drying. *Polym Degrad Stab*, 55: 159-164, 1997.

TOOLE, B P. Hyaluronan: an essential partner in oncogenic pathways and multidrug resistance. Cell Biology, 1-2, 2006.

TSAHAR E, MOYER J D, WATERMAN H, BARBACCI E G, BAO J, LAVKOWITZ G, SHELLY M, STRANO S, PINKAS-KRAMARSKI R, PIERCE J H, ANDREWS G C, YARDEN Y. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J*, 15: 5948-5963, 1998.

TSUDA T, UENO Y,YOSHIKAWA T. *Biochemical Pharmacology*, 71(8): 1184-1197, 2006.

TUR K M, CH'NG H. Evaluation of possible mechanism(s) of bioadhesion. *Internat J Pharmaceut*, 160: 61-74, 1988.

TURLEY, E. A., NOBLE, P. W., AND BOURGUIGNON, L. Y. W. J. Signaling properties of hyaluronan receptors. Biol. Chem, 277, 4589–4592, 2002.

VAN DEN BERG, M. E. Plantas medicinais na Amazônia. 2<sup>nd</sup> Ed., Belém: CNPq/ Programa Trópico Úmido, 1993.

VANLIS J M, KALSSBEEK G L. Glycosaminoglycans in human skin. Br J Dermatol, 88: 355-361, 1973.

VAQUERO J, ZURITA M, MORALES C, CINCU R, OYA S. Expression of vascular permeability factor in glioblastoma specimens: correlation with tumor vascular endothelial surface and peritumoral edema. *J Neurooncol*, 49: 49-55, 2000.

VASIR, J. K., TAMBWEKAR, K., GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. International Journal of Pharmaceutics, 255, 13–32, 2003.

VON-POSER, G.L., SCHRIPSEMA, J., HENRIQUES, A.T., JENSEN, S.R., 2000. The distribution of iridoids in Bignoniaceae Bioch. Syst. Ecol. 28, 351-366.

XAVIER, B. Cosmetic composition comprising interferential particles and a colouring material. Patente: EP1339376A1, 2003.

WANG B C, HE R, LI Z M. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. *Food Technol. Biotechnol.*, 48 (1): 42-49, 2010.

WEN, D, LI, C, DI, H, LIAO, Y, LIU, H. A universal HPLC method for the determiation of phenolic acids in compound herbal medicines. J Agric Food Cehm., 53: (17), 6624-6629, 2005.

WEST,D.C.,HAMPSON, I.N.,ARNOLD, F.,KUMAR, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. Science 228, 1324–1326, 1985.

WERNER S, GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83: 835-870, 2003.

WENER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. Cytokine Growth Factor Rev., 2, 153-165, 1998.

WIDNER, B, BEHR, R, VON-DOLLEN, S, TANG, M, HEU, T, SLOMA, A, STERNBERG, D, DE ANGELIS, P L, WEIGEL, P H, BROWN S. Hyaluronic acid production in Bacillus subtilis. Appl Env Microbiol 71:3747–3752, 2005.

WIECHERS J W. Science and applications of skin delivery systems. Allured Publishing Corporation, USA, 525, 2008.

WILLIAMS, C.A. & GRAYER, R.J. Review: Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Product Reports*, 21(4): 539-573, 2004.

WILTING J, CHRIST B, BOKELOH M. A modified chorioallantoic membrane CAM assay for qualitative and quantitative study of growth factors. *Anat Embryol,* 183: 259-271, 1991.

WILTING J, CHRIST B, BOKELOH M. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF 165 and PDFG-BB. *Anat Embryol*, 186: 251-257, 1992.

WOESSNER J F Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*, 93: 440-447, 1961.

YARDEN Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37: 3-8, 2001.

YUN Y H, GOETZ D J, YELLEN P, CHEN W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials*, 25: 147-157, 2004.

ZAFRA-STONE, S., YASMIN, T., BAGCHI, M. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. Molecular Nutrition & Food Research, 51, 675-683, 2007.

ZAMBRUNO G, MARCHISIO P C, MARCONI A, VASCHIERI C, MELCHIORI A, GIANNETTI A, DE LUCA M. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol*, 129: 853-865,1995.

ZORN B, GARCIA-PIÑERES A J, CASTRO V, MURILLO R, MORA G, MERFORT I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. Phytochemistry, 56: 831–835, 2001.

# ANEXOS

### ANEXOS

Anexo I – Folha de aprovação do Comitê de Ética Experimental em Animais.



#### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "<u>Desenvolvimento de Micro e Nanopartículas</u> <u>de Ácido Hialurônico com Encapsulação do Extrato Vegetal da Arrabidaea</u> <u>chica Para Aplicações Farmacêuticas e Cosméticas no processo</u> <u>cicatrizante</u>" (protocolo nº <u>2406-1</u>), sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Maria</u> <u>Helena Andrade Santana / Viviane Ferre de Souza</u>, está de acordo com os <u>Princípios Éticos na Experimentação Animal</u> adotados pela <u>Sociedade</u> <u>Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)</u> e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o <u>DECRETO Nº 6.899, DE 15</u> DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em <u>06 de maio de</u> <u>2011</u>.

Campinas, 06 de maio de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente

OWB

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/
Anexo II – Protocolo de depósito de Patente.

## 20.12.11 – Protocolo nº 018110050581

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO EXTRATO DE ARRABIDAEA CHICA VERLOT EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICRO E NANOPARTICULADOS E LIPOSSOMAIS, PROCESSOS DE FABRICAÇÃO E USO DOS MESMOS."

MARY ANN FOGLIO, JOÃO ERNESTO DE CARVALHO, ANA LUCIA TASCA GÓIS RUIZ, MICHELLE PEDROZA JORGE, LEILA SERVAT, PATRICIA MARIA WIZIAK ZAGO, MARCOS NOGUEIRA EBERLIN, ELAINE CRISTINA CABRAL POLCELLI, MARIA HELENA ANDRADE SANTANA, **VIVIANE FERRE DE SOUZA**, GLYN MARA FIGUEIRA, ILZA MARIA OLIVEIRA, RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES E RENATA MILIANI MARTINEZ.