

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAULA SANTOS NUNES

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO -
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO
CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NO PROCESSO DE REPARO
CICATRICAL EM ROEDORES

ARACAJU

2009

NUNES/PAULA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO
CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NO PROCESSO DE
REPARO CICATRICIAL EM ROEDORES

2009

PAULA SANTOS NUNES

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO
FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE FILMES DE
COLÁGENO CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NO
PROCESSO DE REPARO CICATRICAL EM
ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

ARACAJU

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

N972d

Nunes, Paula Santos

Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação de filmes de colágeno contendo ácido úsnico no processo de reparo cicatricial em roedores / Paula Santos Nunes. – São Cristóvão, 2010.
108f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1. Espectrofotometria. 2. Cicatrização. 3. Ácido úsnico. 4. Colágeno. I. Título.

CDU 543.392:616-003.9

PAULA SANTOS NUNES

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO
FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE FILMES DE
COLÁGENO CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NO
PROCESSO DE REPARO CICATRICAL EM
ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

2º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Luiz de C. de A. Júnior

PARECER

Dedido esse trabalho àqueles que até nos momentos de silêncio “falavam” de apoio incondicional através de simples gestos, mas essenciais, a saber, meus adoráveis pais e meus queridos irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao final de dois anos de dedicação a um trabalho torna-se imprescindível externar os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste trabalho e sonho. Às pessoas que serão citadas, o meu “muito obrigada”:

À Deus, nosso criador e força sublime. Sabedoria e Simplicidade. Luz que ilumina nosso caminho. Sem a fé que nEle depositamos nada seria possível.

Aos meus amados pais e irmãos, Júlio, Tânia, Ivan e Amanda pelo apoio incondicional, dedicação e amor sempre demonstrados.

A minha querida “Mãe Jota”, sempre disponível a ajudar e orientar no que for preciso.

Ao meu admirável orientador, Professor Adriano Antunes, pela oportunidade e confiança depositadas, pela atenção, amizade e incentivo. Não é possível expressar o quanto lhe sou grata e o quanto me auxiliou e zelou pelo meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Ricardo Albuquerque pela dedicação e disponibilidade, pelas observações educadas e firmes, indispensáveis para realização desse trabalho. Por tudo que me permitiu aprender com sua paciência e atenção.

A Professora Juliana Cardoso, pelo apoio demonstrado em todos os momentos. Desde a prestimosa e acessível professora (ensino da produção dos filmes, correção dos resumos em congressos) à linda e adorável amiga.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia da UFS que em algum momento contribuíram para realização de alguma etapa desse trabalho, particularmente, aos Professores Fracilene Amaral, Lucindo Quintans, Leonardo Bonjardim, Márcio Roberto, Divaldo Lyra, pelas contribuições pertinentes sugeridas para realização desse estudo.

A adorável Rose Nely Pereira, técnica do Laboratório de Morfologia e amiga, pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar sempre que precisei.

Aos meus queridos amigos do LeFT, Marília, Douglas, Jamille, João Paulo, Rodrigo, Carla, Larissa, Izabella, Felipe, Bruno, Mairim e Gabrile, que me acompanharam em cada fase e venceram junto comigo o medo e a ansiedade. A presença de vocês foi

indispensável para concretização de cada etapa deste trabalho. Aprendemos muitas coisas juntos.

Aos colegas Luiz Pereira, Elizandro, Gabriela Borim pelas parcerias indispensáveis em algumas etapas do trabalho.

Aos funcionários do biotério, em especial à Seu Osvaldo, pela dedicação, profissionalismo e cuidado com os animais.

Lista de Figuras

CAPÍTULO II

Figura 1	Filmes bioativos de colágeno.	30
Figura 2	Características estruturais dos lipossomas.	32
Figura 3	Representação esquemática da organização de um Lipossoma Unilamelar (LUV).	34
Figura 4	Direcionamento da encapsulação de drogas em um Lipossoma Multilamelar (MLV).	36
Figura 5	Estrutura molecular plana do ácido úsnico	36

CAPÍTULO III

Figura 1	DTA curves of a) usnic acid, b) collagen film and c) usnic acid-collagen film obtained in heating rate of 10°C.min ⁻¹ under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL.min ⁻¹).	50
Figura 2	TG curves of a) usnic acid, b) collagen film and c) usnic acid-collagen film obtained in heating rate of 10°C.min ⁻¹ under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL.min ⁻¹).	50
Figura 3	IR spectra of a) usnic acid, b) collagen film and c) usnic acid-collagen film.	51
Figura 4	SEM photographs of surface of (a) collagen membrane and (b) and usnic acid-collagen.	52
Figura 5	SEM micrographs of cross-sections of (a) collagen membrane and (b) usnic acid-collagen films.	52

CAPÍTULO IV

Figura 1	Estrutura molecular plana do ácido úsnico	56
Figura 2	Espectro de varredura entre 225 e 400 nm mostrando a especificidade do método construído separadamente com o ácido úsnico e com os outros componentes do biofilme.	62
Figura 3	Curva de calibração construída com ácido úsnico (2 a 10 µg/mL) a 290 nm, em que a equação linear média.	63

CAPÍTULO V

Figura 1	Molecular structure of usnic acid	90
Figura 2	Neutrophilic infiltrations are seen in COL (Ia), PHO (Ib) and UAL (Ic) in 7 days; and in COL (IIa), PHO (IIb), UAL (IIc) in 14 days. In 21 days, chronic infiltrate is still observed in COL (IIIa) and quite less expressive in PHO (IIIb), whereas in UAL (IIIc) it is utterly inconspicuous (HE, 400x magnification).	91
Figura 3	In 7 days conspicuous thin delicate reticularly-arranged type-III collagen fibrils are seen in COL (Ia), PHO (Ib) and UAL (Ic). In 14 days the predominance of type-III collagen fibrils is maintained in COL (IIa), and PHO (IIb), whereas in UAL (IIc) it was observed the predominance of type-I collagen fibers. In 21 days was observed the complete resorption of type III fibers in COL (IIIa), and PHO (IIIb) and in UAL (IIIc) showed a mix of wavy and highly interlaced type I and type III collagen fibers (Sirius Red/Polarization, 100x).	92
Figura 4	Epithelization of the burn wound surface	93

Lista de Tabelas

CAPÍTULO IV

Tabela 1	Dados da curva analítica do ácido úsnico.	63
Tabela 2	Resultados do estudo de repetibilidade do método de dosagem do ácido úsnico em espectroscopia UV.	64
Tabela 3	Resultados da exatidão para três níveis de concentrações diferentes de ácido úsnico.	65
Tabela 4	Avaliação da robustez do método de dosagem do ácido úsnico por espectrofotometria UV.	65
Tabela 5	Análise de massa dos filmes e da quantidade de ácido úsnico extraído.	66
Tabela 6	Taxa de recuperação obtida a partir de biofilmes de colágeno.	67

Lista de Siglas e Abreviações

AU	Ácido úsnico
HE	Hematoxilina/eosina
DTA	Análise Térmica Diferencial
TG	Termogravimetria
DTG	Termogravimetria derivada
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
SEM	Microscopia eletrônica de Varredura
MLV	Vesículas Lipídicas Multilamelares
SUV	Vesículas Lipídicas Unilamelares
COL	Grupo dos animais que utilizaram o filme apenas com colágeno
PHO	Grupo dos animais que utilizaram o filme com colágeno e lipídio
UAL	Grupo dos animais que utilizaram o filme com colágeno, lipídio e ácido úsnico

Anexos

ANEXO I	Aprovação do Comitê de Ética	110
ANEXO II	Etapas metodológicas para obtenção do ácido úsnico	111
ANEXO III	Etapas metodológicas para realização da queimadura no animal	112
ANEXO IV	Etapas metodológicas para obtenção da lâminas histológicas	113
ANEXO V	Exemplo de tipagem da intensidade da reação inflamatória	114

SUMÁRIO

1 - CAPÍTULO I – Introdução	19
1.1 – Objetivos	21
1.1.1 – Objetivo geral	21
1.1.2 – Objetivos específicos	21
2 – CAPÍTULO II – Revisão da literatura	23
2.1- Queimadura	23
2.2- Cicatrização	24
2.3- Colágeno	27
2.4- Ácido úsnico	30
2.5- Lipossomas	33
3 – CAPÍTULO III – Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films	39
3.1 – Abstract	39
3.2 – Introduction	41
3.3 – Material and Methods	42
3.4 – Results and discussion	44
Referências	47
4 – CAPÍTULO IV – Desenvolvimento de um método analítico por espectrofotometria UV para a quantificação de ácido úsnico em filmes bioativos de colágeno	54
4.1 – Resumo	54
4.2 – Abstract	55
4.3 – Introdução	56
4.4 – Material e Métodos	57
4.5 – Resultados e discussão	61
Referências	68

5 – CAPÍTULO V – Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing dermal burn healing	72
5.1 – Abstract	72
5.2 – Introduction	74
5.3 – Material and methods	75
5.4 – Results and discussion	79
Referências	85
 CONCLUSÕES	 95
 REFERÊNCIAS	 96

Nunes, P.S. Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação de filmes de colágeno contendo ácido úsnico no processo de reparo cicatricial em roedores. Dissertação de Mestrado. Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe-UFS. 2009.

RESUMO

Há diversos produtos disponíveis para o tratamento de feridas provocadas principalmente por queimaduras tais como, agentes tópicos, soluções, enxertos, curativos interativos e filmes bioativos. O colágeno têm sido um dos materiais mais estudados, pois representa um importante constituinte protéico da pele. Os avanços científico-tecnológicos têm permitido o aprimoramento destes biomateriais através, por exemplo, da utilização de lipossomas, que possibilitam a incorporação de fármacos insolúveis para posterior liberação controlada diretamente na área lesada. O ácido úsnico (AU), um metabólito secundário de líquens, tem apresentado propriedades biológicas promissoras para o tratamento de feridas, como atividade antimicrobiana, analgésica e antiinflamatória. Nesta perspectiva, o objetivo desse estudo foi desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar o efeito de filmes de colágeno contendo AU sobre o processo de reparo cicatricial em queimaduras de segundo grau. Para a caracterização físico-química dos filmes foi utilizada a análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria (TG/DTG), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após essas análises, foi desenvolvida a validação do método de quantificação de AU nos filmes por espectrofotometria no ultravioleta. Por fim, o ensaio biológico foi realizado com 54 ratos divididos em três grupos: tratados com filme de colágeno (COL); tratados com filmes de colágeno contendo fosfolipídio (LIP); tratados com filmes de colágeno contendo lipossoma/ácido úsnico (AUL). Após 7, 14 e 21 dias seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para análise histológica e imunohistoquímica. Os resultados de análise térmica mostraram através da curva DTA do filme UAL a ausência do pico endotérmico à 201°C, característico da fusão do AU puro, indicando que o fármaco foi incorporado ao sistema polimérico. Estes resultados foram confirmados pelo MEV. As curvas TG/DTG dos filmes LIP e AUL apresentaram comportamento térmico diferente do AU livre. No espectro de IV do filme AUL foram observadas bandas similares ao AU livre, indicando que a incorporação não afetou a estabilidade do mesmo. A validação do método de doseamento apresentou um coeficiente de correlação de 0,9994 e excelente repetibilidade (C.V.< 1,0%). A exatidão apresentou média percentual de recuperação de 100,4%. Os valores dos limites de detecção e quantificação foram de 0,109 e 0,364 µg/mL, respectivamente. A taxa total de recuperação do analito nos filmes apresentou valores entre 100,4 e 82,3%. Os resultados do ensaio biológico aos 7 dias, mostraram que houve uma moderada infiltração neutrofílica, no filme AUL, distribuídos por toda a lesão, enquanto que no COL e LIP, a intensidade da reação inflamatória foi mais leve e limitada as margens da ferida. Aos 14 dias, a reação inflamatória foi reduzida em todos os grupos, no entanto, a reação de granulação foi mais desenvolvida no AUL. Aos 21 dias, observou a presença ainda expressiva de linfócitos nos grupos COL e LIP, enquanto que no AUL houve o predomínio de células plasmáticas. O uso dos filmes de colágeno contendo lipossomas/ácido úsnico (AUL), atuou desde a substituição mais rápida das fibras de colágeno tipo III para tipo I, até a melhora na densidade da collagenização. Conclui-se assim, que os filmes de colágeno contendo lipossomas/ácido úsnico promovem a aceleração dos eventos biológicos associados à dinâmica do reparo cicatricial.

Nunes, P.S. Development, physical-chemical characterization and evaluation of Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing in rats. Dissertação de Mestrado. Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe-UFS. 2009.

ABSTRACT

Disruption of the skin generally leads to an increased fluid loss, infection, hypothermia, scarring, compromised immunity and change in body image; furthermore, large skin damage can cause mortality. Collagen-based film is a potentially useful biomaterial since it is the major constituent of the connective tissue and permit controlled drug release within target tissues. Usnic acid (UA), a dibenzofuran originally isolated from lichens, it can act as an anti-inflammatory, analgesic and antibacterial agent. The purpose of this study was to evaluate the physical-chemical properties and effect of collagen-based films containing usnic acid as a wound dressing for dermal burn healing. Collagen (CL) and usnic acid/collagen-based (UAC) films were characterized using differential thermal analysis (DTA), thermogravimetry (TG/DTG), infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). Second-degree burn wounds of 1 cm² were performed in the dorsum of forty-five Wistar rats, assigned into nine groups (n=5): COL – animals treated with collagen-based films; PHO – animals treated with collagen films containing empty liposomes; UAL – animals treated with collagen-based films containing usnic acid incorporated into liposomes. After 7, 14 and 21 days the animals were euthanized. The specimens removed were formalin-fixed, and paraffin-embedded and histological sections were stained in HE and Sirius Red. In the spectrum of UAC, similar bands of the usnic acid are observed, indicating that the polymerization (film formation) did not affect the stability of the drug. Distinctly, DTA curve of UAC did not show an endothermic peak at 201°C, indicative that the drug was incorporated into the polymeric system. These results were corroborated by the scanning electron microscopy (SEM). The TG/DTG curves of UAC presented a different thermal decomposition profile compared to the individual compounds and CL. These findings suggest the occurrence of molecular dispersion or solubilization of the drug in the collagen film. The specificity revealed that the excipients in the formulation did not interfere with the analysis. The linearity in the range of 2-10 µg/mL presented a correlation coefficient of 0.9994. The method showed excellent repeatability (R.S.D. < 1.0 %). The accuracy, revealed a mean percentage recovery of 100.43 %. The method was robust for the variation of temperature and solvent. The detection and quantization limits were found 0.109 and 0.364 µg/mL. The total rate recovery of the analyte film showed values between 100.4 and 83.2%. Biological assays showed on 7th day there was a moderate infiltration of neutrophils, in UAL, distributed throughout the burn wounds, whereas in COL and PHO, the severity of the reaction was slighter and still limited to the margins of the burn wounds. On the 14th day, the inflammatory reaction was less intense in UAL, with remarkable plasma cells infiltration. On the 21st day, there was unequivocal reduction of the inflammation, which was predominantly composed of plasma cells in all groups, particularly in UAL. The use of collagen-based films containing usnic acid provided more rapid substitution of type-III for type-I collagen on the 14th day, and improved the collagenization density on the 21st day. It was concluded that the use of reconstituted bovine type-I collagen-based films containing usnic acid improved burn healing process in rats.

CAPÍTULO I

Introdução e Objetivos

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização consiste em uma cascata coordenada de eventos moleculares, celulares e bioquímicos que se comportam de forma harmoniosa, a fim de garantir a recomposição do tecido lesado (MANDELABAUM *et al.*, 2003). Entre as maiores causas de danos cutâneos se encontram as queimaduras e os traumas por choque (RUSSO, 1994, YONG *et al.*, 2001). A queimadura é uma lesão causada por agentes térmicos, químicos, elétricos, biológicos ou radioativos que agem no tecido de revestimento do corpo humano, comprometendo parcial ou totalmente a pele e seus anexos, e podendo atingir camadas mais profundas, como tecidos subcutâneos, músculos, tendões e ossos (MENEZES & SILVA, 1988; PAIVA, 2001). Histologicamente, a ferida por queimadura é caracterizada, principalmente, pela necrose por coagulação com formação de três zonas distintas, denominadas zonas de Jackson (MONDRAGON, 1999, ONG *et al.*, 2007).

As queimaduras graves têm efeitos danosos sobre a estrutura e função celular da pele. Esses efeitos variam de acordo com a intensidade e a duração do trauma e da espessura das zonas afetadas. A mortalidade em pacientes queimados ou com extensas lesões provocadas por choques sobre a pele ocorre muitas vezes de forma tardia principalmente por episódios associados à sepse (ARGUIJO *et al.*, 1999; DOKUMCU *et al.*, 2008). MACEDO *et al.*, 2003). É cada vez maior a busca por elementos que atuem na dinâmica da reparação tecidual, principalmente no que se refere à promoção da bioestimulação celular, o que possivelmente resulta na aceleração do processo cicatricial, sem causar efeitos danosos às células, tecidos ou órgãos.

Um fator de grande importância para o sucesso do tratamento destas lesões é a proteção contra o meio externo, obtida por meio de bandagens oclusivas. Neste sentido, destaca-se o aprimoramento das bandagens para disponibilizar produtos interativos que acelerem a cicatrização da lesão. Filmes de colágeno têm sido um dos materiais mais estudados, pois o colágeno tipo I representa um importante constituinte protéico da pele, e parece ter um bom papel na dispersão e dissipação de forças mecânicas, posto que é abundante em tecidos em que forças extremas são transmitidas, como tendões e ossos, além da pele (BERNALES *et al.*, 2004; VIEIRA, 1997). O fato de ser absorvível credita ao colágeno uma grande vantagem especialmente nas áreas queimadas, já que não necessita de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, evitando complicações pós-

operatórias e desconforto ao paciente (OGAWA & PLEPIS, 2002; YAMATOOGI *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo do colágeno I, especialmente em virtude das vantagens relacionadas a uma aceleração do processo de granulação e epitelização e a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado (ALVES *et al.*, 2008; HELARY *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 1990).

Entre os vários compostos de origem natural, o ácido úsnico é um dos mais conhecidos e estudados, apresentando comprovado efeito cicatrizante, antimicrobiano e antibiótico (MELO *et al.*, 2008). Esse composto é oriundo do metabolismo secundário de líquens (associação entre fungos e algas) (AHMADJIAN, 1993).

Os filmes de colágeno funcionam como sistema de liberação controlada de fármacos e são concebidos para se obter adequada concentração plasmática ou níveis de concentração teciduais de fármacos de forma controlada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto (LEE & ROBISON, 2004). O objetivo dessas novas tecnologias é manter invariável o nível sanguíneo terapêutico do fármaco durante um período de tempo prolongado, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento, como a falta de efetividade (dose sub-terapêutica) ou efeitos tóxicos (dose tóxica) da substância ativa. As mais importantes vantagens proporcionadas pela terapia medicamentosa controlada são: melhor adesão do paciente à terapêutica, otimização da dose total do princípio ativo (emprega-se menor dose) e aumento da eficiência do tratamento (HAO *et al.*, 1997; SEHN *et al.*, 2009; VERMA & GARG, 2001).

Tendo em vista a escassez de estudos que relatem o potencial de utilização terapêutica dos ácidos liquênicos como insumo para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente de baixo custo, e que possuam ação antiinflamatória e cicatrizante frente ao reparo cicatricial, esse trabalho teve por interesse desenvolver um curativo biocompatível que soma na busca de um agente cicatrizante usado para o tratamento de queimaduras. Além disso, a descoberta de novos medicamentos constitui parte essencial das Políticas Públicas de saúde e desenvolvimento econômico.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar o efeito de filmes de colágeno contendo ácido úsnico no processo de reparo cicatricial em queimaduras de segundo grau utilizando modelo animal.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente os filmes de colágeno contendo ácido único;
- Desenvolver um método analítico por espectrofotometria de absorção na região do Ultra Violeta para quantificação do ácido úsnico em filmes de colágeno;
- Avaliar *in vivo* o processo de reparo cicatricial de queimaduras de segundo grau tratadas com filmes de colágeno contendo ácido úsnico;

CAPÍTULO II

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 QUEIMADURA

Considerado o maior órgão do corpo humano, a pele é um órgão protetor e impermeável à água, que isola os componentes internos dos componentes do meio externo, representando, portanto, uma barreira natural do organismo. Corresponde a 16% do peso corporal e exerce diferentes funções, como regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra diversos agentes do meio ambiente e funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato) (DEMLING; WAY, 1993; GUIRRO, 2002).

Queimaduras são lesões ocasionadas pela exposição de tecidos orgânicos a diversas formas de energia, não só térmicas, mas também químicas ou ionizantes que atingem a pele. Estima-se que, anualmente, dois milhões de pessoas sofrem queimaduras de graus diferentes nos Estados Unidos (BAYAT *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2005). No Brasil, essa estimativa é de um milhão de acidentes com queimados por ano (MACEDO; ROSA, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Na queimadura, ocorre a destruição da barreira epitelial e da microbiota residente na pele, rompendo o seu efeito protetor. A presença de tecido desvitalizado, de proteínas degradadas e a redução do suprimento de oxigênio favorecem a proliferação de microorganismos patógenos do ambiente, da pele normal que circunda a lesão, ou da própria lesão (BARBOSA *et al.*, 2007). Quando esta barreira se encontra destruída total ou parcialmente em decorrência de traumas, como as queimaduras, ocorrem alterações da homeostase comprometendo assim, a sobrevivência.

A ruptura da pele geralmente leva a um aumento na perda de líquidos, infecções, hipotermia, comprometendo a imunidade corporal (ALEMDAROĞLU *et al.*, 2006, HUNT *et al.*, 1998). Um dos principais fatores que alteram a defesa do hospedeiro, expondo-o aos patógenos, é a destruição da barreira mecânica da pele, favorecendo a invasão de microorganismos por via linfática ou sanguínea, além de levar a uma variedade de estressores físicos, tais como acidose, perda de fluidos, alterações no equilíbrio endócrino, potencial para infecção e dor (CARLUCCI *et al.*, 2007; ISERI, *et al.*, 2008, MACEDO *et al.*, 2005).

Dessa forma, as lesões que atingem a pele bruscamente têm sua gravidade classificada de acordo com a profundidade e a extensão (RUSSO, 1994; SINGER;

CLARK, 1999; SMELTZER; HAIDAR, 1993). As queimaduras podem ser de primeiro grau, quando a lesão atinge apenas a epiderme e não provocam alterações na hemodinâmica; de segundo grau, lesões da epiderme e parte da derme, podendo ser de segundo grau superficial (atinge epiderme e, superficialmente, a derme, restando ainda os pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas) ou de segundo grau profunda (acomete a porção mais profunda da derme, restando geralmente apenas os pêlos) e, por fim, a de terceiro grau, que acomete todas as camadas da pele, podendo atingir também outros tecidos subcutâneos (músculos e ossos) e as terminações nervosas (ALEMDAROĞLU *et al.*, 2006; ZANASI *et al.*, 2007).

A infecção é uma das principais causas de morbidade em pacientes queimados pois impede a cicatrização da ferida por danificar os tecidos e promover o aumento excessivo da inflamação. Por isso, prevenir infecções deve ser um dos cuidados mais importantes a se ter com esses pacientes (ÜLKÜR *et al.*, 2005). A disfunção severa do sistema imune, uma grande colonização cutânea, a prolongada hospitalização e procedimentos invasivos, contribuem, consideravelmente, para o desenvolvimento de um foco infeccioso e, posteriormente, sepse (MACEDO *et al.*, 2003; MACEDO; SANTOS, 2007).

Gragnani e colaboradores (2005) explicam que o tecido lesado, em especial por queimaduras, torna-se um potente meio de cultura para o crescimento de variadas bactérias devido à disponibilidade de nutrientes, ao ambiente úmido e à temperatura e, se não for realizada nenhuma conduta terapêutica, pode causar sepse e, conseqüentemente, elevar o risco de morte.

2.2 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local que envolve complexas alterações entre as células e os componentes da matriz extracelular. Tem sido um tema cada vez mais estudado e a procura de fármacos que acelerem o processo cicatricial tem sido objeto frequente de pesquisa (ARAÚJO *et al.*, 1998; MUZZARELLI, 2008). Esse processo ocorre de duas formas: cicatrização por primeira intenção, que se caracteriza com uma ferida fechada não infectada, em que há aproximação das bordas da ferida, evoluindo para a produção de uma cicatriz, ou cicatrização por segunda intenção, que é uma ferida aberta não infectada, preenchida,

inicialmente, por tecido de granulação, que contrai para formar uma cicatriz (BRASILEIRO FILHO, 2000).

O fenômeno cicatricial envolve uma série de processos que visa a recuperação de elementos estruturais celulares. Esse processo compreende basicamente a eliminação dos tecidos desvitalizados, a regeneração do tecido vascular e conjuntivo, a epitelização e a retração (BALBINO *et al.*, 2005; BLANES, 2004; CORSI, 1995; FERNANDES, 2004). Sehn e colaboradores (2009) afirmam que a cicatrização pode ser dividida em fases distintas, caracterizadas pelo tipo de célula predominante e segue uma sequência harmoniosa de eventos que ocorrem simultaneamente: inflamação, repitelização, reconstrução dérmica, contração e remodelação.

A resposta inflamatória está estreitamente ligada ao processo de reparação tecidual e atua na destruição, diluição ou encerramento do agente agressor, pondo em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, promovem a cicatrização e reconstituem o tecido danificado. Contudo, a inflamação e a reparação, quando não bem-coordenadas, são potencialmente lesivas (CLARK, 1996; NETTO *et al.*, 2007).

Quando a pele é traumatizada desencadeia-se um mecanismo de defesa natural chamado de inflamação aguda e inúmeras interações ocorrem entre as macromoléculas do sistema imune. Esses mediadores não agem apenas no local da lesão, mas também sistemicamente, por ativação da via inflamatória e do sistema imune, envolvido e modulado por citocinas induzidas logo após a lesão, por fatores de crescimento e por outras células endoteliais vasculares (DOKUMCU *et al.*, 2008).

Em determinadas circunstâncias, como um efeito em cadeia a resposta inflamatória torna-se generalizada, uma vez que o excesso de citocinas, a ativação de leucócitos e de células endoteliais levam à produção excessiva de substâncias inflamatórias, podendo levar até à morte. Os papéis do fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-G (IL-G) também são importantes na resposta inflamatória. Estas três citocinas são originárias, principalmente, da ativação dos macrófagos e são descritas como indicadores da gravidade da lesão, bem como da infecção (DOKUMCU *et al.*, 2008; SUMER *et al.*, 2008).

Após a lesão, três fases interdependentes e sobrepostas são identificadas a fim de reparar o processo cicatricial: fase inflamatória ou exsudativa, fase proliferativa ou fiblobástica, e a fase cicatricial ou de contração (KAGAWA *et al.*, 2009).

A fase inflamatória tem início imediatamente após a lesão ou trauma, em que ocorre a vasoconstrição reflexa, mantida posteriormente por substâncias vasoativas (histamina e bradicinina) seguida de uma vasodilatação, com extravasamento de plasma, eritrócitos e leucócitos para este local que apresentará manifestações clínicas de dor, rubor, calor e tumor (CORSI, 1995 ; MANDELAUBAN *et al.*, 2003).

Os neutrófilos são as primeiras células de defesa a migrarem para o local da lesão. Fazem a fagocitose, a lise do tecido desvitalizado e destroem as bactérias, atuando, então, no controle da infecção. Sua atividade é evidenciada por anticorpos presentes na ferida em virtude das alterações vasculares. Eles possuem vida curta e são gradativamente substituídos por outras células do sistema de defesa, caracterizando a fase crônica do processo (MANDELAUBAN *et al.*, 2003).

A inflamação crônica é considerada de duração prolongada (semanas ou meses) e tem como uma das principais características, a lesão tecidual continuada, com infiltração de macrófagos que continuam a fagocitose iniciada pelos neutrófilos. Os macrófagos controlam a formação do tecido de granulação, uma vez que influenciam a angiogênese e estimulam a proliferação de células mesenquimais, além da migração e proliferação dos fibroblastos (MANDELAUBAN *et al.*, 2003). Além dos macrófagos, outras células inflamatórias encontram-se presente na fase crônica do processo cicatricial tais como: linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, em resposta aos antígenos invasores (CORSI *et al.*, 1995).

A fase proliferativa se caracteriza pelo intenso aumento de fibroblastos e neoformação vasculo-capilar, que se inicia por volta do quinto ao décimo quarto dia após a lesão. Nessa fase, as células endoteliais se multiplicam, formando cordões sólidos que entremeiam os fibroblastos. Posteriormente, esses cordões se canalizam, resultando em tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco resistente (KUMAR *et al.*, 2005).

A eliminação dos tecidos desvitalizados apresenta maior importância nas lesões térmicas profundas, já que há acúmulo local de glóbulos brancos que, lentamente, vão promovendo a lise das fibras colágenas por meio da liberação de substâncias enzimáticas, fagocitando detritos celulares e produzindo espécies reativas de oxigênio, evitando a contaminação por microorganismos (DIEGELMANN; EVANS, 2004; FERNANDES, 2004; MORIMOTO *et al.*, 2005).

As células inflamatórias são responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento e citocinas que, associadas à baixa concentração de oxigênio, iniciam o processo de reparo tecidual, atraindo fibroblastos e queratinócitos de áreas adjacentes à lesão. À medida que a concentração local dos fatores de crescimento e citocinas se eleva, os processos de regeneração vascular e fibroplasia se intensificam através da angiogênese, migração e proliferação fibroblástica, formando um tecido rico em elementos vasculares e celulares, denominado tecido de granulação que, aos poucos, vai se alastrando e preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados (CARLUCCI *et al.*, 2007; McDOUGALL *et al.*, 2006; NARINE *et al.*, 2006; TENIUS *et al.*, 2007).

Na dinâmica cicatricial, a síntese de colágeno inicia-se ao terceiro dia, atinge seu pico máximo em três a seis semanas e entra na fase de remodelação, em que o colágeno tipo III é o primeiro a ser sintetizado e, à medida que ocorre maturação do tecido ele é gradativamente substituído pelo colágeno tipo I (CARNEIRO *et al.*, 2005). Nessa fase, ocorre formação do epitélio e contração da ferida em virtude da proliferação celular (HUPP, 1996; MUZZARELLI, 2008). Além da migração e proliferação de queratinócitos a partir da margem da ferida para o centro da lesão, a presença de restos de folículos pilosos, de glândulas sebáceas ou sudoríparas remanescentes contribuem para o crescimento dos núcleos epiteliais, ou seja, quanto mais abundantes os restos de anexos de pele, mais confluentes serão as ilhotas germinativas do epitélio, e mais rápida a cobertura da área lesada (DEMLING; WAY, 1993; DIELGEMANN; EVANS, 2004; DINO *et al.*, 2001; GUIRRO, 2002; ROCHA *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que, nessa fase, a proliferação de uma célula mesenquimal especializada no tecido de granulação adquire características de células musculares lisas, denominadas miofibroblastos, com grande capacidade contrátil. Elas promovem a contração central das bordas da ferida aberta, garantindo aumento da força tênsil da cicatriz. São expressas em condições patológicas como resposta a uma injúria no tecido, e à medida que se formam novas camadas de reação de granulação, as mais profundamente situadas, as mais antigas, vão perdendo sua riqueza em vasos, e os fibroblastos e feixes de colágeno passam a predominar (HUPP, 1996; MUZZARELLI, 2008).

2.3 COLÁGENO

O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados e está presente em tecidos que possuem função mecânica. A matriz

extracelular constitui a maior classe de proteínas fibrosas insolúveis nos tecidos conjuntivos. Os componentes da matriz extracelular estão organizados em um complexo esquema hierárquico, sendo composta por componentes fibrilares (colágenos fibrilares e fibras elásticas), não fibrilares (proteoglicanas e glicoproteínas não colagênicas) e as microfibrilas (colágeno tipo IV e microproteínas associadas a elastina) (FORTI *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2002; HAGA *et al.*, 2005; NIMNI *et al.*, 1987).

O maior componente da matriz é o colágeno, que existe em uma variedade de 24 tipos com características próprias (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2001). Cada tecido possui uma organização específica das fibras colágenas, podendo variar de um arranjo relativamente aleatório das fibras no tecido conjuntivo frouxo a um arranjo muito organizado e paralelo nos tecidos conjuntivos regulares densos, sendo esses componentes encontrados também em pele, ligamento e ossos (WHITING, 2001).

Segundo Junqueira e Carneiro (1999), o colágeno é classificado pela sua organização molecular como do tipo I, II e III. O tipo I é o mais abundante na matrix extracelular de tendões, sendo também encontrado na pele, ossos, ligamentos, em que forças extremas são transmitidas, predominantemente, em animais de grande porte. O tipo II é encontrado, principalmente, em cartilagens e humor vítreo, e o tipo III é mais abundante no tecido conjuntivo frouxo, na derme, nas paredes dos vasos sanguíneos e trato gastrointestinal. O colágeno ainda é classificado em tipo IV, encontrado na membrana basal (VIEIRA, 1997).

O processo de formação do colágeno se dá no retículo endoplasmático dos ribossomos. Inicialmente, há uma sequência-sinal de caráter hidrofóbico que irá, posteriormente, determinar o processo de síntese do colágeno. Durante todo o processo, vários eventos acontecem, desde a hidroxilação em resíduos de lisina e prolina até as reações de glicosilação sobre os resíduos de hidroxilisina (CARVALHO, 2001).

A unidade fundamental do colágeno é a molécula de tropocolágeno, constituída em três cadeias polipeptídicas espiraladas de, aproximadamente, mil aminoácidos que correspondem a uma tripla hélice. As extremidades geralmente não estão em conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas que aumentam a estabilidade das fibras colágenas. No entanto, se ocorrerem de maneira excessiva, podem tornar o colágeno rígido e inextensível. A hidroxilação dos resíduos de prolina e de lisina constitui um evento de fundamental importância para a formação do colágeno (WHITING; ZERNICKE, 2001).

A hidroxilação da prolina é necessária para estabilidade da estrutura helicoidal da molécula. Já as hidroxilações da lisina são importantes tanto para glicosilgalactosildroxilisina, como para a formação do derivado aldeído hidroxilisina que, juntamente com a lisina, participam do processo de formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares. Essas ligações contribuem para aumentar a capacidade das fibras de colágeno de resistir às forças de tensão (CARVALHO, 2001).

As hidroxilações da prolina e da lisina são realizadas por duas enzimas, a prolil-hidroxilase e a lisilhidroxilase. A atividade de ambas depende da presença de oxigênio, α -cetoglutamato e de cofatores, como ácido ascórbico e íon ferroso. Uma dieta deficiente em ácido ascórbico resulta em fragilidade vascular, causando hemorragias freqüentes e enfraquecimento na inserção dos dentes, devido à diminuição da quantidade de ligações cruzadas intra e intermoleculares (CARVALHO, 2001).

O colágeno tem sido usado para diversas aplicações no campo biomédico, o que pode ser atribuído a sua alta resistência à tensão, propriedades hemostáticas, não citotóxicas, biodegradabilidade controlada, baixa antigenicidade e características não inflamatórias (FRIESS, 1998). Além disso, é quimicamente atrativo por vários tipos de células. Seu papel na cicatrização de feridas é bem delineado e, por ser um substrato natural para as células, é altamente essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipos normais em cultura. A matriz de colágeno oferece uma estrutura de suporte biointerativa, a qual guia e estimula apropriada formação tecidual (LEE *et al.*, 2001).

Além de desempenhar importante papel na estrutura dos tecidos o colágeno é capaz de orientar a sua formação e desenvolvimento, no entanto algumas desvantagens estão relacionadas à sua fraca força mecânica. Estas desvantagens vêm sendo minimizadas pela integração de plastificantes, como o propilenoglicol, por exemplo, nos filmes bioativos, melhorando sua flexibilidade e diminuindo a incidência de calcificação *in vivo* e a incorporação de substâncias antimicrobianas (FRIESS, 1998; LOSS *et al.*, 2000; NICOLSI; MORAES, 2005). Segundo Helary e colaboradores (2006) matrizes de colágeno estimulam a proliferação de miofibroblastos, sendo este um dos fatores primordiais para o reparo tecidual.

Células primordiais dentro do processo de reparo tecidual como os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, quando cultivadas em matrizes de colágeno xenogênicas, não apresentaram alterações morfológicas, imunológicas e biomecânicas (ELLIOTT *et al.*, 2003; RUSZCZAK, 2003).

Diversos biomateriais estão sendo utilizados no processo de reparo tecidual, os quais podem ser processados em inúmeras formas como: folhas, esponjas, dispersões, géis, filmes, soluções injetáveis, sendo cada tipo adequado de acordo com suas propriedades e características (AOYAGI, *et al.*, 2007). Os filmes bioativos (Figura 1) que são absorvidos e degradados possuem habilidade de servir de suporte para o crescimento de novos vasos sanguíneos, e possibilitam a nutrição das células que preenchem o tecido afetado e o acesso das células de defesa ao local, ou seja, permitem adesão, migração e proliferação celular (GIRARDI, 2005). Além disso, o colágeno exógeno funciona como um substrato para hemostasia e a quimiotaxia para elementos celulares envolvidos na cicatrização como os granulócitos, macrófagos e fibroblastos, promovendo a maturação da ferida por fornecerem um suporte para uma transição mais rápida à produção do colágeno maduro e seu alinhamento.

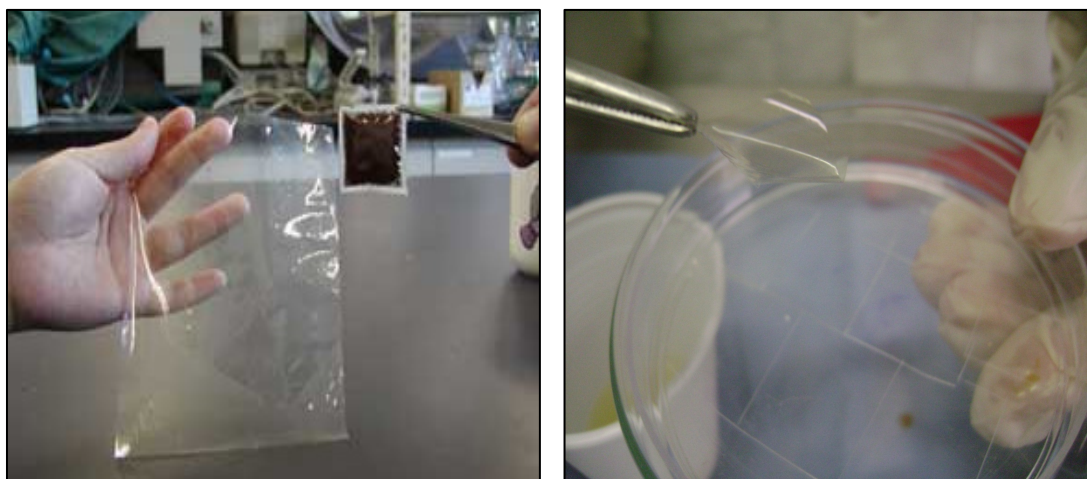


Figura 1. Filmes bioativos de colágeno

2.4 ÁCIDO ÚSNICO

Os líquens são estruturas resultantes da associação entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte) (AHMADJIAN, 1993; APTROOT; SIPMAN, 1997). Eles têm sido usados há séculos na medicina tradicional para fins terapêuticos (COCCHIETTO *et al.*, 2002). Taxonomicamente, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, os líquens são tratados dentro do Reino Fungi, uma vez que, praticamente, 95% dos líquens são constituídos pelo micobionte (HENSSEN; JAHNS, 1974; LEGAZ *et al.*, 2006).

Segundo Honda (1998), calcula-se que existam 13.500 espécies (aproximadamente 600 gêneros) de fungos liquenizados, o que corresponde a 20% dos fungos conhecidos. Os

líquens são encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas, porém são relativamente raros em altitudes acima de 5.000 m e em matas excessivamente escuras. Podem também ser encontrados em desertos ou em regiões polares. Portanto, a presença de líquens nos mais variados habitats e micro-habitats depende da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento. Dessa forma, cada região pode apresentar uma comunidade liquênica com componentes específicos próprios em resposta às condições ambientais.

O metabolismo primário nos líquens consiste na produção específica de um único carboidrato pela alga, a partir da fotossíntese, cuja transferência ao micobionte é rápida, e em quantidade substancial para transformação e acúmulo. Os produtos do metabolismo primário são processados e, a partir do metabolismo secundário, são produzidas as substâncias liquênicas, as quais são quase que na totalidade fenólicas. Dentre elas, pode-se destacar os ácidos alifáticos, depsídeos, depsidonas, benzil ésteres, antraquinonas, terpenóides e derivados do ácido pulvínico, como sendo as principais classes de compostos advindos dos líquens (MAKOTO, *et al.*, 1979; SILVA, 2006).

A produção de metabólitos secundários, denominados substâncias liquênicas ou ácidos liquênicos, vem sendo fonte de diversos trabalhos publicados na literatura (LIRA *et al.*, 2009; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008). A pesquisa sobre estas substâncias começou com os alemães Hesse (1898), Zopf (1905) e Fischer (1913), mas recebeu maior atenção dos japoneses Asahina (1954) e Shibata (1957), que desenvolveram métodos mais simplificados e específicos de extração destes metabólitos (HONDA, 1998). Mais tarde, Culberson (1972), bem como Legaz (1983), desenvolveram técnicas cromatográficas para separação e identificação de substâncias liquênicas (GALLOWAY, 1996).

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione; C₁₈H₁₆O₇] (Figura 5) é um composto derivado do metabolismo liquênico e desempenha importante papel biológico, conferindo aos líquens proteção contra microorganismos invasores e raios UV. É particularmente abundante em gêneros como o *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* e *Evernia* e apresenta duas formas enantioméricas: (+)-ácido úsnico e (-)-ácido úsnico (BAZIN *et al.*, 2008; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1998; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008).

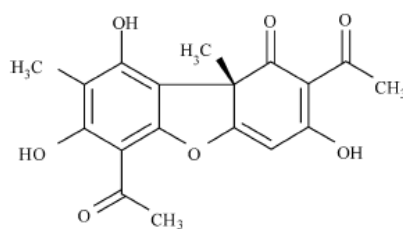


Figura 2. Estrutura molecular plana do ácido úsnico
(INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1998)

Vários desses ácidos liquênicos têm sido estudados do ponto de vista farmacológico (MELO *et al.*, 2008; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008). Sabe-se, atualmente, que o ácido úsnico atua como um agente antitumoral potente, além de apresentar atividade antibiótica, antiprotozoal, antihistamínica e antiviral, sendo usado em cremes antissépticos encontrados, com frequência, no comércio europeu como "Usno" e "Evosin" (COCCHIETTO *et al.*, 2002, HÜNECK; YOSHIMURA, 1996; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

No que diz respeito à atividade antiproliferativa do ácido úsnico, Bazin e colaboradores (2008) mostraram que, tanto a forma (-) quanto a (+) do ácido, apresentam *in vitro* moderada a forte citotoxicidade contra células cancerígenas em humanos, além de induzir apoptose das células de leucemia. Esses resultados são semelhantes ao encontrado por Takai *et al.* (1979), em seu estudo sobre derivados do ácido úsnico, como potencial agente antineoplásico. Cardarelli *et al.* (1997) avaliaram a ação antiproliferativa do (+)-ácido úsnico frente às linhagens de leucemia humana (k-562) comprovando sua eficácia.

A literatura atual apresenta diversos relatos da atividade antibiótica do ácido úsnico (COCCHIETTO *et al.*, 2002; SAENZ *et al.*, 2006; WECKESSER *et al.*, 2007). Uma avaliação da atividade antimicrobiana realizada por Ingólfssdóttir *et al.* (1998), com cinco compostos diferentes oriundos de líquens, mostrou que o ácido úsnico apresentou atividade contra o *Mycobacterium aurum*. Ele também apresentou atividade contra *Streptococcus mutans*, isolado de lesões dentárias, diminuindo o número de unidades formadoras de colônias e agindo seletivamente no crescimento dos microorganismos em voluntários que usaram o creme dental contendo o ácido (GRASSO *et al.*, 1989).

Carvalho e colaboradores (2005) estudaram a eficácia do ácido úsnico extraído da *Cladonia substellata* sobre *Trypanosoma cruzi* em testes *in vitro* e verificaram que o ácido mostrou atividade frente às formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas a partir

dos danos causados à mitocôndria e cinetoplasto. A atividade antiinflamatória do ácido úsnico foi demonstrada por Vijayakumar e colaboradores (2000) em um estudo de edema de pata em ratos. Odabasoglu e colaboradores (2006) mostraram que o ácido úsnico apresentou atividade como protetor gástrico no modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina. Os efeitos citopáticos dos herpes vírus simples tipo I foram inibidos *in vitro* quando células de rins de macaco infectadas foram tratadas com (+) ácido úsnico (PERRY *et al.*, 1999).

Como mostrado anteriormente o ácido úsnico apresenta propriedades biológicas promissoras para o tratamento de feridas, como atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Contudo, essas atividades terapêuticas tornam-se limitadas, pois o metabólico liquênico possui características físico-químicas desfavováveis, como baixa solubilidade em água, sendo imprescindível o desenvolvimento de um sistema de liberação capaz de viabilizar a administração do ácido úsnico em uma formulação que melhore sua solubilidade, bem como, otimize a dose terapêutica.

2.5 LIPOSSOMAS

O benefício terapêutico dos vários medicamentos administrados na forma tradicional é, algumas vezes, limitado pelas características físico-químicas do fármaco, como solubilidade, por exemplo. Através do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e sistemas de vetorização de fármacos, é possível melhorar algumas dessas propriedades, otimizando os efeitos terapêuticos e favorecendo sua utilização clínica (TORCHILIN, 2005).

Nos últimos anos, novas tecnologias farmacêuticas têm sido desenvolvidas no sentido de promover a otimização de fármacos visando, principalmente, aumentar a estabilidade, a solubilidade e reduzir efeitos colaterais, tornando a utilização terapêutica mais segura e eficiente. Além disso, sistemas de vetorização de fármacos para atuarem em sítios específicos também vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas (SANTOS; CASTANHO, 2002).

O primeiro modelo de um sistema de direcionamento de transporte de fármacos foi proposto no século XX por Paul Ehrlich, no qual o fármaco era ligado ao transportador e exibía atividade farmacológica apenas no tecido alvo (mecanismo de especificidade). Esse fato possibilitou a redução dos efeitos indesejáveis em outros tecidos, e reduziu a dose

administrada em virtude da maior eficiência no sítio de ação (SANTOS; CASTANHO, 2002).

Segundo Brangham (1995), as primeiras pesquisas utilizando lipossomas com essa finalidade datam há mais de 30 anos. Elas tinham, como objetivo, investigar as características físicas e físico-químicas de membranas artificiais formadas por compostos anfifílicos em soluções. Os lipossomas podem ser definidos como vesículas microscópicas de tamanhos variados, compostos de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso (caudas hidrofóbicas dos lipídios voltadas para o interior) e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana (cabeças polares direcionadas para o exterior da bicamada) mantendo contato com a fase aquosa (Figura 2) (ARAÚJO *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2007). Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos os lipossomas são altamente versáteis para utilização em pesquisa e na terapêutica (SANTOS; CASTANHO, 2002).

Os fosfolipídeos são compostos de origem natural ou sintética e representam os principais componentes das membranas celulares. Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA *et al.*, 2007).

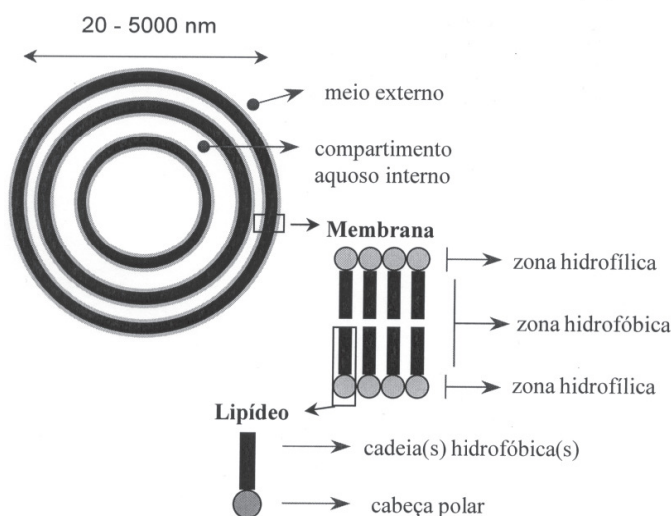


Figura 3. Características estruturais dos lipossomas
(Frézard *et al.*, 2005)

Durante muito tempo, a classificação estrutural dos vários tipos de lipossomas carecia de uniformização e coerência, o que originou alguma confusão na literatura desta área. Devido, em parte, à falta de uma correta caracterização das diversas estruturas, o tipo de lipossoma era indicado pelo seu processo de preparação (sonificação, congelação e descongelação, evaporação em fase reversa), pelo nome do investigador que caracterizou, pela primeira vez, o seu processo de preparação (“Banghamossomas”, “Huangomossomas”) ou, simplesmente, omitido. A partir do início da década de 80, foi definitivamente adotada uma nomenclatura para os lipossomas baseada no seu número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho (SANTOS; CASTANHO, 2002).

Segundo Araújo e colaboradores (2003), a natureza da interação entre os lipídios, a composição química, o tamanho, o número de bicamadas e o método de preparação caracterizam os lipossomas.

A classificação dos lipossomas de acordo com a composição química pode ser agrupada de duas formas: lipossomas de primeira geração (convencionais) e o de segunda geração (sensíveis ao pH, catiônicos, furtivos e direcionados). Os convencionais caracterizam-se pela rápida captura dos macrófagos do sistema de defesa mononuclear fagocitário. Os lipossomas sensíveis ao pH são utilizados para liberar o fármaco no citoplasma ou no tecido intersticial de células tumorais, visto que o pH desse meio é reduzido, comparado com o pH fisiológico normal; os lipossomas catiônicos são apropriados para carrear macromoléculas de carga negativa; os furtivos têm capacidade de fugir da ação fagocítica dos elementos sanguíneos; e os direcionados agem em células específicas (BATISTA *et al.*, 2007; XIONG *et al.*, 2005).

Outra classificação é quanto ao número de bicamadas, podendo formar vesículas multi (MLV) ou unilamelares (LUV), que influenciam diretamente na absorção, distribuição e eliminação dos fármacos encapsulados (Figuras 3 e 4). Eles podem formar vesículas unilamelares (pequenas ou grandes), sendo caracterizadas como lipossomas unilamelares pequenos - SUV (*small unilamellar vesicles*) menores que 100 nm e lipossomas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*) maiores que 100 nm, ressaltando ainda as vesículas multilamelares – MLV (*multilamellar vesicles*) maiores que 1 µm. O tamanho do lipossoma influencia na biodistribuição, pois lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto que lipossomas maiores (com cerca de 200 nm ou mais) tendem a permanecer no local de administração (BATISTA *et al.*, 2007).

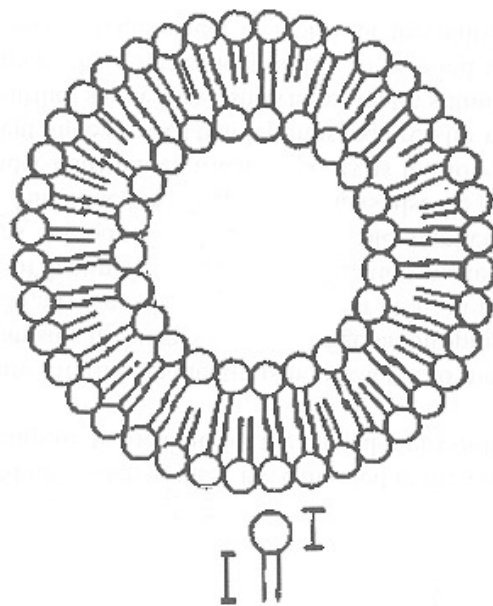


Figura 4. Representação esquemática da organização de um Lipossoma Unilamelar (LUV)
(ARAÚJO *et al.*, 2003).

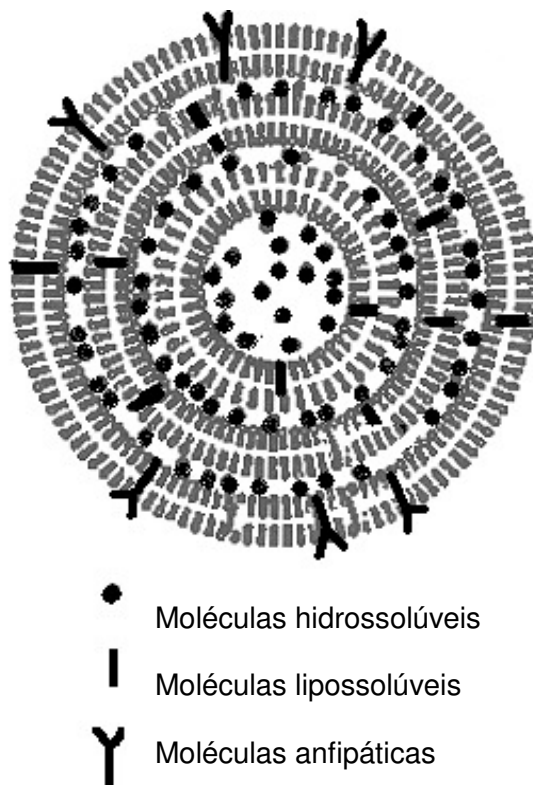


Figura 5. Direcionamento da encapsulação de drogas em um Lipossoma Multilamelar (MLV): Moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas
(ARAÚJO *et al.*, 2003)

Os métodos de preparação dos lipossomas variam de acordo com o objetivo da sua utilização, uma vez que cada método forma um tamanho específico de lipossoma. Utilizando como método de preparação o ultra-som, a extrusão, a microfluidificação e a injeção de solução etanólica de lipídios, obtêm-se vesículas unilamelares pequenas (menores 100 nm), no entanto, utilizando a hidratação do filme lipídico, a desidratação-reidratação, o congelamento-descongelamento e a evaporação em fase-reversa, obtêm-se vesículas multilamentares (maiores 1 µm) (CHRAL *et al.*, 2002; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008).

Os lipossomas são amplamente utilizados como veículo em fórmulas dermocosméticas, apresentando, como vantagem, o transporte de substâncias hidro e lipossolúveis, a alta afinidade pelas membranas biológicas, a biocompatibilidade e biodegradação. Eles têm sido empregados na prevenção da queda de cabelos, promoção do crescimento capilar, desaceleração do processo de envelhecimento da pele, clareamento da pigmentação cutânea e prevenção e tratamento da lipodistrofia ginóide. (CHORILLI *et al.*, 2004).

A aplicação dos lipossomas foi relatada por Mourão e colaboradores (2005) que avaliaram a eficiência do praziquantel (PZQ), fármaco de primeira escolha no tratamento da esquistossomose, encapsulado em lipossomas no tratamento de camundongos BalbC infectados com *S. mansoni*. Os resultados mostraram que os lipossomas contendo PZQ foram mais eficazes na redução de vermes quando comparada com o fármaco livre. Melo e colaboradores (2003) comprovaram a habilidade dos lipossomas em aumentar a eficácia do tartarato de antimônio e potássio (tártaro emético) contra infecção com *S. mansoni*.

Ribeiro-Costa e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* do ácido úsnico livre e em microesferas contra o Sarcoma-180 e o carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2). Eles observaram que a inibição do tumor ocorreu com maior eficácia quando o ácido úsnico foi encapsulado. Lira e colaboradores (2009) observaram que o uso do complexo ácido úsnico/lipossoma pode ser uma estratégia alternativa para superar a baixa solubilidade do ácido em água e manter a sua atividade antimicrobiana.

CAPÍTULO III

Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films

Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films

Paula Santos Nunes¹, Marília Santos Bezerra¹, L.P. Costa², Juliana Cordeiro Cardoso³,
R.L.C. Albuquerque-Júnior³, M.O. Rodrigues², Gabriela Borin Barin², Francilene Amaral
da Silva¹, A.A.S. Araújo^{1*}

¹Departamento de Fisiologia – Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

²Departamento de Química - Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

³Instituto de Tecnologia e Pesquisa-ITP, Av. Murilo Dantas, 300, CEP 49032-490, Sergipe-Brasil.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the physical-chemical properties of collagen (CL) and usnic acid/collagen-based (UAC) films, using differential thermal analysis (DTA), thermogravimetry (TG/DTG), infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). Both films were prepared by casting process using polyethylene glycol 1500 (PEG 1500) as plasticizer. In the spectrum of UAC, similar bands of the usnic acid are observed, indicating that the polymerization (film formation) did not affect the stability of the drug. Distinctly, DTA curve of UAC did not show an endothermic peak at 201°C, indicative that the drug was incorporated into the polymeric system. These results were corroborated by the scanning electron microscopy (SEM). The TG/DTG curves of UAC presented a different thermal decomposition profile compared to the individual compounds

and CL. These findings suggest the occurrence of molecular dispersion or solubilization of the drug in the collagen film.

Keywords: Casting, biodegradable films, usnic acid, collagen, thermal characterization.

*Corresponding author

Departamento de Fisiologia – Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, 49000-100, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. E-mail: *adriasa2001@yahoo.com.br*, Tel./ Fax: 55-11-21056640

Introduction

Natural polymers have been increasingly studied for controlled-release applications due to their biocompatibility and biodegradability. Materials such as hyaluronic acid [1], fibrin [2], fibrinogen [3], and collagen [4] have been tested as carries for drug delivery systems [5]. Collagen is a potentially useful biomaterial since it is a major constituent of connective tissue. The main applications of collagen as drug delivery systems are collagen-shields in ophthalmology, sponges for burns/wounds, and liposomes-collagen associations for transdermal and sustained drug delivery [6-8].

Formulations such as ointments and wound dressings have been developed for the treatment of severe skin wounds or ulcers including bedsores and burn wounds [9-10]. These studies generally involved the development and/or the physical characterization of the materials [11-12]. In this regard, a better understanding of the physical properties of films is of great importance for subsequent applications of these materials. Physical properties are strongly affected by the state of the material: for example, in the glass state the material will be hard and rigid, but in the rubbery state it will be flexible and extendible. Besides, some studies have been carried out in order to incorporate bioactive compounds into collagen-based films, so that such films could work as drug controlled release within target tissues [13-14].

As previously reported, usnic acid is one of the most common and abundant lichen metabolites with interesting antibiotic [15], anti-inflammatory [16], antiprotozoal [17], antitumoral [18], larvicidal [19], antipyretic and analgesic [20] activities. The aim of the present study was to prepare a collagen-based film constituted of usnic acid-loaded liposomes and to evaluate its physico-chemical properties using differential thermal analysis (DTA), thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) and infrared

spectroscopy (FTIR). Films were also characterized regarding microstructure using scanning electron microscopy (SEM).

Experimental

Materials

Usnic acid, 2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzenofurandione, was isolated from *Cladonia substellata* Vainio collected in March, 2006, in the Itabaiana county, Sergipe-SE, Brazil. Lichen sample was identified by M.P. Marcelli (Botanical Institute of São Paulo-SP, Brazil), where a voucher specimen was deposited (Deposit #SP393249). All chemicals were of reagent grade. The collagen was prepared according to the method proposed by Cardoso, 2005 [21].

Extraction and purification of usnic acid

Air-dried lichen (300 g) was extracted with diethyl ether in a Soxhlet apparatus and the precipitate formed on cooling collected, recrystallised from ethanol, yielding 330 mg usnic acid [22].

Films preparation

Collagen-based (CL) films were prepared by casting method using collagen dispersion (2%) in 0.5 M acetic acid with 20% of plasticizer (polyethylene glycol-PEG 1500 Isifar Lot. 021423) in relation to the polymer dry weight. This dispersion was casted onto a clean rimmed perspex plate and allowed to dry at room temperature in order to obtain the films.

Usnic acid-loaded liposomes were prepared by conventional rotary evaporation method. Briefly, phosphatidylcholine (Lipoid GMBH 75% Lot 776095-1) was dissolved in

an appropriate volume of chloroform according to the ratio phosphatidilcoline/usnic acid 18:1 w/w. The mixture was dried to a thin lipid film using a rotary evaporator. This film was kept in desiccator for at least 24 h until the organic solvent was totally eliminated. Then, the lipid film was hydrated and dispersed in water, under vigorous magnetic agitation, promoting the formation of the multilamellar vesicles (MLV). Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared by probe sonication of the MLV dispersion. After this procedure, the usnic acid-loaded liposomes were mixed with collagen dispersion (2% in 0.5 M acetic acid with 20% of collagen:PEG1500 w:w) in the ratio 1:4 (v/v) in order to obtain the usnic acid/collagen-based films (UAC).

Particle size distribution and ζ -potential measurement

The particle size and surface charge potential of usnic acid-loaded liposomes were determined using Zetasizer® (Nano-ZS90, Malvern Instruments, United Kingdom), at 25°C. Samples of liposomes were diluted in water (1:10) for an effective particle count. The distribution and the mean diameter of particles, as well as their standard deviation and polydispersity index (PDI) were assessed. The surface charge of usnic acid-loaded liposomes was determined by measurement of the zeta potential (ζ) by electrophoresis after dilution of liposomes in water, using the same apparatus.

Thermal analysis

TG/DTA curves were obtained in a TA instruments model SDT 2960 Simultaneous using platinum crucibles with about 5 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere (100 mL.min⁻¹) and heating rate of 10°C.min⁻¹ in the temperature range from 25 to 900°C. The DTA cell was calibrated with indium (m.p. 156.6°C; $\Delta H_{\text{fus.}} = 28.54 \text{ J.g}^{-1}$) and zinc (m.p. 419.6°C). TG/DTG was calibrated using a CaC₂O₄.H₂O standard in conformity to ASTM.

Infrared spectroscopy

The infrared absorption data was obtained in the range 4000 - 400 cm^{-1} in KBr pellets using a FTIR-Bomen spectrophotometer model MB-120 at room temperature.

Scanning electron microscopy

The dried films were mounted on aluminum stubs, coated with a thin layer of gold and visualized with a JEOL Model JSM-6360-LV scanning electron microscope, at an accelerated voltage of 20 kV.

Results and discussion

Collagen and UA-loaded liposome showed to be a very interesting material for the development of films. The mean of the vesicles was 70 nm and the surface charge 11.8 ± 7.19 mV. The process developed here, produced films slightly yellowish with moderate opacity and good flexibility. The presence of phosphatidylcholine and collagen of its formulation provide it with better properties if compared with other films.

DTA curve of usnic acid showed an endothermic event between 192-230°C with a well-defined peak at 201°C corresponding to the melting point of the drug (Fig. 1a). Furthermore, the DTA curve showed an exothermic event caused by thermal decomposition of the examined sample. This second event had a peak at 273.3°C. TG curves showed an event of fast mass loss occurring in the range of 230 to 350°C (Fig. 2a), as well as further slow mass loss in the range of 350 to 900°C, which is usually attributed to the elimination of carbonaceous material.

As seen in Fig. 1b, the CL sample showed a major endothermic transition in the DTA curve between 30 and 80°C corresponding to its dehydration (unbound water). However, this event was also seen in the TG curve (Fig. 2b) where a humidity loss of

about 10.24% was detected. This film showed a thermal stability region between 80 and 175°C, and an endothermic event indicated by a broad peak at 303°C, corresponding to the thermal decomposition of this material. This result was confirmed by TG curve.

TG/DTG curve of UAC showed four weight loss events at the following temperature ranges and weight loss percentages: 25–96°C, 150–381°C, 381–516°C and 516–880°C (Fig. 2c). The first event is related to the superficial water releasing. The second and third events correspond to the thermal decomposition process followed by carbonization. The last event is related to the carbon material elimination. DTA curve showed an endothermic peak between 147–371°C, corresponding to the first step of thermal degradation of usnic acid-collagen (Fig. 1c). In addition, the melting peak of usnic acid at 201°C was not observed, indicating absence of free usnic acid. It was noted that UAC has a different thermal decomposition profile compared to the CL indicating that usnic acid was effectively loaded into the membrane.

INSERT FIGURE 1 AND 2

The FTIR spectra of free usnic acid, CL and UAC are shown in Figure 3(a-c), respectively. The usnic acid spectrum (Fig. 3a) showed a 1690 cm⁻¹ band corresponding to a conjugated cyclic ketone group. Weak bands at 1715 and 1678 cm⁻¹ in the infrared spectrum are assigned to the $\nu(\text{C=O})$ non-conjugated cyclic ketone and the non-aromatic methyl ketone, respectively. Conjugation, electron donating ring substituents and possible intra-molecular hydrogen-bonding, all contribute to the lower wavenumber position of the aromatic methyl ketone to 1628 cm⁻¹. It is also possible to assign the antisymmetric and symmetric $\nu(\text{COC})$ aryl alkyl ether modes to bands at approximately 1283 and 1072 cm⁻¹, respectively. In the spectrum of UAC (Fig. 3c), similar bands of the usnic acid are observed, indicating that the film formation did not affect the stability of the drug.

INSERT FIGURE 3

The microstructures of CL and UAC analyzed by SEM are presented in Fig. 4. Both films presented a dense structure, typical of protein films, as has been previously reported for films prepared with amaranth proteins [23]. The microstructure of the cross-sectional area of the films revealed that CL structure was dense, with a fibrous formation parallel arranged in relation to the film surface. Notwithstanding, some porous formation was also detected (Fig. 4 and 5), although these cavities seem to be closed porous. The surface and cross-sections of UAC film shows non-homogeneities when to compare with CL.

INSERT FIGURE 4 AND 5

Conclusion

According to the data presented in this study, it was possible to assert that the usnic acid molecules were encapsulated by liposomes and incorporated into the polymeric system as demonstrated in the analysis of the DTA and TG/DTG curves. Furthermore, similar bands of the usnic acid were observed in the IR spectrum of UAC, indicating the presence of the drug in the system. Nevertheless, further studies are required in order to evaluate whether these *in vitro* models can be used to characterize usnic acid release from collagen-based films.

Acknowledgments

We would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe/FAPITEC-SE for the financial support.

References

1. Sung KC, Topp EM. Effect of drug hydrophilicity and membrane hydration on diffusion in hyaluronic acid ester membranes. *J Control Release* 1995; 37: 95-104.
2. Lee KY, Yuk SH. Polymeric protein delivery systems. *Prog Polym Sci* 2007; 32: 669-97.
3. Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Delivery Rev* 2008; 60: 229-42.
4. Wallacea DG, Rosenblatt J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Delivery Rev* 2003; 55: 1631-49.
5. Stamatialis DF, Papenburg BJ, Gironés M, Saiful S, Bettahalli SNM, Schmitmeier S, Wessling M. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *J Membrane Sci* 2008; 308: 1-34
6. Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm and Biopharm* 1998; 45: 113-36.
7. Wachol-Drewek Z, Pfeiffer M, Scholl E. Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials* 1996; 17: 1733-8.
8. Vasantha V, Sehgal PK, Rao KP. Collagen ophthalmic inserts for pilocarpine drug delivery system. *Int J Pharm* 1988; 47(1-3): 95-102.
9. Aoyagi S, Onishi H, Machida Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *Int J Pharm* 2007; 330: 138-45.
10. Ulkur E, Oncul O, Karagoz H, Yeniz E, Celikoz B. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat™), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and fusidic acid 2%

(Fucidin) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant *Staphylococci*-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. *Burns* 2005; 31: 874-7.

11. Lira AM, Araújo AAS, Basílio IDJ, Santos BLL, Santana DP, Macedo RO. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations. *Therm Acta* 2007; 457: 1-6.

12. Brito MB, Barin GB, Araújo AAS, Sousa DP, Cavalcanti SCH, Lira AAM, Nunes RS. The action modes of *Lippia sidoides* (Cham) essential oil as penetration enhancers on snake skin. *J Therm Anal Cal* 2009; 97 (1): 323-7.

13. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical application of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221: 21-2.

14. Thacharodi D, Rao KP. Collagen membrane controlled transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Int J Pharm* 1996; 131: 97-9.

15. Ingólfssdóttir K, Chung GAC, Skúlason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6: 141-4.

16. Vijayakumara CS, Viswanathana S, Kannappa UM, Reddya S, Parvathavarthinia AB, Sukumarb E. Anti- inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 2000; 71: 564-6.

17. Fournet A, Ferreira ME, Arias AR, Ortiz ST, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME. Activity of Compounds Isolated From Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis Comp. *Biochem Physiol* 1997; 116: 51-4.

18. Santos NPS, Nascimento SC, Wanderley MSO, Pontes-Filho NT, Silva JF, Castro CMMB, Pereira EC, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 64: 154-60.

19. Bomfim RR, Araújo AAS, Cuadros-Orellana S, Melo MGD, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SCH. Larvicidal Activity of *Cladonia substellata* Extract and Usnic Acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. Lat Am J Pharm 2009; 28 (4): 580-4.
20. Ingolfssdottir K. Usnic acid. Phytochemistry 2002; 61: 729-36.
21. Ho HO, Lin LH, Sheu MT. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier. J Contr Rel 1997; 44, 103-12.
22. Kupchan SM, Kopperman HI. L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. Experientia 1975; 31: 625-6.
23. Tapia-Blácido D, Sobral PJ, Menegalli FC. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). J Food Eng 2005; 67: 215-23.

FIGURE CAPTION

Fig. 1. DTA curves of a) usnic acid, b) collagen film and c) usnic acid-collagen film obtained in heating rate of $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ under dynamic nitrogen atmosphere ($50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$).

Fig. 2. TG curves of a) usnic acid, b) collagen film and c) usnic acid-collagen film obtained in heating rate of $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ under dynamic nitrogen atmosphere ($50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$).

Fig. 3. IR spectra of a) usnic acid, b) collagen film and c) usnic acid-collagen film.

Fig. 4. SEM photographs of surface of (a) collagen membrane and (b) usnic acid-collagen.

Fig. 5. SEM micrographs of cross-sections of a) collagen membrane and (b) and usnic acid-collagen films.

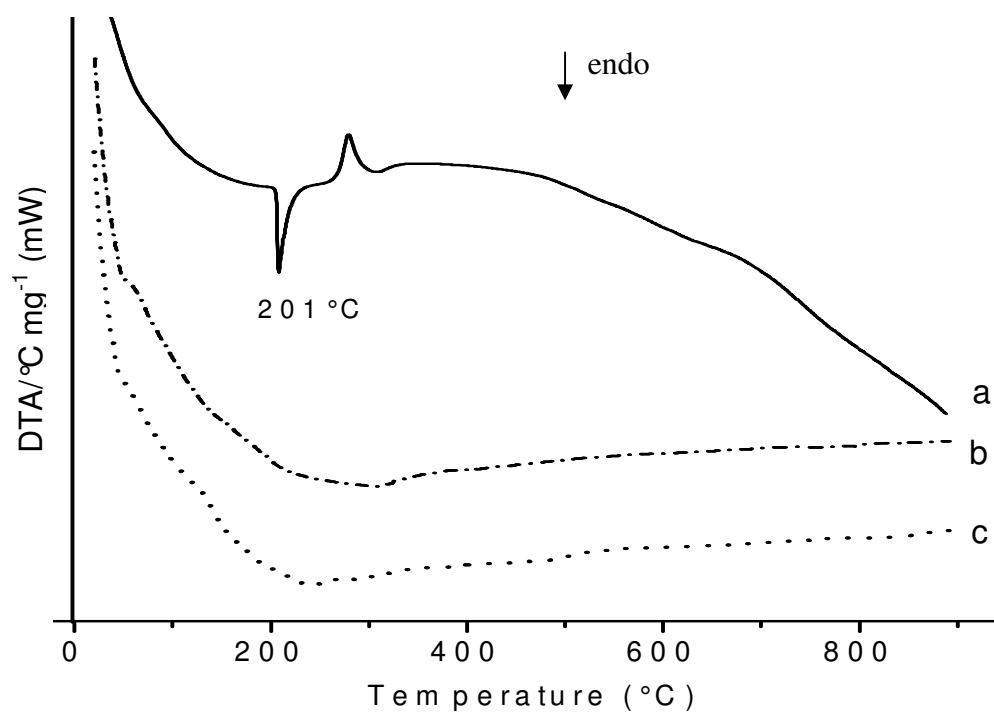


Fig. 1

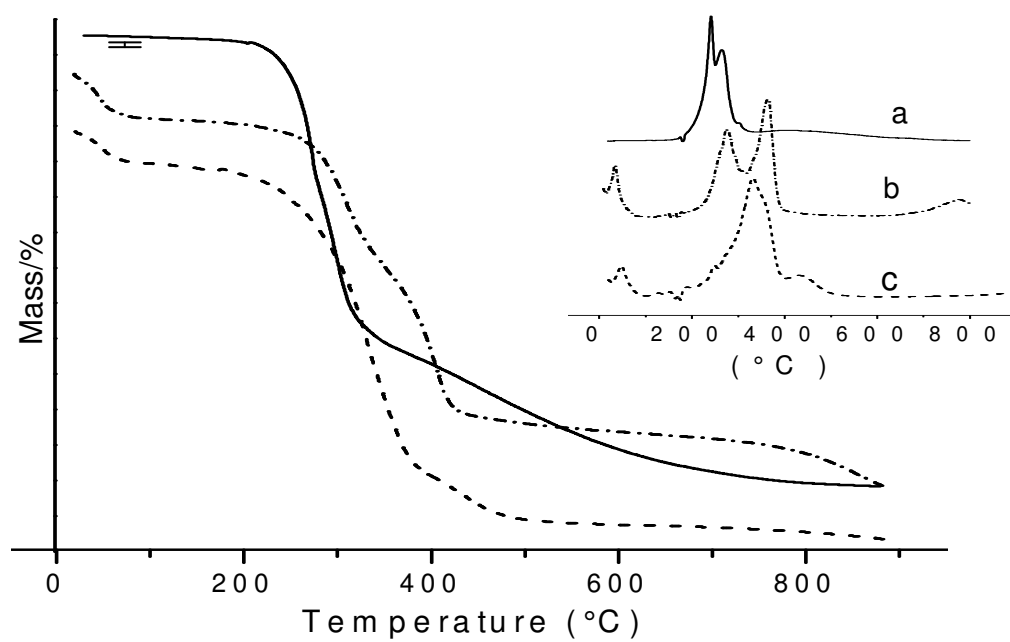


Fig. 2

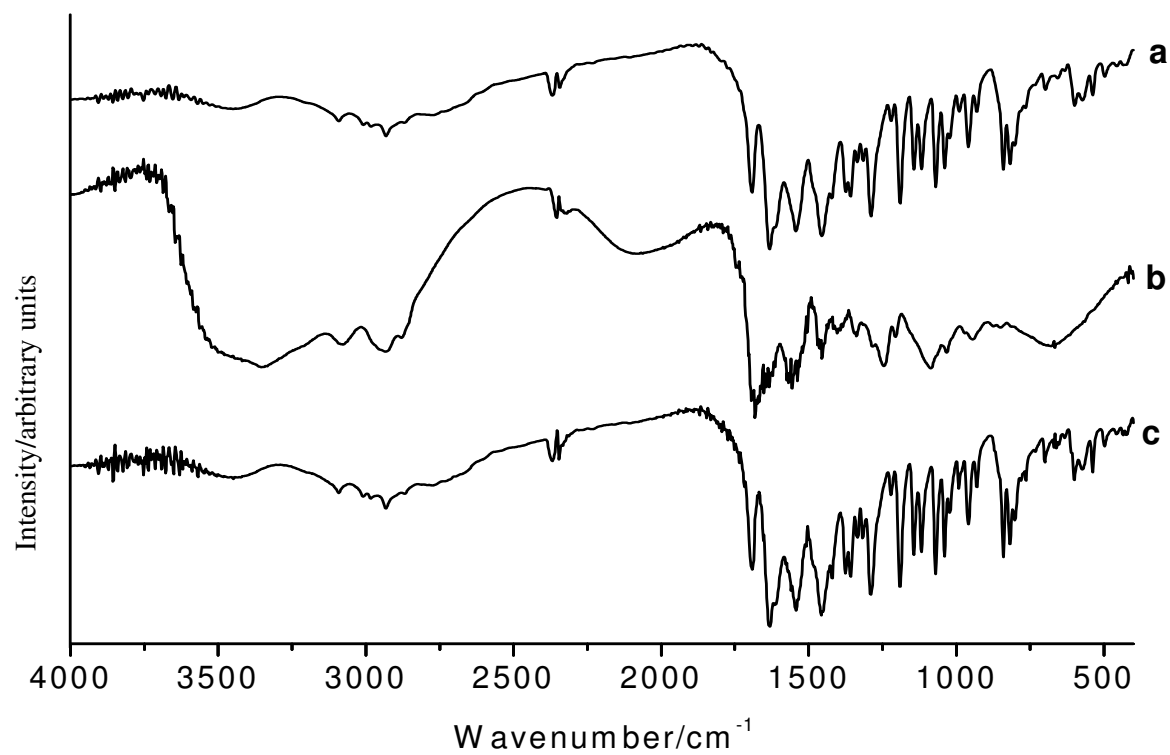


Fig. 3

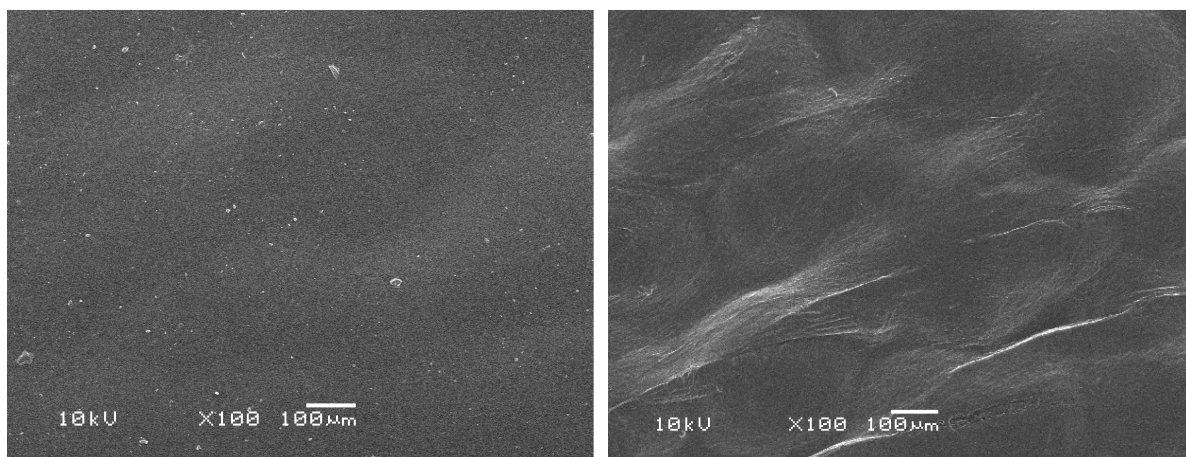


Fig. 4

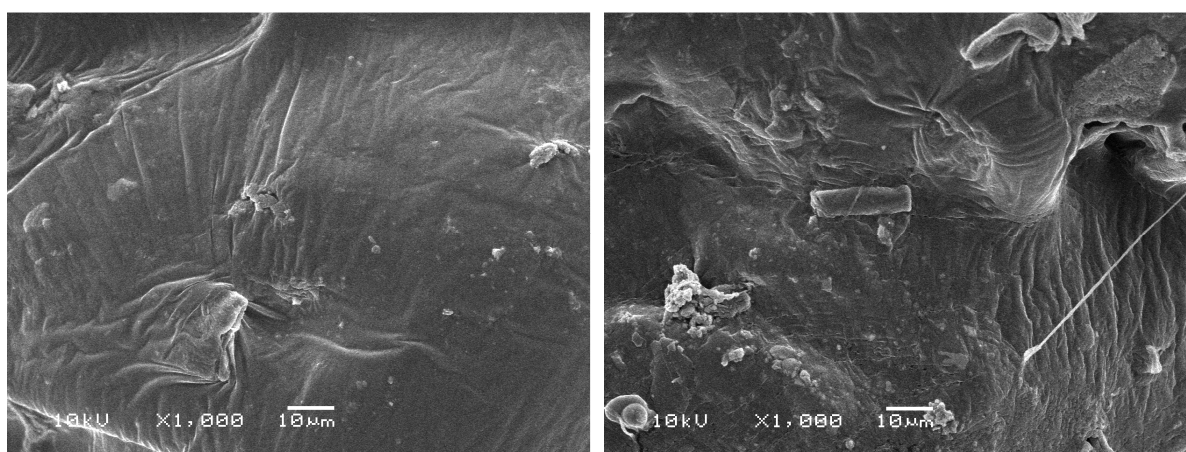


Fig. 5

CAPÍTULO IV

**Desenvolvimento de um método analítico por
espectrofotometria UV para a quantificação de ácido
úsnico em filmes bioativos de colágeno**

Desenvolvimento de um método analítico por espectrofotometria UV para a quantificação de ácido úsnico em filmes bioativos de colágeno

Paula Santos Nunes¹, Douglas Costa de Jesus¹, Francilene Amaral Silva¹, Adriano Antunes de Souza Araújo¹

¹Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, São Cristóvão-SE, Brasil, CEP 49000-100

Ácido úsnico (AU) é um metabólito secundário proveniente de líquens que tem demonstrado importantes atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, antiviral, antiproliferativo e antiinflamatória. O Colágeno é um dos biomateriais mais utilizados tendo várias aplicações como sistema de liberação de fármacos. O objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método quantitativo por espectrofotometria no ultravioleta para quantificação de AU em filmes bioativos de colágeno. Os parâmetros de validação foram determinados de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 899 de 29/05/2003, ANVISA). A especificidade revelou que os excipientes na formulação não interferem com as análises. A faixa de linearidade foi de 8 a 10 µg/mL e apresentou um coeficiente de correlação de 0,9994. O método apresentou excelente repetibilidade (C.V. < 1,0%). A exatidão apresentou média percentual de recuperação de 100,4%. O método mostrou-se robusto para a variação de temperatura e solvente. Os valores dos limites de detecção e quantificação foram de 0,109 e 0,364 µg/mL, respectivamente. A taxa total de recuperação do analito nos filmes apresentou valores entre 100,4 e 82,3%. Os resultados sugerem que o método é reprodutível e pode ser utilizado para quantificação de AU em formulações farmacêuticas.

Unitermos: Ácido úsnico, filmes bioativos, colágeno espectrofotometria no ultravioleta, validação.

ABSTRACT

Development of a UV-spectrophotometric analytical method for the determination of usnic acid in collagen films

The secondary lichen metabolite usnic acid (UA) has demonstrated pharmacological potential effects such as antimicrobial, antiviral, antiproliferative and anti-inflammatory activities. Collagen is one of the most useful biomaterial with various applications as drug delivery systems. The aim of this study was to develop and validate a quantitative method UV spectrophotometric for determination of UA levels in collagen films. The validation parameters were assessed according with National Agency for Sanitary (ANVISA). The specificity revealed that the excipients in the formulation did not interfere with the analysis. The linearity in the range of 2-10 µg/mL presented a correlation coefficient of 0.9994. The method showed excellent repeatability (R.S.D. < 1,0 %). The accuracy, revealed a mean percentage recovery of 100,43 %. The method was robust for the variation of temperature and solvent. The detection and quantization limits were found 0,109 and 0,364 µg/mL. The total rate recovery of the analyte film showed values between 100.4 and 83.2%.

UNITERMS: Usnic acid/determination. Collagen films. Ultraviolet Spectrophotometry. Quantitative analysis/method's validation.

INTRODUÇÃO

O ácido úsnico é um metabólito secundário presente em algumas espécies de líquens (Ahmajiaw, 1995) (Figura 1). Esse composto apresenta diferentes propriedades biológicas com potencial terapêutico como, por exemplo: atividade antibiótica (Ingolfssdottir *et al.*, 1998), antiviral (Scirpa *et al.*, 1999), antitumoral (Kupchan *et al.*, 1975), analgésica, antipirética (Okuyama *et al.*, 1995) e antiprotozoária (Fournet *et al.*, 1997).

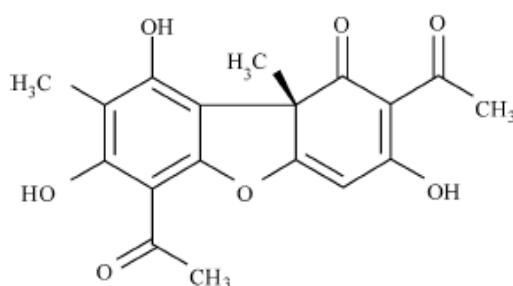


Figura 1. Estrutura molecular plana do ácido úsnico

Estudos têm demonstrado que o ácido úsnico possui um potencial antiinflamatório (Vijayakumar *et al.*, 2000) e cicatrizante (Jin *et al.*, 2005), o que estimula a busca por novos materiais para esta finalidade. Alguns biomateriais, como o colágeno, funcionam como promotores de liberação controlada de fármacos (Helary *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001). Filmes bioativos de colágeno têm sido um dos materiais mais estudados para reparar danos ou traumas químico-mecânicos, devido a sua biocompatibilidade e sua capacidade para promover a cicatrização de feridas (Bernaes *et al.*, 2004).

Neste estudo, foram obtidos filmes bioativos de colágeno contendo ácido úsnico incorporado no sistema com a finalidade de aplicação terapêutica para o reparo cicatricial de pacientes acometidos por queimadura de primeiro e segundo graus severos. Esses sistemas de liberação são concebidos para obter níveis de concentração tecidual de

fármacos de forma controlada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto (Lee *et al.*, 2004). Nesta perspectiva, uma das etapas primordiais para o desenvolvimento de um medicamento é assegurar que ele apresente características desejáveis para sua finalidade. Desta forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificar o ácido úsnico presente em filmes bioativos de colágeno, utilizando espectrofotometria no ultravioleta. O objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa do fármaco (Randau *et al.*, 2005). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Brasil, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Amostras

Para desenvolver e validar o método analítico, foi utilizado metanol (FMAIA) e clorofórmio (ISO FAR). A substância química de referência, ácido úsnico, foi adquirida na Sarsyntex (6168 F 33701).

Equipamentos

Todas as análises para o doseamento de ácido úsnico foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu, UV1800 no comprimento de onda entre 225 e 400 nm, utilizando diluição adequada da solução estoque padrão em metanol.

Biofilmes de colágeno contendo ácido úsnico incorporado em lipossomas

Os filmes bioativos foram produzidos no Laboratório de Ensaaios Farmacêuticos e Toxicidade (LEFT) da Universidade Federal de Sergipe. O método utilizado para preparação do mesmos foi descrito por Nunes *et al.* (2009) (In press). Utilizaram-se filmes obtidos com plastificante propilenoglicol, e preparados em três diferentes concentrações (3, 6 e 12 mg) de ácido úsnico. Esses filmes foram cortados em unidades de 1 cm².

Solução padrão de ácido úsnico

A solução estoque padrão foi obtida pesando 5,0 mg de ácido úsnico, que foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e solubilizado com metanol, utilizando, após isso, a sonicação. Esta solução foi aquecida em banho-maria a 40°C até completa solubilização do fármaco. A concentração final de ácido úsnico foi de 0,05 mg/mL. Diluições apropriadas da solução estoque padrão foram efetuadas com metanol para execução do estudo de validação.

Validação do Método Analítico

Os parâmetros de validação: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados segundo as normas da resolução n°899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Especificidade e Seletividade

A especificidade foi determinada para que o ácido úsnico fosse medido exatamente na presença dos demais componentes da formulação do biofilme. O ensaio de

especificidade e seletividade foi conduzido com os extratos metanólicos dos biofilmes (que continham em sua formulação colágeno, plastificante e lipídio), além do componente ativo ácido úsnico.

Linearidade

A linearidade foi estabelecida pela média de três curvas padrão autênticas, as quais foram obtidas em cinco níveis de concentrações diferentes de ácido úsnico: 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. A faixa de variação correspondente foi de 33,3 a 166,6% da concentração teste. Cada concentração foi determinada em triplicata pela curva padrão. A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

Precisão

Para o estudo de precisão foi utilizada a concentração de 6,0 µg/mL do ácido úsnico (concentração teste) determinada em soluções diferentes ($n = 9$). Os resultados obtidos foram avaliados utilizando médias, desvios padrão e coeficientes de variação.

Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito adicionado em quantidades conhecidas a partir de solução extraída do filme bioativo contendo lipídio, colágeno e plastificante (propilenoglicol) em três concentrações diferentes: 4, 6 e 8 µg/mL, correspondendo, respectivamente, a 66,6, 100 e 133,3% da concentração teste. Todas as

amostras foram preparadas em triplicata (n=9). O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foi utilizada para avaliar a exatidão definida como:

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração experimental obtida} / \text{concentração teórica}) \times 100$$

Robustez

A robustez do método proposto foi verificada pela variação de temperatura durante a análise (4 e 25°C) e pela mudança do fabricante do metanol (QEEL e FMAIA, denominado por A e B, respectivamente). A concentração de 6 µg/mL de ácido úsnico foi determinada em 12 ensaios diferentes. A avaliação da robustez foi realizada pela análise dos coeficientes de variação entre as médias obtidas, utilizando-se o teste de Student (teste bilateral, $p < 0,05$).

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (a) e quantificação (b) foram determinados matematicamente a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. O cálculo para determinar os valores correspondentes ao LD e LQ, baseou-se no desvio-padrão residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva analítica, seguindo as relações:

$$LD = (D.P/I) \times 3,3 \text{ (a)}$$

$$LQ = (D.P/I) \times 10 \text{ (b)}$$

Onde,

D.P.: desvio padrão do intercepto com o eixo Y;

I: valor da inclinação da curva analítica.

Extração e doseamento do ácido úsnico a partir dos filmes bioativos

Cada filme foi colocado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de uma solução 3:1 (clorofórmio/metanol). A partir daí, cada tubo foi submetido à agitação em vortex durante cinco minutos e, depois, submetido à sonicação durante cinco minutos para liberar o conteúdo do ácido úsnico incorporado. Em seguida foram feitas diluições adequadas para que as soluções fossem analisadas por espectrofotometria. Todas as amostras foram realizadas em triplicata para cada biofilme.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Especificidade

Na Figura 2, pode-se observar o espectro de varredura do ácido úsnico, dissolvido em metanol, na faixa compreendida entre 225-400 nm, sendo evidenciado apenas uma banda de absorção máxima em 290 nm, corroborando com relatos prévios (Huneck *et al.*, 1996). Pode-se verificar também o espectro da solução extrativa dos filmes bioativos de colágeno sem o fármaco, apresentando absorbância máxima em 231 nm. Com isso, foi confirmado que é possível quantificar especificamente o ácido úsnico incorporado no filme.

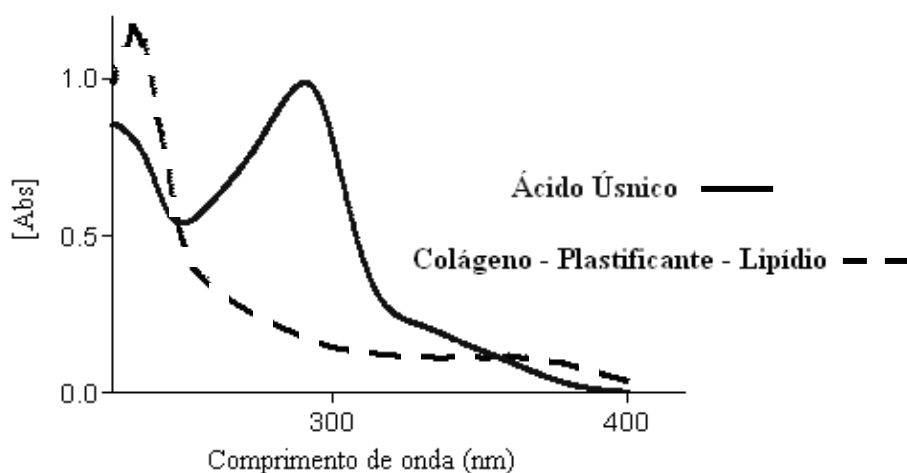


Figura 2. Espectro de varredura entre 225 e 400 nm, mostrando a especificidade do método construído separadamente com o ácido úsnico e com os outros componentes do biofilme. [Abs] = absorbância.

Linearidade

Os dados das curvas analíticas do ácido úsnico, resultantes da média de três curvas padrão (Figura 3), mostrou linearidade na faixa de 2 a 10 µg/mL. A análise de regressão linear (Tabela 1) apresentou a seguinte equação da reta (Eq. 1):

$$\text{Absorbância} = 0,08636 \times [\text{AU}] (\mu\text{g/mL}) - 0,00622 \quad (\text{Eq. 1})$$

O coeficiente de correlação foi de 0,9994, significando que 99,94% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, com os resíduos (erro) de apenas 0,06%. O teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear. Com a análise de linearidade, a regressão demonstrou-se altamente significativa, bem como não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F críticos no nível de 95% de confiança (Tabela 1).

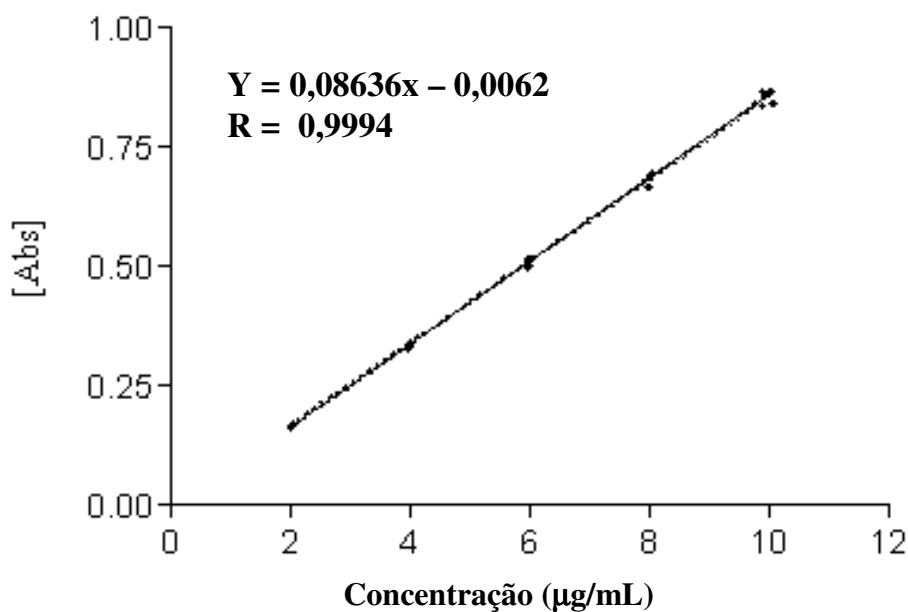


Figura 3. Curva de calibração construída com ácido úsnico (2 a 10 µg/mL) a 290 nm, em que a equação linear média obtida foi $y = 0,08636x - 0,00622$. [Abs] = Absorbância.

TABELA 1. Dados da curva analítica do ácido úsnico.

Concentração de ácido úsnico (µg/mL)	Valor médio de absorbância (±D.P.)*	Concentração calculada de ácido úsnico (±D.P.)*
2	0,168 ± 0,002	2,014 ± 0,020
4	0,339 ± 0,003	3,987 ± 0,020
6	0,510 ± 0,008	5,987 ± 0,029
8	0,684 ± 0,013	8,004 ± 0,025
10	0,857 ± 0,013	10,008 ± 0,040

*D.P. = desvio-padrão da média.

Precisão

A precisão foi avaliada pelo estudo de repetibilidade, o qual apresentou um coeficiente de variação de 0,32%, portanto, menor que o valor máximo exigido de 5% (Tabela 2).

TABELA 2. Resultados do estudo de repetibilidade do método de dosagem do ácido úsnico em espectroscopia UV.

Dados Estatísticos	Absorbância (290 nm)	Concentração (µg/mL)
	0,513	6,012
	0,518	6,070
	0,516	6,047
	0,515	6,035
	0,516	6,047
	0,515	6,035
	0,516	6,047
	0,518	6,070
	0,514	6,023
Média	0,515	6,042
D.P.	0,002	0,019
C.V. (%)	0,321	0,320

*D.P. = desvio-padrão; C.V. = coeficiente de variação

Exatidão

A exatidão foi verificada para três níveis de concentração: baixa, média e alta. Os dados experimentais obtidos revelaram média de recuperação do analito de 100,43% e maior coeficiente de variação de 0,923% (Tabela 3). Os resultados do estudo de exatidão demonstram que pequenas variações da concentração de ácido úsnico podem ser prontamente quantificadas pelo método com exatidão, além de não haver interferência dos excipientes do filme no doseamento do produto final.

TABELA 3. Resultados da exatidão para três níveis de concentrações diferentes de ácido úsnico.

Concentração de ácido úsnico (µg/mL)				Dados estatísticos		
Teórica	Experimental			Média	D.P.	C.V.(%)
4	4,043	4,032	3,974	4,016	0,037	0,923
6	6,047	6,035	6,023	6,035	0,012	0,198
8	8,038	8,015	8,027	8,026	0,011	0,137

*D.P. = desvio-padrão; C.V. = coeficiente de variação

Robustez

A variação da temperatura de análise não afetou a absorbância do ácido úsnico. As concentrações médias obtidas para as análises das soluções acondicionadas nas temperaturas de 4 e 24°C foram de $5,985 \pm 0,03$ µg/mL e $6,065 \pm 0,05$ µg/mL, respectivamente. A mudança da fonte fornecedora de metanol resultou em concentrações médias de $6,081 \pm 0,03$ µg/mL para o tipo A e $6,035 \pm 0,01$ µg/mL para o tipo B. Entre todos os resultados experimentais, o valor máximo do coeficiente de variação encontrado foi de 0,94%. De acordo com o teste *t* (Tabela 4), não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos, quando da alteração na temperatura de análise ou na fonte fornecedora do solvente. Sendo assim, no nível de 95% de confiança, as variações dos parâmetros analisados não influenciam a quantificação do ácido úsnico.

TABELA 4. Avaliação da robustez do método de dosagem do ácido úsnico por espectrofotometria UV.

Valores de <i>t</i>		
<i>T</i> calculado	<i>T</i> crítico	
Temperaturas	Fabricantes	
04°C e 23°C	A e B	
0,182	0,197	4,3 ^a

^a valor tabelado de *t* (teste bilateral, *p* < 0,05)

Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O método demonstrou ser sensível a pequenas concentrações tendo como valor de LQ 0,364 µg/mL, o qual corresponde a 6,06% da concentração do teste. No entanto, o LD encontrado foi de 0,109 µg/mL, concentração equivalente a 1,81% da concentração teste.

Aplicação do método de quantificação do ácido úsnico em filmes bioativos

A partir das análises dos filmes pode-se determinar a massa média das amostras e a quantificação do teor de ácido úsnico (Tabela 5).

TABELA 5. Análise de massa dos filmes e da quantidade de ácido úsnico extraído destes.

Biofilmes		
Conc. do analito (%)	Média da massa do filme ± D.P. (mg)	Média da massa de AU ± D.P. (mg)
25	46,6 ± 5,3 (C.V.% = 10,8)	0,50 ± 0,1 (C.V.% = 17,9)
50	49,5 ± 7,2 (C.V.% = 14,2)	0,58 ± 0,1 (C.V.% = 20,6)
100	70,8 ± 16,2 (C.V.% = 22,8)	2,18 ± 0,5 (C.V.% = 23,0)

*D.P. = desvio-padrão; C.V. = coeficiente de variação

Notou-se que, nas amostras fornecidas, não existia uma homogeneidade adequada de massa, podendo ser notada facilmente uma diferença de massa entre o filme de concentração 50% e o filme de concentração 100%, ambos com propilenoglicol na composição.

Nos dois tipos de biofilmes as médias de massa de ácido úsnico obtidas foram próximas nas concentrações de 25 e 50%, embora o esperado fosse uma proximidade do dobro da concentração de 50% em relação à concentração de 25%.

Observou-se que, em todos os biofilmes, o coeficiente de variação do ácido úsnico recuperado foi alto, tendo destaque para os biofilmes de concentração 100% que apresentaram 23,08%.

A taxa de recuperação total do ácido úsnico também foi avaliada e apresentou valores entre 100,4 e 82,3% (Tabela 6).

TABELA 6. Taxa de recuperação obtida a partir de biofilmes de colágeno

Biofilmes		
Valor teórico (mg)	Determinação em massa (mg) (DP)	Taxa de Recuperação (%)
3,0	3,14 (0,07)	100,4
6,0	5,53 (0,34)	88,5
12,0	10,28 (0,44)	82,3

Os filmes bioativos apresentaram taxa de recuperação 100,4 a 82,3 de acordo com a concentração de ácido úsnico utilizada. Segundo a Resolução nº 899 da ANVISA, valores aceitáveis estão próximos de 100% de recuperação. Sugere-se, com esses resultados, que os filmes obtidos com baixas concentrações mostram-se mais uniformes e o sistema facilita sua liberação. A partir do momento que aumenta-se a quantidade de fármaco a relação fármaco-lipossoma é modificada e a liberação assim como a quantificação torna-se mais difícil.

CONCLUSÕES

A metodologia analítica desenvolvida para o doseamento de ácido úsnico em filmes bioativos de colágeno demonstrou atender às exigências especificadas pela ANVISA, podendo ser considerada específica, linear, precisa, exata e robusta. Dentro do

intervalo estudado, a metodologia demonstrou ser reprodutível e adequada ao controle de qualidade de formulações que contenham ácido úsnico.

Ao aplicar o método analítico para quantificar o ácido úsnico, registrou-se uma baixa variação do fármaco em diferentes concentrações e uma taxa de recuperação total de analito do filme dentro dos parâmetros técnicos exigidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe/FAPITEC-SE) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAJIAW, V. Lichens are more important than you think. *Bioscience*, v.45, p.124, 1995.

BRASIL. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Estabelece metodologias para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 18mar.2004.

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.html.

BERNALES, D.M.; CARIDE, F.; LEWIS, A.; MARTIN, L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tissular y ósea guiadas. *Rev Cubana Invest Biomed*, v. 23, n. 2, p. 65-74, 2004.

CAKIR, A.; SULEYMANCI, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats Fehmidabasoglu., *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, p. 59–65, 2006.

- FOURNET, A., FERREIRA, M.E., ROJAS DE ARIAS, A., TORRES DE ORTIZ, S., INCHAUSTI, A., YALUFF, G., QUILHOT, W., FERNANDEZ, E., HIDALGO, M.E. Activity of compounds isolated from Chilean lichens againsts experimental cutaneous leishmaniasis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 111, p. 69–74, 1997.
- HELARY, C.; OVTRACHT, L.; COULOMB, B.; GODEAU, G.; GIRAUD-GUILLE, M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*, v. 27, n. 25, p.4443-4452, 2006.
- HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of Lichen Substances. *Springer*, p. 228, 1996.
- INGOLFSDOTTIR, K., CHUNG, G.A.C., SKULASON, V.G., GISSURARSON, S.R., VILHELMSDOTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 141–144, 1998.
- JIN, J.; DONG, Y.; HE, L. The study on skin wound healing promoting action of sodium usnic acid. *Zhong Yao Cai*, v.28, p. 109-111, 2005.
- KUPCHAN, S.M., KOPPERMAN, H.I. Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia*, v. 31, p. 625–626, 1975.
- LASIC, D.D. Liposomes: From physics to application. *Amsterdam: Elsevier*, p. .3-7, 1993.
- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, p. 1-22, 2001.
- LEE, T.W.Y.; ROBINSON, J.R.; Remington's Pharaceutical Sciences, 20 ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 933-960, 2004.
- NUNES, T.W.Y.; ROBINSON, J.R.; Remington's Pharaceutical Sciences, 20 ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 933-960, 2004.

- OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., YAMAZAKI, M., KINOSHITA, Y., YAMAMOTO, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Medica*, v. 61, p. 113–115, 1995.
- RANDAU, K.P., MEIRA, J.L., BRAGA, J.M.F., MONTEIRO, D.B., ROLIM-NETO, P.J. Desenvolvimento e validação analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) - Matéria-Prima. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 24, n. 1, p. 104-108, 2005.
- SCIRPA, P., SCAMBIA, G., MASCIULLO, V., BATTAGLIA, F., FOTI, E., LOPEZ, R., VILLA, P., MALECORE, M., MANCUSO, S. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesion by human papillomavirus. *Minerva Ginekol*, v. 51, p. 255–260, 1999.
- VIJAYAKUMAR, C.S., VISWANATHAN, S., KANNAPPA, M., PARVATHAYARTHINI, S., KUNDU, A.B., SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, v. 71, p. 564–566, 2000.

CAPÍTULO V

Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing

Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing

Paula S. Nunes^a, Ricardo L.C. Albuquerque-Jr^b, Marília S. Bezerra^a, Juliana C. Cardoso^b,
Jamille C.C. Souza^a, Lucindo J. Quintans-Jr^a, Leonardo R. Bonjardim^a, Adriano A.S.

Araújo^{a*}

^aDepartamento de Fisiologia – Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

^bInstituto de Tecnologia e Pesquisa-ITP-Universidade Tiradentes, Address: Av. Murilo Dantas, 300, CEP 49032-490, Sergipe-Brasil.

Abstract

Aim out study was assess the effect of collagen-based films containing usnic acid as a wound dressing for dermal burn healing. Thus, type I collagen-based films were prepared by casting process using propyleneglycol as plasticizer. Subsequently, second-degree burn wounds of 1 cm² were performed in the dorsum of forty-five Wistar rats, assigned into nine groups (n=5): COL – animals treated with collagen-based films; PHO – animals treated with collagen films containing empty liposomes; UAL – animals treated with collagen-based films containing usnic acid incorporated into liposomes. After 7, 14 and 21 days the animals were euthanized. The specimens removed were formalin-fixed, and paraffin-embedded and histological sections were stained in HE and Sirius Red. On 7th day there was a moderate infiltration of neutrophils, in UAL, distributed throughout the burn

wounds, whereas in COL and PHO, the severity of the reaction was slighter and still limited to the margins of the burn wounds. On the 14th day, the inflammatory reaction was less intense in UAL, with remarkable plasma cells infiltration. On the 21st day, there was unequivocal reduction of the inflammation, which was predominantly composed of plasma cells in all groups, particularly in UAL. The use of collagen-based films containing usnic acid provided more rapid substitution of type-III for type-I collagen on the 14th day, and improved the collagenization density on the 21st day. It was concluded that the use of reconstituted bovine type-I collagen-based films containing usnic acid improved burn healing process in rats.

Keywords: usnic acid, collagen, wound healing.

Correspondence to:

Prof. Dr. A.A.S. Araújo

Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade, Universidade. Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, São Cristóvão/SE. CEP 49000-100. E-mail: adriasa2001@yahoo.com.br

Phone: +55 79 2105 6841 /Fax: +55 79 2105 6841

1. Introduction

Disruption of the skin generally leads to an increased fluid loss, infection, hypothermia, scarring, compromised immunity and change in body image; furthermore, large skin damage can cause mortality [1]. The concern on the high cost of treatment, resistance to antibiotics, inability to restore initial appearance of the skin and the high rates of septicemia related to severe burn wounds has increased in the last decades [2], so that various formulations such as ointments and wound dressings have been developed for the treatment of these lesions [3].

Natural polymers have been increasingly studied for applications in health care due to their biocompatibility, biodegradability and nontoxicity [4,5]. Collagen-based film is a potentially useful biomaterial since it is the major constituent of the connective tissue and permit controlled drug release within target tissues [6]. The main applications of collagen as drug delivery systems are collagen shields in ophthalmology, sponges for burns/wounds, gel formulation in combination with liposomes for sustained drug delivery and controlling material for transdermal delivery [7].

Usnic acid (UA), a dibenzofuran originally isolated from lichens [8,9], has been shown to work as a growth regulator in higher plants [10,11]. In humans, it can act as an anti-inflammatory [12], antimitotic [13], antineoplastic [14,15], antibacterial [16] and antimycotic [17] agent. However, the potential benefits of UA therapeutic application are limited by its unfavorable physicochemical properties, particularly its very poor water solubility. Therefore, its use in a safe and efficient manner requires a suitable solubilizer agent and/or carrier system for improving the therapeutic index of this drug [18,19].

A wide variety of drugs has been incorporated into or associated with liposomes and nanocapsules, as long as such materials represent excellent drug carrier systems.

Liposomes are vesicles composed of a bilayer of lipid molecules enclosing an aqueous volume. Recent applications have concentrated on their use as drug delivery vehicles due to the ability of incorporating water-soluble materials in their aqueous volume or oil soluble materials in the lipid bilayer [20,21]. It has been reported that the encapsulation of UA has shown to be a suitable strategy to reduce the hepatotoxicity [15] and overcomes the low water solubility [18] of this molecule, providing safety and efficiency to its use in health care.

2. Experimental

2.1 Materials

Usnic acid, 2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzenofurandione (Figure 1) was isolated from *Cladonia substellata* Vainio collected in March, 2006, in the Itabaiana county (180-670 m; 10°41'22" S; 37°24'10" W), Sergipe-SE, Brazil. Lichen sample was identified by M.P. Marcelli (Botanical Institute of São Paulo-SP, Brazil), where a voucher specimen was deposited (Deposit #SP393249). All chemicals were of reagent grade. The collagen was prepared according to the method proposed by Cardoso (2005) [22].

INSERT FIGURE 1

2.2 Extraction and purification of usnic acid

Air-dried lichen (300 g) was extracted with diethyl ether in a Soxhlet apparatus and the precipitate formed on cooling collected, recrystallised from ethanol, yielding 330 mg usnic acid [23].

2.3 Films preparation

Collagen-based films (CL) were prepared through casting method using collagen dispersion (2%) in 0.5 M acetic acid with 20% of plasticizer (propyleneglycol-Isfar Lot. 070967) in relation to the polymer dry weight. This dispersion was casted onto a clean rimmed perspex plate and allowed to dry at room temperature in order to obtain the films.

UA-loaded liposomes were prepared by conventional rotary evaporation method. Briefly, phosphatidylcholine (Lipoid GMBH 75% Lot 776095-1) was dissolved in chloroform according to the ratio phosphatidylcholine/usnic acid of 18:1 w/w. The mixture was dried to a thin lipid film using a rotary evaporator. This film was kept in desiccator for at least 24 h until the organic solvent was totally eliminated. Then, the lipid film was hydrated and dispersed in water, under vigorous magnetic agitation, promoting the formation of the multilamellar vesicles (MLV). Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared by probe sonication of the MLV dispersion. After this procedure, the usnic acid-loaded liposomes were mixed with collagen dispersion (2% in 0.5 M acetic acid with 20% of collagen: propyleneglycol w:w) in the ratio of 1:4 (v/v). After solvent evaporation, the films were cut off in square shape (2/2cm), and sterilized using UV rays (20 min) in order to obtain the usnic acid/collagen-based films (UAC). The characterization of usnic acid/collagen-based films we reported in previous research [24].

2.4 Animals

The animals used in this study were adult male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage, weighing 250-300 g. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding, in a temperature and humidity-controlled environment and supplied with food and water *ad libitum*. Experimental protocols and procedures were

approved by the Federal University of Sergipe Animal Care and Use Committee (CEPA/UFS # 08/09).

2.5 Burning Procedures and Groups

Forty-five rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine (100 mg/kg – 5 mg/kg) and 1 cm² standard-sized square-shaped second-degree burn wounds were performed in the back of the animals. Animals were handled in accordance to the principles of aseptic chain in order to avoid bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into three groups of fifteen animals each: COL – animals treated with collagen-based films; PHO – animals treated with collagen films containing empty liposomes; UAL – animals treated with collagen-based films containing usnic acid incorporated into liposomes. After 7, 14 and 21 days, five animals of each group were euthanized by intramuscular administration of 0.8 ml/Kg zoletil, 0.43 ml/Kg Tiopental and 5 ml/K potassium chloride g (Ariston 19,1%, 2,559 mEq/ml) and the area corresponding to the wound region in the back of the animals was surgically removed and formalin-fixed for further histological examination.

2.6 Histological procedures

The surgical specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded according to the routine laboratorial techniques. Subsequently, serial 5 µm thick sections were obtained and stained in hematoxylin-eosin and picrosirius.

2.6.1 Assessment of the inflammatory profile (IP) and epithelization rates (ER)

The profile inflammatory (IP) was classified as acute (predominance of

polymorphonuclear cells) and chronic (predominance of mononuclear cells), and graded as slighter/absent, moderate or severe. The epithelization rates (ER) was evaluated by measuring the epidermal migration from the normal wound margin to the point where the migrating epithelium stopped processing. ER (%) was determined by the relation between the new epithelium present in the total wound and total area of wound.

2.6.2 Assesment of the collagen deposition

Histological sections stained in picosirius and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis of the collagen deposition. Collagen fibers were analyzed according to their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange, orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long) and disposition (reticularly arranged or interlaced).

2.7 Assessment of the mean of myofibroblasts for histological field (MF).

Myofibroblasts were detected by using a monoclonal antibody against the α -smooth muscle actin antigen (clone 1A4; 1:200, 12 h, Dako, Glostrup, Denmark). After washing in PBS, slides were incubated with biotin-labeled antimouse secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), then washed in PBS, and incubated with peroxidase-labeled streptavidin (DAKO). The reaction products were visualized by immersing the slides in freshly prepared diaminobenzidine (Dojindo, Kumamoto, Japan). Ten histological sections (x 40, 10 ocular, 0.739 mm² per field) were randomly selected and the mean of immunostained cells was assessed with an image analysis system (Imagelab[®]) as previously described by Ribeiro et al (2009) [25].

2.8 Statistical analysis

Statistical significant difference in the severity of the inflammatory reaction was assessed by chi-squared test, whereas the significance of the differences in the MC mean was verified by analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey test. Each time point was analyzed separately, and two-tailed α -level of $P < 0.05$ was significant.

3. Results and discussion

Biological experiments

On the seventh day, there was a moderate infiltration of neutrophils, in UAL, distributed throughout the burn wounds, whereas in COL and PHO, despite the same inflammatory profile had been evidenced, the severity of the reaction was clearly slighter and still limited to the margins of the burn wounds. Moreover, a poorly developed granulation tissue was observed in all groups, but the vascular content was also more evident in UAL (Figure 2 - Ia, Ib, Ic). These findings were expected, since soon after injury, as a result of vascular and biochemical changes, a substantial amount of neutrophils migrate into the wound to prevent the invasion and proliferation of microorganisms; subsequently, these polymorphonuclear cells are gradually replaced by mononuclear cells as the wound healing continues, in a bottom-top process [26].

After 14 days, the severity of the inflammation ranged from moderate to intense, chronic in the bottom and acute in the top of the burn wounds, in all groups (Figure 2 – IIa, IIb, IIc). The reason for the maintenance of intense inflammation in the group treated with collagen films, without usnic acid, lays on the fact that, although collagen presents plenty of biomodulatory effects, these molecules do not exhibit anti-inflammatory activity [27].

However, COL and PHO showed lymphocyte-rich infiltrate, whereas an expressive content of plasma cells was observed in UAL in addition to the lymphocytic infiltrate. Besides, the exuberant granulation tissue observed in UAL, in opposition to the less fibrovascular lymphocyte-rich tissue seen in COL and PHO, suggests that the use of collagen-based films containing usnic acid apparently favored the installation of the earlier events involved in wound healing process.

Finally, twenty-one days after the burn procedures, the severity of the inflammatory reaction was evidently reduced in UAL (mild) in comparison with the other groups (moderate) (Figure 2 – IIIa, IIIb, IIIc). These findings might be related to the usnic acid biological properties, which may be involved in the inhibition of prostaglandin synthesis, similarly to non-steroidal anti-inflammatory drugs [28]. The few inflammatory cells observed in UAL were composed almost exclusively by plasma cells, in opposition to the still expressive presence of lymphocytes in COL and PHO (Figure 2 – IIIa, IIIb, IIIc). Therefore, it is suggested that the use of UAL might provide acceleration of the latter phases of the immunological response, such as B cells activation and differentiation into plasma cells. On the other hand, the maintenance of lymphocyte-rich infiltrate in COL and PHO suggests that the biological events that characterize the local immunological response are taking place more slowly in these groups. Whereas residual granulation tissue composed by some few clusters of dilated and congested capillary blood vessels tissue was still observed in the surface of the burn wounds, in addition to an extremely cellular connective tissue, in COL and PHO, it could not be evidenced in UAL, which showed connective tissue represented by dense collagen-rich cicatricial scar. This is suggestive that the healing process was substantially advanced in the groups treated with UA. The improvement in the skin wound healing induced by usnic acid has been previously reported, although this effect had not been mediated by fibroblasts proliferation [29].

INSERT FIGURE 2

Therefore, the epithelization is considered a relevant step of wound healing, once keratinocytes are supposed to be source of cytokines involved in remodeling the collagen fibers deposited at the final stages cicatricial repair. The ER was significantly higher in UAL than in COL ($p = 0.040$) and PHO ($p = 0.044$) in 7 days, but there was no significant difference among the groups either in 14 ($p = 0.153$) or in 21 days ($p = 0.09$) (Figure 3). These findings might be related to the fact that the molecules of usnic acid were probably released into the insulted area during the first days of the healing process, as long as the collagen-based film is resorpted. Thus, considering that usnic acid has been previously proved to work as mitogen factor for keratinocytes in *in vitro* assays [30], the lichenic metabolite would act directly on epithelial cells in the edge of the wounds, providing cell proliferation and migration to form the new superficial lining earlier than in the other groups.

INSERT FIGURE 3

The method of picosirius-polarization has contributed substantially for the identification and comprehension of the collagen and its function. This method is based on the presence of alkaline aminoacids in the collagen molecules that strongly react with the acid stain (Sirius red). This process increases the birefringence of the normal aggregated collagen molecules. Besides, differentiation between the types of collagen is also possible, since the type I is intensely birefringent (yellow-orangish and reddish), and composed of long thick fibers, whereas type III is less birefringent (greenish) and constituted by short, thin delicate fibers [31].

In this study, only scanty deposition of thin delicate reticularly arranged fibrils exhibiting greenish and yellow-greenish birefringence (type-III collagen) was observed in all groups after seven days. However, in UAL (Figure 4 – Ic), the fibers appeared thicker and longer than in COL and PHO (Figure 4 – Ia, Ib), particularly in the margins of the burn wounds. Inconspicuous deposition of collagen fibrils was expected, since the collagen synthesis begins around the fifth day, in order to provide spatial orientation of angioblasts during the very early stages of wound healing [32].

In 14 days, there was a remarkable improvement of the collagenization in UAL, since deposition of gross wavy parallel-arranged bundles of birefringent yellow-orangish collagen fibers (type-I collagen) was observed (Figure 4 – IIc). Oppositely, COL and PHO exhibited deposition of long but still delicate collagen fibers, composed predominantly by type III collagen (Figure 4 – IIa, IIb). The high content of collagen fibers, in addition to the dense arrangement and wavy appearance of the bundles suggests that this lichenic constituent might play an important role in the fibroplasias dynamic. This theory is also supported by the thicker appearance of the fibers in UAL even in the seventh day.

In 21 days, it was evidenced intense deposition of gross thick parallel-arranged collagen bundles, less densely deposited in the top of the scars, and apparent complete resorption of type III fibers, in COL and PHO (Figure 4 – IIIa, IIIb). Nevertheless, UAL showed a mix of wavy and highly interlaced type I and type III collagen fibers, whose arrangement resembled the normal dermis (Figure 4 – IIIc). The replacement of a substantial part of the content of type III collagen for type I molecules during the healing process is an absolutely expected phenomenon [33,34]. However, the excessive production of type I collagen, as observed in COL and PHO, might easily lead to the formation of undesirable hypertrophic scars and keloids [35,36]. On the other hand, the moderate content of less thick collagen fibers in UAL appears to provide low probability of keloid

development, a quite desirable property in pro-healing materials. Besides, the pattern of arrangement and balance in the content of both type I and type III collagen fibers as seen in UAL seems to suggest that the remodeling phase of the scar, represented by degradation of the gross connective matrix formed and gradual and progressive deposition of a new depurated matrix rich in both collagen molecules, is highly advanced in comparison to the other groups, which would justify the clear resemblance with the normal histological appearance of the dermal collagen. It must also be stressed that despite the biological effects of usnic acid on the fibroplasia dynamics seem to be probably related to a possible increase in the fibroblast metabolism, as long as both synthesis and degradation of the collagen molecules were apparently stimulated in this study, further investigations are required in order to fully clarify the precise mechanism of the healing modulation pathways provided by this lichenic constituent.

INSERT FIGURE 4

Regarding the MF, no significant difference was verified among the groups in 7 days ($p=0.30$). In 14 days, the content of myofibroblasts was significantly higher in PHO than in COL ($p<0.05$ and 0.01 respectively). However in 21 days, the myofibroblasts content was significantly reduced in UAL compared to COL ($p<0.01$) and PHO ($p<0.01$). Also, in opposition to COL and PHO, this cell subset decreased in UAL compared to the content observed in 21 days.

INSERT FIGURE 5

Myofibroblasts are a cell type with a contractile phenotype characterized by a cytoskeleton rich in actin microfilaments involved in wound contraction [37]. Therefore,

myofibroblastic differentiation is supposed to be a crucial event leading to a suitable healing of larger wounds, which have more extensive loss of cells and tissue [25]. In this study, the application of collagen-based films containing liposomal-loaded usnic acid might have provided fibroblastic transformation into myofibroblasts at the early stages of the burn healing process. Notwithstanding, in 21 days, the number of myofibroblasts decreased, most likely due to apoptosis, and scar tissue formed. On the other hand, in COL and PHO, the healing process appeared to be considerably slower, so that the process of myofibroblastic apoptosis apparently had not yet taken place. However further studies are necessary to clarify if this cell phenotype transformation is a direct effect of the usnic acid itself, or a result of the release of differentiating factors by other cells involved in the healing process (Figure 5).

In conclusion, we demonstrated that collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid are quite useful in improving burn healing. Moreover, it is also suggested that this improvement is probably related to the modulation of some of the biological events involved in this process, such as the inflammatory response, epithelization and collagen formation.

Acknowledgments

We would like to thank the National Council of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brazil) and the Research Supporting Foundation of State of Sergipe (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe/FAPITEC-SE) for the financial support.

References

- [1] Alemdaroglu, C., Degim, Z., Celebi, N., Zor, F., Ozturk, S., Erdogna, D., 2006. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, 32, 319–327.
- [2] Hosseini, S.V., Tanideh, N., Kohanteb, J., Ghodrati, Z., Mehrabani, D., Yarmohammadi, H., 2007. Comparison between Alpha and Silver Sulfadiazine ointments in treatment of Pseudomonas infections in 3rd degree Burns. *International Journal of Surgery*, 5, 23-26.
- [3] Aoyagi, S., Onishi, H., Machida, Y., 2007. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 330, 138–145.
- [4] Girardi, R.C.G., 2005. Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de São Carlos, São Paulo.
- [5] Mali, S., Grossmann, M.V.E., Garcia, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., 2006. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 75, 453-460.
- [6] Gopinath, D., Ahmed, M.R., Gomathi, K., Chitra, K., Sehgal, P.K., Jayakumar, R., 2004. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25, 1911-17.
- [7] Helary, C., Ovtracht, L., Coulomb, B., Godeau, G., Giraud-Guille, M. M., 2006. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*, 27, 4443-4452.

- [8] Knopp, W., 1844. Chemisch-physiologische untersuchung uber die flechten. Justus Annalen der Chemie, 49, 103–124.
- [9] Stark, J.B., Walter, E.D., Owens, H.S., 1950. Method of isolation of usnic acid from *Ramalina reticulata*. Journal of the American Chemical Society, 72, 1819–1820.
- [10] Huneck, S., Schreiber, K., 1972. Wachstumsregulatorische eigenschaften von flechten-und-moos-inhaltsstoffen. Phytochemistry, 11, 2429–2434.
- [11] Bazin, M., Lamer, A., Delcros, G., Rouaud, I., Philippe Uriac, P., Joël Boustie, J., Corbel, J., Tomasi, S., 2008. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16, 6860–6866.
- [12] Vijayakumara, C.S., Viswanathana, S., Kannappa, U., Reddya, M., Parvathavarthinia, S., Kundub, A.B., Sukumarb, E., 2000. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. Fitoterapia, 71, 564-566.
- [13] Cardarelli, M., Serino, G., Campanella, L., Ercole, P., De Cicco-Nardone, F., Alesiani, O., Rossiello, F., 1997. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. Cellular and Molecular Life Science, 53, 667–672.
- [14] Takai, M., Uehara, Y., Beisler, J. A., 1979. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. Journal of Medicinal Chemistry , 22, 1380–1384.
- [15] Santos, N.P.S., Nascimento, S.C., Wanderley, M.S.O., Pontes-Filho, N.T., Silva, J.F., Castro, C.M.M.B., Pereira, E.C., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S., 2006. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 64, 154–160.
- [16] Ingolfisdottir, K., Chung, G.A.C., Gissourarson, S.R., Skulason, V.G., Vilhelmsdottir, M., 1998. In vitro antimycobacterial activity of lichen metabolites. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 6, 141–144.

- [17] Yamamoto, Y., Miura, Y., Kinoshita, Y., Higuchi, M., Yamada, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., Koshimizu, K., 1995. Screening of tissue culture and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor-induced Epstein–Barr virus activation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 43, 1388–1390.
- [18] Lira, M.C.B., Ferraz, M. S., Silva, D.G.V.C, Cortes, M.E., Teixeira, K.I., Caetano, N.P., Sinisterra, R.D., Ponchel, G., Santos-Magalhães, N.S., 2009. Inclusion complex of usnic acid with b-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64, 215–224.
- [20] Batista, C.M., Carvalho, C.M.B., Magalhães, N.S.S., 2007. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 2.
- [21] New, R.R.C., 1992. In *Liposomes: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK.
- [22] Cardoso, J.C., 2005. Desenvolvimento de gel a partir de colágeno modificado para liberação prolongada de fármacos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.
- [23] Kupchan, S.M., Kopperman, H.I., 1975. L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia*, 31, 625-6.
- [24] Nunes, P.S., Bezerra, M.S., Costa, L. P., Cardoso, J.C., Albuquerque-Jr., R. L. C., Rodrigues, M.O., Barin, G.B., Silva, F.A., Araújo, A.A.S. J. 2010. *Therm. Anal. Calorim.* 99, 1011–1014.
- [25] Ribeiro, M.A.; Albuquerque, R.L.; Ramalho, L.M.; Pinheiro, A.L.; Bonjardim, L.R. & Da Cunha, S.S., 2009. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. *Photomed. Laser Surg.*, 27, 49-55.

- [26] Diegelmann, R.F., Evans, C.M., 2004. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9, 283-89.
- [27] Srivastava, S., Gorham S.D., French, D.A., Shivas, A.A., Courtney, J.M., 1990. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. *Biomaterials*, 11, 155-61.
- [28] Vijauakumar, C.S., Viswanathan, S., Reddy, M.K., Parvathavarthini, S., Kundu, A.B., Sukumar, E., 2000. Anti- inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71, 564-566.
- [29] Jin, J., Dong, Y., He, L., 2005. The study on skin wound healing promoting action of sodium usnic acid. *Zhong Yao Cai*, 28, 109-11.
- [30] Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., Verotta, L., 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med.*, 75, 607-13.
- [31] Melo, E.C.M., Lemos, M., Ximenes Filho, J.A., Sennes, L.U., Saldiva, P.H.N., Tsuji, D.H., 2003. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*, 113, 2187-91.
- [32] Ramos, A.F.N., Miranda, J.L., 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *The Journal of Venomous Animals and Toxins*, 13, 697-710.
- [33] Carneiro, C.G., Sennes, L.U., Saldiva, P.H.N., Tsuji, D.H., Ximenes-Filho, J.A., 2005. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia*, 71, 798-802.

- [34] Rich, L., Whittaker, P., 2005. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 22, 97-104.
- [35] Sandulache, V.C., Parekh, A., Li-Korotky, H., Dohar, J.E., Hebda, P.A., 2007. Prostaglandin E2 inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen synthesis. *Wound Repair Regen.*, 15, 122-33.
- [36] Verhaegen, P.D., Van Zuijlen, P.P., Pennings N.M., Van Marle J., Niessen, F.B., Van Der Horst, C.M., Middelkoop, E., 2009. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen.*, 17, 649-56.
- [37] Van Beurden, H.E., Von Den Hoff, J.W., Torensma, R., Maltha, J.C., and Kuijpers-agtman, A.M., 2005. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J. Dent. Res.* 84, 871–880.

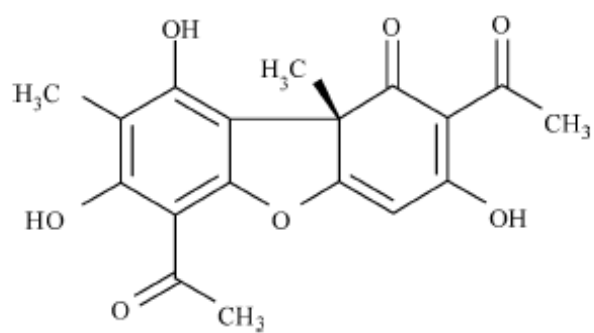


Figure 1. Molecular structure of usnic acid.

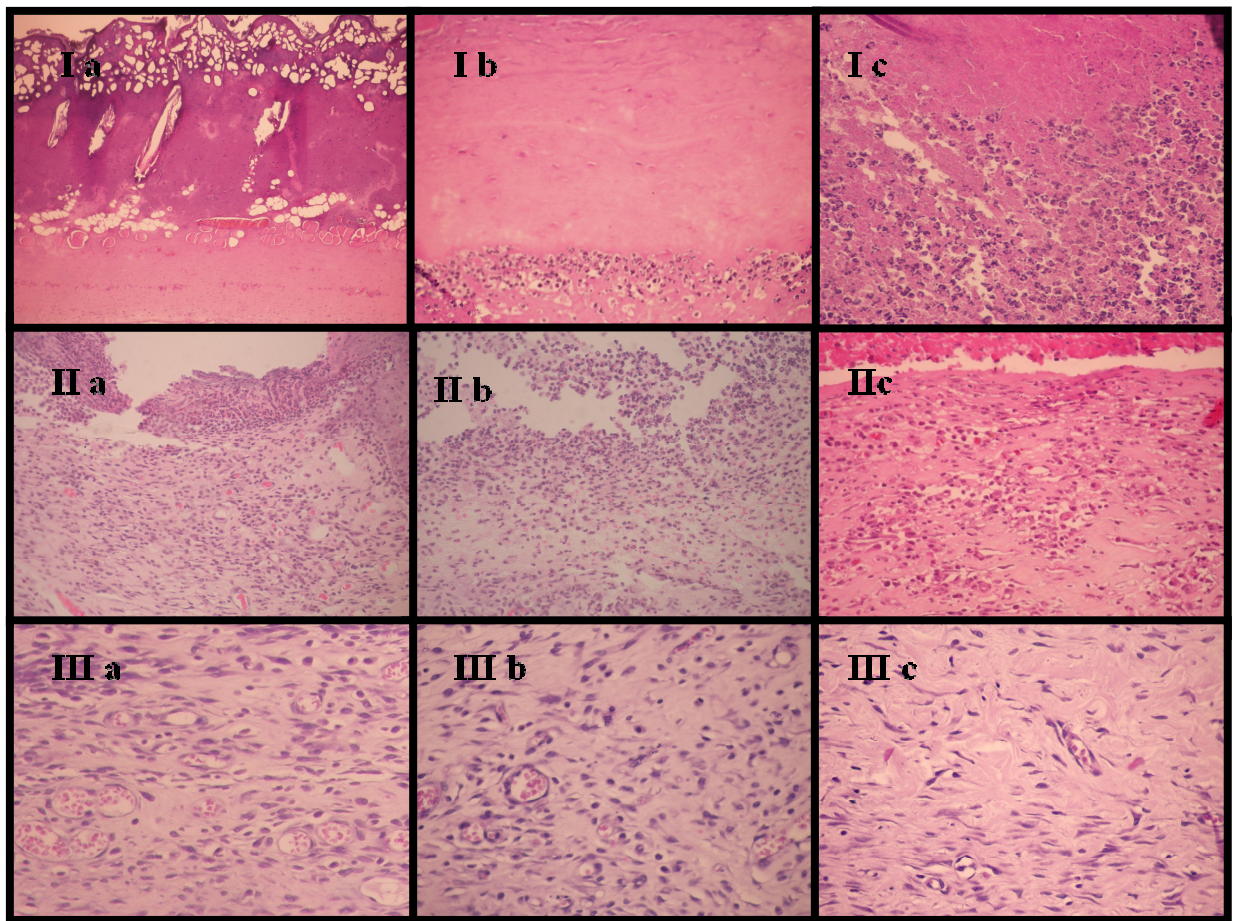


Figure 2. Neutrophilic infiltration is seen in COL (Ia), PHO (Ib) and UAL (Ic) in 7 days; and in COL (IIa), PHO (IIb), UAL (IIc) in 14 days. In 21 days, chronic infiltrate is still observed in COL (IIIa) and quite less expressive in PHO (IIIb), whereas in UAL (IIIc) it is utterly inconspicuous (HE, 400x magnification).

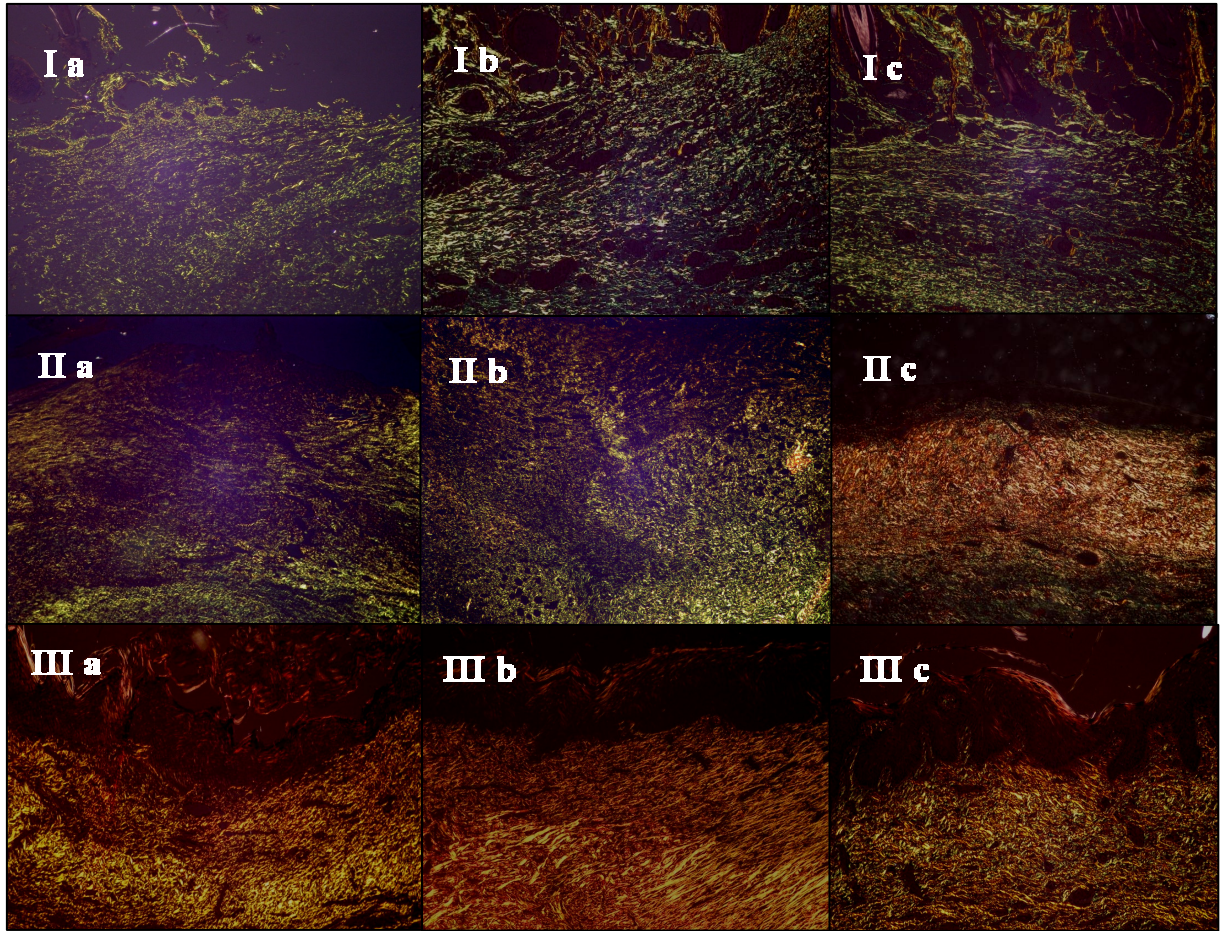


Figure 3. In 7 days, conspicuous thin delicate reticularly-arranged type-III collagen fibrils are seen in COL (Ia), PHO (Ib) and UAL (Ic). In 14 days the predominance of type-III collagen fibrils is maintained in COL (IIa), and PHO (IIb), whereas in UAL (IIc) it was observed the predominance of type-I collagen fibers was observed. In 21 days was observed the complete resorption of type III fibers in COL (IIIa), and PHO (IIIb) and in UAL (IIIc) was observed, which showed a mix of wavy and highly interlaced type I and type III collagen fibers (Sirius Red/Polarization, 100x).

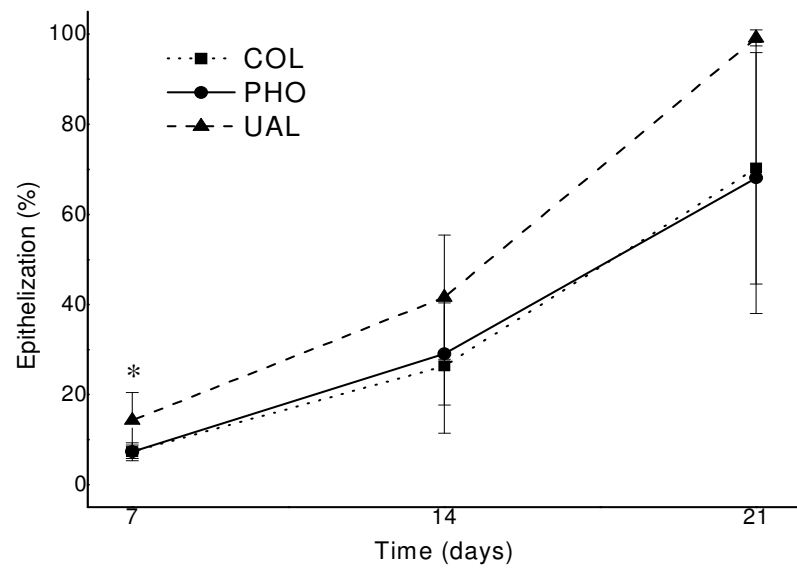


Figura 4. Epithelization of the burn wound surface

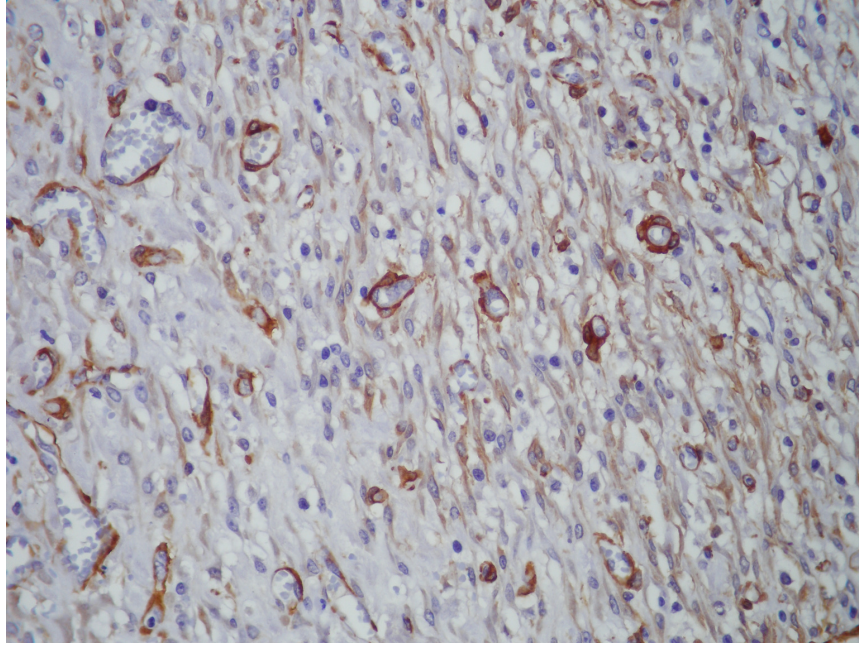


Figure 5. Miofibroblasts cells

CAPÍTULO VI

Conclusão

CONCLUSÃO

- Os resultados da caracterização físico-química comprovaram a incorporação do ácido úsnico nos filmes de colágeno, uma vez que os resultados de DSC mostraram ausência do pico endotérmico de fusão do AU, as curvas TG/DTG dos filmes apresentaram comportamento térmico diferenciado quando comparado com o AU puro e o filme controle, e os resultados de infravermelho mostraram as bandas do AU nos filmes preparados.
- Os parâmetros de validação para o desenvolvimento do método analítico por espectrofotometria de absorção na região do UV para quantificação do ácido úsnico em filmes de colágeno mostraram-se dentro das especificações previstas na Resolução 899 da Anvisa.
- O teor médio de ácido úsnico presente nos filmes foi de $12,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, determinado por espectrofotometria de absorção na região do UV.
- Os filmes de colágeno contendo ácido úsnico promovem de forma eficaz a melhora da cicatrização de queimaduras utilizando modelo animal. Além disso, sugere-se que esta melhora esteja relacionada a modulação de alguns dos eventos biológicos envolvidos neste processo, tais como a resposta inflamatória, epitelização e formação de colágeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. New York. 1993. 250p

ALVES, D. F. S., CABRAL, F. C. J., CABRALL, P. P. A. C., OLIVEIRA, R. M. J., REGO, A. C. M., MEDEIROS, A. C. Effects of topical application of the honey of melipona subnitida in infected wounds of rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.

ALEMDAROĞLU, C., DEĞİM, Z., ÇELEBI, N., ZOR, F., ÖZTÜRK, S., ERDOĞAN. D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v. 32, n. 3, p. 319-327, 2006.

APTROOT, A., SIPMAN, H. J. M. Diversity of Lichenized Fungi in the Tropics. **Biodiversity of tropical microfungi. Hong Kong University Press**. p. 93-106, 1997.

ARAÚJO, C. F. R., SOUZA, F. Z. A., GRECA, F. H., GUERREIRO, M. H. C. P. M, LEITE, A. L., MANSUR, A. E. C., KANTOR, D. C., NASSIF, A. E. Efeito do agarol e do trigliceril sobre a cicatrização da pele. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 232-237, 1998.

ARAÚJO, D.R., PINTO, L.M.A., BRAGA, A.F.A., PAULA, E. Formulações de Anestésicos Locais de Liberação Controlada: Aplicações Terapêuticas. **Revista Brasileira Anestesiologia**. v. 53, n. 5, p. 663 – 671, 2003.

ARGUIJO, H.G., SANES, J.C., VALVERDE, H.D., VOLTRICO, S.M.R., HAIDBAUER, A. Actualización em anestesia para pacientes quemados. **Pren. Méd. Argent**. 86, 808-818, 1999.

AOYAGI, S., ONISHI, H., MACHIDA, Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 330, n. 1, p. 138-145, 2007.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 3, p. 27-51, 2005.

BARBOSA, E, MOREIRA, E. A. M., FAINTUCH, J., PEREIRA, M. J. L. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Revista de Nutrição**. v. 20, n. 6, 2007.

BATISTA, C.M., CARVALHO, C.M.B., MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 2, 2007.

BAYAT, M., VASHEGHANI, M.M., RAZAVI, N. Effect of low-level helium–neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 83, n. 2, p. 87-93, 2006.

BAZIN, M., LAMER, A., DELCROS, G., ROUAUD, I., PHILIPPE URIAC, P., JOËL BOUSTIE, J., CORBEL, J., TOMASI, S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 6860–6866, 2008.

BERNALES, D. M., CARIDE, F., LEWIS, A., MARTIN, L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso em técnicas de regeneración tissular y óssea guiadas. **Revista Cubana Invest Biomed**. v. 32, n. 2, p. 65-74, 2004.

BLANES, L., BAPTISTA-SILVA, J. C. C. **Tratamento de feridas e cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo, 2004.

BRANGHAM, A. D. Surrogate cells or trojan horses. The discovery of Lipossomes. **BioEssays**. v. 17, p. 1081-1088, 1995.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6 ed. Rio de Janeiro, 2000.

CARDARELLI, M., SERINO, G., CAMPANELLA, L., ERCOLE, P., NARDINE, F. C., ALESIANI, O., ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid in different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 667-672, 1997.

CARLUCCI, V. D. S., ROSSI, L. A., FICHER, A. M. F. T., FERREIRA, E., CARVALHO, E. C. A experiência da queimadura na perspectiva do paciente. **Revista Escola Enfermagem –USP**, v. 41, n. 1, p. 21-8, 2007.

CARNEIRO, C. G., SENNES, L. U., SALDIVA, P. H. N., TSUJI, D. H., XIMENES, J. A. F. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfoplógico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 72, n. 2, p. 198-802, 2005.

CARVALHO, H. F., RECCO-PEMENTEL, S. M. **A célula**. São Paulo: Manole, 2001.

CARVALHO, E. A. B., ANDRADE, P. P., SILVA, N. H., PEREIRA, E. C., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v. 36, p. 155–161, 2005.

CHORILLI, M., LEONARDI, G. R., OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**. v. 16, n. 7/8, 2004.

CHRAL, S.S., MURARI, R., AHMAD. I. Lipossomas: uma revisão. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 4, 2002.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. In: molecular and cellular biology of wound repair. **New York: Plenum Press**, 1996.

COCCHIETTO, M., SKERT, N., NIMIS, P. L., SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137–146, 2002.

CORSI, E. C. C., CORSI, P. R. Fatores que prejudicam a cicatrização das feridas: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 85, n. 2, p. 47-53, 1995.

DEMLING, R. H, WAY, L. W. **Queimaduras e outras lesões térmicas**. In: **Way LW, editor, Cirurgia: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 170-80p.

DIEGELMANN, R. F., EVANS, C. M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, p. 283-89, 2004.

DINO, R. G, SERRA, M. C., MACIEIRA, L. Queimaduras no Brasil. In: Condutas atuais em queimaduras. **Revinter**. v. 1, n. 3, 2001.

DOKUMCU, Z., ERGUN, O., CELIK, H. A., AYDEMIR, S., SEZAK, M., OZOK, G., CELIK, A. Clostridial collagenase aggravates the systemic inflammatory response in rats with partial-thickness burns. **Burns**, v. 34, p. 935 – 94, 2008.

ELLIOTT, J. T., TONA, A., WOODWARD, J. T., JONES, P. L., PLANT, A. L. Thin Films of Collagen Affect Smooth Muscle Cell Morphology. **Langmuir**, v. 19, n. 5, p. 1506-1514, 2003.

FERNANDES, N. C. **Melhoria do cuidado ao paciente queimado: orientações para a elaboração de um instrumento de avaliação**. 2004. Dissertação (Mestrado) Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo.

FORTI, F. L., GOISSIS, G., PLEPIS, A. M. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **Jornal Biomaterials Application**, v. 20, n. 3, p. 267-85, 2006.

FREITAS, A. C., PINHEIRO, A. L. B., OLIVEIRA, M. G. RAMALHO, L. M. P. Assessment of the behavior of myofibroblasts on scalpel and CO2 laser wounds: An immunohistochemical study in rats. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v. 20, n. 4, p. 221-115, 2002.

FRÉZARD, F., SCHETTINI, D. A., ROCHA, O. G. F., DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química. Nova**. v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 45, p. 113-136, 1998.

GALLOWAY, D. J. Lichen biogeography. **Lichen biology**, p. 199-216, 1996.

GARFIELD, F. M., Quality assurance principles for analytical laboratories, Arlington: **Association of Official Analytical Chemistry International**, 1994.

GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de São Carlos, São Paulo.

GRAGNANI, A., GONÇALVES, M. L., FERIANI, G., FERREIRA, L. M. Análise microbiológica em queimaduras. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 20, n. 4, p. 237-40, 2005.

GRASSO, L., GHIRARDI, P. E., GHIONE, M. Usnic acid, a selective antimicrobial agent against *Streptococcus mutans*: a pilot study. **Current Therapy Research**, v. 45, p. 1067-1070, 1989.

GUIRRO, E., GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2002.

HAGA, H., IRAHARA, C., KOBAYASHI, R., NAKAGAKI, T., KAWABATA, K. Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 3, p. 2250-6, 2005.

HAO, H-O., LIN, L-H., SHEU, M-T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 44, n. 2/3, p. 103-112, 1997.

HELARY, C., OVTRACHT, L., COULOMB, B., GODEAU, G., GIRAUD-GUILLE, M.M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. **Biomaterials**. v. 27, n. 25, p. 4443-4452, 2006.

HENSSEN, A., JAHNS, M. Lichenes. **Georg Thieme Verlag, Stuttgart**, 1974, 467p.

HONDA, N. K. A química dos líquens. **Química nova**. v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.

HOSSEINI, S. V., TANIDEH, N., KOHANTEB, J., GHODRATI, Z., MEHRABANI, D., YARMOHAMMADI, D. Comparison between Alpha and Silver Sulfadiazine ointments in treatment of Pseudomonas infections in 3rd degree burns. **International Journal of Surgery**, v. 5, n. 1, p. 23-26, 2007.

HÜNECK, S., YOSHIMURA, I. Identification of lichen substances. **Springer**, p. 493, 1996.

HUNT, J. P., HUNTER, C. T., BROWNSTEIN, M. R. GIANNOPOULOS, A., HULTMAN, C. S., DESERRES, S., BRACEY, L., FRELINGER, J., MEYER, A. A. The Effector Component of the Cytotoxic T-Lymphocyte Response Has a Biphasic Pattern after Burn Injury. **Journal of Surgical Research**. v. 80, n. 2, p. 243-25, 1998.

HUPP, J. R. **Reparação de feridas**. Cirurgia oral e maxilo-facial. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996, 54-62p.

INGÓLFSDÓTTIR, K., CHUNG, G. A. C., SKÚLASON, V. GISSURARSON, S. R., VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical sciences**. v. 6, p. 141-144, 1998.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729-736, 2002.

İŞERI, S. O., GEDIK, I. E., ERZİK, C., USLU, B., ARBAK, S., GEDIK, N., YEĞEN. B. C. Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma. **Burns**, v. 34, n. 3, p. 361-369, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 289p.

KAGAWA, S., AYA MATSUO, A., YAGI, Y., IKEMATSU, K., TSUDA, R., NAKASONO, I. The time-course analysis of gene expression during wound healing in mouse skin. **Legal Medicine**. v. 11, p. 70-75, 2009.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Robins patologia-Bases Patológicas das doenças. **Elservier**. 2005.

LEE, C. H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical application of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 21-22, 2001.

LEE, T. W. Y., ROBINSON, J. R. **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 933-960p.

LEGAZ, M. E., VICENTE, C., PEREIRA, E. C., FILHO, X. L., ALVES R. S.: **Importância econômica dos líquens para o homem**, 2006, 581-619p.

LIRA, M. C. B., MILENA S. FERRAZ, M. S., SILVA, D. G. V. C, CORTES, M. E. TEIXEIRA, K. I., NELLY P., CAETANO, N. P., SINISTERRA, R. D., PONCHEL, G., SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Inclusion complex of usnic acid with b-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, p. 215–224, 2009.

LOSS, M., WEDLER, V., KUNZI, W., MEULI-SIMMEN, C., MEYER, V.E. Artificial skin, splitthickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. **Burns**, v. 26, n. 7, p. 644-52, 2000.

MACEDO, J. L. S., ROSA, S. C. **Estudo epidemiológico dos pacientes internados na Unidade de Queimados: Hospital Regional da Asa Norte**, Brasilia Med, 2000, 87-92p.

MACEDO, J. L. S., ROSA, S. C., CASTRO, C. Sepsis in burned patients. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 647-652, 2003.

MACEDO, J. L. S., ROSA, S. C., MECEDO, K. C. S., CASTRO, C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 32, n. 4, 2005.

MACEDO, J. L. S., SANTOS, J. B. Predictive factors of mortality in burn patients. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v. 49, n. 6, p. 365-370, 2007.

MAKOTO TAKAI, M., UEHARA, Y., BEISLER, J.A. Usnic Acid Derivatives as Potential Antineoplastic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 22, n. 11, 1979.

MANDELABAUM, S.H., DI SANTIS, É.P., MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares. **Revista de Dermatologia**, 78(4), 393-410, 2003.

McDOUGALL, S., DALLON, J., SHERRATT, J., MAINI, P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modeling and clinical implications. **Philos Transact Math Physics Engineering Science**. v. 364, p.1385-1405, 2006.

MELO, A. L., SILVA-BARCELLOS N. M., DEMICHELI C., FRÉZARD, F. Enhanced chistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International Journal Pharmaceutics**, v. 255, p. 227–230, 2003.

MELO, M. G. D., ARAÚJO, A. A. S., ROCHA, C. P. L., ALMEIDA, E. M. S. A., SIQUEIRA, R. S., BONJARDIM, L. R., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Purification, Physicochemical Properties, Thermal Analysis and Antinociceptive Effect of Atranorin Extracted from *Cladonia kalbii*. **Biological & Pharmaceutical**, v. 31, n. 10, p. 1977-1980, 2008.

MENEZES, E. L. M., SILVA, M. J. **A enfermagem no tratamento dos queimados**. São Paulo: EPU, 1988.

MONDRAGON, P. Tratamiento de las quemaduras. **Boletim Médico Hospital Infantil México**, v. 56, p. 459-70, 1999.

MORIMOTO, N.; SASO, Y.; TOMIHATA, K.; TAIRA, T.; TAKAHASHI, Y.; OHTA, M.; SUZUKI, S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. **Journal of Surgical Research**, v. 125, n. 1, p. 56-67, 2005.

MOURÃO, S. C., COSTA, P. I., SALGADO, H. R. N., GREMIÃO, M. P. D. Improved of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **International Journal Pharmaceutics**. v. 295, p. 157-162, 2005.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, 2008.

NARINE, K., WEVER, D. O., VALCKENBORGH, V. V. D., FRANCOIS, K., BRACKE, M., SMET, D. S., MAREEL, M., NOOTEN, V. G. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 10, p. 2707-16, 2006.

NETTO, B. D. M., SCHWEGLER, A. C., LIMA, A. A., SCUR, E. M. Avaliação de mastócitos da mucosa intestinal de ratos submetidos à ingestão de ácidos graxos insaturados. **Revista Brasileira de Nutrição**, v 22, n. 3, p. 230-236, 2007.

NICOLOSI, J. G., MORAES, A. M. **Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: Estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados**. VI Cobeq. 2005.

NIMNI, M. E., CHEUNG, D., STRATES, B., KODAMA, M., SHEIKH, K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **Journal of Biomedical**, v. 21, p. 741-771, 1987.

ODABASOGLU, F., CAKIR, A., SULEYMAN, H., ASLAN, A., BAYIR, Y., HALICI, M., KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. p. 103, 59–65, 2006.

OLIVEIRA, K. C., PENHA, C. M., MACEDO, J. M. Perfil epidemiológico de crianças vítimas de queimaduras. **Arq Med.** v. 32, p. 55-8, 2007.

OGAWA, A. C., PLEPIS, A. M. G. Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. **Polímeros.** V. 12, n. 2, 2002.

ONG, C. T., KHOO, Y. T., TAN, E. K., MUKHOPADHYAY, A., DO, D. V., HAN, H. C., LIM, I. J. Epithelial-mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion. **Journal Pathology.** v. 211, n. 1, p. 95-108, 2007.

PAIVA, M. B. G. **Massagem terapêutica em vítimas de queimaduras.** Associação Fluminense de Reabilitação. Niterói, 2001.

PERRY, N. B., BENN, M. H., BRENNAN, N. J., BURGESS, E. J., ELLISS, G., GALLOWAY, D. J., LORIMER, S. D., TANGNEY, R. S. Antimicrobial, Antiviral and cytotoxic activity of New Zealand Lichens. **Lichenologist.** v.31, p. 627-636, 1999.

REED, R., HOLMES, D., WEYERS, J, JONES, A. J., **Practical Skills in Biomolecular Sciences**, Ed. Prentice Hall, 1998.

RIBEIRO-COSTA, R. M., ALVES, A. J., SANTOS, N. P., NASCIMENTO, S. C., GONÇALVES, E. C. P., SILVA, N. H., HONDA, N. K., SANTOS-MAGALHÃES, N. S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Jornal of microencapsulation**, v. 21, p. 371-384, 2004.

ROCHA, J. A. M., OLIVEIRA, R. G., FARIAS, R. E., ANDRADE, L. C. R., AERESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia de laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Brazilian Dermatology.** v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

RUSSO, A. C. **Considerações gerais sobre queimaduras.** São Paulo. 1: 216-220, 1994.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 55, p. 1595-1611, 2003.

SAENZ, M. T., GARCIA, M. D., ROWE, J. G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. **Fitoterapia**. v. 77, p. 156–159, 2006.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1181-1185, 2002.

SEHN, E., HERNANDES, L., FRANCO, S. L., GONÇALVES, C. C. M., BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation using cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 115-120, 2009.

SILVA, H. P. B. **Radiossensibilidade gama de Clandonia substellata Vainio (líquen) e o conseqüente efeito sobre rochas calcárias**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SINGER, A. J., CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738-746, 1999.

SIQUEIRA-MOURA, M. P., LIRA, M. C. B., SANTOS-MAGALHÃES, N. S., Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido usnico em lipossomas. **Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44,n. 4, 2008.

SMELTZER, S. C., HAIDAR, B. G. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

SRIVASTAVA, S., GORHAM, S. D., FRENCH, D. A., SHIVAS, A. A., COURTNEY, J. M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. **Biomaterials**. v. 11, p. 155-161, 1990.

SUMMER, G. J., ROMERO-SANDOVAL, E. A., BOGEN, O., DINA, O. A., KHASAR, S. G., LEVINE, J.D. Proinflammatory cytokines mediating burn-injury pain. **Pain**, v. 135 n. 1-2, p. 98-107, 2008.

TAKAI, M., UEHARA, Y., BEISLER, J.A. Usnic Acid Derivatives as Potential Antineoplastic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 11, 1979.

TENIUS, F.P., BIONDO-SIMÕES, M.L.P., IOSHII, S.O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 82, n. 2, p. 141-149, 2007.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Drug Discovery Reviews**. v. 4, p. 145-160, 2005.

ÜLKÜR, E., ONCUL, O., KARAGOZ, H., YENIZ, E., ÇELİKÖZ, B. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat™), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass®), and fusidic acid 2% (Fucidin®) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant Staphylococci-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. **Burns**. v. 31, n. 7, p. 874-877, 2005.

VERMA, R. K., GARG, S., Current status of drugs delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology**, v. 25, p. 1-14, 2001.

VIEIRA, D. C. **Estudos da liberação da rolitetraciclina suportada em gel injetável de colágeno aniônico ransana**. 1997, **Dissertação (Mestrado)**- Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIJAUAKUMAR, C. S., VISWANATHAN, S., REDDY, M. K., PARVATHAVARTHINI, S., KUNDU, A. B., SUKUMAR, E. Anti- inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**. v. 71, p. 564-566, 2000.

WECKESSER, S., SIMON-HAARHAUS, B., WITTMER, A., PELZ, K., SCHEMPP, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**. v. 14, p. 508–516, 2007.

WHITING, W. C., ZERNICKE, R. F. **Biomecânica da Lesão Musculoesquelética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 18-29p.

XIONG, X-B., HUANG, Y., LU, W-L., ZHANG, X., ZHANG, H., NAGAI, T., ZHANG, Q. Enhanced intracellular delivery and improved antitumoral efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic. **Jornal of Controlled Release**, v. 107, p. 262-275, 2005.

YAMATOIGI, R. S., RAHAL, S. C., GRANJEIRO, J. M., TAGA, R., CESTARI, T. M., LIMA, A. F. M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 35, n. 4, p. 837-842, 2005.

YONG, L. L., KHOR, E., LOKE, W. K., LAU, S. K., SUM, C. K. J. **Journal Biomedical Materials**. v. 53, n. 1, p. 8–17, 2001.

ZANASI, S. J., FILHO, G. V. P., TELERMAN, R., CLARO, F. D., POSSARI, E., RSTOM, S. A. Queimadura solar de terceiro grau no idoso. **Arq Med ABC**. v. 32, n. 1, p. 34-7, 2007.

ANEXO I

ANEXO II

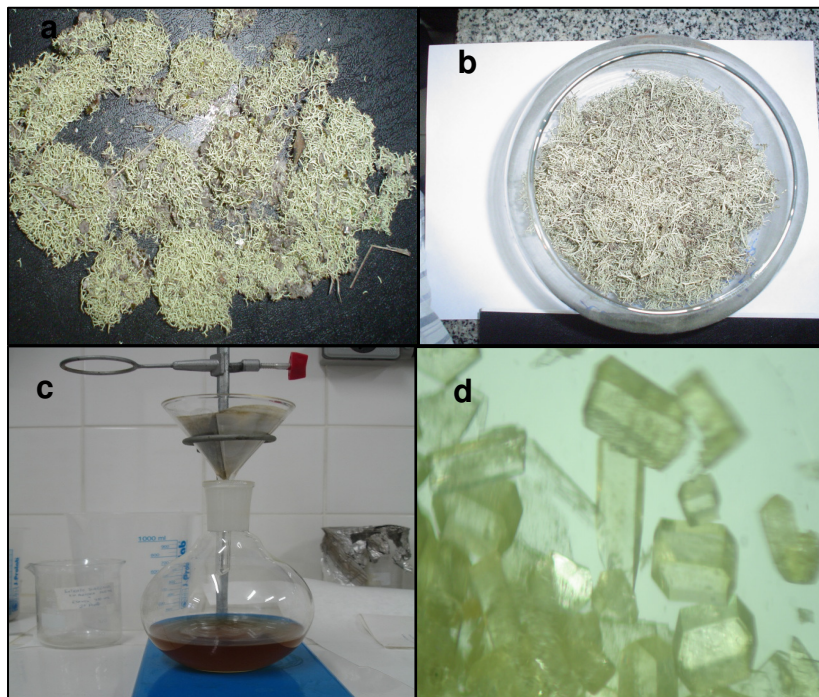


Figura 1. (a) Limpeza do talo líquênico da *Cladonia substellata* (b) maceração (c) filtração (d) cristais de ácido úsnico com alta pureza.

ANEXO III

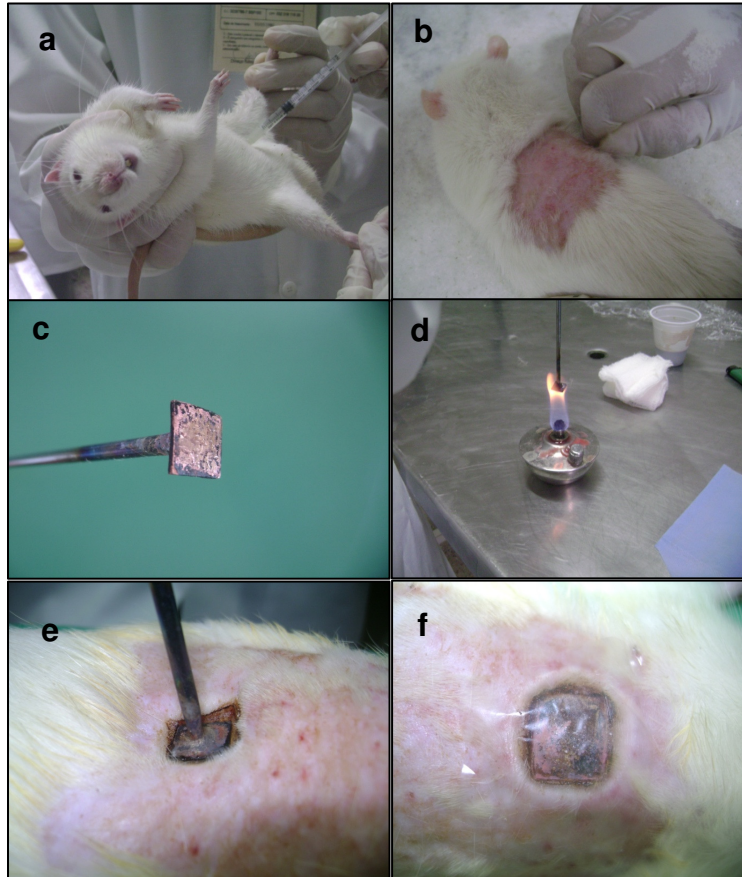


Figura 1. Etapas dos procedimentos metodológicos. (a) Anestesia (b) Tricotomia manual (c) instrumento confeccionado para indução da queimadura (d) aquecimento do instrumento no Bico de Bunsen (e) procedimento de indução da queimadura (f) área de necrose coagulativa no dorso do animal após a realização da queimadura e recobrimento com a membrana.

ANEXO IV

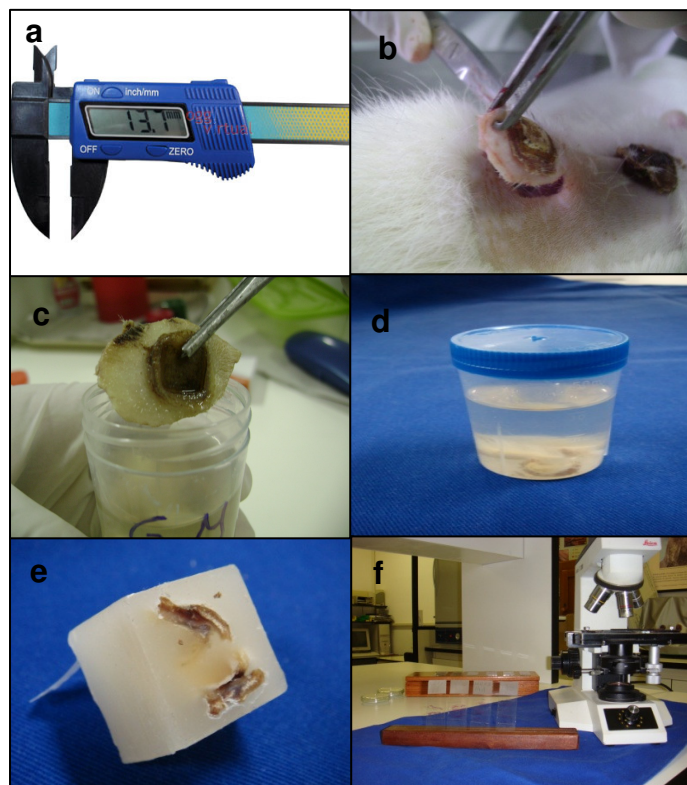


Figura 1. (a) Paquímetro digital para medir a área cicatricial (b) remoção dos espécimes (c) e (d) acondicionamento em frasco plástico contendo formol a 10% (e) inclusão dos espécimes na parafina (f) cortes histológicas para coloração e leitura das lâminas.

ANEXO V

Tabela 1. Exemplo da tipagem (categorização morfológica) da reação inflamatória. Análise quantitativa das diferentes células inflamatórias individualmente. (+1) fenótipo celular estudado correspondeu a menos de 10% do total de células inflamatórias sediadas na área da queimadura; (+2) quando o fenótipo celular estudado correspondeu a mais de 10% e menos de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da queimadura; (+3) quando o fenótipo celular estudado correspondeu a mais de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da queimadura.

Tempo	Grupos	Intensidade da Reação Inflamatória				
		R1	R2	R3	R4	R5
7 dias	COL	+3	+3	+3	+3	+3
7 dias	PHO	+3	+3	+2	+3	+3
7 dias	UAL	+3	+3	+3	+3	+3
14 dia	COL	+3	+2	+2	+3	+3
14 dias	PHO	+3	+2	+2	+2	+3
14 dias	UAL	+2	+2	+2	+2	+3
21 dias	COL	+2	+3	+2	+1	+2
21 dias	PHO	+2	+2	+2	+1	+2
21 dias	UAL	+1	+1	+2	+1	+2