



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO, ADESÃO E
ESTABILIDADE DE MEMBRANAS DE GELATINA
CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NA FORMA LIPOSSOMAL
PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

BRUNO DOS SANTOS LIMA

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO, ADESÃO E
ESTABILIDADE DE MEMBRANAS DE GELATINA
CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NA FORMA LIPOSSOMAL
PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

BRUNO DOS SANTOS LIMA

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências da Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. PhD. Adriano Antunes de Souza Araújo

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2017

LIMA/ BRUNO
DOS SANTOS

ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO, ADESÃO E ESTABILIDADE DE
MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NA FORMA
LIPOSSOMAL PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

2017

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

Lima, Bruno dos Santos

L732e Estudos de liberação, permeação, adesão e estabilidade de membranas de gelatina contendo ácido úsnico na forma lipossomal para o tratamento de queimaduras / Bruno dos Santos Lima ; orientador Adriano Antunes de Souza Araújo. – São Cristóvão, 2017.

88 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Farmácia. 2. Queimaduras. 3. Polímeros. 4. Ácido úsnico. I. Araújo, Adriano Antunes de Souza. II. Título.

CDU 615.12:616.5-001.17

BRUNO DOS SANTOS LIMA

ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO, ADESÃO E
ESTABILIDADE DE MEMBRANAS DE GELATINA
CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO NA FORMA LIPOSSOMAL
PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências da Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____

Orientador: Prof. PhD. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Prof. Dra. Francilene Amaral da Silva

2º Examinador: Prof. PhD. Danilo César Galindo Bedor

PARECER

DEDICATÓRIA

À minha mãe... “Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo: minha mãe.” (Abraham Lincoln)

AGRADECIMENTOS

Mais um ciclo em minha vida acadêmica chega ao fim! Mestrado em ciências farmacêuticas! Obrigado, Deus! Obrigado por todas as bênçãos e oportunidades! Agradeço do fundo do coração a minha mãe, Silvaneide, que nunca mediu esforços para que essa conquista tornasse realidade. Obrigado por toda dedicação, amor e carinho! Essa conquista é para a senhora! Te amo! Agradeço a minha namorada, Hoany, por todo amor, apoio e companheirismo durante toda essa etapa. Te amo!

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Adriano Antunes, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos transmitidos e por ser um exemplo de profissional. Agradeço a minha co-orientadora Paula Menezes, por toda ajuda e disponibilidade em contribuir com meu trabalho em todas as etapas (Do processo seletivo até a dissertação). Às professoras Paula Nunes, Francilene e Mairim por todas contribuições e avaliações para com meu trabalho, as quais levarei para minha vida acadêmica!

Agradeço aos meus colegas do LeFT, por toda ajuda e parceria científica. Obrigado Ana Maria, Anny, Bruna, Caio, Clara, Dayanne, Eloísa, Gabi, Graça, Guilherme, Jamily, Igor, Isabella, Isla, Lee, Lívia, Luciana, Marília, Saran, Valléria, Tati e Yasmim. Desejo todo sucesso para vocês. À turma de mestrado 2016.1 do PPGCF-UFS pelo apoio e diversão durante as aulas e seminários da vida. À todos que fazem parte do PPGCF-UFS, principalmente André e Cristiani, por sempre me ajudarem e tirarem minhas dúvidas (que não foram poucas).

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação. À todos os colaboradores (universidades, laboratórios, professores e alunos). À CAPES, pelo financiamento, através da bolsa de mestrado. Agora, que venha o doutorado! Vamos em frente, sempre em frente!

RESUMO

Estudos de liberação, permeação, adesão e estabilidade de membranas de gelatina contendo ácido úsnico na forma lipossomal para o tratamento de queimaduras. Bruno dos Santos Lima, 2017.

As queimaduras são lesões na pele que geralmente são causadas por acidentes térmicos e o tratamento dessa enfermidade é considerado um grande desafio, devido a quantidade de complicações que podem causar. Dessa forma, é necessário buscar alternativas que otimizem o tratamento das lesões causadas por queimaduras, como por exemplo, o uso de membranas bioativas. O ácido úsnico (AU) é uma substância que apresenta potencial para o tratamento de queimaduras. No entanto, esse composto apresenta algumas características físico-químicas desfavoráveis, como a baixa solubilidade em água. Uma das maneiras de estabilizar essa situação é através da utilização do AU encapsulado em lipossoma, combinado com uma membrana de gelatina. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi preparar e caracterizar membranas de gelatina contendo AU incorporado em lipossomas para o tratamento de queimaduras. As membranas foram preparadas de acordo com método de *casting* e os lipossomas pela técnica de rotaevaporação do solvente. Após a obtenção, a capacidade de intumescimento das membranas foi avaliada. Um método analítico foi desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual, foi utilizado para determinar o teor e a eficiência de encapsulação do AU nas membranas. Estudos de liberação *in vitro*, permeação e adesão do AU nas camadas da pele foram realizados através de células de Franz, seguidos da avaliação da estabilidade e fotoestabilidade da formulação. Macroscopicamente, as membranas de gelatina apresentaram coloração levemente amarelada, superfície lisa e capacidade de intumescimento em tampão fosfato (pH 7,4) e soro fisiológico. O método desenvolvido por CLAE, mostrou-se eficaz para identificação e quantificação do AU e todos os parâmetros utilizados para a validação apresentaram resultados adequados de acordo com a legislação vigente (RE 899 – ANVISA, 2003). O teor de AU nas membranas foi de $172,07 \pm 0,27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, obtendo eficiência de encapsulação de 93,75%. Os experimentos de liberação *in vitro* demonstraram que as membranas de gelatina contendo AU na forma lipossomal apresentaram um perfil de liberação controlado, liberando 98,15% ($41,37 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) do AU em 24 horas de análise. O AU apresenta capacidade de penetrar e permear nas camadas da pele, pois, foi quantificado na epiderme ($3,54 \pm 0,79 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e na derme ($13,64 \pm 0,17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), respectivamente, bem como, possui capacidade de adesão, uma vez que, permaneceram aderidos na pele após a lavagem da formulação com solução salina (epiderme: $2,32 \pm 0,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; derme: $8,87 \pm 0,56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). As membranas apresentaram estabilidade à variações térmicas e a exposição à luz, pois não demonstraram alterações nas características macroscópicas e/ou diminuição significativa do teor do AU. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que as membranas de gelatina contendo AU na forma lipossomal é uma formulação promissora para o tratamento de queimaduras, pois apresentam capacidade de controlar a liberação do AU e apresentam estabilidade adequada, além do fato, que o AU apresenta capacidade de penetrar, permear e de aderir-se nas camadas da pele.

Palavras-chave: Queimaduras, biomateriais, gelatina, ácido úsnico, lipossomas.

ABSTRACT

Studies of release, permeation, adhesion and stability of gelatin membranes containing usnic acid incorporated into liposomes for the burns treatment. Bruno dos Santos Lima, 2017.

Burns are injuries in the skin that are usually caused by thermal accidents and the treatment of this disease is considered a great challenge due the amount of complications that are caused. Therefore, is necessary to look for alternatives that optimize the treatment of injuries caused by burns such as the use of bioactive membranes. Usnic acid (UA) is a substance that has potential for the burns treatment. However, this compound presents some unfavorable physical-chemical characteristics, such as low solubility in water. One way to stabilize this situation is through the use of AU encapsulated in liposome and combined with a gelatin membrane. Therefore, the purpose of this work was to prepare and characterize gelatin membranes containing AU incorporated in liposomes to the burns treatment. The membranes were prepared according with the casting method and the liposomes by the solvent rotavaporation technique. After obtaining, the swelling capacity of the membranes was evaluated. The analytical method was developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC), which was used to determine the content and encapsulation efficiency of UA in the membranes. *In vitro* release studies, permeation and adhesion of UA to skin layers were performed by Franz cells, and after, the stability and photostability of formulation was evaluated. Macroscopically, gelatin membranes showed yellowish color, smooth surface and swelling capacity in phosphate buffer (pH 7.4) and saline solution. The method developed by HPLC was effective to the identification and quantification of UA and all parameters used for validation showed suitable results according with the current legislation (RDC 899 – ANVISA, 2003). The UA content in the membranes was $172.07 \pm 0.27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, obtaining encapsulation efficiency of 93.75%. The *in vitro* release experiments demonstrated that the gelatin membranes containing UA in liposomes showed a controlled release profile, releasing 98.15% ($41.37 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) of the UA in 24 hours of analysis. The UA has the ability to penetrate and permeate in the skin layers because it was quantified in the epidermis ($3.54 \pm 0.79 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and dermis ($13.64 \pm 0.17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) respectively, as well as, it has adhesion capacity, because it remained adhered to the skin after washing the formulation with saline solution (epidermis: $2.32 \pm 0.95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; dermis: $8.87 \pm 0.56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). The membranes showed stability to thermal variations and light exposure, because they didn't show changes in the macroscopic characteristics and /or significant decrease in the UA content. According with the results obtained, we can conclude that gelatin membranes containing AU in liposomes are a promising formulation for the burns treatment, because they have the capacity to release control of UA and showed adequate stability, besides the fact that AU has the ability to penetrate, permeate and adhere in the skin layers.

Keywords: Burns, biomaterials, gelatin, usnic acid, liposomes.

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. Revisão da Literatura	20
3.1. Pele	20
3.2. Queimaduras.....	23
3.3. Cicatrização	26
3.4. Produtos tecnológicos usados para o tratamento de queimaduras.....	28
3.5. Biomateriais	30
3.6. Gelatina.....	34
3.7. Ácido úsnico.....	35
3.8. Lipossomas	38
4. Material e métodos	43
4.1. Material	43
4.2. Preparo das membranas.....	43
4.3. Ensaio de intumescimento	44
4.4. Desenvolvimento e validação do método analítico para a identificação e quantificação do AU por CLAE.....	45
4.4.1. Linearidade	45
4.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
4.4.3. Precisão.....	46
4.4.4. Exatidão.....	46
4.4.5. Robustez.....	47
4.5. Teor e eficiência de encapsulação do AU nas Memb/AU/Lip.....	47
4.6. Uniformidade de conteúdo do AU nas Memb/AU/Lip	48
4.7. Estudos de liberação <i>in vitro</i> do AU	48
4.8. Absorção transdérmica do AU	49
4.8.1. Preparo da pele	49
4.8.2. Permeação <i>in vitro</i> do AU nas camadas da pele	49
4.9. Ensaio de lavabilidade	50

4.10. Estudo piloto de estabilidade	51
4.11. Estudo piloto de fotoestabilidade	51
4.12. Análises estatísticas.....	51
5. Resultados e discussão.....	52
5.1. Obtenção das Memb/AU/Lip	52
5.2. Capacidade de intumescimento das Memb/AU/Lip.....	53
5.3. Desenvolvimento e validação do método por CLAE	55
5.4. Eficiência de encapsulação do AU nas Memb/AU/Lip	60
5.5. Uniformidade de conteúdo do AU nas Memb/AU/Lip	61
5.6. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AU	62
5.7. Estudos de penetração/permeação <i>in vitro</i> do AU	65
5.8. Adesão do AU nas camadas da pele	66
5.9. Estudo piloto de estabilidade das membranas.....	69
5.10. Estudo piloto de fotoestabilidade das membranas	73
6. Conclusão	76
7. Referências	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da pele.	21
Figura 2	Representação esquemática dos tipos de queimaduras na pele.	25
Figura 3	Estrutura química do AU ($C_{18}H_{16}O_7$; massa molar: 344,31 g/mol).	36
Figura 4	A: Estrutura básica dos lipossomas. B: Representação esquemática da incorporação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos nos lipossomas.	39
Figura 5	Classificação dos tipos de lipossomas.	41
Figura 6	Memb/AU/Lip obtida pelo método de <i>casting</i> após a secagem.	52
Figura 7	Perfil de intumescimento das Memb/AU/Lip em tampão fosfato (pH 7,4) e soro fisiológico. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão (n= 3) das análises.	54
Figura 8	A: Cromatograma do AU padrão obtido por CLAE (280 nm). B: Perfil cromatográfico do AU extraído das membranas obtido por CLAE (280 nm).	56
Figura 9	Curva de calibração do AU padrão na faixa de concentração de 5 – 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.	57
Figura 10	Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AU nas Memb/AU/Lip e Memb/AU. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão (n= 6) das análises.	64
Figura 11	Perfil de penetração e permeação do AU nas camadas da pele. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão (n= 6) das análises.	65
Figura 12	Porcentagem de AU retida nas Memb/AU/Lip e/ou na pele após às 4 horas de lavagem. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão (n= 6) das análises.	67

- Figura 13 Perfil de adesão do AU nas camadas da pele. *** ($p < 0,0001$). 68
Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 6$) das análises.
- Figura 14 Perfil do estudo de estabilidade das membranas sob 70
refrigeração (5 ± 2 °C) durante 120 dias. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 3$) das análises.
- Figura 15 Perfil do estudo de estabilidade das membranas sob 70
temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 120 dias. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 3$) das análises.
- Figura 16 Perfil do estudo de estabilidade das membranas 71
acondicionadas em estufa (45 ± 2 °C) durante 120 dias. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 3$) das análises.
- Figura 17 Perfil do estudo de fotoestabilidade das membranas durante a 74
exposição à luz nos intervalos de tempo de 0 – 72 horas. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 3$) das análises.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) da validação do AU.	58
Tabela 2	Teste de recuperação do AU em diferentes concentrações.	59
Tabela 3	Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e EE (%) do AU nas Memb/AU/Lip.	60
Tabela 4	Distribuição do AU nas Memb/AU/Lip.	62
Tabela 5	Teor médio (n= 3) do AU nas frações das Memb/AU/Lip e Memb/AU nos intervalos de tempo dos estudos de estabilidade.	72
Tabela 6	Teor médio (n= 3) de AU nas frações das Memb/AU/Lip e Memb/AU nos intervalos de tempo dos estudos de fotoestabilidade.	74

LISTA DE NOMENCLATURAS

µg: Massa em microgramas;
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
AU: Ácido úsnico;
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
DP: Desvio padrão;
DPR: Desvio padrão relativo;
EE: Eficiência de encapsulação;
FDA: *Food and Drug Administration*;
g: Massa em gramas;
GRAS: *Generally Regarded As Safe*;
LD: limite de detecção;
LQ: limite de quantificação;
LUV: Vesículas unilamelar grande;
Memb/AU/Lip: Membranas de gelatina contendo AU incorporado em lipossomas;
Memb/AU: Membranas de gelatina contendo AU sem lipossomas;
mg: Massa em miligramas;
mL: Volume em mililitros;
MLV: Vesículas multilamelar;
nm: Nanômetro
PTFE: Politetrafluoretileno;
SUV: Vesículas unilamelar pequena;
TR: Tempo de retenção;
UV: Ultravioleta.

1. Introdução

As queimaduras são feridas traumáticas que são causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. Atuam nos tecidos de revestimento do corpo humano, ocasionando a destruição parcial ou total da pele e seus anexos, podendo atingir camadas mais profundas, como o tecido celular subcutâneo, músculos e ossos (LIMA JÚNIOR et al., 2008). No Brasil, a estimativa é que ocorram aproximadamente 1 milhão de acidentes com queimaduras por ano, sendo que 100 mil pacientes procuram atendimento hospitalar e destes, cerca de 2,5 mil morrem por razão direta ou indireta de suas lesões (RICCI et al., 2015).

No geral, a incidência de queimaduras está reduzindo nos últimos anos, devido ao aumento da prevenção por parte da população, tanto em casa e nos locais de trabalho. Conseqüentemente, a taxa global de mortalidade de queimaduras diminuiu em cerca de 30% devido aos avanços no manejo das queimaduras agudas e novas técnicas de controle à sepse (principal causa de mortalidade após esse tipo de lesão) (RAFLA; TREDGET, 2011).

Os aspectos sociais e econômicos devem ser levados em consideração para o tratamento de pacientes acometidos por queimaduras, pois podem apresentar efeitos negativos, levando a perda da qualidade de vida e diminuição da produtividade dos pacientes (SEM; PALMIERI; GREENHALGH; 2015). O tratamento para as lesões dérmicas causadas por queimaduras abrange processos que objetivam combater as infecções, o alívio da dor, o tempo para o reparo cicatricial completo e a qualidade da cicatriz, a qual, pode gerar resultados físicos e psicológicos desagradáveis (ONO et al., 2015).

Dentre os procedimentos terapêuticos utilizados para o tratamento de queimaduras, destacam-se o uso de formulações farmacêuticas derivadas da sulfadiazina de prata (HERMANS, 2007; SERAFINI et al., 2014). Porém, dependendo da situação, opta-se pelo uso de cirurgias e outras técnicas, como o “*laser terapêutico*”. No entanto, esses processos são minuciosamente longos, de alto custo e muitas vezes resultam em cicatrizes e danos na pele que deverão ser tratados através de novas terapias após esses procedimentos. Diante disso, a busca por novas alternativas para o desenvolvimento de formulações com ação

anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante, tornou-se crescente entre pesquisadores em todo o mundo (ONO et al., 2015).

Uma dessas alternativas, é o uso de biomateriais, que surgem como uma ferramenta promissora para o tratamento de lesões causadas por queimaduras, pois apresentam diversas vantagens, tais como: são biodegradáveis, apresentam baixo custo e podem ser utilizados em tecidos biológicos para avaliar, aumentar ou substituir tecidos ou exercer uma determinada função no organismo (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; DAS; BAKER, 2016). Dentre os biomateriais, membranas sintéticas de gelatina, demonstram potencial para o tratamento de queimaduras, pois apresentam propriedades mecânicas adequadas, capacidade de promover e acelerar a granulação e epitelização da pele, além de permitir a liberação gradual de fármacos em tecidos alvos (DANTAS et al., 2011; NUNES et al., 2016).

Diante do exposto, existe um crescente interesse em estudos, que avaliam a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais, com ênfase para os derivados de polímeros, como a gelatina. Dentre os produtos naturais, destaca-se o ácido úsnico (AU), um metabólito secundário extraído do líquen *Cladonia substellata* Vainio, que apresenta diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, como por exemplo: atividade anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR et al., 2000), antibacteriana (KARABACAK; TAYA; KIVANÇ, 2014; MARTINELLI et al., 2014), antioxidante (RABELO et al., 2012) e cicatrizante (NUNES et al., 2016).

De acordo com os exemplos citados, pode-se inferir que as atividades descritas até o presente momento para o AU, tornam esse composto uma matéria-prima promissora para futuras investigações. Entretanto, o AU possui limitações quanto a sua solubilidade e estabilidade, que podem reduzir os seus efeitos farmacológicos. No entanto, é possível contornar a baixa solubilidade em água e melhorar as características físico-químicas de fármacos, através da sua encapsulação em nanopartículas (CONTRI et al., 2014).

Dentre os sistemas nanoestruturados, podemos destacar os lipossomas, os quais, são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas

orientadas em torno de um compartimento aquoso. A sua estrutura é semelhante a membrana celular, em termos de hidrofiliidade e lipofiliidade, sendo assim, são adequados como carreadores de fármacos e moléculas insolúveis em água. Os lipossomas são capazes de controlar a liberação, reduzir a toxicidade e melhorar a biodisponibilidade de fármacos, além de serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos. Desse forma, estes nanossistemas são versáteis e comprovadamente atóxicos, sendo candidatos seguros para administração de produtos farmacêuticos (HUANGA et al., 2014; NUNES et al., 2016; PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstraram o efeito de membranas de colágeno contendo AU incorporados em lipossomas no tratamento de queimaduras em ratos. As membranas foram caracterizadas e avaliadas quanto aos efeitos sobre o processo de reparo cicatricial e concluiu-se que as membranas promoveram a aceleração da cicatrização da pele (NUNES et al., 2011). Outros estudos, avaliaram as propriedades mecânicas e físico-químicas de membranas de gelatina contendo AU em lipossomas, utilizando técnicas de análise estrutural, térmica e morfológica, além da adição de nanopartículas de prata para a realização de ensaios microbiológicos (MENEZES, 2013; TEIXEIRA, 2016).

Apesar do desenvolvimento das análises citadas anteriormente, nenhum estudo relacionado com a quantificação do AU nas membranas de gelatina foi realizado, bem como, estudos de liberação, permeação e adesão nas camadas pele e estabilidade das formulações. Esses testes são de grande importância, pois os resultados obtidos dessas análises, juntamente com os testes de caracterização físico-química e ensaios clínicos comprovarão a eficácia da formulação para o tratamento de queimaduras. De acordo com o que fora apresentado, este trabalho teve como objetivo preparar e avaliar o teor, perfil de liberação, permeação, adesão e estabilidade de membranas de gelatina contendo AU incorporados em lipossomas para o tratamento de queimaduras.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o teor, liberação, permeação, adesão *in vitro* nas camadas da pele e a estabilidade de membranas de gelatina contendo AU na forma lipossomal.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar membranas de gelatina contendo AU incorporados em lipossomas;
- Avaliar a capacidade de intumescimento das membranas;
- Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificação e quantificação do AU;
- Determinar o teor, eficiência de encapsulação e uniformidade de distribuição do AU nas membranas;
- Analisar o perfil de liberação *in vitro* do AU;
- Verificar a permeação cutânea *in vitro* e adesão do AU nas camadas da pele;
- Avaliar a estabilidade e a fotoestabilidade da formulação.

3. Revisão da Literatura

3.1. Pele

A pele desempenha um papel crucial na manutenção da vida através da regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico. Atua como barreira mecânica protegendo os componentes internos dos agentes nocivos do meio externo, sendo responsável pela regulação térmica do corpo e armazenamento de gordura, além de controlar o fluxo sanguíneo e as funções sensoriais, tais como: frio, calor, odor, tato, pressão e dor (NAWAZ; BENTLEY, 2011). Quando esta barreira é interrompida devido à lesões como queimaduras, essas funções não são mais adequadamente realizadas. Dessa forma, é imprescindível manter sua integridade de maneira eficaz e em casos de traumas ou lesões e restaura-la o mais rápido possível (WOLF et al., 2011).

De modo geral, a pele é constituída por três barreiras principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1). A epiderme é a camada que fica em contato com o meio exterior, é fina e avascular, representando a barreira fisiológica de proteção. A derme é a camada abaixo da epiderme, caracterizada por ser altamente vascularizada, além de contribuir na elasticidade, coesão e termorregulação da pele. A hipoderme é a camada mais profunda da pele e assume funções de proteção e reserva energética. Além disso, a pele apresenta subestruturas anexas essenciais para a proteção e manutenção da homeostasia, tais como: a glândula sebácea e sudorípara responsáveis pela produção de sebo e sudorese, respectivamente e os pêlos e unhas que apresentam funções de proteção (COUTURAUD, 2009; RHEIN; PEOPLES; WOLF, 2009).

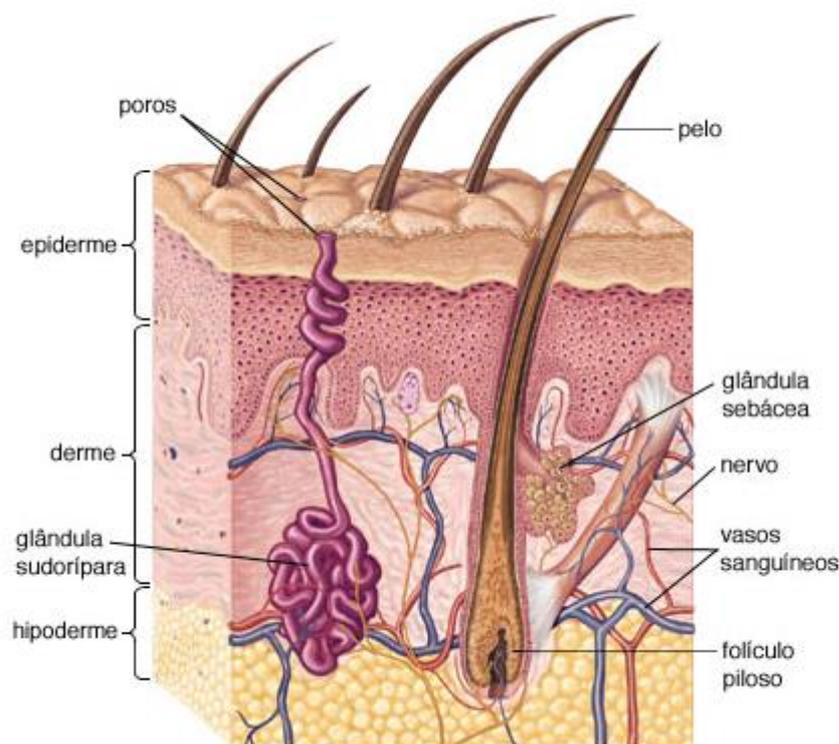


Figura 1: Representação esquemática da pele.

Fonte: Disponível em: <<http://escola.britannica.com.br/assembly/135568/A-pele-humana-tem-tres-camadas-a-epiderme-a-derme>>. Acesso em: 22 de novembro de 2016.

Na epiderme ocorre a migração celular das subcamadas mais internas para as mais superficiais, em um processo conhecido como queratinização. Esta camada forma-se a partir de sua fronteira com a derme, local definido como junção dermo-epidérmica. A epiderme, de maneira mais específica, é dividida em diferentes subcamadas, sendo que a primeira é denominada como estrato basal, seguida do estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e por fim, o estrato córneo (LORENCINI et al., 2014).

O estrato basal, a subcamada mais profunda da epiderme, é composta por células-tronco que originarão os queratinócitos e melanócitos, os quais produzem queratina e melanina, respectivamente. A queratina é uma proteína estrutural que proporciona resistência à pele e à melanina, que é o pigmento responsável pela cor

da pele e proteção contra a radiação ultravioleta. Além disso, o estrato basal também é constituído pelas células de Langerhans e de Merkel, que possuem papel importante para a barreira imunológica da pele e na percepção sensorial. A atividade germinativa da camada basal é muito alta, proporcionando a migração dos queratinócitos para as camadas superiores. Nessas camadas, os queratinócitos, tornam-se achatados, acumulam queratina, desidratam-se, perdem os núcleos e morrem, alcançando o estado máximo da diferenciação celular, no qual são denominados de corneócitos (RHEIN; PEOPLES; WOLF, 2009; LORENCINI et al., 2014).

Os corneócitos compõem o estrato córneo da epiderme, uma subcamada de células queratinizadas mortas que conferem rigidez à superfície da pele e dificultam a sua permeabilidade, além de serem a primeira camada exposta à fármacos e produtos cosméticos. O estrato córneo também se apresenta como uma barreira eficiente contra raios ultravioleta, calor, frio, microrganismos, produtos químicos e forças mecânicas. A hidratação adequada do estrato córneo é de grande importância para que ele descame apropriadamente. O fator de umectação/hidratação natural da pele é composto por lactato, aminoácidos formados a partir da quebra de filagrina, ácido carboxílico da pirrolidona (PCA), ácido urocânico, sais inorgânicos, açúcares e uréia. Então, quando os corneócitos atingem a porção mais externa do estrato córneo, sofrem descamação. Em uma epiderme saudável, há um equilíbrio entre os processos de proliferação e descamação o que resulta em um ciclo completo de renovação em um período de 28 dias (BARONI et al., 2012, LORENCINI et al., 2014; WICKETT; VISSCHER, 2015).

A derme é uma camada espessa de tecido conjuntivo abaixo da epiderme, é vascularizada, enervada e nela estão presentes as glândulas sudoríparas e os folículos pilosos com suas glândulas sebáceas. As células mais comuns da derme são os fibroblastos que são responsáveis pela síntese de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, que conferem propriedade viscoelástica a essa camada (RHEIN; PEOPLES; WOLF, 2009). O colágeno é a principal proteína fibrosa insolúvel encontrada no tecido conjuntivo e na matriz extracelular dérmica,

fornecendo à pele força e resistência. A elastina compõe as fibras elásticas da pele, conferindo-lhe elasticidade (POON; KANG; CHIEN, 2015).

A matriz extracelular da derme é caracterizada pela presença de proteoglicanas e glicosaminoglicanas livres, como o ácido hialurônico e por mastócitos, que desempenham papel de proteção contra infecções. A presença de vasos sanguíneos na derme são de extrema importância, pois garantem o fornecimento de nutrientes e promovem a distribuição sistêmica de fármacos aplicados topicamente. As terminações nervosas (nervos sensitivos) presentes na derme são responsáveis pela determinação das propriedades sensoriais da pele. A derme está dividida em duas camadas: a camada papilar, que está em contato com a epiderme e é formada por tecido conjuntivo frouxo; e a camada reticular, a qual, é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam a presença das fibras colagenosas (RHEIN; PEOPLES; WOLF, 2009; LORENCINI et al., 2014).

A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais interna da pele, liga-se a derme através de expansões das fibras colágenas e elásticas e é constituída principalmente por células de gordura denominadas adipócitos (células que acumulam lipídios, como os triglicerídeos) e por mastócitos. A quantidade de células, de fibras, vascularização e inervação depende da região corporal. A hipoderme desempenha funções importantes para o corpo, como isolamento térmico e proteção mecânica do organismo as pressões e traumatismos externos, reservatório de gordura, além de sustentar e conferir mobilidade as camadas superiores da pele (COUTURAUD, 2009; RHEIN; PEOPLES; WOLF, 2009; LORENCINI et al., 2014).

3.2. Queimaduras

Os aspectos socioeconômicos são relevantes no tratamento de pacientes acometidos por queimaduras, pois os procedimentos terapêuticos necessitam de cobertura imediata para auxiliar na reparação, proteção contra infecções e restauração das funções normais da pele. O tratamento de queimaduras sempre foi um desafio, tanto pela sua gravidade, como pela multiplicidade de complicações que normalmente ocorrem. Apesar da existência de procedimentos médicos

avançados, o tratamento ainda pode ser um grande problema, uma vez que, durante esses procedimentos pode ocasionar a ativação de uma cascata pró-inflamatória predispondo o paciente a estados de sepse e falência múltiplas dos órgãos (ISERI et al., 2008; ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; SEN et al., 2015).

A queimadura é uma lesão na pele provocada geralmente pelo calor, mas também pode ser causada pelo frio, eletricidade, produtos químicos e radiações. A pele pode ser destruída parcialmente ou totalmente, atingindo desde os pêlos, até músculos e ossos. Em países ocidentais, os acidentes causados por chama e escaldadura, principalmente água quente e óleo, são as causas mais comuns. A queimadura se constitui em uma lesão dos tecidos vivos, a qual, varia desde uma pequena bolha até formas graves e capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à sua extensão e à sua profundidade (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; GHANIMÉ; RIZKALLAH; SAID, 2013).

As queimaduras podem gerar lesões traumáticas graves que levam à deformidades, invalidez e até a morte. Aproximadamente 195 mil mortes são atribuídas diretamente à queimaduras em todo o mundo e a maior parte delas (95%) ocorrem em países subdesenvolvidos, onde os programas de prevenção a queimaduras ainda são primários (WANG et al., 2015). Um estudo de revisão sobre tratamentos de queimaduras em países de média e baixa renda demonstrou que cerca de 80% dos países têm a capacidade de oferecer os cuidados iniciais básicos para toda a população. Porém, a minoria destes são capazes de fornecer tratamentos avançados (GUPTA et al., 2014).

De acordo com a gravidade e profundidade da lesão, as queimaduras podem ser classificadas em primeiro, segundo e terceiro grau (Figura 2). Quando apenas a epiderme é acometida, caracteriza a queimadura de primeiro grau ou superficial, apresentando eritema, dor intensa e vermelhidão. Porém, não há formação de bolhas e alterações hemodinâmicas, ocorre regeneração completa da pele e não deixam sequelas. As queimaduras de segundo grau são caracterizadas por serem lesões dérmicas com espessura parcial e apresentam flictenas, visando conter a perda de água e sais minerais. São divididas em superficiais e profundas (FERREIRA et al., 2003; NOWAK, 2012).

As superficiais são aquelas que envolvem a epiderme e a porção superficial da derme, sendo que as glândulas sebáceas e sudoríparas são conservadas. Os sintomas são semelhantes com os da queimadura de primeiro grau incluindo o aparecimento de bolhas, aparência úmida da lesão e não costumam deixar cicatriz no local. As profundas são aquelas que afetam quase toda a porção dérmica, sendo semelhantes às de terceiro grau. Há o risco de destruição das terminações nervosas da pele, porém são menos dolorosas que as superficiais. Nesse tipo de queimadura é comum o surgimento de cicatriz (FERREIRA et al., 2003; NOWAK, 2012).

Por fim, as queimaduras de terceiro grau, as quais, são caracterizadas por serem as mais profundas, acometem toda a derme e atingem o tecido subcutâneo, causando a destruição total de nervos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas, vasos sanguíneos e ainda podem alcançar músculos e estruturas ósseas. As lesões causadas por esse tipo de queimadura são esbranquiçadas, secas, indolores e levam a deformação da região afetada, que não se curam sem procedimentos cirúrgicos, necessitando de enxertos (NOWAK, 2012).

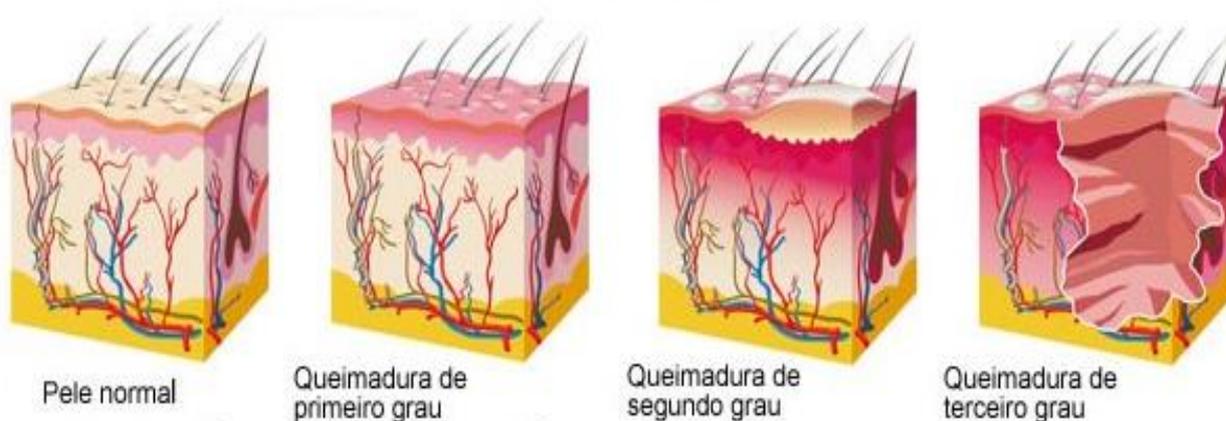


Figura 2: Representação esquemática dos tipos de queimaduras na pele.

Fonte: Disponível em: <<http://fuiacampar.com.br/primeiros-socorros-para-queimaduras/>> Acesso em: 22 de novembro de 2016.

Os tratamentos das queimaduras implicam não somente em cirurgias de enxertia de pele precoces, mas também em controlar e orientar a regeneração

cicatricial. Um dos recursos que está sendo utilizado para este fim é a utilização de *lasers* de baixa potência, que é uma técnica de fototerapia que envolve a aplicação de luz monocromática e corrente de baixa energia que apresenta capacidade para induzir a cicatrização de lesões na pele (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010). Todos os procedimentos voltados para o tratamento de queimaduras tem como objetivo evitar infecções por agentes externos, amenizar a dor e realizar o reparo cicatricial da lesão com eficácia e rapidez. Porém, a cicatriz continua a ser o maior problema para os centros de queimadura, contribuindo para resultados físicos e psicológicos negativos. Por isso, é de grande interesse a busca por novas formulações que possam ser usadas como agentes cicatrizantes e antimicrobianos, que atuem acelerando a dinâmica cicatricial, além de possibilitar um tratamento eficaz, de maior conforto e breve retorno à normalidade da vida do paciente (BRUNO et al., 2013; GHIEH et al., 2015; GEE KEE et al., 2015).

3.3. Cicatrização

A cicatrização de lesões cutâneas é um acontecimento fisiológico complexo concebido não só para restaurar a função mecânica da pele e sua homeostase, mas também para reduzir o risco de infecção e ainda mais complicações, como consequências sistêmicas (GAINZA et al., 2015). O reparo cicatricial é caracterizado por uma sequência de eventos biológicos que envolvem a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular em um processo dinâmico, harmônico e identificado pelo tipo de célula predominante (ZAMAN et al., 2011).

Cicatrização é um processo de restauração da integridade física interna e externa das estruturas do corpo e compreende complexas interações entre as células e vários outros fatores. É um processo dinâmico e complexo, composto de três fases: inflamação, proliferação e remodelação dos tecidos (SENGUPTA et al., 2015). A fase inflamatória ou exsudativa, inicia-se logo após a lesão e encerra no quarto ou quinto dia, incluindo as etapas de hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual, tendo como objetivo remover tecidos desvitalizados. Em resposta a agentes inflamatórios, ocorre a diminuição do fluxo sanguíneo pela vasoconstrição para prevenção de perda sanguínea. As plaquetas

ativam processos bioquímicos, liberam mediadores da inflamação, fatores de crescimento e glicoproteínas adesivas que constituem a matriz celular que auxiliam no recrutamento das células inflamatórias no reparo da lesão (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; ISAAC et al., 2010).

Após esse procedimento, neutrófilos, monócitos, macrófagos e plaquetas são atraídos para o local da lesão para realizar a fagocitose e degradação de colágeno e elastina. Nesta fase, o macrófago é a célula mais importante, pois estabiliza a ferida e realiza a limpeza da área lesionada por meio da fagocitose de bactérias e tecido necrosado, direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação e preparando a área para a próxima fase da reparação tecidual (ROCHA JR et al., 2006; ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; ISAAC et al., 2010).

A segunda fase do processo de cicatrização é a fase proliferativa, que é responsável pela formação do tecido de granulação e é dividida em três subfases: reepitelização, fibroplasia e angiogênese. Durante a reepitelização ocorre a migração de queratinócitos do leito da ferida e dos anexos epiteliais. A fibroplasia é a proliferação de fibroblastos, os quais produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, que são responsáveis pelo desbridamento (remoção de tecidos desvitalizados para preparar o leito da ferida para a cobertura definitiva) e remodelamento fisiológico. Os fibroblastos também são responsáveis pela produção de colágeno que conferem força e integridade ao tecido. A última etapa da fase proliferativa é a angiogênese que consiste na formação de novos vasos sanguíneos que darão suporte à formação da nova matriz, sendo essencial para a nutrição e a oxigenação do novo tecido que está sendo formado (MANDELBAUM; DISANTIS; MANDELBAUM, 2003; ROCHA JR et al., 2006; ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; ISAAC et al., 2010).

A última fase do processo é a de maturação ou remodelação, onde ocorre a substituição do colágeno tipo 3 pelo tipo 1, absorção de água e diminuição do número de vasos. É a fase mais longa da cicatrização, podendo durar meses ou anos. Durante essa fase, o tecido de granulação retrocede, o colágeno depositado se remodela e uma cicatriz com maior força de tensão se forma, devido ao cruzamento de diferentes padrões das fibras de colágeno, sendo este o

responsável pela força e integridade do reparo. Esses elementos extracelulares, principalmente o colágeno, comprimem de maneira mecânica as paredes recém-formadas e delicadas dos capilares sanguíneos, diminuindo o número de fibroblastos ativos e a formação de novos vasos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; ISAAC et al., 2010; BOATENG et al., 2015).

Devido à complexidade patológica e fisiológica do processo de cicatrização, a perfeita regeneração dos tecidos é difícil de ser alcançada. Portanto, é necessário a avaliação de novos tratamentos, bem como, o uso de novas estratégias relacionadas com a incorporação de fármacos sintéticos ou produtos naturais em sistemas versáteis, que promovam a aceleração do processo de reparo cicatricial de maneira eficaz e segura, além do fato que esses sistemas devem ser eficazes em todas as fases de cicatrização, visto que, cada fase apresenta uma característica.

3.4. Produtos tecnológicos usados para o tratamento de queimaduras

A sulfadiazina de prata na forma de cremes e/ou pomadas, bem como, impregnada em gazes é considerada o padrão ouro para o tratamento de queimaduras, pois é o produto mais utilizado no tratamento não cirúrgico dessa enfermidade, principalmente em casos de 1º grau e 2º grau superficial. No entanto, os produtos derivados dessa substância apresentam algumas limitações, como por exemplo, são formulações opacas e não biodegradáveis, necessitando de trocas diárias. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de novas formulações e produtos tecnológicos para o tratamento das lesões causadas por queimaduras (HERMANS, 2007; SERAFINI et al., 2014).

A busca por formulações que atuem acelerando a dinâmica cicatricial e possibilitando um tratamento eficaz que possam trazer maior conforto e breve retorno a qualidade da vida do paciente, tem sido cada vez maior. Vários materiais como o alginato, quitosana, colágeno, celulose, gelatina e formulações como os hidrogéis, hidrocolóides e películas transparentes são recomendadas como curativos passivos para feridas e queimaduras, devido à sua influência na resposta

celular local (WANG et al., 2012; JIN et al., 2013; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014). Alguns estudos relatam que várias formulações, como as citadas acima, apresentam capacidade de atuar na terapêutica da cicatrização de queimaduras, exibindo diferentes ações, tais como: angiogênese, inflamação, fibroplasia, epitelização e formação de colágeno (NUNES et al., 2011; KANOKPANONT et al., 2012; WANG et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2013).

Devido aos diferentes tipos de queimaduras e suas profundidades, produtos específicos que atendam às necessidades e à fisiologia de cada caso devem ser utilizados para tratar as consequências funcionais e estéticas das lesões. As crescentes pesquisas nesta área que tem como o objetivo aperfeiçoar os produtos usados como recurso terapêutico e o desenvolvimento de novos tratamentos com princípios naturais e sintéticos, estão melhorando o prognóstico dos pacientes queimados (DE MELO COSTA et al., 2015). Algumas patentes de produtos produzidos a partir de compostos naturais apresentam potencial para o tratamento de queimaduras, pois são capazes de acelerar o reparo tecidual, diminuir a dor e a inflamação, aumentar a síntese de fibroblastos e otimizar a regeneração da pele (SERAFINI et al., 2014; DE MELO COSTA et al., 2015).

Nos últimos anos, é crescente em centros médicos e grupos de pesquisa o uso e desenvolvimento de novos produtos que atuem nos tecidos lesados por queimaduras. Os curativos têm uma grande variedade de formulações e componentes, que podem apresentar atividade anti-séptica, biológica e/ou possuir prata na sua composição, como por exemplo, o *Acticoat™*, que funciona como uma membrana de polietileno de alta densidade e revestida de prata nanocristalina que atua revestindo a região da pele afetada por queimaduras, protegendo da contaminação bacteriana e favorecendo a cicatrização (WANG; KRAVCHUK; KIMBLE, 2010; SERAFINI et al., 2014).

Alguns curativos podem apresentar ação de oclusão na lesão, tais como: o *Biobrane™*, que é uma membrana de silicone com *nylon* ligado à peptídios do colágeno dérmico, substituto temporário da pele à curto prazo, por ser semipermeável, flexível e com boa aderência; e o *Tegaderm™*, uma membrana sintética que proporciona a formação de uma camada protetora no local lesado, controlando a redução de perdas protéicas e a diminuição da contaminação e

proliferação bacteriana (WANG; KRAVCHUK; KIMBLE, 2010; SERAFINI et al., 2014).

Além dos produtos citados, podemos destacar o *DuoDerme™*, membrana impermeável que funciona como curativo hidroativo, ou ainda o *CollatampFacie™*, membrana de colágeno tipo I derivada de tendão de Aquiles de bovinos que pode ser utilizada como um equivalente epidérmico temporário (MENDES JUNIOR; VITERBO; ROSA, 2007). Outros produtos também são comercializados para o tratamento das lesões causadas por queimaduras, tais como: *Aquacel Ag™*, *Mepilex Ag™*, *Actisorb Ag™*. Além desses, existem diversos produtos à base de biomateriais que são utilizados e comercializados para o tratamento de queimaduras, demonstrando que o mercado de biomaterias está em constante crescimento e é favorável para a população, pois são produtos que apresentam eficácia terapêutica (CASSIDY et al., 2005; CARUSO et al., 2006; KHUNDKAR; MALIC; BURGE, 2010; RIGO et al., 2012; SELCUK et al., 2012).

Alguns estudos desenvolveram membranas produzidas a partir de gelatina, pectina, colágeno, goma xantana, entre outros componentes. Os resultados obtidos mostram, que as membranas são geralmente biodegradáveis e biocompatíveis, e funcionam como uma matriz filmogênica para os princípios ativos que podem atuar no processo de cicatrização. Estas membranas têm sido foco de diversas pesquisas científicas e da indústria farmacêutica, pois são completamente absorvidos pela pele, formando uma matriz sobre a queimadura que funciona como uma rede de apoio para a proliferação celular e neoformação da vascularização. Assim, eles agem eficientemente em várias fases do processo de cicatrização (AYMAN et al., 2011; JIN et al., 2013; DE MELO COSTA et al., 2015).

3.5. Biomateriais

O tratamento de queimaduras é considerado desafiador devido à gravidade dos sintomas que as lesões podem causar. Diversos fatores locais e sistêmicos interferem e retardam a cicatrização e, por isso, a reparação tecidual tem chamado atenção de pesquisadores em busca de métodos terapêuticos que possam solucionar ou minimizar as falhas nesse processo (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010). Os avanços na tecnologia e na compreensão desse tipo

de lesão impulsionaram o desenvolvimento de diversos curativos e alternativas de tratamento. Os curativos atualmente disponíveis podem ser classificados em diferentes tipos, com base nos materiais utilizados para a sua fabricação, podendo incluir: filmes, membranas, sprays, hidrocolóides, hidrogéis, entre outros (GENUINO et al., 2014).

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados. A busca por biomateriais disponíveis para a medicina regenerativa é cada vez maior e novos materiais têm sido desenvolvidos, alegando vantagens sobre os já existentes. A escolha do biomaterial vai depender da aplicação pretendida, porém a maioria deles deve apresentar boa biocompatibilidade e uma microestrutura porosa apropriada para facilitar a infiltração celular, proliferação e diferenciação (NELL et al., 2012).

Na comunidade científica de biomateriais e áreas relacionadas a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, um biomaterial é definido como uma substância produzida para adquirir uma forma, que por si só, ou fazendo parte de um sistema complexo, através do controle da interação com os componentes do sistemas vivos, é utilizada para direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico. Em outras palavras, um biomaterial é utilizado para substituir ou auxiliar a função do tecido enquanto está em contato com ele, seja interna ou externamente (CHEN; LIANGA; THOUAS, 2013).

O progresso da ciência dos materiais foi concomitante com o rápido desenvolvimento de outros campos, como a biologia molecular e a nanotecnologia, produzindo uma revolução no uso dos biomateriais, os quais, foram submetidos a aplicações em diversas áreas da pesquisa. Existe uma gama de biomateriais disponíveis, porém, a sua utilização com eficácia e segurança ainda é um desafio, pois podem ocasionar reações adversas no corpo humano. (EKDAHL et al., 2011; DAS; BAKER, 2016).

Holzapfel e colaboradores (2013), classificaram os biomateriais em três tipos: Inertes, bioativos e bioabsorvíveis. Os inertes são os biomateriais mais

rígidos, não absorvíveis, capazes de provocar nenhuma ou mínima reação tecidual após sua aplicação. Os bioativos possibilitam a ligação do biomaterial ao tecido do hospedeiro, melhorando a migração do material através da estimulação do crescimento de um novo tecido. Os bioabsorvíveis são inicialmente incorporados dentro do tecido e caracterizados como tempo-dependentes, ou seja, são completamente absorvidos com o tempo (HOLZAPFEL et al., 2013).

Dentre os biomateriais, podemos destacar os polímeros, os quais, podem ser sintéticos ou naturais. Os sintéticos são degradados por erosão em massa e hidrólise de ligações de éster e o tempo de degradação pode variar de semanas à anos. São exemplos: polietileno, poli(álcool vinílico), polimetilmetacrilato (PMMA), poldimetilsiloxano, poli(etileno tereftalato), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(óxido de etileno), e poli(ε-caprolactona). Alguns desses polímeros são usados como materiais de suturas e alguns fixadores ortopédicos de ligamentos e tendões (MENDES JUNIOR; VITERBO; ROSA, 2007; JIN et al., 2013).

Os polímeros naturais ou biopolímeros são formados na natureza durante o ciclo de crescimento de todos os organismos. A síntese desses polímeros envolve enzimas catalisadoras, reações de crescimento de cadeias ativando monômeros, que caracterizam processos metabólicos complexos dentro de células. Dentre esses, destacam-se: alginato, amido, quitosana, ácido hialurônico, colágeno, gelatina, caseína e heparina. Esses polímeros possibilitam o desenvolvimento de inúmeros produtos na engenharia de materiais e de tecidos e na área médica, pois apresentam arquitetura celular que atua como suporte mecânico para construção de novos tecidos *in vitro* ou *in vivo*, assim como, possibilita a incorporação de substâncias ativas em sua estrutura protéica. Portanto, devem apresentar características físico-químicas bem definidas e adequadas para cada fim individualmente (MENDES JUNIOR; VITERBO; ROSA, 2007; JIN et al., 2013).

Dentre as formulações derivadas de biomateriais, podemos ressaltar as membranas bioativas, as quais, se apresentam como preparações finas, flexíveis, transparentes (permitindo a visualização do processo de regeneração cutânea), permeáveis ao vapor de água, oxigênio e impermeáveis à bactérias. São indicadas para o tratamento de queimaduras, lesões pós-operatória e feridas menores incluindo abrasões e lacerações. Os hidrogéis e hidrocolóides também são

amplamente utilizados, principalmente para o tratamento clínico de feridas crônicas e lesões causadas por queimaduras e geralmente, são constituídos de alginato e/ou glicerina (JEANES; BITMEAD, 2015; DAS; BAKER, 2016).

Segundo Jayakumar e colaboradores (2011), um curativo ideal se comporta como substituto da pele e é utilizado para encobrir a lesão e ajudar na cicatrização, fornecendo um formato estrutural para o tecido subjacente, induzindo a neoformação vascular, permitindo trocas gasosas, impedindo a proliferação de microrganismos, controlando o excesso de exsudato, enquanto mantém o ambiente úmido. Além disso, precisa ser não aderente, facilmente removido e deve apresentar propriedades antialérgicas, não tóxicas, bem como, promover a cicatrização da lesão (JAYAKUMAR et al., 2011).

As práticas terapêuticas que utilizam como base materiais de origem natural têm ganhado destaque devido às diversas características favoráveis ao processo de reparação cicatricial, bem como biocompatibilidade, biodegradabilidade e algumas estruturas semelhantes à pele humana. A biocompatibilidade é a capacidade de ação de um biomaterial no momento da realização de uma aplicação específica que consiste na preservação de elementos celulares do sangue, não provocar respostas imunes e não induzir carcinogenicidade ou mutagenicidade. Além disso, devem apresentar propriedades biomecânicas capazes de corresponder às solicitações dinâmicas e estáticas que estarão sujeitas (BOATENG et al., 2015).

Entretanto, devido à necessidade de trocas frequentes e à fabricação não nacional de alguns destes produtos, o custo para a utilização dos mesmos é elevado, tornando-os pouco acessíveis à população de baixa renda e economicamente inviáveis para utilização em larga escala nas Unidades de Terapia de Queimados (DARGAVILLE et al., 2013; BANYARD et al., 2015). Assim, um dos grandes desafios das pesquisas na área de reparação tissular consiste no desenvolvimento de produtos à base de biomateriais que apresentem as características adequadas ao tratamento e que sejam produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo e fácil obtenção (DANTAS et al., 2011; GHIEH et al., 2015; NUNES et al., 2016).

3.6. Gelatina

Um dos biomateriais amplamente utilizado na engenharia de tecidos é a gelatina, que é uma proteína obtida por hidrólise do colágeno. A desnaturação a partir da tripla-hélice do colágeno resulta na formação de polieletrólitos carregados. Em solução, estes polieletrólitos podem interagir com moléculas de carga oposta para formar complexos poli-iônicos que permitem a adesão de fatores de crescimento (AHMAD et al., 2012; BOATENG et al., 2015).

Dois tipos de gelatina podem ser produzidos dependendo do tipo de extração. A gelatina tipo A, que é obtida a partir da pele de porco, por meio de um pré-tratamento ácido, antes do processo de extração e a tipo B, é extraída por meio de hidrólise básica, de ossos de origem bovina (PEREZ et al., 2013). É importante ressaltar, que existe uma fonte alternativa para obtenção de gelatina: a pele de peixe. Esse tipo de gelatina apresenta ponto de fusão inferior em relação às proteínas obtidas de mamíferos, o que pode representar vantagem farmacotécnica no que tange aos aspectos sensoriais. Contudo, sua produção é limitada, por ser um procedimento de extração caro em comparação aos outros e dessa forma corresponde apenas a cerca de 1% do mercado de produção de gelatina (YOUNG, 2005; BORAN; REGENSTEIN, 2010; BOATENG et al., 2015).

A gelatina apresenta destaque por suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas. Sua utilização nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, garantiu seu reconhecimento como um material *Generally Regarded As Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Cerca de 350 mil toneladas de gelatina são produzidas por ano, que movimentam um mercado de 2 bilhões de dólares (BORAN; REGENSTEIN, 2010; ELZOGHBY, 2013; PEREZ et al., 2013; BOATENG et al., 2015).

Além disso, a gelatina é um polímero natural que não apresenta antigenicidade, é reabsorvível *in vivo* e devido à presença de um grande número de grupos funcionais na cadeia lateral, pode ser facilmente modificada para formar materiais quimicamente reticulados, sendo que, apresenta propriedades versáteis, como excelente capacidade de formação de películas, permite a incorporação de elementos ativos em sua estrutura, proporciona hemostasia e assim, facilita a adesão e proliferação celular durante a cicatrização. No entanto, as fracas

propriedades mecânicas tem sido descritas como algumas das desvantagens deste biomaterial, mas essas limitações são geralmente minimizadas com a reticulação ou combinação de outros polímeros ou a adição de agentes plastificantes, como o propilenoglicol (CURCIO et al., 2010; PEREZ et al., 2013; BOATENG et al., 2015).

Um estudo proposto por Perez e colaboradores (2013) relata a utilização de matrizes inteligentes para a engenharia de tecidos com a incorporação de compostos bioativos em membranas de gelatina, de modo que esses compostos possam ser liberados para atuar diretamente na pele lesionada (PEREZ et al., 2013). Adicionalmente, outros autores sugerem que este produto favorece a proliferação de fibroblastos, promove a cicatrização e dessa forma pode ser utilizada como matriz de uma formulação para o tratamento de queimaduras (CAVALCANTE et al., 2011; NUNES et al., 2016).

3.7. Ácido úsnico

Os líquens são seres vivos resultantes da simbiose entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte). Podem ser encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas e desta forma cada região apresenta organismos simbióticos diferentes com componentes específicos próprios em resposta a sua condição ambiental. Mais de 17 mil espécies e mais de 800 produtos secundários de líquens são conhecidos (MARTINELLI et al., 2014).

A produção de metabólitos secundários derivados de líquens, denominados substâncias ou ácidos liquênicos, têm sido considerada valiosa devido às suas atividades biológicas e por isso, é fonte de muitos estudos na medicina tradicional. Dentre eles, o ácido úsnico (AU) (Figura 3), desde o seu primeiro isolamento, em 1844, tornou-se o metabólito liquênico mais estudado, pois este composto natural apresenta grande potencial terapêutico (ARAÚJO et al., 2015; NITHYANAND et al., 2015).

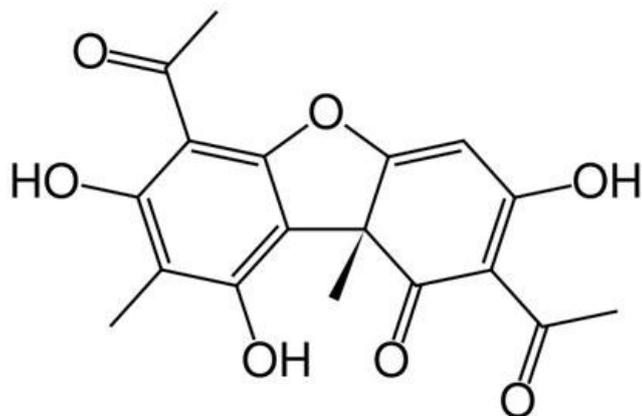


Figura 3: Estrutura química do AU ($C_{18}H_{16}O_7$; massa molar: 344,31 g/mol).

Fonte: Adaptado de ARAÚJO et al., 2015.

O AU exibe propriedades redox-ativas variáveis, atuando como um agente antioxidante e pró-oxidante, de acordo com as diferentes condições do sistema e do ambiente celular (RABELO et al., 2012). Carvalho e colaboradores demonstraram que o AU apresenta atividade antiprotozoária contra o *Trypanosoma cruzi*, pois esse composto foi eficaz no combate das formas epimastigota e tripomastigota desse agente etiológico (DE CARVALHO et al., 2005). A atividade antiviral do AU contra o poliomavírus e influenza A (H1N1) foi relatada por Campanella et al. (2002) e Sokolov et al. (2012), respectivamente, confirmando que essa molécula pode ser utilizada para o tratamento de infecções virais.

O AU apresenta atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, evitando a transmissão da dengue, que é uma doença viral causada pelo flavivírus, o qual, é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* (BOMFIM et al., 2009). Diversos estudos comprovaram a atividade antitumoral do AU em células humanas, tais como MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HeLa (adenocarcinoma do colo do útero) e HCT-116 (carcinoma do cólon) (SONG et al., 2012; BAČKOROVÁ et al., 2012; BRISDELLI et al., 2013). O AU é eficaz na proteção contra a radiação ultravioleta (UV) e em baixas concentrações pode ser utilizado como ativo no preparo de filtros solares (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010).

A atividade do AU frente à *Candida orthopsilosis* e *Candida parapsilosis* foi investigado por Pires e colaboradores (2012). Os resultados apresentados neste estudo foi o primeiro relato do AU mostrando atividade inibitória e fungicida (*in vitro*) (PIRES; LUCARINI; MENDES-GIANNINI, 2012). Vijayakumar e colaboradores (2000), demonstraram que o AU apresenta atividade anti-inflamatória dose-dependente, empregando os modelos agudos e crônicos em roedores (VIJAYAKUMAR et al., 2000).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana do AU, Karabacak e colaboradores (2014), desenvolveram um sistema coloidal utilizando baixas concentrações de AU e comprovaram sua ação contra diversos microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumonia* (KARABACAK; TAYA; KIVANÇ, 2014). Micropartículas poliméricas carregadas de AU revelaram eficácia contra *Staphylococcus epidermidis* e grande potencial para a confecção de curativos para tratamento de feridas infectadas (MARTINELLI et al., 2014).

O potencial do AU como agente cicatrizante de lesões dérmicas foi descrito na literatura científica, sendo o mecanismo de ação correlacionado com a sua capacidade para estimular a motilidade celular e como um promotor na regeneração de tecidos, acelerando a migração celular (JIN; DONG; HE, 2005). Bruno e colaboradores (2013) através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, apresentaram resultados consistentes sobre a baixa citotoxicidade e a alta propriedade cicatrizante do AU. Outros estudos avaliaram o efeito cicatrizante do AU incorporado em membranas de colágeno em roedores e do AU incorporado em membranas de gelatina em porcos e comprovaram que o AU apresenta eficácia para o tratamento e cicatrização de lesões na pele causadas por queimaduras (NUNES et al., 2011; NUNES et al., 2016).

Como demonstrado anteriormente, o AU apresenta propriedades promissoras no tratamento de queimaduras, devido principalmente à sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante. Contudo, essas atividades terapêuticas tornam-se limitadas, pois esse metabólito liquênico possui características físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade em água.

Outro problema é sua alta hepatotoxicidade, que impede a sua administração por via oral, limitando sua aplicação terapêutica (FRANCOLINI et al., 2013). Sendo assim, produtos insolúveis e/ou tóxicos devem ser veiculados através de um sistema de liberação capaz de otimizar a dose terapêutica, minimizar a ocorrência de efeitos tóxicos e viabilizar a administração do composto em uma formulação que melhore sua solubilidade, como exemplo: os sistemas lipossomais (VENTURINI et al., 2015; PEREZ et al., 2016).

3.8. Lipossomas

Nanotecnologia é uma definição para as técnicas, materiais e dispositivos que atuam em escala nanométrica, ou seja, estruturas que mantêm forma e tamanho situados entre 1 a 999 nanômetros (nm). Representa uma das tecnologias mais promissoras do século XXI e tem sido considerada como a nova revolução industrial em diversas áreas da pesquisa (PAPAKOSTAS et al., 2011). A tecnologia em nanoescala têm atraído muita atenção pela expectativa do impacto que materiais nanoestruturados podem causar na veiculação de novos produtos, proporcionando uma forma de dosagem de fármacos mais adequada, bem como, melhorando sua penetração nas células e liberação direta nos tecidos alvos (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Nos últimos anos, com os avanços das pesquisas científicas, a nanotecnologia tem sido bastante empregada no tratamento e prevenção de doenças. Os sistemas nanoestruturados, sejam eles nanopartículas lipídicas, poliméricas ou lipossomas, apresentam benefícios para a incorporação de fármacos, tais como: protegem as substâncias contra agentes externos, aumentam a estabilidade e a biodisponibilidade de formulações e apresentam a capacidade de promover a liberação controlada de fármacos (VENTURINI et al., 2015; PEREZ et al., 2016).

Os lipossomas são estruturas vesiculares formadas por uma ou mais bicamadas concêntricas de lipídios intermediadas por compartimentos aquosos. Estes sistemas possuem natureza anfifílica, elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade (Figura 4). Além disso, podem ter seu tamanho, composição lipídica/aquosa e propriedades de superfície facilmente modificadas. Estas

características tornam os lipossomas sistemas altamente versáteis, atuando como nanocarreadores, capazes de transportar fármacos pouco solúveis em água, de forma a aumentar a biodisponibilidade e propiciar sua administração (DIMER et al., 2013).

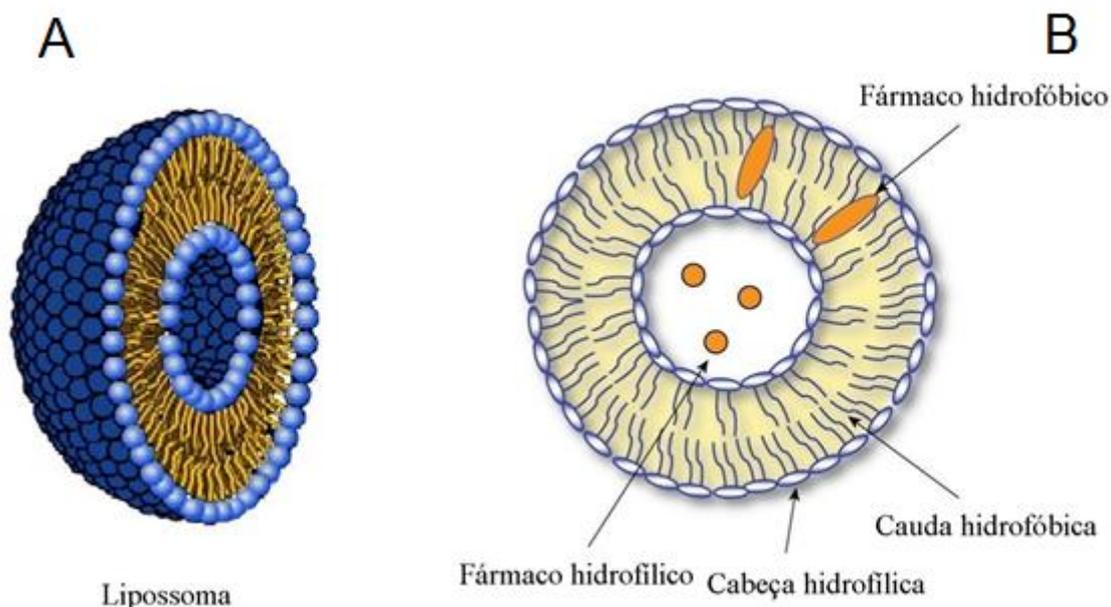


Figura 4: A: Estrutura básica dos lipossomas. B: Representação esquemática da incorporação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos nos lipossomas.

Fonte: Disponível em: <http://www.wikilectures.eu/index.php/Liposomes_as_drug_carriers> Acesso: 23 de novembro de 2016.

A natureza anfifílica dos lipossomas permitem que eles sejam capazes de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas simultaneamente, sendo que, as hidrofílicas ficam depositadas no compartimento aquoso e as lipofílicas se inserem na bicamada lipídica. Os lipossomas são capazes de proteger o fármaco da degradação e reduzir sua toxicidade. Podem ser produzidos e formulados para realizar a distribuição específica do composto no tecido alvo e realizam a liberação controlada do ativo encapsulado (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

Os lipossomas são basicamente constituídos por fosfolipídios que podem ser de origem natural ou sintética e representam os principais componentes das

membranas celulares. A porcentagem molar de fosfolipídios varia de 55 a 100% dos componentes lipossômicos totais. Os lipídios mais utilizados no preparo de lipossomas são os que apresentam forma cilíndrica, como a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline. Esses lipídios tendem a formar uma bicamada estável em meio aquoso. Porém, dentre estes, a fosfatidilcolina é a mais empregada em formulações de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade em casos de variações de pH ou da concentração de sal no meio (JING et al., 2015; PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016). O colesterol é o componente principal adicionado nas formulações de lipossomas para estabilizar a bicamada lipídica. Além disso, podem ser utilizados para aumentar a fluidez, elasticidade e permeabilidade dos lipossomas (MAGARKAR et al., 2014).

A classificação dos lipossomas pode ser determinada com base no tamanho e no número de camadas de fosfolipídios. São classificados em: vesículas multilamelar (MLV), vesículas unilamelar pequena (SUV) e vesículas unilamelar grande (LUV) (Figura 5). As MLV, são lipossomas compostos por uma série de bicamadas fosfolipídicas concêntricas separadas por fase aquosa. São grandes em tamanho, podendo medir até 5 μm . As SUV são constituídas por um compartimento aquoso fechado por uma única bicamada lipídica. O tamanho destes lipossomas variam de 20-100 nm. As LUV também são compostas de uma única bicamada lipídica que circunda o compartimento aquoso, porém, o tamanho destes lipossomas são maiores que as SUV, variando de 100-250 nm (AKBARZADEH et al., 2013; PATTNI et al., 2015; PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

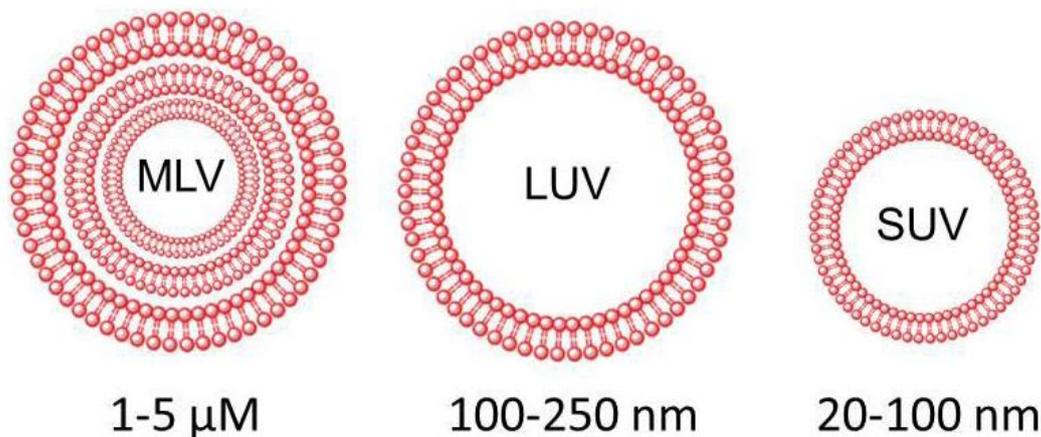


Figura 5: Classificação dos tipos de lipossomas.

Fonte: Adaptado de PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016.

Existem vários métodos para o preparo de lipossomas, tais como: remoção de solvente, remoção de detergente, remoção de emulsão e injeção de etanol. O método de preparo influencia as propriedades dos lipossomas, incluindo a sua forma, tamanho, estabilidade e eficiência de carregamento do fármaco. O método de remoção de solvente é o método mais comum e o primeiro descrito para produção de lipossomas. Resumidamente, os lipídios são dissolvidos em mistura de clorofórmio e/ou metanol na concentração de 10-20 mg.mL⁻¹, dependendo da solubilidade. O solvente é removido pela técnica de rotaevaporação sob pressão reduzida para produzir uma fina película de lipídios, denominada de filme fosfolipídico. Este é submetido a secagem durante o tempo necessário, seguida por hidratação com solução aquosa (LAQUINI et al., 2012; AKBARZADEH et al., 2013; BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Alguns estudos já utilizaram o AU encapsulado em lipossomas. Lira e colaboradores (2009) observaram que o uso do complexo AU/lipossomas pode ser uma estratégia alternativa para superar a baixa solubilidade do AU em água e manter a sua atividade antimicrobiana (LIRA et al., 2009). Nunes e colaboradores (2011), demonstrou que o AU encapsulado em lipossomas e incorporado em membranas de colágeno, apresenta atividade cicatrizante, sendo eficaz para o tratamento de queimaduras (NUNES et al., 2011). Ferraz-Carvalho e colaboradores

(2016), avaliaram o efeito o AU/lipossomas contra o *Mycobacterium tuberculosis* (agente etiológico da tuberculose) e demonstraram que o AU incorporado em lipossomas pode ser utilizado como uma forma de dosagem para melhorar a atividade antimicrobiana da rifampicina, que é um fármaco de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas pelo *M. tuberculosis* (FERRAZ-CARVALHO et al., 2016). De acordo com esses estudos, a incorporação do AU em sistemas lipossomais melhoram suas propriedades físico-químicas e eficácia farmacológica.

4. Material e métodos

4.1. Material

Para o preparo das membranas de gelatina foi empregado gelatina em pó (fornecedor NP produtos alimentícios LTDA), propilenoglicol (Proquimios®) e ácido acético (Neon®). Para o preparo dos lipossomas, utilizou-se o lipídio fosfatidilcolina (Lipoid GmbH®), (+)- ácido úsnico ($C_{18}H_{16}O_7$, pureza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®) e clorofórmio (Dinâmica®). Dimetilsulfóxido (Sytnh®) e tampão fosfato pH 7,4 (Neon®) foram utilizados como meios de dissolução para as membranas. Metanol (*HPLC gradient grade*, Sigma-Aldrich®) e água ultrapura (*milli-q system*, millipore®) foram utilizados como fase móvel para os procedimentos analíticos.

4.2. Preparo das membranas

As membranas de gelatina contendo AU incorporado em lipossomas (Memb/AU/Lip) foram preparadas de acordo com o método descrito por NUNES e colaboradores (2016). Inicialmente, preparou-se a solução de gelatina, contendo 1 g de gelatina em pó, 60 mL de ácido acético (0,5 mol/L) e 0,2 g de propilenoglicol (agente plastificante). Essa solução foi submetida à agitação magnética durante 24 horas.

Os lipossomas foram preparados dissolvendo 250 mg de fosfatidilcolina e 10 mg de AU em 20 mL de clorofórmio. Essa solução foi sonicada em banho de ultrassom por 10 minutos e após esse procedimento, o solvente orgânico foi evaporado pela técnica de rotaevaporação sob temperatura de 40 °C. Após a evaporação do solvente, formou-se um filme fosfolipídico no fundo do balão, o qual, foi ressuspenso com 40 mL de água ultrapura e em seguida foi submetido a banho de ultrassom por 30 minutos, formando uma dispersão de lipossomas em meio aquoso. Após 24 horas de agitação da solução de gelatina, verteu-se a solução dos lipossomas, mantendo-se sob agitação magnética por mais 24 horas.

As Memb/AU/Lip foram obtidas utilizando o método de *casting* (NUNES et al., 2016). Nesse método as dispersões aquosas de polímeros são vertidas em suportes adequados, tais como: superfícies de polietileno ou placas de petri. Dessa forma, após às 24 horas de agitação, verteu-se a solução das membranas em

placas de petri de 14 cm de diâmetro, as quais, foram depositadas em capela para a secagem à temperatura ambiente.

Membranas de gelatina contendo AU sem lipossomas (Memb/AU) foram preparadas utilizando a mesma metodologia, com exceção do uso da fosfatidilcolina para a formação do filme fosfolipídico. Nessa formulação, o AU foi dissolvido no clorofórmio e adicionado diretamente na solução de gelatina. Essas membranas sem lipossomas, ou seja, contendo o AU “livre”, foram utilizadas como formulação controle de alguns experimentos, para fins de comparação de resultados.

4.3. Ensaio de intumescimento

A capacidade de intumescimento das membranas foi avaliada pela técnica de imersão (HASANI-SADRABADI et al., 2011). As Memb/AU/Lip foram fracionadas em área de 25 cm² e divididas em dois grupos (A e B). O grupo A foram imersas em 100 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e o B em 100 mL de soro fisiológico. As análises foram determinadas com os meios de imersão à temperatura de 37 ± 2 °C. Para determinar o grau de intumescimento, as amostras foram inicialmente pesadas e imersas em recipientes contendo os meios, em diferentes intervalos de tempo: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. Após cada tempo, as amostras foram removidas do meio, colocadas em papel filtro para retirar o excesso de líquido e pesadas novamente. As análises foram realizadas em triplicata (n= 3) e a quantidade de líquido adsorvido pelas Memb/AU/Lip foi determinada pela equação 1.

$$Eq. (1): I = \frac{(Pu - Ps)}{Ps} * 100$$

onde, Pu (peso úmido) é o peso da amostra após o tempo de imersão no meio e Ps (peso seco) é o peso inicial da amostra.

4.4. Desenvolvimento e validação do método analítico para a identificação e quantificação do AU por CLAE

Para as análises cromatográficas, foi preparada uma solução estoque de AU (padrão; pureza $\geq 98\%$) dissolvido em metanol na concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A solução obtida foi submetida à banho de ultrassom por 30 minutos e em seguida, filtrada em filtros de membrana (PTFE) de $0,45 \mu\text{m}$. As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido *Shimadzu*®, equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A HT, um forno CTO-20A, um detector de arranjo de diodos SPD20Avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20A. As análises foram determinadas em uma coluna analítica C18 de fase reversa *Phenomenex Luna* de $150 \times 4,6 \text{ mm}$ de diâmetro ($5 \mu\text{m}$ tamanho de partícula). O fluxo da fase móvel foi de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção da amostra foi de $20 \mu\text{L}$. Os solventes utilizados na fase móvel foram: (B) metanol e (A) ácido acético (1%) em água *milli-q* (v/v). O método consistiu de um sistema isocrático de eluição na proporção de 90/10 (B/A) da fase móvel em um tempo de análise de 10 minutos (NUNES et al., 2015). O comprimento de onda para detecção do AU foi de 280 nm e a temperatura do forno foi de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a identificação do AU nas Memb/AU/Lip, estas foram dissolvidas em 10 mL de metanol e mantidas sob agitação magnética por 12 horas. A solução obtida foi filtrada em filtros de membrana (PTFE) de $0,45 \mu\text{m}$ e analisada por CLAE. O AU presente nas membranas foi identificado com base no tempo de retenção (TR) e no espectro de absorção ultravioleta (UV) do AU padrão.

O método analítico foi validado de acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, regulamentada pela ANVISA, que determina a “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Os parâmetros utilizados para a validação foram: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez (ANVISA, 2003).

4.4.1. Linearidade (Intervalo de calibração)

A linearidade do método foi estabelecida através da avaliação do coeficiente de correlação (r) de uma curva de calibração do AU. A curva foi obtida

em cinco concentrações diferentes: 5, 10, 25, 50 e 100 µg·mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata (n= 3).

4.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O Limite de detecção (LD) pode ser determinado com base na relação de que o sinal da substância analisada é 3 vezes maior que o ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) com base na relação de 10 vezes maior que ruído da linha de base (ANVISA, 2003). O LD e LQ foram calculados de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente.

$$Eq. (2): LD = \frac{DPa * 3}{IC}$$

$$Eq. (3): LQ = \frac{DPa * 10}{IC}$$

onde, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva de calibração.

4.4.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada de acordo com a repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). A repetibilidade foi determinada a partir do preparo de 9 amostras do AU na concentração de 100 µg·mL⁻¹, realizadas no mesmo dia, com o mesmo analista e instrumentação. A precisão intermediária foi avaliada com o preparo de 6 amostras do AU na concentração de 100 µg·mL⁻¹ em dois dias diferentes, com analistas e instrumentação diferentes. Os resultados foram expressos de acordo com o desvio padrão relativo (DPR) das análises.

4.4.4. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, realizou-se um teste de recuperação utilizando o método de adição de padrão, o qual, consiste em adicionar quantidades conhecidas de AU nas soluções metanólicas das Memb/AU/Lip. A recuperação foi determinada adicionando três amostras de AU em três diferentes concentrações: 5 (baixa), 50 (média) e 100 (alta) µg·mL⁻¹. Todas as amostras foram analisadas em

triplicata (n= 3). As porcentagens de recuperação foram calculadas de acordo com equação 4 e os resultados também foram expressos de acordo com o DPR das análises.

$$Eq. (4): \text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{Conc. experimental} - \text{Conc. teórica})}{\text{Quant. AU adicionada}} * 100$$

Onde, a Concentração experimental é a quantidade de AU nas Memb/AU/Lip com as soluções padrões adicionadas, a Concentração teórica é a quantidade de AU nas Memb/AU/Lip sem os padrões e a Quant. AU adicionada é a quantidade de AU nas três diferentes concentrações.

4.4.5. Robustez

A robustez foi determinada através de pequenas variações dos parâmetros utilizados no desenvolvimento do método analítico. Os parâmetros escolhidos foram o fluxo da fase móvel e a temperatura do forno o qual a coluna foi aplicada. O fluxo da fase móvel foi modificado para 0,8; 0,9 e 1,1 mL·min⁻¹ e a temperatura foi alterada para 20, 30 e 35 °C.

4.5. Teor e eficiência de encapsulação do AU nas Memb/AU/Lip

O teor e a eficiência de encapsulação (EE) do AU foram determinados através da dissolução de segmentos de Memb/AU/Lip com área de 7 cm² em 10 mL de metanol, mantidos sob agitação magnética constante (250 rpm) por 12 horas, para permitir que todo AU encapsulado na membrana esteja em solução. Em seguida, a solução obtida foi filtrada em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por CLAE. Os segmentos foram obtidos a partir de três Memb/AU/Lip diferentes (A, B e C) e as análises foram realizadas em triplicata (n= 3). A EE foi calculada de acordo com equação 5, descrita abaixo:

$$Eq. (5): EE = \frac{C1}{C2} * 100$$

onde, C1 é o teor de AU presente nas membranas e C2 é a quantidade inicial de AU utilizado para preparar as Memb/AU/Lip.

4.6. Uniformidade de conteúdo do AU nas Memb/AU/Lip

Para determinar se o AU está distribuído de maneira uniforme ao longo das Memb/AU/Lip, foram obtidas 11 frações com área de 7 cm², sendo que cada fração foi dissolvida em 10 mL de metanol e mantida sob agitação durante 12 horas. As soluções obtidas foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e o teor de AU em cada fração foi determinado por CLAE. Esse experimento foi realizado utilizando 3 Memb/AU/Lip diferentes. Dessa forma, foram analisadas 33 frações por CLAE.

4.7. Estudos de liberação *in vitro* do AU

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados em células de Franz automatizadas (*MicroettePlus Multi-Group*®, *Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA*), sob temperatura de 37 ± 0,5 °C. A área de difusão das células de Franz foi de 1,76 cm² e o compartimento do meio receptor de 7 mL. Membranas de acetato de celulose (12 kDa, *Sigma-Aldrich*®) foram fixadas na extremidade das células com a função de “barreira” para a liberação e foram pré-hidratadas com solução salina para se fixarem entre o compartimento doador e receptor das células de Franz, sobre as quais, foram aplicadas as Memb/AU/Lip. O ensaio utilizou como meio receptor, solução aquosa de DMSO 2% (v/v), sob agitação magnética constante (250 rpm) e o sistema foi mantido em condição *sink* durante todo experimento (SERAFINI et al., 2014). Alíquotas de 2 mL do meio receptor foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18 e 24 horas. Na medida em que as alíquotas eram retiradas, a mesma quantidade de meio receptor era repostada no compartimento. As amostras coletadas foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para quantificar a quantidade de AU liberado em cada intervalo de tempo. As coletas e análises foram realizadas em sextuplicatas (n= 6). Os experimentos de liberação *in vitro* também foram realizados com a formulação controle (Memb/AU), com o objetivo de comparar os resultados das duas membranas e comprovar a possível liberação controlada que é obtida com formulações contendo lipossomas (PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

4.8. Absorção transdérmica do AU

4.8.1. Preparo da pele

Para os estudos de penetração/permeação do AU nas camadas da pele foram utilizadas peles de orelha de porco como membrana. As amostras de pele foram doadas por um abatedouro de animais da região (São Cristóvão, Sergipe, Brasil). O excesso de gordura dos tecidos, hipoderme e pêlos foram removidos e a superfície da pele foi devidamente limpa com água corrente e armazenada em papel alumínio à -20°C até sua utilização. Antes de cada experimento, a pele foi cortada em pedaços redondos com área de 3 cm de diâmetro e apresentaram espessura entre 1,8 e 2,2 mm, medidas por um medidor de espessura de marcação (No. 7301®, Mitutoyo, Japan).

4.8.2. Permeação *in vitro* do AU nas camadas da pele

Os experimentos de permeação foram realizados em células de Franz automatizadas (*MicroettePlus Multi-Group*®, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA), sob temperatura de 37 ± 0,5 °C, durante 24 horas. O meio receptor utilizado para a garantia da condição *sink* foi 7 mL de uma solução aquosa de DMSO 2% (v/v), mantido sob agitação magnética constante (250 rpm) durante todo o experimento (SERAFINI et al., 2014). As peles foram aplicadas manualmente na área de difusão da célula de Franz (1,76 cm²) com solução salina e sobre elas foram aplicadas as Memb/AU/Lip. Alíquotas de 2 mL do meio receptor foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18 e 24 horas. Na medida em que as alíquotas eram retiradas, a mesma quantidade de meio receptor era repostada no compartimento. As amostras coletadas foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e quantificadas por CLAE. As coletas e análises foram realizadas em sextuplicatas (n= 6).

Antes do ensaio de permeação, o estrato córneo foi removido das peles através da técnica de *tape stripping*, utilizando 18 pedaços de fita adesiva, para simular lesões na pele causadas por queimaduras de 1º grau. Após às 24 horas de experimento, realizou-se a quantificação de AU nas camadas da pele. Para isto, a epiderme e a derme foram separadas da pele através da sua imersão em banho de água quente (60 °C) por 45 segundos. Em seguida, a epiderme foi removida com o auxílio de um bisturi e a derme foi cortada em pequenos pedaços. O AU foi extraído

das camadas da pele com metanol. Para este procedimento, a epiderme e a derme foram colocadas em tubos de ensaio diferentes, dissolvidas em 6 mL de metanol, submetidas à 2 minutos de extração em vórtex, seguido de 30 minutos no banho de ultrassom. As amostras foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para a quantificação de AU retido nas camadas da pele (SERAFINI et al., 2014)

4.9. Ensaios de lavabilidade

A fim de avaliar a adesividade das Memb/AU/Lip na pele, foi realizado o ensaio de lavabilidade, sendo que, foram utilizadas peles de orelha de porco, obtidas e tratadas nas mesmas condições das peles do ensaio de permeação *in vitro*. As análises foram realizadas em células de Franz manuais “modificadas” (Gilson® Manipuls 3), com área de difusão de 1,76 cm² e compartimento do meio receptor de 4,5 mL. Essas células modificadas apresentam uma entrada e uma saída para um líquido de lavagem (solução aquosa de NaCl 0,9%), o qual, com auxílio de uma bomba de vácuo lava a formulação, com objetivo de determinar se o AU é removido das Memb/AU/Lip ou se apresentam capacidade de se aderir na formulação ou na pele.

A solução aquosa de NaCl 0,9% (v/v) foi utilizada pois simula o suor (CONTRI et al., 2014). As Memb/AU/Lip foram aplicadas sobre as peles de orelha de porco, umedecidas com 30 µL de soro fisiológico e mantidas em contato por 1 hora para que ocorra a adesão da formulação à pele. Em seguida, a bomba foi ligada e as amostras foram lavadas com fluxo de 0,3 mL·min⁻¹. Após o intervalos de tempo de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4 horas, 2,5 mL da solução de lavagem foi coletada. As amostras foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por CLAE. As análises foram realizadas em sextuplicatas (n= 6).

Após 4 horas de experimento, realizou-se a quantificação de AU aderido nas Memb/AU/Lip e/ou nas camadas da pele. A epiderme e a derme foram separadas utilizando banho de água quente (60 °C) por 45 segundos. Em seguida, a epiderme foi removida com o auxílio de um bisturi e a derme foi cortada em pequenos pedaços. O AU foi extraído das camadas da pele com metanol. Para este procedimento, a epiderme e a derme foram colocadas em tubos de ensaio

diferentes, dissolvidas em 6 mL de metanol, submetidas a 2 minutos de extração em vórtex, seguido de 30 minutos no banho de ultrassom. As amostras foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para a quantificação de AU aderido nas Memb/AU/Lip e/ou nas camadas da pele.

4.10. Estudo piloto de estabilidade

A estabilidade foi avaliada com as Memb/AU/Lip e com a formulação controle (Memb/AU) fracionadas com área de 7 cm², as quais, foram divididas em três grupos. O primeiro grupo foi mantido em refrigeração com temperatura de 5 ± 2 °C; o segundo grupo permaneceu em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e o terceiro grupo foi acondicionado em uma estufa sob a temperatura de 45 ± 2 °C. Todas as amostras foram armazenadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados. O estudo foi realizado no intervalo de tempo de 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias. Após cada tempo, as membranas foram dissolvidas em metanol, filtradas e o teor de AU foi determinado por CLAE para avaliar se houve degradação do fármaco durante o estudo. Todas as análises foram realizadas em triplicata (n= 3).

4.11. Estudo piloto de fotoestabilidade

Os ensaios de fotoestabilidade foram realizados através do método de incidência de luz UV sobre as membranas. A fonte de luz é um modelo similar ao padrão de emissão D65, que é o padrão internacional reconhecido para luz do dia, definido na ISO 10977 (ANVISA, 2012). As Memb/AU/Lip e as Memb/AU foram fracionadas com área de 7 cm² e expostas à luz no intervalos de tempo de: 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Após a exposição em cada tempo, as amostras foram dissolvidas em metanol, filtradas e analisadas por CLAE para avaliar o teor de AU durante o estudo. As análises foram realizadas em triplicata (n= 3).

4.12. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism* versão 5.0, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão. As comparações entre os grupos (Memb/AU/Lip e Memb/AU) foram realizadas pelo teste t de *Student*, para um intervalo de confiança de 95%. Valores de p < 0,05 foram considerados com diferença estatística significativa.

5. Resultados e discussão

5.1. Obtenção das Memb/AU/Lip

Gelatina e AU incorporado em lipossomas, mostraram-se substâncias adequadas para a produção de membranas biodegradáveis, uma vez que, a gelatina é um polímero versátil que apresenta boas propriedades mecânicas para a formação de películas principalmente com a adição de agentes plastificantes e a fosfatidilcolina, fosfolípido utilizado para a produção dos lipossomas, apresenta grande estabilidade, devido sua estrutura química (CURCIO et al., 2010; JING et al., 2015). As Memb/AU/Lip apresentaram características macroscópicas homogêneas e deposição aparentemente uniforme do fármaco na formulação.

As membranas foram obtidas pela técnica de *casting* (NUNES et al.,2016) e após serem vertidas em placas de petri, foram secas sob temperatura ambiente, removidas das placas com o auxílio de uma pinça de metal e em seguida suas características organolépticas foram analisadas. As Memb/AU/Lip foram embaladas, lacradas, identificadas e armazenadas em dessecador. Macroscopicamente, apresentaram uma coloração levemente amarelada, baixa opacidade, boa flexibilidade, sem odor característico e exibiram uma superfície lisa, sem a presença de grumos, rachaduras ou ranhuras (Figura 6).



Figura 6: Memb/AU/Lip obtida pelo método de *casting* após a secagem.

5.2. Capacidade de intumescimento das Memb/AU/Lip

O intumescimento de membranas biodegradáveis pode ser relatado como o aumento do volume do polímero que as constitui, devido a sua imersão em um determinado solvente. Esse processo está relacionado com a entrada de água na matriz por capilaridade e/ou difusão. Na medida que uma membrana é imersa em uma solução aquosa, o intumescimento ocorre até que a força osmótica que fortalece a reticulação da rede polimérica seja balanceada (ZHANG, 2007).

A capacidade de intumescimento das matrizes poliméricas é um parâmetro importante que pode influenciar o perfil de liberação de fármacos, pois este processo depende da permeabilidade da membrana no meio de dissolução e às alterações na estrutura da matriz polimérica proporcionadas pelo intumescimento influenciarão na difusão do princípio ativo através da membrana (SHAH; PARADKAR, 2007). Dessa forma, é de grande importância que a membrana tenha alto potencial de intumescimento e que não apresente rápida degradação no meio.

Tampão fosfato é frequentemente utilizado para esse experimento pois simula as condições fisiológicas do corpo. Em nosso estudo o soro fisiológico também foi utilizado como meio, pois é empregado para a aplicação das Memb/AU/Lip nos pacientes acometidos por queimaduras. O intervalo de tempo escolhido para o ensaio foi de 0 à 24 horas, uma vez que, o maior índice de intumescimento ocorre geralmente após 1 hora de imersão no meio (BIGI et al., 2010). A figura 7 apresenta o perfil de intumescimento das Memb/AU/Lip.

De acordo com a figura 7, as Memb/AU/Lip apresentaram um aumento na porcentagem de intumescimento, ou seja, ganharam peso a partir do tempo que foram imersas nos meios. As Memb/AU/Lip imersas em tampão fosfato apresentaram intumescimento máximo em 4 horas de imersão com 623,25 % de ganho de massa em relação ao peso inicial, enquanto que as Memb/AU/Lip imersas em soro fisiológico apresentaram intumescimento de 682,24 % em relação ao peso inicial em 6 horas de imersão.

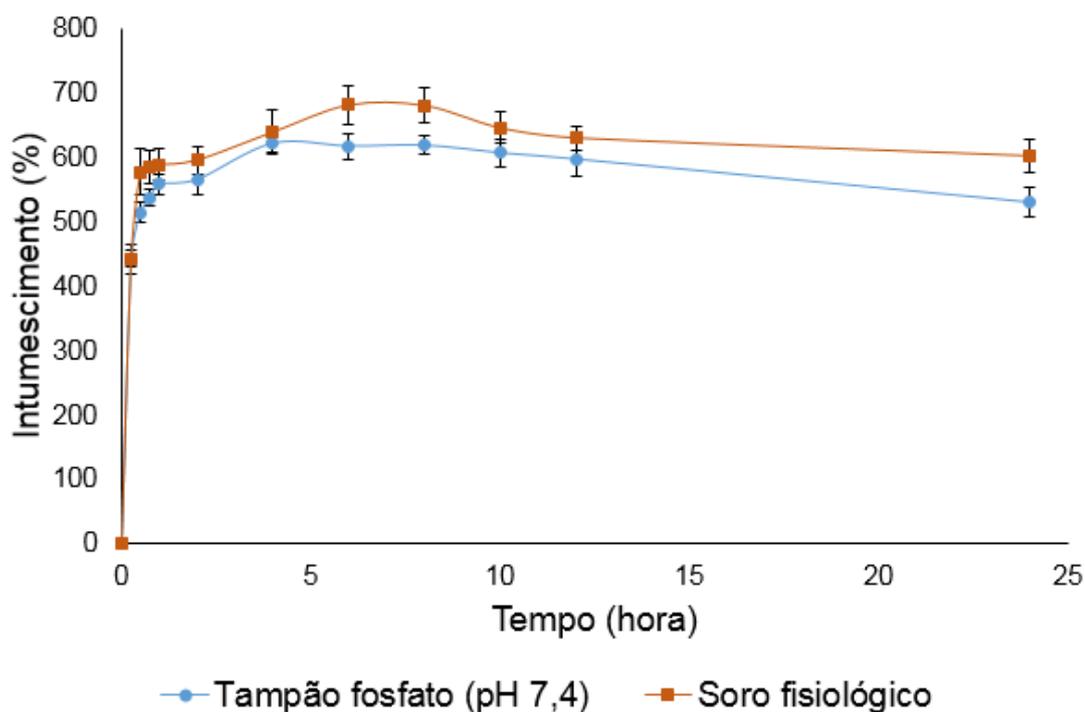


Figura 7: Perfil de intumescimento das Memb/AU/Lip em tampão fosfato (pH 7,4) e soro fisiológico. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão (n= 3) das análises.

Biscarat e colaboradores (2015) avaliaram o intumescimento de membranas de gelatina contendo polietilenoglicol e tereftalaldeído. Os autores relataram que a formulação apresenta capacidade de ganho de massa quando imersa em água por até 26 horas, pois as moléculas de água penetram nos pequenos interstícios das tripla-hélices da matriz de gelatina, a qual, é um polímero hidrofílico (BISCARAT et al., 2015). Prabhu e colaboradores (2015) realizaram o intumescimento de hidrogéis de gelatina contendo gentamicina e dexametasona em tampão fosfato (pH 7,4) e demonstraram que a formulação apresenta ganho de massa de até 365,56 % em aproximadamente 3 horas de experimento (PRABHU et al., 2015).

De acordo com os relatos descritos na literatura e com os resultados obtidos em nosso experimento, podemos observar que as formulações a base de gelatina apresentam potencial de intumescimento em diversos meios e assim são capazes de realizar a liberação o ativo. As Memb/AU/Lip apresentam capacidade de

intumescimento em ambos os meios analisados, pois obtiveram ganho de massa em relação ao peso inicial. No entanto, as imersas em soro fisiológico apresentaram vantagem devido o maior percentual de intumescimento em 24 horas de experimento. Apesar da diminuição do ganho de massa a partir de 4 e 6 horas em tampão fosfato e no soro fisiológico, respectivamente, as membranas não foram degradadas durante o experimento, ou seja, permaneceram estáveis nos meios de imersão durante 24 horas.

5.3. Desenvolvimento e validação do método por CLAE

A técnica de CLAE é bastante utilizada para identificação e quantificação de substâncias em diversas matrizes, tais como: plantas medicinais, plasma sanguíneo, sistemas nanoestruturados e diversas formulações farmacêuticas em geral. Essa ferramenta analítica permite realizar análises de vários tipos de produtos naturais ou sintéticos de maneira rápida, segura e eficaz em um curto intervalo de tempo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A figura 8A mostra o cromatograma do AU padrão no comprimento de onda de 280 nm. O AU apresentou um pico cromatográfico com TR de 7 minutos. A figura 8B mostra o cromatograma (280 nm) do AU presente nas Memb/AU/Lip, o qual, apresentou o mesmo TR e espectro UV do composto padrão. Com esses dados, confirma-se a presença de AU nas membranas e dessa forma, o método analítico desenvolvido por CLAE é viável para realizar a quantificação do AU nas Memb/AU/Lip. Além disso, podemos afirmar que o método apresenta especificidade para o composto analisado, uma vez que, apenas o pico cromatográfico do AU foi eluído, sem a presença de outros compostos, impurezas e/ou produtos de degradação.

Diante do exposto, o emprego de um sistema isocrático de eluição (a concentração da fase móvel é constante durante toda análise) utilizando como fase móvel uma mistura de metanol / ácido acético 1% (v/v) foi apropriado, pois possibilitou a eluição de um pico cromatográfico com excelente resolução, além do fato, que o tempo de análise foi adequado pois o AU foi identificado em TR inferior à 10 minutos (NUNES et al., 2015).

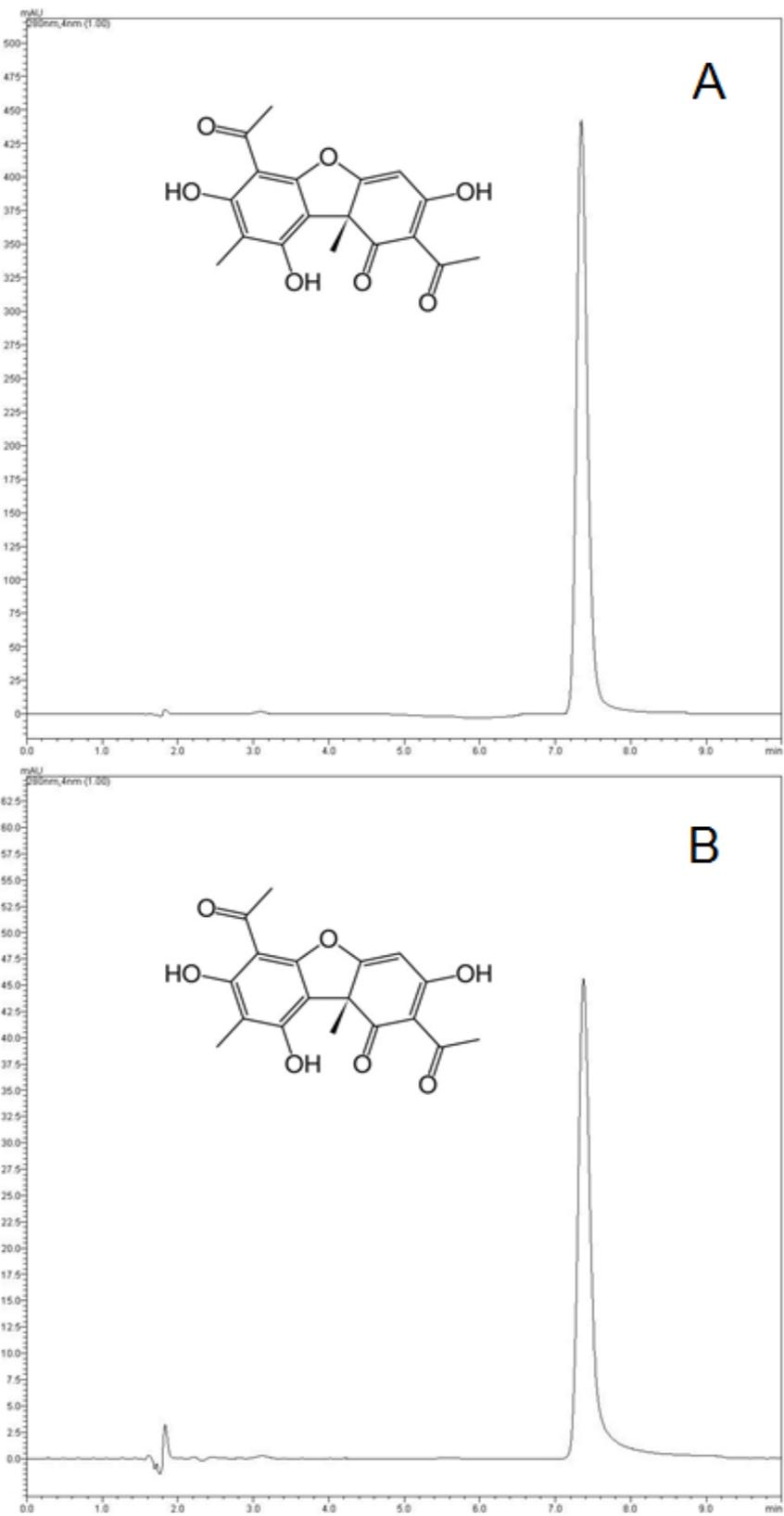


Figura 8: A: Cromatograma do AU padrão obtido por CLAE (280 nm). B: Perfil cromatográfico do AU extraído das membranas obtido por CLAE (280 nm).

O método analítico desenvolvido por CLAE foi validado em termos de linearidade, LD, LQ, precisão, exatidão e robustez. O método apresentou linearidade adequada na faixa de concentração de 5 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtendo a equação da reta $y = 92376x + 42438$ e coeficiente de correlação (r) = 0,9998 (Figura 9). Esse resultado está de acordo com a legislação vigente, a qual, admite um valor mínimo para coeficiente de correlação de 0,99 (ANVISA, 2003).

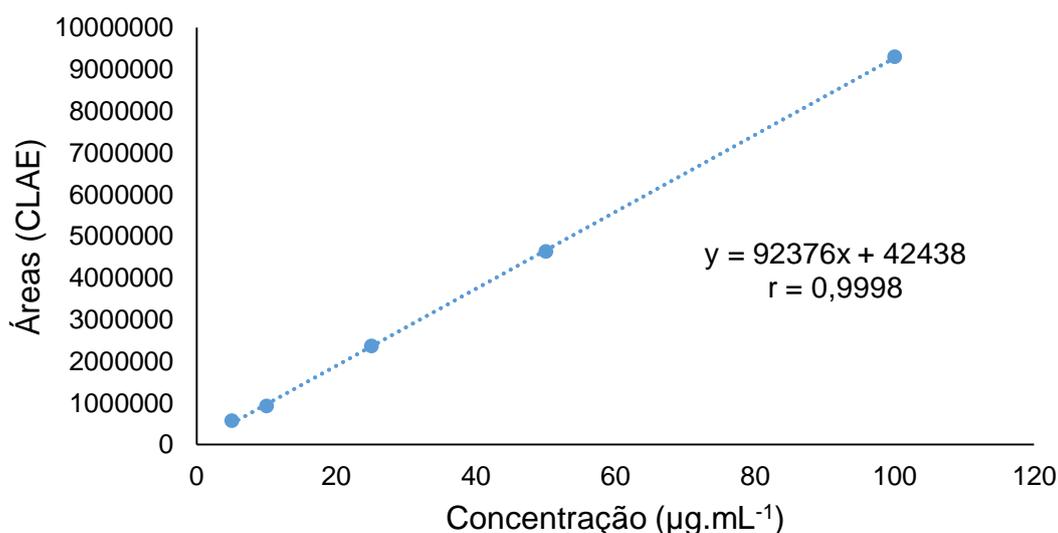


Figura 9: Curva de calibração do AU padrão na faixa de concentração de 5 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

LD e LQ foram calculados de acordo com as equações 2 e 3 e apresentaram valores de 0,28 e 0,83 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e LQ é a menor quantidade do analito que possa ser quantificado e que apresente precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). Esses resultados demonstram que o método apresenta uma alta sensibilidade para identificação e quantificação do AU.

A precisão do método foi avaliada de acordo com a repetibilidade e precisão intermediária. As análises de repetibilidade apresentaram DPR de 0,17 % e as análises de precisão intermediária DPR de 0,27 e 0,39 % nos dias 1 e 2, respectivamente (Tabela 1). Esses resultados podem ser considerados adequados para procedimentos analíticos, uma vez que, aos valores de DPR das análises foram menores que 1%.

Tabela 1: Ensaios de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) da validação do AU.

Repetibilidade			
Conc. teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média \pm DP (n= 9)	DPR (%)
100	100,38		
100	100,19		
100	99,89		
100	100,14		
100	99,95	100,15 \pm 0,17	0,17 %
100	100,33		
100	100,05		
100	100,34		
100	100,11		
Precisão intermediária			
Dia 1			
Conc. teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média \pm DP (n= 6)	DPR (%)
100	100,16		
100	100,35		
100	100,18	100,12 \pm 0,26	0,27 %
100	99,81		
100	99,79		
100	100,43		
Dia 2			
100	99,87		
100	100,17		
100	100,57	100,32 \pm 0,40	0,39 %
100	100,86		
100	99,80		
100	100,22		

A exatidão foi determinada com o teste de recuperação. A quantidade original de AU nas Memb/AU/Lip foi de 55,30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (área: 2,25 cm^2). As análises realizadas na concentração baixa (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentaram recuperação de 100,33 \pm 0,61 % e DPR de 0,60 %. Na concentração média (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a recuperação foi de 100,11 \pm 0,32 % e o DPR 0,30 %. Na concentração alta (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a recuperação foi de 99,83 \pm 0,38 % e o DPR 0,39 % (Tabela 2). Esses resultados comprovam que o método além de preciso, também é exato, pois apresentou valores de DPR menores que 5 % em todas concentrações analisadas e taxa de recuperação entre 95 – 105 % (ANVISA, 2003).

Tabela 2: Teste de recuperação do AU em diferentes concentrações.

Quant. Adicionada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Quant. Original ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Quant. Detectada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Média \pm DP (n= 3)	DPR (%)
Conc. Baixa					
5	55,30	60,29	99,80		
5	55,30	60,31	100,20	100,33 \pm 0,61	0,60
5	55,30	60,35	101,00		
Conc. Média					
50	55,30	105,31	100,02		
50	55,30	105,23	99,86	100,11 \pm 0,32	0,30
50	55,30	105,53	100,46		
Conc. Alta					
100	55,30	154,74	99,44		
100	55,30	155,14	99,84	99,83 \pm 0,38	0,39
100	55,30	155,53	100,23		

A robustez é definida como a capacidade do método em resistir à pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003). O método pode ser considerado robusto, uma vez que, nenhuma alteração significativa aconteceu nos cromatogramas com as alterações dos parâmetros escolhidos (fluxo da fase móvel, coluna analítica e temperatura). O pico do AU manteve boa resolução cromatográfica e TR na faixa de 7 minutos.

5.4. Eficiência de encapsulação do AU nas Memb/AU/Lip

A EE é um parâmetro quantitativo utilizado para calcular a quantidade (medida em porcentagem) do princípio ativo encapsulado na formulação, sendo que, foi calculada usando a equação 5 e os valores estão listados na tabela 3. A EE foi mensurada nas Memb/AU/Lip com área de 7 cm² e a quantidade inicial de AU utilizada no preparo foi de 183,54 µg·cm⁻². O teor de AU obtido com as análises por CLAE foi de 172,07 ± 0,27 µg·cm⁻² e dessa forma a EE foi de 93,75%. O valor da EE próximo à 100% indica que praticamente todo AU foi incorporado nos lipossomas/membranas, demonstrando que o método de obtenção das Memb/AU/Lip é adequado e eficiente.

Tabela 3: Teor (µg·cm⁻²) e EE (%) do AU nas Memb/AU/Lip.

	Teor (µg·cm⁻²)	Teor (µg·cm⁻²)	Média ± DP (Todas as amostras)	EE (%)
Membrana A	Membrana A	Média ± DP (n= 3)		
Segmento 1	172,32			
Segmento 2	171,65	172,04 ± 0,34		
Segmento 3	172,14			
Membrana B	Membrana B	(Média ± DP) (n= 3)		
Segmento 1	172,21			
Segmento 2	172,44	172,22 ± 0,21	172,07 ± 0,27	93,75%
Segmento 3	172,02			
Membrana C	Membrana C	(Média ± DP) (n= 3)		
Segmento 1	171,75			
Segmento 2	172,29	171,97 ± 0,28		
Segmento 3	171,87			

Alguns estudos realizaram a incorporação de fármacos sintéticos em lipossomas e demonstraram bons resultados quanto à EE. Li e colaboradores

(2016) realizaram a incorporação de luteolina em lipossomas com a finalidade de melhorar sua solubilidade e aumentar o potencial anticâncer. A EE obtida foi de 71,55 % (LI et al., 2016). Li e colaboradores (2016) prepararam uma formulação com madecassoside encapsulado em lipossomas para otimizar o uso desse fármaco no combate à psoríase e obtiverem uma EE de 70,14 % (LI et al., 2016). Luo e colaboradores (2016) encapsularam ácido oleanólico em lipossomas com o objetivo de aumentar a sua solubilidade em água e os níveis da substância na corrente sanguínea. A EE do ácido oleanólico/lipossomas foi de 83,30 % (LUO et al., 2016). Os lipossomas são sistemas nanoestruturados que apresentam característica anfifílica e dessa forma, conseguem carrear substâncias polares e/ou apolares com eficiência. Dessa forma, a EE de produtos sintéticos em lipossomas tende a ser alta, com valores próximo à 100% (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

5.5. Uniformidade de conteúdo do AU nas Memb/AU/Lip

A uniformidade de conteúdo é um método utilizado para avaliar a distribuição do princípio ativo na formulação. A principal finalidade da técnica é demonstrar que a substância em estudo foi difundida ao longo de toda a preparação, sem acúmulos em determinados pontos. O AU apresentou uma distribuição uniforme nas Memb/AU/Lip, pois o teor das 33 frações analisadas por CLAE apresentaram pequenas variações. O teor médio e o DPR foram de $171,71 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 0,48 %; $171,94 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 0,33 %; $172,04 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 0,18 %, para as membranas 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 4). Porfírio e colaboradores (2015), fizeram um estudo semelhante com filmes de hidroxipropilmetilcelulose contendo zidovudina e lamivudina, demonstrando a distribuição uniforme dessas substâncias na formulação, com DPR de 1,14 e 0,46%, respectivamente (PORFÍRIO et al., 2015).

Tabela 4: Distribuição do AU nas Memb/AU/Lip.

Fração	Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)		
	membrana 1	membrana 2	membrana 3
1	172,32	171,38	172,14
2	171,65	172,48	172,33
3	172,13	171,45	171,65
4	172,10	172,47	172,09
5	172,44	171,45	171,57
6	172,35	171,31	171,68
7	170,66	171,36	172,28
8	171,36	172,51	171,75
9	172,71	172,56	172,48
10	170,08	172,67	172,22
11	171,05	171,72	172,35
Média \pm DP (n= 11)	171,71 \pm 0,83	171,94 \pm 0,58	172,04 \pm 0,32
DPR (%)	0,48 %	0,33 %	0,18 %

A eficácia de produtos farmacêuticos designados para uso tópico, como os cremes, géis, hidrogéis e membranas biodegradáveis, pode ser aumentada com o princípio ativo uniformemente distribuído na formulação, garantindo a liberação da substância na mesma quantidade em toda área de aplicação. Essa particularidade é de grande importância para as Memb/AU/Lip, as quais, serão submetidas à ensaios clínicos por nosso grupo de pesquisa, para avaliar sua eficácia no tratamento de lesões causadas por queimaduras.

5.6. Perfil de liberação *in vitro* do AU

Os estudos de liberação *in vitro* do AU das Memb/AU/Lip e Memb/AU (formulação controle) foram realizados com a utilização de células de Franz com área de difusão de 1,76 cm², utilizando como barreira de liberação uma membrana de acetato de celulose e a condição *sink* do sistema foi mantida usando uma solução aquosa de DMSO 2% (v/v). A quantidade inicial de AU nas membranas com área de 1,76 cm² foi de 42,15 µg·cm⁻².

O perfil de liberação do AU foi obtido com base no percentual de liberação do fármaco em função do tempo (Figura 10). As Memb/AU não apresentaram um perfil de liberação controlado, uma vez que, permitiu a rápida liberação do AU presente na formulação. O perfil mostra que em 4 horas de experimento, 99,44% (41,91 µg·cm⁻²) do AU foi liberado. Esse fato ocorre, pois as Memb/AU foram preparadas sem a incorporação do AU em lipossomas, ou seja, o AU está “livre” e dessa forma, a membrana não foi capaz de controlar a liberação ao longo do tempo.

Por outro lado, as Memb/AU/Lip apresentou um perfil de liberação controlado. Nas primeiras duas horas de experimento, as Memb/AU/Lip demonstraram uma fase *burst* de liberação. Essa fase é comum de formulações que apresentam sistemas de liberação controlado e é caracterizada pela rápida liberação do fármaco em pouco tempo de experimento (ZHAI et al., 2014). Em 2 horas, foi liberado 38,70% (16,31 µg·cm⁻²) do AU presente. No entanto, após às 2 horas até alcançar 24 horas, as Memb/AU/Lip mostraram uma liberação controlada do AU, liberando 98,15% (41,37 µg·cm⁻²) do AU presente. Essa membrana foi preparada com AU incorporados em lipossomas, os quais, são nanossistemas versáteis que conseguem controlar a liberação de fármacos.

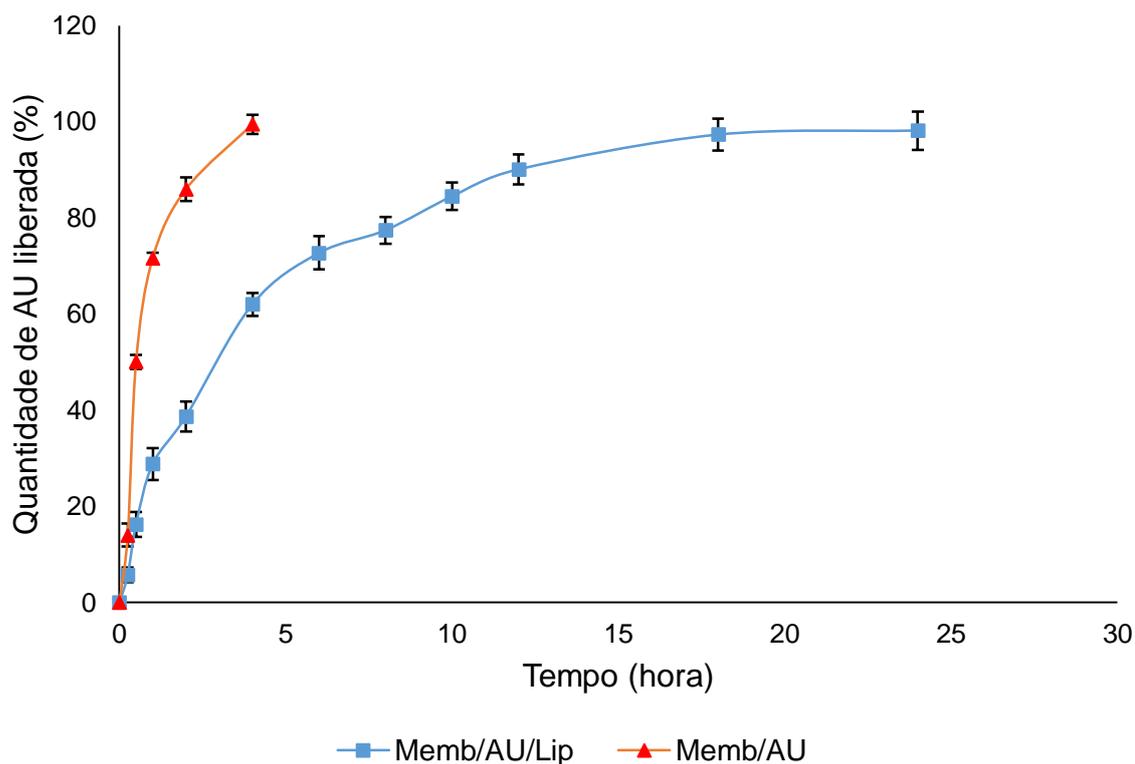


Figura 10: Perfil de liberação *in vitro* do AU nas Memb/AU/Lip e Memb/AU. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n=6$) das análises.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível confirmar que a Memb/AU/Lip foi capaz de controlar a liberação do AU, devido a sua incorporação nas vesículas dos lipossomas. Yang e colaboradores (2015), realizaram um estudo com cloridrato de vancomicina incorporados em lipossomas e relataram um perfil de liberação semelhante ao nosso estudo, com a fase *burst* acontecendo em 4 horas de experimento e a liberação de 94% do fármaco após 10 horas. Nesse mesmo estudo, eles discutiram que o sistema apresenta um perfil de liberação controlado, que pode ser explicado porque o fármaco foi envolvido pelo invólucro lipídico dos lipossomas e assim, o fármaco foi liberado gradualmente pelas matrizes lipídicas. Portanto, as Memb/AU/Lip podem manter a concentração do princípio ativo constante durante um longo período de tempo e reduzir a frequência de administração (YANG et al., 2015).

5.7. Estudos de penetração/permeação *in vitro* do AU

A absorção cutânea *in vitro* do AU foi avaliada através de células de Franz com área de difusão de 1,76 cm², usando pele de porco como barreira de permeação. O estrato córneo da pele foi removido para simular uma queimadura de 1º grau. O perfil de penetração e permeação do AU nas camadas da pele foi obtido com a quantificação do AU em µg por cm² na epiderme e na derme, respectivamente (Figura 11).

A quantidade de AU na epiderme foi de 3,54 ± 0,79 µg·cm⁻² (8,41 %). No entanto, uma maior quantidade de AU foi quantificado na derme (13,64 ± 0,17 µg·cm⁻² (32,38 %)). Esses resultados mostram uma diferença significativa (p < 0,0001) entre a quantidade de AU nas camadas da pele, pois o AU tende a se acumular na derme em maior quantidade, quando comparado com a epiderme (SERAFINI et al., 2014). Com esses resultados, podemos afirmar que o AU incorporado em lipossomas tem a capacidade de penetração e permeação, pois foi quantificado na epiderme e na derme, respectivamente.

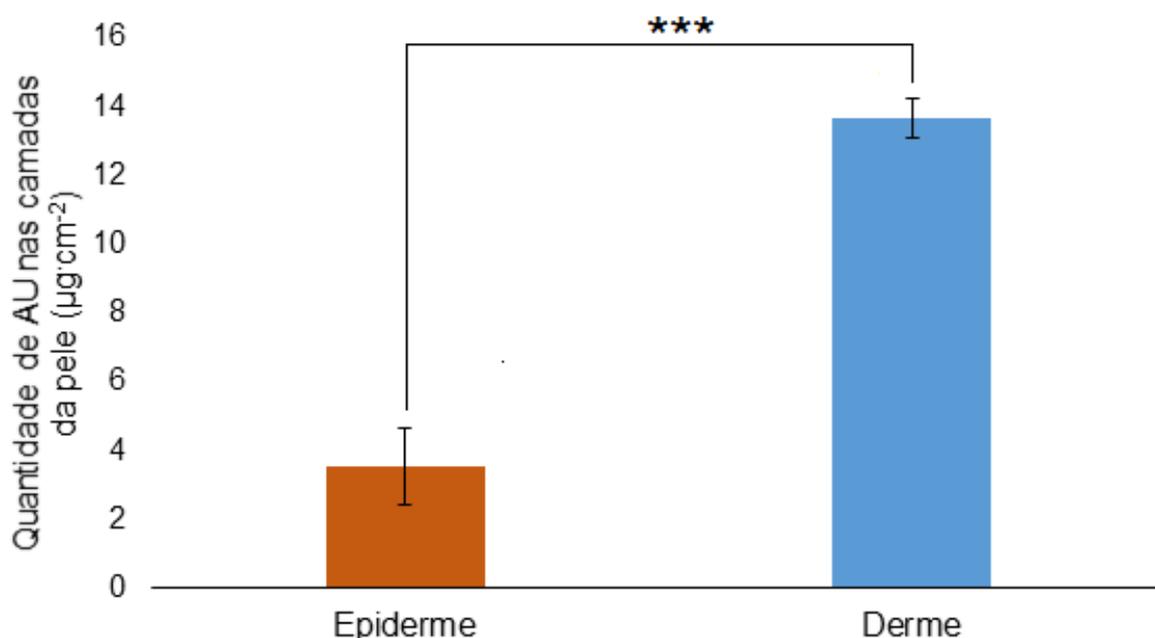


Figura 11: Perfil de penetração e permeação do AU nas camadas da pele. *** (p < 0,0001). Os resultados foram expressos de acordo com a média ± desvio padrão (n= 6) das análises.

Indubitavelmente, na medida em que um fármaco está sendo liberado e apresenta a capacidade de penetrar e permear nas camadas da pele, ele apresenta potencialidade para aplicação em sistemas transdérmicos. Alguns estudos relatam que lipossomas em comparação com outros sistemas de liberação de fármacos, aumentam e/ou melhoram a retenção do fármaco na pele devido à presença dos fosfolípidios (RAZA et al., 2013; CLARES et al., 2014).

Serafini e colaboradores (2014), demonstraram que o AU apresenta capacidade de permeação nas camadas da pele. Nesse trabalho, uma formulação simples utilizando AU livre incorporado em gel de hidroxietilcelulose comprovou que o AU tem grande potencial para aplicação transdérmica. Nesse sentido, nós removemos o estrato córneo para simular lesão de 1^o grau e avaliar o perfil de penetração / permeação na pele lesada. Serafini et al (2014) demonstraram que o AU é capaz de penetrar no estrato córneo que representa a principal barreira física da pele. Dessa forma, o AU é uma molécula promissora para uma formulação transdérmica porque é capaz de penetrar a epiderme a partir do estrato córneo e permear até atingir a derme, como foi demonstrado com nossos experimentos (SERAFINI et al., 2014).

5.8. Adesão do AU nas camadas da pele

O ensaio de lavabilidade foi utilizado para medir a capacidade de adesão das Memb/AU/Lip na pele. É de grande importância que uma formulação de uso tópico apresente eficiência para aderir-se na superfície da pele, pois assim, evita interrupções durante o tratamento, como por exemplo, em situações que seja necessário o movimento do membro no qual foi aplicada ou em circunstâncias que provoque a sudorese da região. Antes dos experimentos de lavabilidade *in vitro*, utiliza-se solução salina ou soro fisiológico para lavar a formulação teste, simulando condições de suor (CONTRI et al., 2014).

O perfil de lavabilidade foi obtido de acordo com a porcentagem de AU aderido na pele em função do tempo. Antes da lavagem da formulação, as Memb/AU/Lip com área de 1,76 cm² apresentava teor de 42,15 µg.cm⁻² de AU. A figura 12 mostra a quantidade de AU removida da formulação com a lavagem, que corresponde à 26,03 % (10,98 µg.cm⁻²). Dessa forma, após 4 horas de experimento,

73,97 % ($31,17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) de AU permaneceu nas Memb/AU/Lip e/ou na pele. Em seguida, foi realizado a quantificação do AU aderido nas camadas da pele (figura 13). Na epiderme, foi quantificado $2,32 \pm 0,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de AU e na derme $8,87 \pm 0,56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Esses resultados mostram uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre a quantidade de AU aderido nas camadas da pele, pois o AU tende a permanecer na derme em maior quantidade.

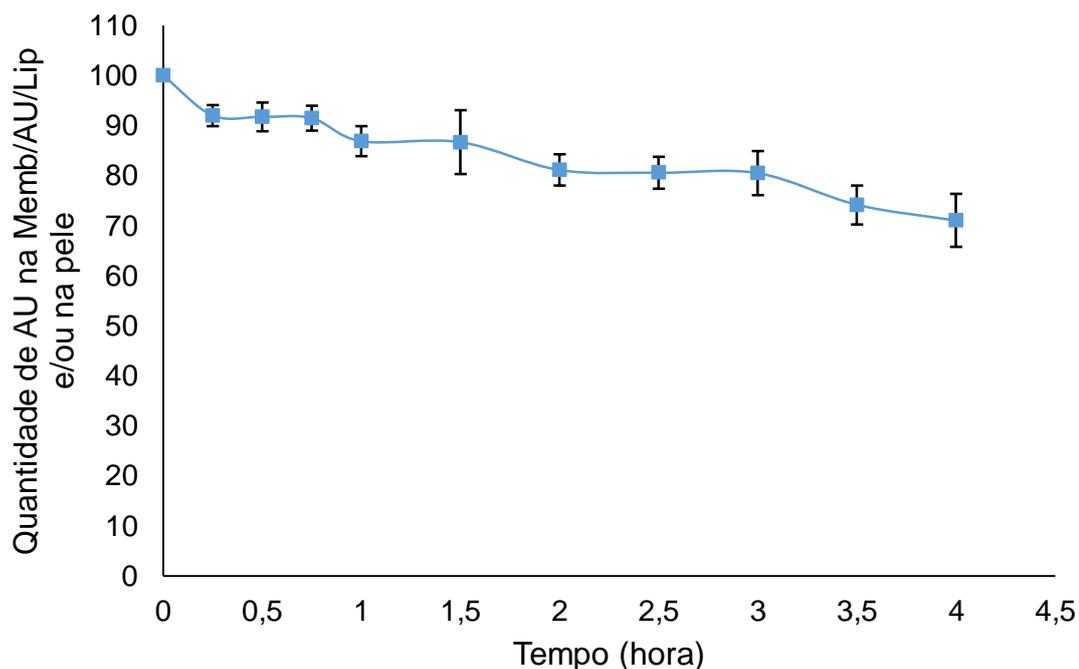


Figura 12: Porcentagem de AU retida nas Memb/AU/Lip e/ou na pele após às 4 horas de lavagem. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 6$) das análises.

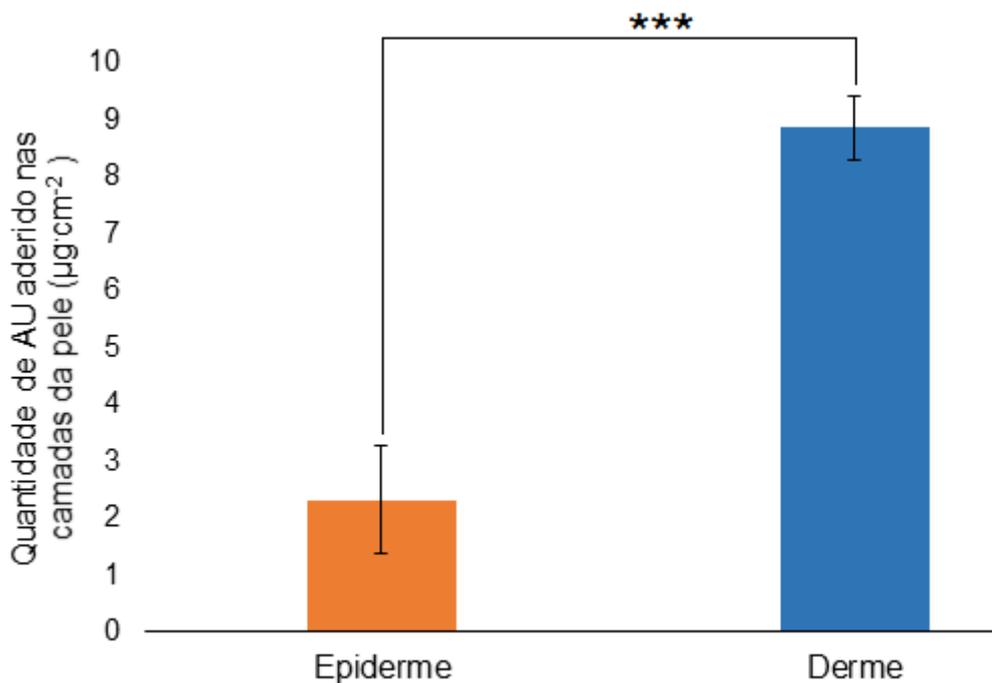


Figura 13: Perfil de adesão do AU nas camadas da pele. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 6$) das análises.

Contri e colaboradores (2014) avaliaram a adesividade de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicina e di-hidrocapsaicina incorporados em hidrogel de quitosana. Essa formulação apresentou capacidade de adesão na pele, após lavagem com solução aquosa de NaCl 0,9% durante 5 horas. As nanocápsulas poliméricas possibilitaram a adesão da formulação devido a sua grande área superficial, aumentando o contato com a pele. A quitosana, polímero escolhido nesse trabalho, apresenta propriedades adesivas, proporcionando uma boa interação da formulação com a pele (CONTRI et al., 2014). As Memb/AU/Lip são constituídas de gelatina, polímero natural com características bioadesivas e por lipossomas, os quais, são sistemas nanoestruturados que protegem o fármaco de agente externos e assim como as nanocápsulas poliméricas, podem otimizar o contato do fármaco com a pele proporcionando uma maior adesão.

De acordo com os dados obtidos, o AU na forma lipossomal presente nas membranas é de fato, parcialmente aderido nas camadas da pele e dessa forma,

as Memb/AU/Lip, apresentam-se como uma formulação promissora para o tratamento de lesões causadas por queimaduras, pois, apresentam capacidade de controlar a liberação do AU, realizar a penetração/permeação cutânea e proporcionar a adesão do fármaco na pele.

5.9. Estudo piloto de estabilidade das membranas

Os testes de estabilidade envolvem várias fases do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica e um dos seus objetivos é conhecer o período de tempo que um produto mantém suas propriedades terapêuticas, frente às variações climáticas ambientais onde está sendo comercializado (SANTOS; MORETTO, 2005). A estabilidade do produto final irá depender das propriedades físico-químicas, dos constituintes da formulação e de fatores ambientais, tais como: luz, temperatura e umidade. Essas análises são de grande importância, pois avaliam a degradação do princípio ativo de uma preparação, bem como, o surgimento de produtos de degradação e alterações nas características macroscópicas da formulação.

Em nosso estudo, as membranas teste e controle, foram submetidas à diferentes condições de temperatura durante 120 dias. Quanto à refrigeração, o teor do AU das Memb/AU/Lip foi de $172,52 \pm 0,47 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tempo 0 e de $169,01 \pm 0,52 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tempo 120 e para as Memb/AU foi $171,83 \pm 0,41 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $143,52 \pm 0,10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Figura 14). Após as análises por CLAE das Memb/AU/Lip acondicionadas em temperatura ambiente, o teor de AU no tempo 0 foi de $172,80 \pm 0,50 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e no tempo 120, $170,39 \pm 0,59 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, enquanto que para as Memb/AU foi de $172,23 \pm 0,27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $152,54 \pm 0,58 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Figura 15). As Memb/AU/Lip que foram acondicionadas em estufa apresentaram teor de AU de $172,49 \pm 0,26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $168,58 \pm 0,63 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, nos tempos 0 e 120, respectivamente e as Memb/AU $172,69 \pm 0,13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $145,79 \pm 0,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, nos tempos 0 e 120, respectivamente (Figura 16).

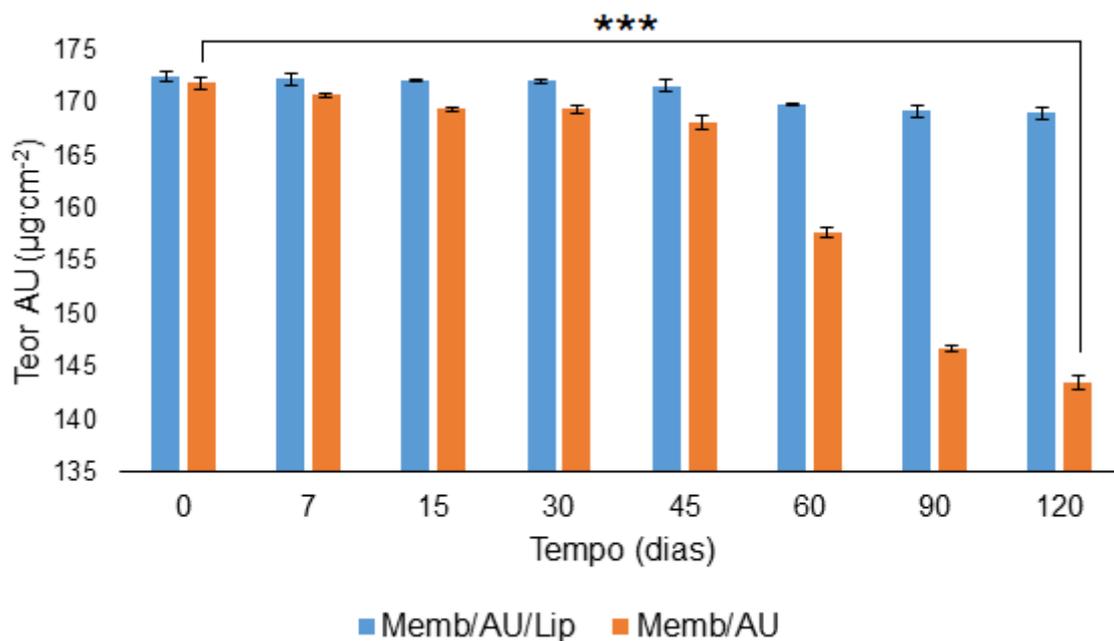


Figura 14: Perfil do estudo de estabilidade das membranas sob refrigeração (5 ± 2 °C) durante 120 dias. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 3$) das análises.

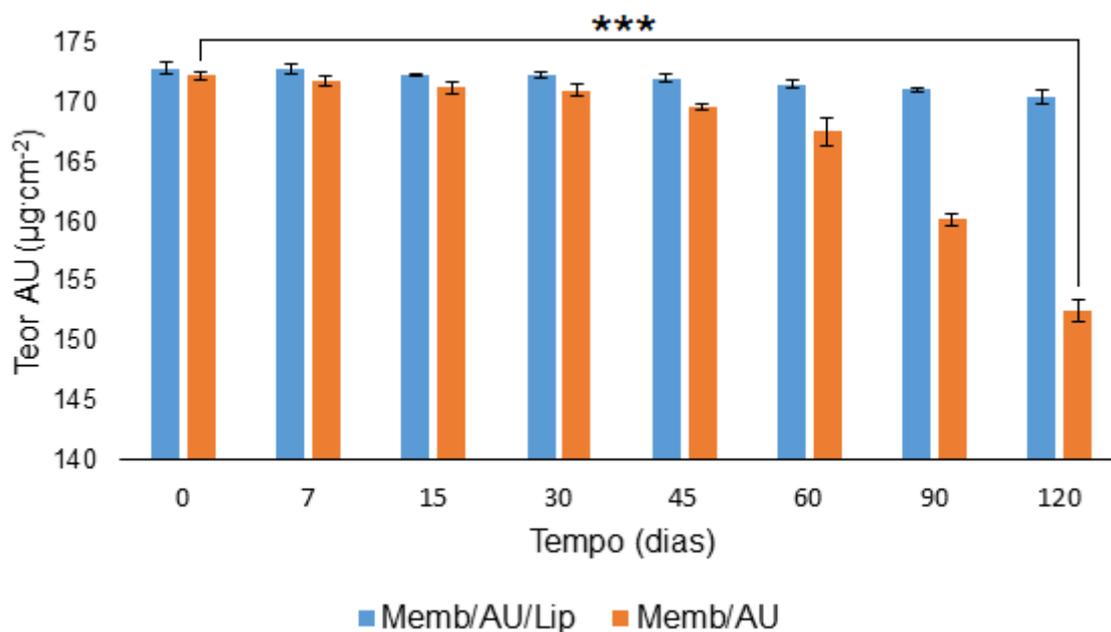


Figura 15: Perfil do estudo de estabilidade das membranas sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 120 dias. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n= 3$) das análises.

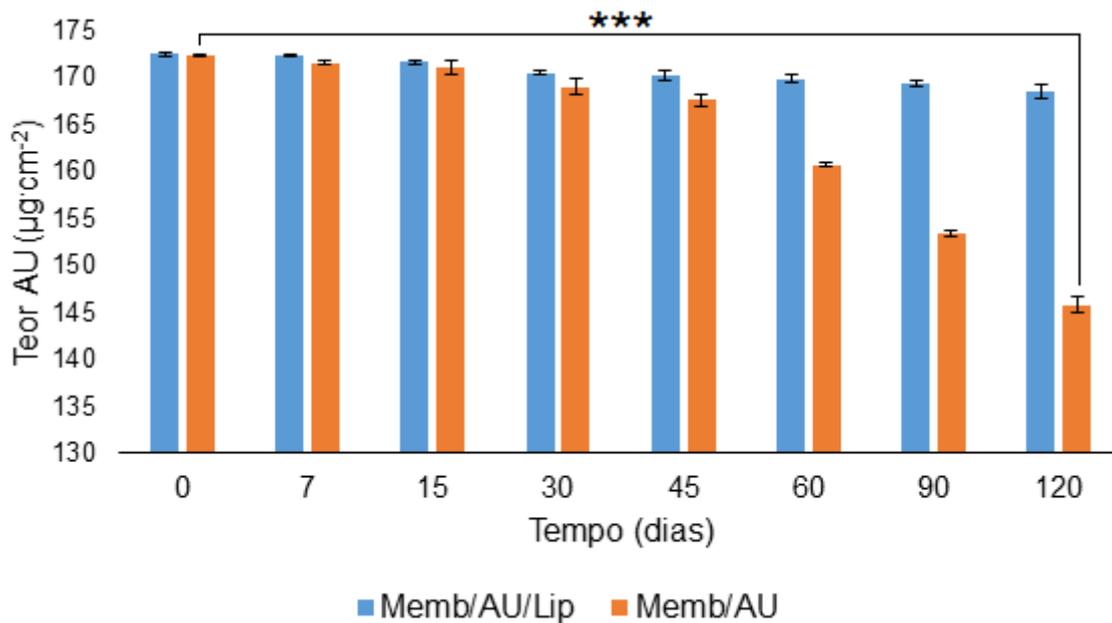


Figura 16: Perfil do estudo de estabilidade das membranas acondicionadas em estufa ($45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 120 dias. *** ($p < 0,0001$). Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n = 3$) das análises.

A quantidade de AU nas membranas diminuem com o passar do tempo, provavelmente, devido a uma degradação térmica do composto. Para as Memb/AU/Lip o teor de AU diminui 2,03 %, 1,39 % e 2,26 %, no intervalo de tempo de 120 dias, quando acondicionados em freezer, temperatura ambiente e estufa, respectivamente. Na formulação controle (Memb/AU) a quantidade de AU diminui 16,47 %, 11,43 % e 15,57 % em 120 dias, quando submetidas à refrigeração, temperatura ambiente e estufa, respectivamente. As Memb/AU apresentaram uma redução significativa do teor de AU no intervalo de tempo de 0 à 120 dias ($p < 0,0001$), enquanto que as Memb/AU/Lip não apresentaram.

Com esses resultados, podemos observar que a diminuição do teor de AU é menor nas Memb/AU/Lip, uma vez que, nessa formulação o AU está incorporado em lipossomas, o qual, é um sistema nanoestruturado que apresenta capacidade de proteger os fármacos contra agentes externos, como por exemplo, variações de temperatura. No entanto, o AU das Memb/AU apresentou uma taxa de degradação maior, o que está relacionado com o fato do AU está “livre” ao longo da membrana. O teor médio ($n = 3$) do AU de todas frações das membranas utilizadas para os ensaios de estabilidade estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Teor médio (n= 3) do AU nas frações das Memb/AU/Lip e Memb/AU nos intervalos de tempo dos estudos de estabilidade.

Teor AU ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) Memb/AU/Lip (Média \pm DP (n= 3))			
Tempo (dias)	Refrigeração	Temp. ambiente	Estufa
0	172,52 \pm 0,47	172,80 \pm 0,50	172,49 \pm 0,26
7	172,20 \pm 0,50	172,75 \pm 0,48	172,46 \pm 0,10
15	172,03 \pm 0,10	172,31 \pm 0,10	170,66 \pm 0,17
30	172,03 \pm 0,19	172,28 \pm 0,20	170,56 \pm 0,22
45	171,60 \pm 0,57	171,99 \pm 0,29	170,18 \pm 0,51
60	169,90 \pm 0,10	171,50 \pm 0,42	169,45 \pm 0,36
90	169,19 \pm 0,59	171,04 \pm 0,20	169,37 \pm 0,47
120	169,01 \pm 0,52	170,39 \pm 0,59	168,58 \pm 0,63
Teor AU ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) Memb/AU (Média \pm DP (n= 3))			
Tempo (dias)	Refrigeração	Temp. ambiente	Estufa
0	171,83 \pm 0,41	172,23 \pm 0,27	172,69 \pm 0,13
7	170,73 \pm 0,23	171,71 \pm 0,44	171,62 \pm 0,17
15	169,38 \pm 0,20	171,25 \pm 0,53	171,10 \pm 0,83
30	169,36 \pm 0,32	170,94 \pm 0,51	169,02 \pm 0,92
45	168,09 \pm 0,61	170,62 \pm 0,10	167,62 \pm 0,63
60	157,70 \pm 0,54	169,51 \pm 1,25	160,67 \pm 0,20
90	146,67 \pm 0,28	160,19 \pm 0,58	153,41 \pm 0,30
120	143,52 \pm 0,57	152,54 \pm 0,88	145,79 \pm 0,92

Durante os experimentos de estabilidade não foi observado o surgimento de produtos de degradação ou impurezas nas membranas, uma vez que, as análises de teor por CLAE não apresentaram cromatogramas com a eluição de outros picos cromatográficos, além do pico correspondente ao AU no TR de 7 minutos. Não houve alterações nas características macroscópicas das Memb/AU/Lip, mantendo-se a coloração amarelada, boa flexibilidade e superfície lisa (sem a presença de grumos ou ranhuras).

5.10. Estudo piloto de fotoestabilidade das membranas

Estudos de fotoestabilidade de formulações farmacêuticas são necessárias para determinar condições de armazenamento, a fim de garantir a qualidade de produtos farmacêuticos de uso humano e veterinário. Esses testes tem como objetivo demonstrar que exposição à luz não resulta em alterações significantes no produto ou degradação do princípio ativo (ANVISA, 2012). Para esses ensaios, as membranas foram expostas à uma fonte de luz durante intervalo de tempo de 0 – 72 horas.

O perfil de fotoestabilidade da formulação teste e controle está presente na figura 17. As Memb/AU/Lip apresentaram teor de AU de $172,05 \pm 1,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tempo 0 e de $169,92 \pm 0,36 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tempo 72 horas. A quantidade de AU das Memb/AU/Lip diminuiu 1,23 % no intervalo de tempo do experimento. Os resultados demonstram que a luz não é capaz de degradar o AU da formulação, de forma que provoque a inatividade do produto. Esse fato está associado a incorporação do AU em lipossomas, os quais, são capazes de proteger o fármaco da exposição à luz, bem como, de variações térmicas, resultados comprovados com o estudo piloto de estabilidade das membranas.

Por outro lado, as Memb/AU apresentaram teor de AU de $172,07 \pm 0,64 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $117,65 \pm 2,57 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ nos tempos 0 e 72 horas, respectivamente. Nessa formulação o teor de AU diminuiu 31,6 % após 72 horas, ou seja, ocorreu uma diminuição significativa do teor de fármaco em relação às Memb/AU/Lip ($p < 0,0001$), pois nas Memb/AU o AU não está incorporado em lipossomas, ou seja, o fármaco não apresenta uma estrutura de proteção contra a luz. As características macroscópicas das membranas não foram alteradas durante a exposição à luz e não houve aparecimento de produtos de degradação ou impurezas, pois não foi detectado outros picos cromatográficos durante as análises por CLAE. O teor médio ($n= 3$) de AU das Memb/AU/Lip e Memb/AU em todos intervalos de tempo estão descritos na tabela 6.

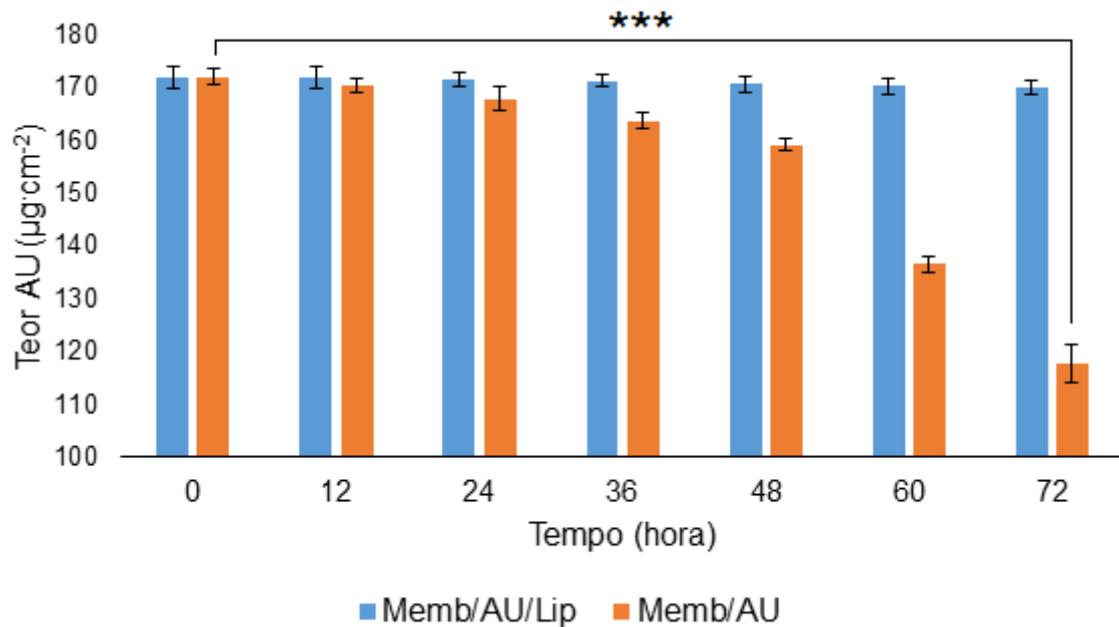


Figura 17: Perfil do estudo de fotoestabilidade das membranas durante a exposição à luz nos intervalos de tempo de 0 – 72 horas. *** (p < 0,0001). Os resultados foram expressos de acordo com a média ± desvio padrão (n= 3) das análises.

Tabela 6: Teor médio (n= 3) de AU nas frações das Memb/AU/Lip e Memb/AU nos intervalos de tempo dos estudos de fotoestabilidade.

Teor AU (µg·cm⁻²; Média ± DP (n= 3))		
Tempo (horas)	Memb/AU/Lip	Memb/AU
0	172,05 ± 1,05	172,07 ± 0,64
12	171,90 ± 0,94	170,32 ± 0,38
24	171,54 ± 0,43	167,89 ± 1,40
36	171,24 ± 0,10	163,69 ± 0,49
48	170,68 ± 0,59	159,16 ± 0,23
60	170,34 ± 0,48	136,59 ± 0,29
72	169,92 ± 0,36	117,65 ± 2,57

Os ensaios de estabilidade e fotoestabilidade são de grande importância durante as etapas do desenvolvimento de um produto farmacêutico até a sua aprovação para comercialização no mercado, pois são testes base para a determinação do prazo de validade e das condições de armazenamento do produto.

De acordo com os nossos resultados, as Memb/AU/Lip provavelmente apresentam prazo de validade adequado para sua utilização, uma vez que, não demonstraram diminuição significativa do princípio ativo ou alterações das propriedades físico-químicas e macroscópicas durante o tempo de estudo.

6. Conclusão

Com os resultados obtidos do presente estudo, podemos afirmar que as Memb/AU/Lip é um produto obtido a partir de biomateriais e com base nanotecnológica promissor para o tratamento de lesões causadas por queimaduras. O método analítico desenvolvido e validado por CLAE demonstra que o AU é incorporado de maneira efetiva nas membranas, com EE de 93,75%, confirmando que o método de obtenção das membranas é eficaz. Macroscopicamente, as Memb/AU/Lip mostram uma distribuição uniforme do AU, que foi comprovado pelo teste de uniformidade de conteúdo e também apresenta capacidade de intumescimento em tampão fosfato (pH 7,4) e soro fisiológico. As Memb/AU/Lip foram capazes de controlar a liberação do AU, promover a penetração e permeação do fármaco nas camadas da pele, bem como, apresentou capacidade de adesão na pele. A formulação demonstrou estabilidade quanto à variações térmicas e exposição à luz. Diante do exposto, os resultados obtidos com essas caracterizações, abrem as perspectivas que essas membranas são um produto inovador e com potencial para a realização de ensaios clínicos, com a expectativa que futuramente, sejam utilizadas para a otimização do tratamento de queimaduras.

7. Referências

AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocoll**, v. 28, n. 1, p. 189-199, 2012.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Res Lett**, v. 8, p. 102-108, 2013.

ANDRADE, A. G.; LIMA, C. F.; ALBUQUERQUE, A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 21-30, 2010.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. **Nat Prod Res**, v. 29, n. 23, p. 2167-2180, 2015.

AYMAN, A. et al. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and fibroblast growth factor production. **Am J Surg**, v. 201, p. 809-818, 2011.

BAČKOROVÁ, M. et al. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 3, p. 462-468, 2012.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz J Pharm Sci**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BANYARD, D. A. et al. Regenerative Biomaterials: A Review. **Plast Reconstr Surg**, v. 135, n. 6, p. 1740-1748, 2015.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin. Dermatol**, v. 30, n. 3, p. 257-262, 2012.

BIGI, A. et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763 – 768, 2010.

BISCARAT, J. et al. Effect of chemical cross-linking on gelatin membrane solubility with a non-toxic and non-volatile agent: Terephthalaldehyde. **Int J Biol Macromol**, v. 74, p. 5-11, 2015.

- BOATENG, J. et al. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. **Int J Biol Macromolec**, v. 79, p. 63-71, 2015.
- BOMFIM, R. R. et al. Larvicidal activity of Cladonia substellata extract and usnic acid against Aedes aegypti and Artemia salina. **Lat Am J Pharm**, v. 28, p. 580-584, 2009.
- BORAN, G.; REGENSTEIN, J. M. Fish gelatin. **Adv Food Nutr Res**, v. 60, p. 119-143, 2010.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 975-999, 2015.
- BRISDELLI, F. et al. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. **Phytother Res**, v. 27, n. 3, p. 431-437, 2013.
- BRUNO, M. et al. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.
- CAMPANELLA, L. et al. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, v. 84, p. 329-334, 2002.
- CARUSO, D. M. et al. Randomized clinical study of Hydrofiber dressing with silver or silver sulfadiazine in the management of partial-thickness burns. **J Burn Care Res**, v. 27, n. 3, p. 298-309, 2006.
- CASSIDY, C. et al. Biobrane versus duoderm for the treatment of intermediate thickness burns in children: a prospective, randomized trial. **Burns**, v. 31, n. 7, p. 890-893, 2005.
- CAVALCANTE, D. R. R. et al. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 77, n. 3, p. 278-284, 2011.
- CHEN, Q.; LIANGA, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Polym Sci**, v. 38, p. 584-671, 2013.

CLARES, B. et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. **Int J Pharm**, v. 473, p. 591-598, 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª edição, editora: Unicamp, 2006.

CONTRI, R. V. et al. Combined Effect of Polymeric Nanocapsules and Chitosan Hydrogel on the Increase of Capsaicinoids Adhesion to the Skin Surface. **J. Biomed. Nanotechnol**, v. 10, n. 5, p. 820-830, 2014.

CONTRI, R. V. et al. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. **J Biomed Nanotechnol**, v. 10, n. 5, p. 820-830, 2014.

COUTURAUD, V. **Biophysical characteristics of the skin in relation to race, sex, age, and site**. 3ª Ed. Informa Healthcare, New York, 2009.

CURCIO, M. et al. Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 76, n. 1, p. 48-55, 2010.

DANTAS, M. D. M. et al. Improvement of dermal burn healing by associating sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 6, p. 1-9, 2011.

DARGAVILLE, T. R. et al. Sensors and imaging for wound healing: a review. **Biosens Bioelectron**, v. 41, p. 30-42, 2013.

DAS, S.; BAKER, A. B. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 4, n. 82, p. 1-20, 2016.

DE ALMEIDA, E. B. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 2, p. 419- 425, 2013.

DE CARVALHO, E. A. B. et al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v. 36, n. 2, p. 155-161, 2005.

DE MELO COSTA, A. C. et al. Products with Natural Components to Heal Dermal Burns: A Patent Review. **Recent Pat Biotechnol**, v. 9, n. 3, p. 168-175, 2015.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Quim Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

EKDAHL, K. N. et al. Innate immunity activation on biomaterial surfaces: A mechanistic model and coping strategies. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 1042-1050, 2011.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **J Control Release**, v. 172, n. 3. p. 1075-1091, 2013.

FERRAZ-CARVALHO, R. S. et al. Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 330-334, 2016.

FERREIRA, E. et al. Curativo do paciente queimado: uma revisão da literatura. **Rev Esc Enferm USP**, v. 37, p. 44-45, 2003.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. D. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Quím Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FRANCOLINI, I. et al. Water Soluble Usnic Acid-Polyacrylamide Complexes with Enhanced Antimicrobial Activity against Staphylococcus epidermidis. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 4, p. 7356-69, 2013.

GAINZA, G. et al. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 1551-1573, 2015.

GEE KEE, E. L. et al. Randomized controlled trial of three burns dressings for partial thickness burns in children. **Burns**, v. 41, n. 5, p. 946-955, 2015.

GENUINO, G. A. S. et al. Topical petrolatum gel alone versus topical silver sulfadiazine with standard gauze dressings for the treatment of superficial partial

thickness burns in adults: A randomized controlled trial. **Burns**, v. 40, n. 7, p. 1267-1273, 2014.

GHANIMÉ, G.; RIZKALLAH, N.; SAID, J. M. Epidemiology of major burns at the Lebanese Burn Center in Geitawi, Lebanon. **Ann Burns Fire Disasters**, v. 26, n. 2, p. 59-62, 2013.

GHIEH, F. et al. The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review. **Biomed Res Int**. v. 2015, 2015.

GUPTA, S. et al. Burn management capacity in low and middle-income countries: a systematic review of 458 hospitals across 14 countries. **Int J Surg**, v. 12, n. 10, p. 1070-1073, 2014.

HASANI-SADRABADI, M. M. et al. Preparation and characterization of nanocomposite polyelectrolyte membranes based on Nafion® onomer and nanocrystalline hydroxyapatite. **Polymer**, v. 52, p. 1286-1296, 2011.

HERMANS, M. H. Results of an internet survey on the treatment of partial thickness burns, full thickness burns, and donor sites. **J Burn Care Res**, v. 28, n. 6, p. 835-847, 2007.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.

HUANGA, Y. et al. Optimization on preparation conditions of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide liposome and its immunological activity. **Carbohydr Polym**, v. 104, p. 118-126, 2014.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina (USP)**, v. 89, n. 3, p. 125-131, 2010.

ISERI, S. O. et al. Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma. **Burns**, v. 34, p. 361-369, 2008.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology adv**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JEANES, A.; BITMEAD, J. Reducing bloodstream infection with a chlorhexidine gel IV dressing. **Br J Nurs**, v. 24, p. 14–19, 2015.

JIN, G. et al. Tissue engineered plant ex-tracts as nanofibrous wound dressing. **Biomaterials**, v. 34, p. 724-34, 2013.

JIN, G. et al. Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. **Biomaterials**, v. 34, n. 3, p. 724-734, 2013.

JIN, J.; DONG, Y.; HE, L. The study on skin wound healing promoting action of sodium usnic acid. **J Chinese med mat**, v. 28, n. 2, p. 109-111, 2005.

JING, L. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian J Pharm Sci**, v. 10, p. 81-98, 2015.

KANOKPANONT, S. et al. An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing. **Int J Pharm**, v. 436, n. 2, p. 141-153, 2012.

KARABACAK, R. B.; TAYA, T.; KIVANÇ, M. Preparation of novel antimicrobial polymer colloids based on (+)-usnic acid and poly(vinylbenzyl chloride). **React Funct Polym**, v. 83, p. 7-13, 2014.

KHUNDKAR, R.; MALIC, C.; BURGE, T. Use of Acticoat dressings in burns: what is the evidence? **Burns**, v. 36, n. 6, p. 751-758, 2010.

KOHLHARDT-FLOEHR, C. et al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under uvb-light irradiation – studies on human cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 101, n. 1, p. 97-102, 2010.

LAOUINI A. et al. Preparation, Characterization and Application of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Sci Biotech**, v. 1, p. 147-168, 2012.

LI, J. et al. Vitamin E TPGS modified liposomes enhance cellular uptake and targeted delivery of luteolin: An in vivo/in vitro evaluation. **Int J Pharm**, v. 512, n. 1, p. 262-272, 2016.

LI, Z. et al. Increased cutaneous wound healing effect of biodegradable liposomes containing madecassoside: preparation optimization, in vitro dermal permeation, and in vivo bioevaluation. **Int J Nanomedicine**, v.11, p. 2995-3007, 2016.

LIMA JÚNIOR, E. M. et al. **Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo**. 2ª Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2008.

LIRA, M. C. B. et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **J Liposome Res**, v. 19, p. 49-58, 2009.

LORENCINI, M. et al. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Res Rev**, v. 15, p. 100-115, 2014.

LUCCA, L. C. P.; LACERDA, D. **Diferenças entre a pele masculina e feminina in Tratato Internacional de Cosmecêuticos**. 1ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

LUO, Y. et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Int J Nanomedicine**, v.11, p. 3111-3129.

MAGARKAR, A. et al. Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. **Sci Rep**, v. 4, p. 1-5, 2014.

MANDELBAUM, S. H.; DISANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARTINELLI, A. et al. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly(L-lactide) microparticles. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 88, n. 2, p. 415-423, 2014.

MARTINELLI, A. et al. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly(L-lactide) microparticles. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 88, n. 2, p. 415-23, 2014.

MENDES JUNIOR, E. C. S.; VITERBO, F.; ROSA, C. S. Análise análise histológica ológica e morfométrica morfométrica da área cruenta tratada com membrana membrana de silicone silicone: estudo em ratos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 5, p. 395-400, 2007.

MENEZES, L. F. **Preparação, caracterização físico-química e microestrutural de membranas de gelatina contendo ácido úsnico**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe, 2013.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Int J Pharm**, v. 463, n. 2, p. 127-136, 2014.

NAWAZ, Z.; BENTLEY, G. Surgical incisions and principles of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 2, p. 59-62, 2011.

NEEL, E. A. A. et al. Collagen – emerging collagen based therapies hit the patient. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, p. 429-456, 2012.

NEEL, E. A. A. et al. Collagen – emerging collagen-based therapies hit the patient. **Adv Drug Deliv Ver**, n. 65, p. 429-456, 2012.

NITHYANAND, P. et al. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. **Microbiol Res**, v. 179, p. 20-28, 2015.

NOWAK, T. J. Burn pathophysiology. **Perioper Nurs Clin**, v. 7, n. 1, p. 9-17, 2012.

NUNES, P. S. et al. Collagen-Based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **J Biomed Biotechnol**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

NUNES, P. S. et al. Validation of a UV-VIS Spectrophotometric method for the determination of usnic acid /collagen-based membranes. **Scientia Plena**, v. 11, n. 9, p. 1-9, 2015.

NUNES; P.S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **Int J Pharm**, v. 513, n. 1, p. 473-482, 2016.

ONO, S. et al. Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns. **Burns**, v. 41, n. 4, p. 820-824, 2015.

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. **Braz arch biol technol**, v. 59, p. 1-10, 2016.

PAPAKOSTAS, D. et al. Nanoparticles in dermatology. **Arch Dermatol Res**, v. 303, n. 8, p. 533-550, 2011.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chem Rev**, v. 115, n. 19, p. 10938-10966, 2015.

PEREZ, A. P. et al. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. **Colloids Surf B**, v. 139, p. 190-198, 2016.

PEREZ, R. A. et al. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, n. 4, p. 471-496, 2013.

PIRES, R. H.; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Effect of Usnic Acid on Candida orthopsilosis and C. parapsilosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 595-597, 2012.

POON, F.; KANG, S.; CHIEN, A. L. Mechanisms and treatments of photoaging. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 31, n. 2, p. 65-74, 2015.

PORFÍRIO, L. O. et al. Compatibility study of hydroxypropylmethylcellulose films containing zidovudine and lamivudine using thermal analysis and infrared spectroscopy. **J Therm Anal Calorim**, v. 120, p. 817-828, 2015.

PRABHU, P. et al. Investigation of hydrogel membranes containing combination of gentamicin and dexamethasone for ocular delivery. **Int J Pharm Investig**, v. 5, n. 4, p. 214-225, 2015.

RABELO, T. K. et al. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 2, p. 304-314, 2012.

RAFLA, K.; TREDGET, E. E. Infection control in the burn unit. **Burns**, v. 37, n. 1, p. 5-15, 2011.

RAZA, K. et al. Nano-lipoidal carriers of tretinoin with enhanced percutaneous absorption, photostability, biocompatibility and anti-psoriatic activity. **Int J Pharm**, v. 456, p. 65-72, 2013.

RESOLUÇÃO - RDC Nº 45 - "Realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos." **ANVISA**, 2012.

Resolução RE nº 899. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **ANVISA**, 2003.

RHEIN, L. D.; PEOPLES, C.; WOLF, B. **Skin, hair and nail structure and function**. 4ª Ed. Allured Books, Carol Stream-Illinois, 2009.

RICCI, F. P. F. M. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes com queimadura em membros superiores atendidos em uma Unidade de Queimados terciária. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 1, p. 10-13, 2015.

RIGO, C. et al. Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care. **Burns**, v. 38, n. 8, 1131-1142, 2012.

ROCHA JR, A. M. et al. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An bras dermatol**, v. 81, n. 2, p.150-156, 2006.

SANTOS, N.; MORRETO, L. D. **Estabilidade de fármacos e medicamentos**, v. 6, São Paulo, Febrapharma, 2005.

SELCUK, C. T. et al. Comparison of the antibacterial effect of silver sulfadiazine 1%, mupirocin 2%, Acticoat and octenidine dihydrochloride in a full-thickness rat burn model contaminated with multi drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Burns**, v. 38, n. 8, 1204-1209, 2012.

SEN, S.; PALMIERI, T.; GREENHALGH, D. Review of Burn Research for Year 2014. **J Burn Care Res**, v. 36, n. 6, p. 587-594, 2015.

SENGUPTA, M. et al. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. **Muller J Med Sci Res**, v. 6, n. 1, p.27-30, 2015.

SERAFINI, M. R. et al. Determination of in vitro usnic acid delivery into porcine skin using a HPLC method. **J Chromatogr Sci**, v. 53, p. 757-760, 2014.

SERAFINI, M. R. et al. Recent Patents on Medicinal Plants/Natural Products as a Therapeutic Approach to Wounds and Burns Healing. **Recent Pat Biotechnol**, v. 8, n. 3, p. 231-239, 2014.

SHAH, M. H.; PARADKAR, A. Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 67, p. 166 – 174, 2007.

SOKOLOV, D. N. et al. Anti-viral activity of (2)- and (b)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, p. 7060-7064, 2012.

SONG, Y. et al. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. **Angiogenesis**, v. 15, n. 3, p. 421-432, 2012.

TEIXEIRA, L. G. B. **Desenvolvimento, caracterização e atividade antimicrobiana de membranas de gelatina contendo ácido úsnico e nanopartículas de prata.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe, 2016.

VENTURINI, C. G. et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. **Eur J Pharm Sci**, v. 79, p. 36-43, 2015.

VIJAYAKUMAR, C. S. et al. Antiinflammatory activity of (b)-usnic acid. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 564-566, 2000.

WANG, K. A. et al. Epidemiology and outcome analysis of hand burns: A 5-year retrospective review of 378 cases in a burn center in Eastern China. **Burns**, v. 41, n. 7, p. 1550-1555, 2015.

WANG, X. et al. Fabrication and characterization of poly(Llactide- co-glycolide) knitted mesh-reinforced collagen-chitosanscaffolds for dermal tissue engineering. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 8, p. 204-215, 2012.

WANG, X. Q.; KRAVCHUK, O.; KIMBLE, R. M. A retrospective review of burn dressings on a porcine burn model. **Burns**, v. 36, n. 5, p. 680-687, 2010.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 10, p. 98-110, 2015.

WOLF, S. E. et al. The year in burns 2010. **Burns**, v. 37, n. 8, p. 1275-1287, 2011.

YANG, Z. et al. Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: Characterizations and evaluation. **Int J Pharm**, v. 495, p. 508-515, 2015.

YOUNG, S. et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **J Control Release**, v. 109, n. 1, p. 256-274, 2005.

ZAMAN, H. U. et al. Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 4, n. 7, p. 1369-1375, 2011.

ZHAI, Y. et al. Lipid nanocapsules for transdermal delivery of ropivacaine: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Int J Pharm**, v. 471, p. 103-111, 2014.

ZHANG, Y. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. **Colloid Polym Sci**, v. 285, p. 855 – 863, 2007.