

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas e nanoemulsões contendo fenitoína: desenvolvimento de
formulações cutâneas e estudo *in vivo* do efeito sobre a cicatrização
cutânea

ALINE MARQUEZ CARDOSO

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas e nanoemulsões contendo fenitoína: desenvolvimento de formulações cutâneas e estudo *in vivo* do efeito sobre a cicatrização cutânea

Dissertação apresentada por **Aline Marquez Cardoso** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profº. Drº. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2017.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18/05/2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.^a Dr.^a Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr.^a Leticia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr.^a Clarice Madalena Bueno Rolim

Universidade Federal de Santa Maria

CIP - Catalogação na Publicação

Cardoso, Aline Marquez
Nanocápsulas e nanoemulsões contendo fenitoína:
desenvolvimento de formulações cutâneas e estudo in
vivo do efeito sobre a cicatrização cutânea / Aline
Marquez Cardoso. -- 2017.

93 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Nanocápsulas. 2. Nanoemulsões. 3. Hidrogéis.
4. Fenitoína. 5. Cicatrização. I. Beck, Ruy Carlos
Ruver, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405, do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Farmatox da Universidade Federal de Santa Maria, com financiamento da CAPES, CNPq e FAPERGS. A autora recebeu bolsa de estudo CAPES.

Aos meus pais, Valmor e Salete, e à minha irmã, Danieli.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ruy Carlos Ruver Beck pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança e orientação.

Às professoras Sílvia Stanisçuaski Guterres e Adriana Raffin Pohlmann pelo incentivo e conhecimentos repassados.

À professora Marilise Bürger pela colaboração e contribuições nesse trabalho.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia e do Laboratório K204 do Instituto de Química pelo incentivo e momentos de descontração.

Aos colegas do Grupo Farmatox da UFSM, principalmente, à Raquel Cristine Silva Barcelos, Karine Roversi e Domenika Rubert Rossato pelo acolhimento no laboratório no período dos experimentos em Santa Maria e pelas importantes contribuições recebidas.

Às amigas que conquistei no decorrer do mestrado, em especial à Franciele Bruinsmann, Ricardo Lorenzoni, Tanira Aguirre, Andréia Garcia Härter, Gabriele Dadalt Souto, Flavia Peña, Rafaela Pizzi Dal’Pupo, Lali Ronsoni, Edilene Gadelha e Aline Alves. Obrigada por toda ajuda, amizade e apoio em cada momento de dificuldade.

Em especial, agradeço à minha família pela força, incentivo, compreensão, preocupação com meu bem-estar e por estarem sempre presentes, apesar da distância.

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade cutânea *in vitro* e avaliar *in vivo* o efeito da fenitoína nanoencapsulada e nanoemulsionada no processo de cicatrização de feridas cutâneas, a partir de hidrogéis de quitosana. As nanocápsulas e nanoemulsões foram obtidas, caracterizadas físico-quimicamente e analisadas morfologicamente por MET. Os hidrogéis de quitosana contendo nanoestruturas também foram caracterizados e os aspectos morfológicos observados por MEV. O estudo de liberação *in vitro* foi realizado, utilizando sacos de diálise e células de difusão de Franz para obter o perfil de liberação do fármaco a partir das nanoestruturas e dos hidrogéis, respectivamente. A bioadesão dos hidrogéis foi avaliada através do Texturômetro e a permeação cutânea *in vitro*, através de células de difusão de Franz, utilizando pele de orelha de porco íntegra e lesada, como membrana. O efeito *in vivo* na cicatrização de feridas cutâneas foi avaliado através da regressão de lesões em ratos e análise histológica qualitativa. As nanocápsulas e nanoemulsões apresentaram diâmetro médio de 161 ± 4 e 125 ± 6 nm, potencial zeta de -15.7 ± 0.3 e -10.8 ± 0.4 mV, pH de 5.6 ± 0.1 e 5.0 ± 0.7 , teor próximo ao teórico e eficiência de encapsulação de 95.2 ± 1.4 e 88.7 ± 1.1 %, respectivamente. Os hidrogéis apresentaram pH adequado para a aplicação cutânea, teores próximos a 100% e comportamento reológico não-newtoniano pseudoplástico. Os hidrogéis contendo o fármaco nanoencapsulado ou nanoemulsionado controlaram a sua liberação em relação ao hidrogel contendo o fármaco livre, além de apresentar uma maior adesão à pele e diminuir a permeação do fármaco para a derme e o compartimento receptor. O efeito *in vivo* da fenitoína no processo de cicatrização foi demonstrado somente no 4º dia após o início do tratamento, através da porcentagem de redução de feridas, confirmada pelas análises histológicas, que mostraram aumento na proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas no tecido da ferida. Apesar da associação da fenitoína a nanocarreadores não ter influenciado na presença de fibroblastos e colágeno no tecido lesado, essa estratégia foi fundamental para diminuir a penetração do fármaco na derme, reduzindo o risco de absorção percutânea.

Palavras-chave: nanocápsulas, nanoemulsões, hidrogéis, fenitoína, cicatrização de feridas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* skin permeability and to evaluate *in vivo* the effect of nanoencapsulated and nanoemulsioned phenytoin in the healing process of cutaneous wounds from chitosan hydrogels. The nanocapsules and nanoemulsions were obtained, characterized physically-chemically and analysed morphologically by MET. The chitosan hydrogels containing nanostructures were also characterized and the morphological aspects observed by MEV. The *in vitro* release study was performed using dialysis bags and Franz diffusion cells to obtain the drug release profile from nanostructures and hydrogels, respectively. The bioadhesion of the hydrogels was evaluated through a texture analyser and the *in vitro* skin permeation using Franz diffusion cells, using uninjured and injured pig ear skin, as membranes. The *in vivo* effect on skin wound healing was evaluated through the regression of lesions in rats and qualitative histological analysis. The nanocapsules and nanoemulsions presented mean diameter of 161 ± 4 and 125 ± 6 nm, zeta potential of -15.7 ± 0.3 and -10.8 ± 0.4 mV, pH of 5.6 ± 0.1 and 5.0 ± 0.7 , drug content was close to theoretical and encapsulation efficiency of 95.2 ± 1.4 and $88.7 \pm 1.1\%$, respectively. The hydrogels presented adequate pH for the skin application, drug content was close to 100% and pseudoplastic non-Newtonian rheological behavior. Hydrogels containing the nanoencapsulated or nanoemulsioned phenytoin controlled their release in relation to the hydrogel containing the non-encapsulated drug, besides to present a greater adhesion to the skin and to decrease the permeation of the drug to the dermis and the receptor compartment. The *in vivo* effect of phenytoin in the healing process was only demonstrated on the 4th day after to start the treatment through the percentage of wound reduction, and it was confirmed by histological analyses which showed an increase in the proliferation of fibroblasts and deposition of collagen fibers in the wound tissue. Although the association of phenytoin to the nanocarriers have not influenced in the presence of fibroblasts and collagen fibers in the wound tissue, this strategy was fundamental to reduce the penetration of the drug into the dermis, reducing the risk of percutaneous absorption.

Keywords: Nanocapsules, Nanoemulsions, Hydrogels, Phenytoin, Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química da quitosana.....	27
Figura 2. Estrutura química da fenitoína	29

CAPÍTULO I

Figure 1. Transmission electron photomicrographs of nanoparticles	54
Figure 2. Distributions of particles sizes by volume and numbere and number.....	56
Figure 3. Scanning electron photomicrographs of chitosan hydrogels	57
Figure 4. Phenytoin release profiles from nanoparticles.....	58
Figure 5. Phenytoin release profiles from hydrogels	59
Figure 6. Bioadhesion measurements.....	60
Figure 7. Histological images of the porcine ear skin	61
Figure 8. Phenytoin skin permeation and penetration of the drug	63
Figure 9. Percentage of cutaneous wound contraction in rats.....	65
Figure 10. Histological sections from the wound area at day 4	67
Figure 11. Histological sections from the wound area at day 6	68
Appendix A. Supplementary material	
Figure S1. Rheograms of hydrogels.....	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Physicochemical characteristics of the nanocapsules and suspensions	53
Table 2. Characteristics of the hydrogels	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Pele	23
1.2 Feridas cutâneas e cicatrização	24
1.3 Quitosana	27
1.4 Fenitoína	28
1.5 Administração tópica e sistemas nanocarreadores de fármacos	31
2 OBJETIVOS	35
3 CAPÍTULO I	39
4 DISCUSSÃO	75
5 CONCLUSÃO.....	81
6 REFERÊNCIAS.....	85

1.1 Pele

Correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal, a pele é considerada como o maior órgão do corpo humano. Além de funções sensoriais e imunológicas, a pele atua como uma barreira biológica primária entre o corpo e o ambiente, sendo capaz de impedir a penetração de compostos do ambiente nas camadas epidérmicas e dérmicas, evitar a perda excessiva de água através da epiderme e impedir a invasão de substâncias patogênicas (FOLDVARI, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; POHLMANN *et al.*, 2008, BOAKYE *et al.*, 2015). A espessura da pele humana pode variar entre 0.05 mm e 2 mm, incluindo as diferentes camadas que a constitui: epiderme, derme e hipoderme (FOLDVARI, 2000).

A epiderme é uma porção epitelial de origem ectodérmica, composta por melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel e várias camadas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. A camada mais externa da epiderme, denominada estrato córneo, é uma matriz lipídica, composta por colesterol, ácidos graxos livres e ceramidas, formando uma estrutura altamente ordenada, tridimensional e impermeável à entrada de substâncias hidrofílicas e macromoleculares. Abaixo do estrato córneo, encontra-se a epiderme viável, subdividida em basal, espinhosa e granulosa. A formação dessas camadas epidérmicas é resultado da diferenciação dos queratinócitos e de alterações na expressão gênica, no conteúdo de proteínas e na morfologia celular (FOLDVARI, 2000; BOAKYE *et al.*, 2015; LESNIAK e JARZYNKA, 2015; SMEDEN e BOUWSTRA, 2016).

Localizada abaixo da epiderme, a derme é formada por tecido conjuntivo e encontra-se unida à epiderme pela membrana basal ou junção dermoepidérmica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A derme é composta por fibroblastos, células endoteliais e mastócitos, e também por uma rede de fibras proteicas, responsáveis pela resistência e elasticidade proporcionada à pele, incluindo colágeno (tipo I e III), elastina e glicosaminoglicanos. Também faz parte da derme, inúmeros vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e terminações nervosas (ASBILL e MICHNIAK, 2000; FOLDVARI, 2000; CEVC e

VIERL, 2010). Em condições em que envolvem processos inflamatórios, como em casos de cicatrização de feridas, macrófagos, linfócitos e leucócitos também podem ser encontrados na derme (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

A hipoderme, por sua vez, localizada entre a derme e a fáscia muscular, é a camada mais interna, formada por tecido adiposo. Juntamente com a derme, a hipoderme ajuda na absorção de choques mecânicos que podem prejudicar a vasculatura da pele e os nervos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; POHLMANN *et al.*, 2008; CEVC e VIERL, 2010).

1.2 Feridas cutâneas e cicatrização

Dentre os eventos que podem afetar a fisiologia da pele, destacam-se as feridas, que são alterações na integridade física da pele, cujas rupturas no tecido corpóreo podem ser ocasionadas por qualquer tipo de trauma (físico, químico, mecânico ou desencadeado por uma afecção clínica) e podem ser classificadas como feridas agudas ou crônicas (BLANES, 2004; FARIA, 2010).

As feridas agudas (como queimaduras, incisões cirúrgicas, abrasões e lacerações), cuja inflamação dura aproximadamente 2 (duas) semanas, podem ser superficiais envolvendo a epiderme e a derme ou de espessura total, em que a camada subcutânea também é comprometida. As feridas crônicas, por sua vez, decorrentes de um problema fisiológico subjacente (como insuficiência vascular, diabetes, hipertensão e úlceras venosas) podem persistir por meses ou anos (TONNESEN *et al.*, 2000; DREIFKE *et al.*, 2015).

Considerando que a prevalência global de doenças crônicas (principalmente doenças vasculares e diabetes) está aumentando, conseqüentemente há um aumento no número de pacientes susceptíveis ao desenvolvimento de feridas crônicas graves (NUGENT, 2008; MELO *et al.*, 2011). No Brasil, há uma preocupação nos serviços da rede básica de saúde, visto que lesões crônicas contribuem para o aumento do gasto público e principalmente, interferem na qualidade de vida das pessoas (BRASIL, 2002; GOMES *et al.*, 2011; PESSOA, 2014).

Enquanto as feridas agudas progridem fisiologicamente à cicatrização, as

crônicas podem ter sua reparação tissular dificultada. Diversos fatores, como a extensão e profundidade da lesão, presença de infecção, idade, estado nutricional, doenças associadas e o uso de determinados medicamentos, estão associados e são capazes de desencadear complicações graves (BRASIL, 2002; BLANES, 2004; MORGAN e NIGAM, 2013).

Quando a estrutura de um tecido é lesionada, rapidamente a sua regeneração é ativada. Dessa forma, a cicatrização de feridas restaura a integridade física das estruturas corporais internas ou externas e envolve interações entre as células e outros fatores (ALIMOHAMMD *et al.*, 2007). Este é um processo altamente complexo, o qual consiste de uma seqüência de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que ao interagirem promovem a reconstituição do tecido. Os estágios de cicatrização são interdependentes, sobrepostos e simultâneos, classificados em: fase inflamatória, fase de proliferação e fase de maturação (CAMPOS *et al.*, 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012; PESSOA, 2014).

A fase inflamatória inicia-se após o dano tecidual, com a liberação de substâncias vasoconstritoras pelas membranas celulares. Com a lesão no endotélio, as plaquetas iniciam sua atividade, estimulando a cascata de coagulação e secretando fatores de crescimento, prostaglandinas e tromboxanas. Dessa forma, inicia-se o restabelecimento da homeostase com a formação do coágulo, seguido de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que promove o recrutamento de células inflamatórias, principalmente, leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos, para o tecido cicatricial (MANDELBAUM *et al.*, 2003; OLIVEIRA e DIAS, 2012; PESSOA, 2014).

Entre o terceiro e quarto dia após o dano tecidual, inicia-se a fase de proliferação, também denominada fase de granulação. Essa fase é iniciada pela epitelização, na qual ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio; acompanhada pela angiogênese, que é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares. Além disso, a formação do tecido de granulação ocorre devido aos fibroblastos, que são responsáveis por sintetizar glicosaminoglicanos, fibras colágenas tipo I e III, elastina e fibronectina, e por diferenciarem-se em miofibroblastos para promover a contração da ferida (CAMPOS, 2007; OLIVEIRA e

DIAS, 2012).

A última fase da cicatrização, conhecida como fase de maturação ou remodelação, consiste no aumento da síntese e deposição de colágeno, que formam feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente à pele. As fibras depositadas aleatoriamente sofrem lise pelas colagenases, tornando a configuração da lesão mais regular. Dessa forma, ocorre a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando o tecido cicatricial (BLANES, 2004; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Apesar de ser um processo sistêmico, a reparação do tecido lesionado requer condições que favoreçam a viabilidade do processo fisiológico no local. Por isso, torna-se imprescindível a introdução da terapia tópica de feridas, que compreende etapas de limpeza (remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, identificação e eliminação de processos infecciosos) e a utilização de curativos, os quais devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, serem capazes de manter a umidade no leito da ferida, absorver o excesso de exsudato, promover o isolamento térmico, permitir a troca gasosa necessária para o processo de reparação e proteger o ferimento contra traumas e invasão bacteriana (BLANES, 2004; ARCHANA *et al.*, 2013).

Para acelerar o processo de cicatrização de feridas e evitar a cronicidade, é necessário o tratamento adequado. Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de descobrir novos regimes terapêuticos, principalmente de uso tópico, para acelerar a cicatrização de feridas (HASAMNIS *et al.*, 2010; MORGAM e NIGAM, 2013).

Park e colaboradores (2009) desenvolveram micropartículas de gelatina contendo *scaffolds* de quitosana associados a fatores de crescimento de fibroblastos. Os autores demonstraram o aumento na cicatrização das feridas em modelo de úlceras de pressão, em ratos. Em estudo de Charernsriwilaiwat e colaboradores (2012) verificaram um aumento na cicatrização de feridas em ratos Wistar, após a aplicação tópica de nanofibras de quitosana contendo lisozima. Ribeiro e colaboradores (2013) demonstraram a melhora no processo de cicatrização de feridas *in vivo*, a partir da aplicação de um hidrogel de dextrana contendo micropartículas de quitosana e fatores de crescimento endotelial epidérmico e vascular. Também em 2013, Santos e colaboradores desenvolveram membranas de quitosana e de soja, as quais promoveram a re-epitelização, seguida da reparação da camada epidérmica mais externa, indicando uma rápida

cicatrização do tecido lesado em ratos. Em 2014, Moura e colaboradores desenvolveram curativos a partir de diferentes derivados de quitosana contendo neurotensina, que é um neuropeptídeo que atua como modulador inflamatório na cicatrização de feridas. Os resultados indicaram que a formulação aplicada promoveu uma liberação sustentada de neurotensina, e foi capaz de cicatrizar feridas em ratos diabéticos.

1.3 Quitosana

A quitosana (Figura 1) é um heteropolissacarídeo catiônico, constituído por várias unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina interligadas por ligações β , e dois grupos funcionais (OH e NH_2). Obtida a partir da desacetilação parcial da quitina, sob condições alcalinas ou por hidrólise enzimática, a quitosana é insolúvel em água em pH neutro e alcalino, porém torna-se solúvel em pH ácido, devido a protonação de grupamentos amino livres (RINAUDO, 2006; BEZERRA, 2011).

Com destaque na indústria farmacêutica, a quitosana é utilizada, principalmente, como veículo de sistemas de liberação controlada de fármacos, bandagens, géis injetáveis e membranas periodontais (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009). Além disso, esse polímero também vem sendo utilizado no desenvolvimento de hidrogéis, nanopartículas, membranas, nanofibras e filmes para o tratamento de feridas (KUMAR *et al.*, 2012; ARCHANA *et al.*, 2013, SANTOS *et al.*, 2013; GANESH *et al.*, 2016; DEVI e DUTTA, 2017).

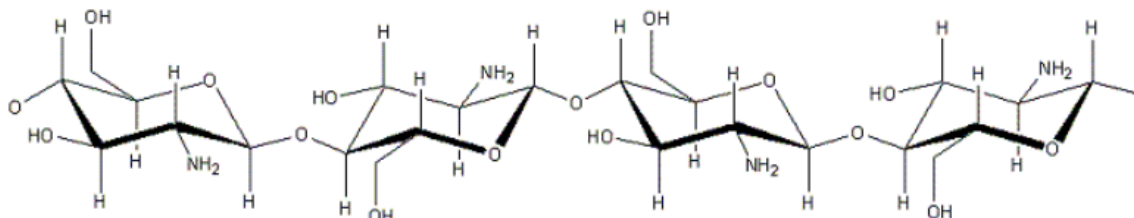


Figura 1. Estrutura química da quitosana.

Dentre os curativos existentes, a utilização de hidrogéis é uma alternativa positiva para produzir condições fisiológicas ideais para a cicatrização e recuperação

da lesão (MEDEIROS, 2006). Os hidrogéis são indicados para feridas secas ou com pouco exsudato, feridas limpas e superficiais, áreas doadoras e receptoras de enxerto, úlceras diabéticas, úlceras de pressão e queimaduras de primeiro e segundo grau (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Permitem a permeação do oxigênio, absorvem exsudatos de tecidos e mantém o leito da ferida úmido, prevenindo a desidratação do local (GONG *et al.*, 2013).

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros sintéticos e naturais. Dentre eles, destaca-se a quitosana, que é um polímero natural biodegradável, biocompatível e que não apresenta toxicidade (LIN e METTERS, 2006; DREIFKE *et al.*, 2015). Os hidrogéis são redes tridimensionais, obtidos a partir da reticulação das cadeias da quitosana e de interações secundárias, estabelecidas pela solubilização em meio aquoso ácido. Essas interligações entre as cadeias do polímero permitem a difusão de água e levam a formação do gel, aumentando as propriedades mecânicas do mesmo (PEPPAS *et al.*, 2000; BERGER, 2004; CONTRI *et al.*, 2010).

1.4 Fenitoína

A fenitoína (PHT; 5,5-difenil-2,4-imidazolidinediona), cuja fórmula estrutural está representada na Figura 2, é um fármaco anticonvulsivante que foi descoberto em 1938 e introduzido no tratamento da epilepsia, nesse mesmo ano (BRUNTON *et al.*, 2012). Pertencente à primeira geração de fármacos utilizados para o tratamento de convulsões parciais e tônico-clônicas, atua no bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes, impedindo-os de se tornarem funcionais e gerarem potenciais de ação excitatória (BRUNTON *et al.*, 2012; FIRMINO *et al.*, 2014).

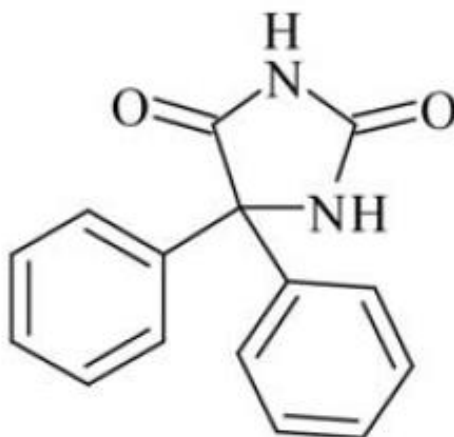


Figura 2. Estrutura química da fenitoína.

A utilização, tanto de fenitoína como de fenitoína sódica, está disponível em diferentes tipos de apresentação oral (preparações de liberação rápida e prolongada) e intravenosa (pró-fármaco hidrossolúvel, chamado fosfenitoína). O desenvolvimento dessas diferentes apresentações, utilizando também a fenitoína sódica e fosfenitoína, é justificado pela baixa hidrossolubilidade do fármaco (BRUNTON *et al.*, 2012).

De acordo com Brunton e colaboradores (2012), os efeitos adversos decorrentes do uso da fenitoína são dependentes da via de administração, da duração da exposição e da dose. Dentre eles, destacam-se arritmias cardíacas; transtornos gastrointestinais; osteomalácia com hipocalcemia e elevação da fosfatase alcalina, devido às alterações no metabolismo das vitaminas D e K e à inibição da absorção intestinal de cálcio; anemia megaloblástica; hirsutismo; inibição do hormônio antidiurético (ADH); hiperglicemia e glicosúria, devido à inibição da secreção de insulina; irritações cutâneas e hiperplasia gengival (BRUNTON *et al.*, 2012; FIRMINO *et al.*, 2014).

A hiperplasia gengival ocorre em cerca de 20% dos pacientes durante o tratamento crônico, sendo a manifestação mais comum em crianças e jovens, uma vez que o uso da fenitoína é mais frequente em pessoas com menos de 25 anos de idade (BRUNTON *et al.*, 2012; ARYA e GULATI 2012). É caracterizada pelo crescimento anormal dos tecidos gengivais, podendo apresentar alterações nos tecidos periodontais e modificações na resposta inflamatória e imunológica (PARAGUSSU, 2012).

Devido aos frequentes relatos de hiperplasia gengival, iniciaram-se investigações a respeito da hipótese de utilizar a fenitoína como agente cicatrizante. Swamy e colaboradores (2004) realizaram ensaios a partir de biópsias de amostras gengivais e dérmicas, que haviam sido submetidas ao tratamento com esse fármaco. Os ensaios de proliferação celular indicaram que houve aumento significativo dose-dependente na proliferação de fibroblastos gengivais e revelaram que, em fibroblastos dérmicos, houve alterações na expressão dos fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de feridas. Dessa forma, concluíram que a fenitoína pode ser considerada um agente cicatrizante, devido à estimulação de fibroblastos e da atividade de fatores de crescimento.

Em um estudo clínico, realizado em 2011, após a avaliação de 104 pacientes portadores de úlcera venosa crônica, Hokkam e colaboradores dividiram os pacientes em um grupo de estudo (n=54, tratado com fenitoína loção) e um grupo controle (n=50, tratado com soro fisiológico), os quais receberam tratamento 1 (uma) vez ao dia, antes de aplicar o curativo. Após 8 semanas de acompanhamento, verificaram completa cicatrização em 35 pacientes do grupo de estudo e 26 pacientes do grupo controle, sugerindo a utilização de fenitoína tópica, associada a tratamentos já estabelecidos, para a cicatrização de úlceras venosas crônicas.

Em 2013, Mittal e Khan também verificaram o predomínio de fibroblastos, associado à queratinização do epitélio escamoso, ao analisar imagens histopatológicas de tecido gengival de uma paciente do sexo feminino, com 17 anos de idade. Esta paciente apresentou aumento gradual na gengiva na região mandibular, após a administração de fenitoína, sem apresentar dor.

Dessa forma, vários estudos odontológicos sugerem a rápida cicatrização de feridas, associada ao menor grau de inflamação e dor, devido ao uso da fenitoína. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a fenitoína induz a cicatrização tecidual não está definido (HASAMNIS *et al.*, 2010). Arya e Gulati (2012) sugerem que os mecanismos do crescimento gengival, induzido por este anticonvulsivante, são múltiplos e complexos, incluindo alterações a nível celular e molecular, envolvendo fibroblastos, citocinas, fatores de crescimento, além da suscetibilidade genética.

É importante enfatizar que o único estudo que associou a fenitoína à nanocarreadores, com o intuito de verificar a atividade cicatrizante desse fármaco, foi desenvolvido por Teo e colaboradores (2016). Os autores avaliaram a exposição de queratinócitos humanos (células HaCat) à nanoemulsões contendo fenitoína e

verificaram um aumento significativo na viabilidade celular em relação às células não tratadas, indicando o potencial cicatrizante do fármaco.

1.5 Administração tópica e sistemas nanocarreadores de fármacos

O desenvolvimento de formulações para aplicação tópica é uma alternativa importante para o transporte de fármacos, uma vez que possui a capacidade de reduzir a absorção sistêmica e conseqüentemente, os efeitos indesejados relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (COUVREUR *et al.*, 2002; SILVA, *et al.*, 2010). A administração de fármacos através da via cutânea possui vantagens em relação às outras vias, visto que é indolor, não invasiva, possui melhor adesão do paciente à terapia, baixo efeito sistêmico e não há efeito de primeira passagem hepática (SILVA *et al.*, 2010).

Entretanto, quando somente o efeito tópico é desejado, o fármaco não deve ser absorvido pela corrente sanguínea, devendo ser direcionado apenas para a área afetada. Por outro lado, quando o objetivo da aplicação cutânea for ação sistêmica, é necessário que o fármaco permeie até a derme, siga para a corrente sanguínea e então que seja conduzido ao sítio de ação (POHLMANN *et al.*, 2008; BOAKYE, 2015).

Com o intuito de melhorar a eficácia de fármacos após a aplicação cutânea, sistemas nanoestruturados são alternativas que têm sido propostas nos últimos anos, pois possuem a propriedade de alterar a biodisponibilidade, distribuir e direcionar os fármacos para os sítios onde deverão exercer o efeito farmacológico. Isso é possível, devido à grande área superficial desses sistemas, tornando-os altamente eficazes na aplicação de substâncias lipofílicas e promovendo a liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA *et al.*, 2004; GUTERRES *et al.*, 2007). Além disso, esses sistemas nanoestruturados também podem proteger as substâncias ativas contra a degradação externa, como fotodegradação, oxidação, hidrólise e alterações de pH (FLORES *et al.*, 2015).

Dentre as nanoestruturas existentes com grande aplicabilidade em produtos cosméticos e dermatológicos, destacam-se os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões (ALVES *et al.*, 2007; GUTERRES *et al.*, 2007; BHALEKAR *et al.*, 2009; CLARES *et al.*, 2014; FLORES *et*

al., 2015). Esses nanocarreadores, que diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural, são promissores para a incorporação de substâncias ativas em formulações de uso tópico, devido ao tamanho nanométrico das partículas (diâmetro inferior a 1 μm) (COUVREUR *et al.*, 2002; CLARES *et al.*, 2014; FLORES, *et al.*, 2015).

Nesse contexto, as nanocápsulas são constituídas por um núcleo oleoso, envolto por uma parede polimérica, na qual o fármaco pode estar adsorvido e/ou dissolvido no núcleo. Além disso, possuem vantagens devido a maior estabilidade *in vivo* e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; GUTERRES *et al.*, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). As nanoemulsões, por sua vez, são constituídas por gotículas de óleo, dispersas na fase aquosa e estabilizadas por tensoativos (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; ANTON *et al.*, 2008; PAINES *et al.*, 2015). São facilmente vetorizadas e possuem propriedades biofísicas (poder de hidratação) (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004).

As gotículas de óleo, formando nanoemulsões, e o núcleo oleoso das nanocápsulas, geralmente são compostas por triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, devido a sua ampla solubilidade em diversas substâncias ativas. No entanto, estudos recentes demonstraram a obtenção de nanoestruturas a partir de óleos vegetais, tais como óleo de semente de uva, romã, amêndoas, coco, arroz, soja e girassol (ALMEIDA *et al.*, 2009; CONTRI *et al.*, 2013; JUNIOR *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014; RIGO *et al.*, 2013; RIGO *et al.*, 2015).

Alves e colaboradores (2007) avaliaram a penetração cutânea da nimesulida a partir de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões incorporadas em hidrogéis de Carbopol®, utilizando pele humana e a técnica de células de difusão de Franz. Com o objetivo de comparar a capacidade de diferentes nanocarreadores em modular a penetração do fármaco na pele, constataram que nanocápsulas e nanoesferas promoveram a retenção de fármaco no estrato córneo, sugerindo maior afinidade das formulações contendo polímero com a camada córnea. Por outro lado, para as nanoemulsões, o fármaco foi encontrado somente na derme. A concentração de nimesulida no estrato córneo foi significativamente maior para hidrogéis contendo nanocápsulas, quando comparada às formulações de nanoesferas e nanoemulsões.

Em estudo realizado em 2010, Senyigit e colaboradores avaliaram a penetração de propionato de clobetasol a partir de nanopartículas de lecitina e

quitosana e verificaram um acúmulo do fármaco na epiderme da pele de orelha de porco, sem permeação significativa. Após diluir as nanopartículas contendo fármaco em hidrogel de quitosana, verificaram que o propionato de clobetasol teve uma retenção similar na epiderme e derme quando comparado ao creme comercial. A redução na concentração de propionato de clobetasol após a diluição pode ter proporcionado uma redução de efeitos colaterais desse fármaco.

Sob outra perspectiva, Clares e colaboradores (2014) avaliaram a permeação e penetração de nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas contendo palmitato de retinol em células de difusão de Franz, utilizando pele humana como membrana. Verificaram que houve a permeação do palmitato de retinol a partir de todos os nanocarreadores, sendo a maior concentração permeada a partir de nanoemulsões, que exibiram menor tamanho, proporcionando uma maior área de superfície para a absorção do fármaco. Por outro lado, a retenção do palmitato de retinol nas camadas da pele, foi significativamente maior para lipossomas, quando comparado às demais formulações, devido à presença de fosfolipídios biocompatíveis em sua estrutura.

Dessa forma, o uso da nanotecnologia é uma alternativa para modificar e controlar a permeação e penetração de fármacos, através da via cutânea, com reduzida absorção sistêmica (POHLMANN *et al.*, 2008). Apesar de possuir a propriedade de barreira biológica, a pele é passível de penetração de substâncias através de suas diferentes camadas, principalmente em relação à natureza e integridade da pele, concentração de fármaco aplicado e propriedades físico-químicas das nanoestruturas utilizadas (BECK *et al.*, 2011).

Considerando estudos anteriores a respeito do potencial da fenitoína como agente cicatrizante, a importância do uso da nanotecnologia na vetorização de fármacos, a falta de conhecimento sobre a fenitoína associada à nanocarreadores incorporados em hidrogéis e os possíveis efeitos sobre a cicatrização de feridas, motivaram esta pesquisa. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a permeação cutânea *in vitro*, utilizando tanto pele íntegra como lesada, e o efeito *in vivo* de hidrogéis contendo fenitoína nanoencapsulada e nanoemulsionada no processo de cicatrização de feridas cutâneas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a permeabilidade cutânea *in vitro* e avaliar *in vivo* o efeito da fenitoína nanoencapsulada ou nanoemulsionada no processo de cicatrização de feridas cutâneas, a partir de hidrogéis de quitosana.

Objetivos Específicos

- Preparar nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona (PCL), contendo óleo de semente de uva e fenitoína pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, avaliando as suas características físico-químicas;
- Preparar e caracterizar nanoemulsões contendo óleo de semente de uva e fenitoína, preparadas pelo método de emulsificação espontânea;
- Estudar o emprego de nanocápsulas e nanoemulsões contendo fenitoína na obtenção de hidrogéis de quitosana, como formulações semissólidas para aplicação cutânea;
- Avaliar os perfis de liberação *in vitro* da fenitoína a partir das formulações semissólidas;
- Estudar o efeito da nanoencapsulação/nanoemulsificação da fenitoína, sobre sua permeação/retenção cutânea *in vitro*, utilizando pele suína lesionada e sem lesões aparentes, estabelecendo uma comparação entre as formulações líquidas e semissólidas;
- Avaliar a bioadesão dos hidrogéis de quitosana em pele suína;
- Estudar o efeito *in vivo* da fenitoína nanoencapsulada ou nanoemulsionada sobre a cicatrização cutânea em ratos.

CAPÍTULO I

Chitosan hydrogels containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use: skin permeation/penetration and efficacy in wound healing

Chitosan hydrogels containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use: skin permeation/penetration and efficacy in wound healing

Aline Marquez Cardoso¹, Edilene de Oliveira Gadelha¹, Karine Coradini¹, Franciele Aline Bruinsmann¹, Tanira Aguirre¹, Ricardo Lorenzoni¹, Raquel Cristiane Silva Barcelos², Karine Roversi², Domenika Rubert Rossato², Adriana Raffin Pohlmann^{1,3}, Sílvia Stanisçuaski Guterres¹, Marilise Escobar Bürger², Ruy Carlos Ruver Beck¹ #.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 90610-000, Brazil

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 91501-970, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 97105-900, Brazil

O Capítulo I é constituído por um artigo científico submetido que, no texto completo da dissertação defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 42 – 73.

DISCUSSÃO

A produção de nanocápsulas e nanoemulsões contendo fenitoína ($0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi demonstrada empregando os métodos de deposição do polímero pré-formado e emulsificação espontânea, respectivamente, e utilizando poli (ϵ -caprolactona) como parede polimérica (no caso de nanocápsulas), óleo de semente de uva e polissorbato 80, como tensoativo. Este fármaco lipofílico é utilizado no tratamento de convulsões parciais e tônico-clônicas e atua no bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes, impedindo-os de se tornarem funcionais e gerarem potenciais de ação excitatória. O efeito adverso mais recorrente em pacientes (cerca de 20%) que fazem o uso crônico desse medicamento é a hiperplasia gengival. Devido aos frequentes relatos em relação ao crescimento anormal dos tecidos gengivais, deu início às investigações com a hipótese de utilizar a fenitoína como agente cicatrizante (uso off-label). Nesse trabalho, o uso da nanoencapsulação e nanoemulsificação associados à incorporação em hidrogéis de quitosana foram propostas, a fim de avaliar a possibilidade de utilizar esse fármaco em nova via de administração, verificar o controle de liberação e permeação a partir dessas nanoestruturas, seguido da confirmação ou não da hipótese da fenitoína ter atividade cicatrizante.

Em relação à caracterização físico-química dessas nanoestruturas, obtiveram-se características nanotecnológicas adequadas. As nanocápsulas e nanoemulsões apresentaram diâmetro médio (espalhamento de luz dinâmica) de 161 ± 4 e 125 ± 6 nm, zeta potential (mobilidade eletroforética) de -15.7 ± 0.3 e -10.8 ± 0.4 mV, pH de 5.6 ± 0.1 e 5.0 ± 0.7 , teor do fármaco próximo ao teórico e eficiência de encapsulação de 95.2 ± 1.4 e $88.7 \pm 1.1\%$, respectivamente. Verificou-se uma diferença no diâmetro médio e potencial zeta entre nanocápsulas e nanoemulsões, que pode ser estar relacionada ao tipo de óleo utilizado, presença do polímero nas nanocápsulas e presença de polissorbato 80 na interface partícula/água. Em relação às nanoestruturas sem fármaco, verificou-se que a nanoencapsulação e nanoemulsificação não provocaram alterações nas características das formulações. A análise morfológica (Microscopia Eletrônica de Transmissão) demonstrou a presença de nanopartículas esféricas com diâmetro semelhante ao obtido por espalhamento de luz dinâmico.

Da mesma forma, os hidrogéis contendo nanocápsulas e nanoemulsões também apresentaram características adequadas para aplicação tópica (pH e comportamento reológico) e a íntegra manutenção das nanoestruturas nas formulações semissólidas, comprovada pela análise de tamanho (difração a laser) e análise morfológica (Microscopia Eletrônica de Varredura). O estudo de bioadesão desses hidrogéis mostrou o maior trabalho de adesão à superfície da pele suína, a partir de formulações semissólidas contendo as nanoestruturas incorporadas, devido às forças interfaciais com o tecido epitelial.

O estudo de liberação *in vitro* da fenitoína, a partir das nanoestruturas e hidrogéis, mostrou que o fármaco foi liberado mais lentamente a partir de nanocápsulas e do seu respectivo hidrogel. É importante salientar que quando incorporado em hidrogéis, esse controle torna-se maior, uma vez que a substância ativa precisa ser liberada das nanocápsulas para então, difundir-se pelo hidrogel e em seguida, para o compartimento receptor.

Em relação ao estudo de permeação/penetração *in vitro*, utilizando pele íntegra e pele lesada, foi possível verificar a influência das condições da pele na permeação de substâncias. Foi observado que hidrogéis contendo nanocápsulas mostrou ser a única formulação capaz de reter o fármaco nas camadas da pele, impedindo-o de permear para o meio receptor. Paralelamente, os hidrogéis contendo a fenitoína nanoemulsionada também demonstraram um maior controle de retenção do fármaco na pele, com menor quantidade atingindo o meio receptor em comparação a formulação contendo o fármaco livre. Esses resultados realçam a importância de associar esse fármaco aos nanocarreadores, em formulações semissólidas, no controle de entrega de fármacos. Embora, a ausência de fármaco no meio receptor e a retenção na derme não significa que a absorção sistêmica não possa ocorrer, uma vez que essa camada da pele é rica em vasos sanguíneos e linfáticos. Entretanto, a quantidade de fármaco que atinge a derme a partir dos hidrogéis contendo o fármaco nanoencapsulado/nanoemulsionado foram muito inferiores comparadas às quantidades atingidas pelo hidrogel contendo o fármaco livre.

Através do experimento *in vivo*, foi possível verificar que no 4º dia, após o início do tratamento, teve a maior porcentagem de redução de feridas a partir de hidrogéis contendo fenitoína, confirmada pelas análises histológicas, que mostraram

a proliferação de fibroblastos e fibras colágenas, com ausência de focos necróticos, indicando um importante efeito da fenitoína na cicatrização na dose avaliada.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade tecnológica na obtenção de nanocápsulas e nanoemulsões contendo fenitoína, através da técnica de deposição do polímero pré-formado e emulsificação espontânea, respectivamente. Com características físico-químicas adequadas e sem haver a influência do fármaco em suas propriedades, foi possível a incorporação dessas nanoestruturas em hidrogéis. Esses também apresentaram características ideais para a aplicação cutânea, mostrando um maior controle na liberação do fármaco a partir de hidrogéis contendo os nanocarreadores e consequente retenção do fármaco nas camadas da pele, tanto íntegra como lesada. O efeito da fenitoína no processo de cicatrização cutânea foi evidenciado pelo aumento da proliferação de fibroblastos e fibras colágenas no tecido cutâneo, embora macroscopicamente a atividade cicatrizante da fenitoína somente pôde ser demonstrada no 4º dia após o início do tratamento, através da maior porcentagem de redução de feridas. Além disso, apesar da associação da fenitoína a nanocarreadores não ter influenciado a proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas no tecido lesado, essa estratégia foi fundamental para diminuir a penetração do fármaco na derme, reduzindo o risco de absorção percutânea. Além disso, os resultados do estudo *in vivo* sugerem que a fenitoína poderia ser explorada como uma substância antienvhecimento pelas propriedades demonstradas de aumentar a deposição de fibras de colágeno na pele.

REFERÊNCIAS

Alimohammd, A.; Mohammadali, M.; Mahmud, K.; Khadijeh, S.; 2007. A study of the effect of magnesium hydroxide on the wound healing process in rats. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* 16:4, 165-170.

Almeida, J.S.; Jezur, L.; Fontana, M.C.; Paese, K.; Silva, C.B.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R.; 2009. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. *Latin American Journal of Pharmacy* 28:2, 165-172.

Alves, M.P.; Scarrone, A.L.; Santos, M.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; 2007. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* 341, 215–220.

Anton, N.; Benoit, J.P.; Saulnier, P.; 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release* 128, 185–199.

Archana, D.; Dutta, J.; Dutta, P.K.; 2013. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. *International Journal of Biological Macromolecules* 57, 193-203.

Arya R.; Gulati, S.; 2012. Phenytoin-induced gingival overgrowth. *Acta Neurologica Scandinavica* 125:3, 149-155.

Asbill, C.S.; Michniak, B.B.; 2000. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3:1, 36-41

Beck, R.C.R.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. 1° ed. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt. O.; Peppas, N.A.; Gurny, R.; 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19-34.

Bezerra, A.M. *Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular*, 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Bhalekar, M.R.; Pokharkar, V.; Madgulkar, A.; Patil, N.; Patil, N.; 2009. Preparation and Evaluation of Miconazole Nitrate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 10:1, 289-296.

Blanes, L. Tratamento de feridas. Cirurgia vascular: guia ilustrado. Baptista-Silva JCC, editor. São Paulo: 2004.

Boakye, C.H.A; Patel, K. Singh, M.; 2015. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* 489, 106–116.

Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E. Fessi, H.; 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics* 280, 241–251.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde, 2002. Manual de Conduas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas. Cadernos de Reabilitação em Hanseníase Série J, n. 2.

Brunton, L.L.; Chabner, B.A.; Knollmann, B.C. As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12º ed. Artmed: São Paulo, 2012.

Campos, A.C.L.; Borges-Branco, A.; Groth, A.K.; 2007. Cicatrização de feridas. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* 20:1, 51-58.

Cevc, G.; Vierl, U.; 2010. Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release* 141, 277–299.

Charernsriwilaiwat, N.colaboradores (2012)raisal. oo T.ernNgawhirunpat, T.hirunpat Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. *International Journal of Pharmaceutics* 427, 379– 384.

Clares, B.; Calpena, A.C.; Parra A.; Abrego, G.; Alvarado, H.; Fanguero, J.F.; Souto, E.B; 2014. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 473, 591–598.

Contri, R.V.; Katzer, T.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. ; 2010. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: An innovative formulation for topical delivery. *Soft Materials* 8:4, 370-385.

Contri, R.V.; Katzer, T.; Ourique, A. F.; Silva, A.L.M.; Beck, R.C.R.; Pohlman, A.R.; Guterres, S.S.; 2013. Combined Effect of Polymeric Nanocapsules and Chitosan Hydrogel on the Increase of Capsaicinoids Adhesion to the Skin Surface. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9, 1-11.

Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C.; 2002. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 19:2, 99-134.

Devi, N.; Dutta, J.; 2017. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. *International Journal of Biological Macromolecules* 1, 1-8.

Dreifke, M.B; Jayasuriya, A.A.; Jayasuriya, A.C.; 2015. Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering C* 48, 651–662.

Faria, M.M.P. Prevalência, perfil clínico e sócio-demográfico dos portadores de feridas, usuários do Sistema Único de Saúde, internados em um hospital geral no Tocantins. 2010. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

Firmino, F.; Almeida, A.M.P.; Silva, R.J.G.; Alves, G.S.; Granadeiro, D.S.; Penna, L.H.G.; 2014. A produção científica acerca da aplicabilidade da fenitoína na cicatrização de feridas. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* 48:1, 166-173.

Flores, F.C.; Lima, J.A.; Silva, C.R.; Benvegnú, D.; Ferreira, J.; Burger, M.E.; Beck, R.C.R.; Rolim, C.M.B.; Rocha, M.I.U.M.; Veiga, M.L.; Silva, C.B.; 2015. Hydrogels Containing Nanocapsules and Nanoemulsions of Tea Tree Oil Provide Antiedematogenic Effect and Improved Skin Wound Healing. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 15, 800–809.

Foldvari, M.; 2000. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3:12, 417-425.

Ganesh, M.; Aziz, A.S.; Ubaidulla, U.; Hemalatha, P.; Saravanakumar, A.; Ravikumar, R.; Peng, M.M.; Choi, E.Y.; Jang, H.T.; 2016. Sulfanilamide and silver nanoparticles-loaded polyvinyl alcohol-chitosan composite electrospun nanofibers: Synthesis and evaluation on synergism in wound healing. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 39, 127nal.

Gomes, T.; Cade, N.V.; Rohr, R.V.; Fejoli, M.M.; 2011. Caracterização das lesões crônicas e os fatores associados em moradores de um território de saúde em Vitória, Espírito Santo. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde* 13:1, 52-57.

Gong, C.Y.; Wu, Q.; Wang, Y.; Zhang, D.; Luo, F.; Zhao, X.; Wei, Y.; Qian, Z., 2013. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. *Biomaterials* 34, 6377-6387.

Guterres, S.S.; Alves, M.P.; Pohlmann, A.R.; 2007. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights* 2, 147–157.

Hasamnis, A.A.; Mohanty, B.K.; Muralikrishna, P.S.; 2010. Evaluation of Wound Healing Effect of Topical Phenytoin on Excisional Wound in Albino Rats. *Journal Young Pharmacists* 2:1, 59-62.

Hokkam, E.; Labban, G.E.; Shams, M.; Rifaat, S.; El-mezaien, M.; 2011. The use of topical phenytoin for healing of chronic venous ulcerations. *International Journal of Surgery* 9, 335-338.

Junior, E.S.; Junior, G.B.Z.; Zanella, I.; Raffin, R.; Cielo, V.; Rossato, J.; Bulhões, L.O.S.; 2013. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. *Disciplinarum Scientia* 14:1, 115-122.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 358-370, 2004.

Kumar, P.T.S.; Lakshmanan, V.K.; Anilkumar, T.V.; Ramya, C.; Reshmi, P., Unnikrishnan, A.G.; Nair, S.V.; Jayakumar, R.; 2012. Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces* 4, 2618–2629.

Laranjeira, M.C.M.; Fávere, V.T.; 2009. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova* 32:3, 672-678.

Lesniak, W.; Jarzynka, A.G.; 2015. The S100 proteins in epidermis: Topology and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850, 2563–2572.

Lin, C.C.; Metters, A.T., 2006. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 1379–1408.

Mandelbaum, S.H.; Di Santis, E.P.; Mandelbaum, M.H.S.; 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78:4, 393-410.

Medeiros, A.B.F. Úlcera por pressão em idosos hospitalizados: análise da prevalência e fatores de risco, 2006. 127f. Dissertação (Mestrado em Cuidados Clínicos em Saúde e Enfermagem) – Curso de Pós-Graduação em Cuidados Clínicos em Saúde e Enfermagem, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

Melo, L.P.; Silva, N.P.; Silva, K.C.L.; Ponte, M.P.T.R.; Gualda, D.M.R.; 2011. Representações e práticas de cuidado com a ferida crônica de membro inferior: uma perspectiva antropológica. *Cogitare Enfermagem* 16:2, 303-310.

- Mittal, A.; Khan, S.; 2013. Phenytoin-induced gingival overgrowth: A case Report. *Journal of Pierre Fauchard Academy* 27, 102-105.
- Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A.; 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385, 113th: A
- Morgan, C.; Nigam, Y., 2013. Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds. *Angiogenesis* 16, 493–502.
- Moura, L.I.F.; Dias, A.M.A.; Leal, E.C.; Carvalho, L.; Sousa, H.C.; Carvalho, E.; 2014. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin—an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta Biomaterialia* 10, 843–857.
- Nugent, R.; 2008. Chronic Diseases in Developing Countries Health and Economic Burdens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1136, 70–79.
- Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V.; Correa, M.A.; Cera, L.F.R.; Formariz, T.P.; 2004. Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, 27:1, 131-138.
- Oliveira, I.V.P.M.; Dias, R.V.C.; 2012. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. *Acta Veterinaria Brasilica* 6:4, 267-271.
- Paines, T.C.; Lima, J.A.; Weber, J.; Flores, F.C.; Silva, C.B.; 2015. Desenvolvimento tecnológico de hidrogéis a partir de nanoemulsão contendo clotrimazol em associação com o óleo de melaleuca. *Ciência e Natura* 37, 106–115.
- Paraguassú, G.M.; Castro, I.C.V.; Santos, M.S.; Ferraz, E.G.; Filho, J.M.P.; 2012. Aspectos periodontais da hiperplasia gengival modificada por anticonvulsivantes. *Clínica e Pesquisa em Odontologia* 4:1, 26-30.
- Park, C.J.; Clark, S.G.; Lichtensteiger, C.A.; Jamison, R.D.; Johnson, A.J.W.; 2009. Accelerated wound closure of pressure ulcers in aged mice by chitosan scaffolds with and without bFGF. *Acta Biomaterialia* 5, 1926–1936.
- Peppas, N.A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 27-46.
- Pessoa, A.F.M. A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos, 2014. 44f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Tecidual) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Tecidual do Instituto de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Pohlmann, A.R.; Petter, C.O.; Balzaretto, N.M. Guterres, S.S.; 2008. Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia. 1° ed. UFRGS: Porto Alegre, 2008.

Ribeiro, M.P.; Morgado, P.I.; Miguel, S.P.; Coutinho, P.; Correia, I.J.; 2013. Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials Science and Engineering C* 33, 2958–2966.

Rigo, L.A.; Frescura, V.; Fiel, L.; Coradini, K.; Ourique, A.F.; Emanuelli, T.; Quatrin, A.; Tedesco, S.; Silva, C.B.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Beck, R.C.R.; 2013. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1-10.

Rigo, L.A.; Silva, C.R.; Oliveira, S.M.; Cabreira, T.N.; Silva, C.B.; Ferreira, J.; Beck, R.C.R.; 2015. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93, 11–17.

Rinaudo, M.; 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.

Santos, T.C.; Höring, B.; Reise, K.; Marques, A.P.; Silva, S.S.; Oliveira, J.M.; Mano, J.F.; Castro, A.G.; Reis, R.L.; Griensven, M.V.; 2013. In Vivo Performance of Chitosan/Soy-Based Membranes as Wound-Dressing Devices for Acute Skin Wounds. *Tissue Engineering* 19:7,8; 860-869.

Santos, S.S.; Lorenzoni, A.; Pegoraro, N.S.; Denardi, L.B.; Alves, S.H.; Schaffazick, S.R.; Cruz, L.; 2014. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 116, 270–276.

Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Mezzalana, G.; Guterres, S.S.; 2006. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17:3, 562-569.

Senyigit, T.; Sonvico, F.; Barbieri, S.; Özer, Ö.; Santi, P.; Colombo, P.; 2010. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *Journal of Controlled Release* 142, 368–373.

Silva, J.A.; Apolinário, A.C.; Souza, M.S.R.; Damasceno, B.P.G.L.; Medeiros, A.C.D.; 2010. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada* 31:3, 125-131.

Smeden, J.V.; Bouwstra, J.A.; 2016. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current Problems in Dermatology* 49, 8–26.

Sonneville-Aubrun, Simonnet, J.T.; L'Alloret, F.; 2004. Nanoemulsions: a new vehicle for skin care products. *Advances in Colloid and Interface Science* 108:109, 145–149.

Swamy, S.M.K.; Tan, P.; Zhu, Y.Z.; Lu, J.; Achuth, H.N.; Moochhala, S.; 2004. Role of phenytoin in wound healing: microarray analysis of early transcriptional responses in human dermal fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 661–666.

Teo, S.Y.; Yew, M.Y.; Lee, S.Y.; Rathbone, M.J.; Gan, S.N.; Coombes, A.G.A.; 2016. *In Vitro* Evaluation of Novel Phenytoin-Loaded Alkyd Nanoemulsions Designed for Application in Topical Wound Healing. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106:1, 377-384.

Tonnesen, M.G.; Feng, X.; Clark, R.A.F.; 2000. Angiogenesis in Wound Healing. *The Society for Investigative Dermatology* 5:1, 40-46.