

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

**Associação de cumestrol com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: influência do método de complexação sobre a liberação a partir de bases hidrofílicas e avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*.**

BARBARA ELISABETH KUMMER MACHADO

Porto Alegre, 2016.

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

**Associação de cumestrol com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: influência do método de complexação sobre a liberação a partir de bases hidrofílicas e avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*.**

Dissertação apresentada por **Barbara Elisabeth Kummer Machado** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiana Lima Dora

Porto Alegre, 2016.

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 28 de março de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Claudia Maria Oliveira Simões

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Silvia Staniscuaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Kummer Machado, Barbara Elisabeth

Associação de cumestrol com hidroxipropil-beta-ciclodextrina: influência do método de complexação sobre a liberação a partir de bases hidrofílicas e avaliação da atividade cicatrizante in vivo. / Barbara Elisabeth Kummer Machado. -- 2016.

114 f.

Orientadora: Valquiria Linck Bassani.

Coorientadora: Cristiana Lima Dora.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Cumestrol. 2. Ciclodextrina. 3. Atividade cicatrizante. I. Linck Bassani, Valquiria, orient. II. Lima Dora, Cristiana, coorient. III. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico que disponibilizou equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pois sem ele não teria forças suficientes pra lutar.

À minha orientadora, professora Valquíria Linck Bassani, pela oportunidade e orientação. Pela paciência e confiança em mim depositada. Pelos conselhos, ensinamentos e amizade. Agradeço imensamente por todo apoio, auxílio e tranquilidade transmitida.

À minha co-orientadora, professora Cristiana Lima Dora, pela orientação e ensinamentos. Pelo acolhimento e cuidado durante meus experimentos. Agradeço por todas as colaborações que foram de grande valia.

À professora Bárbara Spaniol por me acompanhar desde a graduação, agradeço ao apoio e incentivo.

Ao meu marido, Leonardo pelo carinho, amor, paciência e compreensão. Por confiar no meu potencial e me apoiar em todas minhas decisões.

Aos meus pais, Wanderley e Liselote, pelo incentivo, carinho e apoio em todos os momentos. Em especial, por me incentivarem a buscar meus objetivos.

À minha irmã, Tatiana pela amizade, carinho e compreensão.

Aos meus sogros, Vera e Tadeu por todas as palavras de conforto e apoio.

Aos meus cunhados Diego e Leandro pelo carinho e amizade.

Aos professores George Ortega, Helder Teixeira, Letícia Koester e Pedro Petrovick pelos ensinamentos e amizade.

A todos os meus colegas, amigos e parceiros do Laboratório de Desenvolvimento Galênico por todos ensinamentos e companheirismo. Em especial a grande amizade das minhas colegas de orientadora, Sara e Simony por todos os ensinamentos, carinho e compreensão.

A todos meus colegas da FURG, em especial a Marília, Michelle, Lidiane Kerollyn, Giani, Gustavo, Jaderson, Gabriela por toda a troca de conhecimento e parceria. À professora, Ana Horn e ao Magno pelas análises histológicas e troca de experiência.

Às minhas colegas de faculdade, amigas, irmãs, Laís, Fernanda, Paula, Nicole, Ana Glória e Tamires por toda a confiança, parceria e companheirismo.

A todos que de alguma maneira colaboraram, torceram ou incentivaram o meu crescimento durante estes dois anos.



## RESUMO

O cumestrol é um flavonoide pertencente à classe dos coumestanos e é encontrado principalmente em plantas como a alfafa, trevo e soja. Classificado como um fitoestrógeno, devido sua afinidade pelos receptores estrogênicos, ao cumestrol também são atribuídas propriedades antioxidante e antiinflamatória. Caracterizando-se como uma molécula com reduzida hidrossolubilidade, a sua associação com ciclodextrina representa uma interessante estratégia para superar esta limitação biofarmacêutica. No presente trabalho, realizou-se diferentes métodos de associação de cumestrol com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) : método de micro-ondas seguido de liofilização, organo-aquoso seguido de *spray drying* e simples mistura. As associações obtidas foram caracterizadas, incorporadas em diferentes hidrogéis hidrofílicos (quitosana e hipromelose - HPMC) e a liberação do cumestrol foi avaliada, em célula de difusão do tipo Franz. A observação, em estudos preliminares realizados *in vitro*, de que o cumestrol associado à HP $\beta$ CD promovia a proliferação de fibroblastos motivou o estudo de avaliação de suas propriedades cicatriciais em modelo animal, de avaliação da atividade cicatrizante, numa etapa subsequente do presente trabalho. Os resultados revelaram que a associação cumestrol:HP $\beta$ CD obtida pelo método de *spray drying* incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU:CD-SD) apresentou a melhor desenvoltura no perfil de liberação *in vitro*. Nos ensaios *in vivo* os resultados observados a partir da avaliação da contração da ferida excisada, da análise da enzima mieloperoxidase (MPO) e da análise histológica ao longo de 12 dias de tratamento indicaram que o tratamento realizado com HPMC+COU:CD-SD apresentou resultados interessantes frente ao processo de cicatrização, sendo semelhante em eficácia, se comparado com o controle positivo (Dersani®), mas mais eficiente que o mesmo, uma vez que o fechamento de 50% da ferida foi alcançado em menos tempo. Além disso, as análises histológicas indicaram que ambos tratamentos apresentaram uma organização adequada do tecido após 12 dias. Este conjunto de resultados inéditos evidencia o uso do cumestrol em preparações destinadas à promoção da cicatrização.

**Palavras-chave:** cumestrol, ciclodextrina, cicatrização cutânea, liberação do cumestrol e atividade cicatrizante *in vivo*.



## ABSTRACT

The Coumestrol is a flavonoid which belongs to the coumestans class and is found mainly in plants such as alfalfa, clover and soybeans. Classified as a phytoestrogen, because of its affinity to the estrogen receptor, coumestrol is also meant to have antioxidant and anti-inflammatory properties. Characterized as a molecule with reduced water solubility, its association with cyclodextrin is an interesting strategy to overcome this biopharmaceutical limitation. In the present work, different methods of coumestrol association with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) were performed: microwave method followed by freeze-drying, organo-aqueous followed by spray drying and simple mixing. The obtained combinations were characterized, incorporated in different hydrophilic hydrogels (chitosan and hypromellose - HPMC) and the release of coumestrol was evaluated in Franz type diffusion cell. The observation, in preliminary studies *in vitro*, that coumestrol associated to HP $\beta$ CD promoted the proliferation of fibroblasts led to the evaluation study of its wound healing properties in animal models, of the evaluation of healing activity, in a subsequent stage of this work. The results showed that the association coumestrol:HP $\beta$ CD obtained by the spray drying method incorporated into hydrogel HPMC (HPMC+COU:CD-SD) showed the best performance *in vitro* release profile. In *in vivo* assays the observed results from the assessment of the contraction of the excised wound, the analysis of myeloperoxidase enzyme (MPO) and histological analysis over 12 days of treatment indicated that the treatment carried out with HPMC+COU:CD-SD had interesting results across the healing process, being similar in efficacy if compared to the positive control (Dersani<sup>®</sup>), but more efficient than the same, once the closure of 50 % of the wound was achieved in less time. Furthermore, histological analyzes showed that both treatments presented a proper organization of the tissue after 12 days. This set of new results showcases the use of coumestrol in preparations intended for the promotion of healing.

**Keywords:** coumestrol, cyclodextrin, skin healing, coumestrol release and healing activity *in vivo*.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituição dos grupos, dose e modo de administração dos grupos para realização do ensaio de cicatrização <i>in vivo</i> .....	61
Tabela 2. Evolução do peso dos ratos ao longo do tratamento.....	78
Tabela 3. Evolução da temperatura das lesões ao longo do tratamento .....	79
Tabela 4. Análise histológica em 2 dias após a lesão.....	86
Tabela 5. Análise histológica em 7 dias após a lesão.....	88
Tabela 6. Análise histológica em 12 dias após a lesão.....	90



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Estágios da cicatrização da ferida **1)** Momento da lesão, sangramento dos vasos sanguíneos; **2)** Forma-se o coágulo e os leucócitos limpam a ferida. **3)** Os vasos sanguíneos regridem e o tecido de granulação é formado. **4)** Regeneração do epitélio e formação de fibrose do tecido conjuntivo.

..... 35

**Figura 2.** Estrutura química do cumestrol..... 40

**Figura 3.** Estrutura química da HP $\beta$ CD..... 44

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura

(A) COU, (B) HP $\beta$ CD, (C) COU:CD-MF, (D) COU:CD-SD, (D') COU:CD-SD, (E) COU:CD-MO-LI e (E') COU:CD-MO-LI..... 67

**Figura 2.** Espectro FTIR (A) HP $\beta$ CD, (B) COU, (C) COU:CD-MF, (D)COU:CD-SD e (E) COU:CD-MO-LI..... 68

**Figura 3.** Curvas de calorimetria diferencial exploratória de (A) COU, (B) HP $\beta$ CD, (C)COU:CD-MF, (D) COU:CD-SD e (E) COU:CD-MO-LI..... 70

**Figura 4.** Perfil reológico dos hidrogéis: (A) quitosana 2,25 % e (B) HPMC 3,5 %..... 72

**Figura 5.** Curva de espalhabilidade em função do peso adicionada (A) HPMC e (B) quitosana..... 73

**Figura 6.** Liberação do cumestrol livre incorporado em hidrogel: (A) HPMC+COU e (B) quitosana+COU..... 74

**Figura 7.** Liberação da mistura física (COU:CD) incorporado em com hidrogel: (A)HPMC+COU:CD-MF e (B) quitosana+COU:CD-MF..... 75

<b>Figura 8.</b> Liberação da associação (COU:CD) pelo método de micro-ondas seguido de liofilização incorporado em hidrogel: (A) HPMC+COU:CD-MO-LI e (B) quitosana+COU:CD-MO-LI.....	76
<b>Figura 9.</b> Liberação da associação (COU:CD) pelo método de <i>spray drying</i> incorporado em hidrogel: (A) quitosana+COU:CD-SD e (B) HPMC+COU:CD-SD.....	77
<b>Figura 10.</b> Área da ferida ao longo do tratamento. Estatisticamente significante comparando o grupo Dersani® no tempo de 2 horas com o tempo zero (### $p < 0,001$ ); estatisticamente significante comparando todos os grupos com o controle positivo de cada tempo (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ).....	80
<b>Figura 11.</b> Fotografias representando a contração da ferida nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.....	82
<b>Figura 12.</b> Porcentagem de contração das feridas ao longo do experimento.....	83
<b>Figura 13.</b> Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) ao longo do experimento. Estatisticamente significante comparando todos os grupos com o controle positivo de cada tempo * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ .....	85
<b>Figura 14.</b> Aspecto histológico das peles coletadas após 48 horas do tratamento. a,b,c,d: respectivamente, DERSANI®, HPMC, HPMC+COU:CD-SD, HPMC+COU. (A: processo inflamatório, B: hemorragia, C: edema, D: neoangiogênese, E: colágeno, F: re-epitalização). Coloração tricômico de Mallory. Aumento: 200X (100 $\mu$ m).....	87
<b>Figura 15.</b> Aspecto histológico das peles coletadas após 7 dias do tratamento. a,b,c,d: respectivamente, DERSANI®, HPMC, HPMC+COU:CD-SD, HPMC+COU. (A: processo inflamatório, B: hemorragia, C: edema, D: neoangiogênese, E: colágeno, F: re-epitalização). Coloração tricômico de Mallory. Aumento: 200X (100 $\mu$ m).....	89
<b>Figura 16.</b> Aspecto histológico das peles coletadas após 12 dias do tratamento. a,b,c,d: respectivamente, DERSANI®, HPMC, HPMC+COU:HP $\beta$ CD-SD, HPMC+COU. (B: hemorragia, C: edema, D: neoangiogênese, E: colágeno, F: re-epitalização). Coloração: tricômico de Mallory. Aumento: 200X (100 $\mu$ m).....	91

**Figura 17.** Análise da quantidade de vasos após a lesão nos animais submetidos aos diferentes tratamentos, n= 6 animais, ANOVA,  $p < 0,05$ ..... 92



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>Objetivo geral</b> .....	27
<b>Objetivos específicos</b> .....	27
<b>CAPÍTULO I</b> .....	29
<b>Revisão da literatura</b> .....	29
<b>Pele: estrutura e cicatrização.</b> .....	31
<b>Flavonoides: atividade estrogênica e cicatrizante</b> .....	36
<b>Cumestrol (COU)</b> .....	40
<b>Ciclodextrinas (CD)</b> .....	42
<b>Hidrogéis</b> .....	46
<i>Hidrogel de Hipromelose (HPMC)</i> .....	46
<i>Hidrogel de quitosana</i> .....	48
<b>CAPÍTULO II</b> .....	51
<b>Associação de cumestrol/hidroxipropil-<math>\beta</math>-Ciclodextrina:</b> .....	51
<b>caracterização, incorporação em hidrogel , avaliação da liberação e da atividade cicatrizante.</b> .....	51
<b>Introdução</b> .....	54
<b>Metodologia</b> .....	55
<b>Obtenção da matéria prima</b> .....	55
<b>Associação do cumestrol com a HP<math>\beta</math>CD</b> .....	55
<i>Método utilizando micro-ondas seguido de liofilização</i> .....	55
<i>Método de associação em meio orgânico-aquoso, seguido de spray drying</i> .....	56
<i>Preparação da mistura física de cumestrol:HP<math>\beta</math>CD</i> .....	56
<b>Caracterização das associações cumestrol:HP<math>\beta</math>CD</b> .....	56
<i>Doseamento do cumestrol por CLAE</i> .....	56
<i>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)</i> .....	57
<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)</i> .....	57
<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	57
<b>Preparação dos Hidrogéis</b> .....	58
<i>Hidrogel de Hipromelose (HPMC)</i> .....	58
<i>Hidrogel de quitosana</i> .....	58

<b>Ensaio de Liberação <i>in vitro</i></b> .....	59
<i>Modelo matemático</i> .....	59
<b>Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i></b> .....	60
<i>Animais</i> .....	60
<i>Protocolo Experimental</i> .....	60
<i>Ensaio de atividade cicatrizante in vivo</i> .....	61
<i>Avaliação histológica</i> .....	63
<i>Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) em feridas cutâneas</i> .....	63
<b>Análise Estatística</b> .....	64
<b>Aspectos éticos</b> .....	64
<b>Descarte de resíduos</b> .....	65
<i>Químicos</i> .....	65
<i>Biológicos</i> .....	65
<b>Resultados e Discussão</b> .....	65
<i>Caracterização dos hidrogéis</i> .....	71
<i>Liberação in vitro</i> .....	73
<i>Ensaio de atividade cicatrizante in vivo</i> .....	78
<i>Atividade da mieloperoxidase (MPO)</i> .....	84
<i>Procedimento histológico</i> .....	86
<b>CONCLUSÕES</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99





A descoberta de novas substâncias ativas visando novos alvos terapêuticos, bem como os avanços tecnológicos relacionados com os sistemas de liberação de moléculas bioativas vem sendo objeto de pesquisas em todo o mundo, buscando novos fármacos ou o rejuvenescimento dos existentes (SIMÕES, 2010). Neste panorama observa-se que estudos com relação à avaliação terapêutica de extratos e compostos isolados de origem vegetal vêm ganhando espaço

Neste contexto, destacam-se os flavonoides, metabólitos secundários de várias plantas. Nesta classe estão inseridos os isoflavonoides que se dividem em duas subclasses, a das isoflavonas e a dos coumestanos (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004). O cumestrol é o principal representante da classe dos coumestanos sendo sua presença evidenciada, principalmente, na família *Fabaceae*. É classificado como um fitoestrógeno, por possuir características estruturais semelhantes ao estrogênio (CHANDSAWANGBHUWANA e BAKER, 2014). Os flavonoides destacam-se pelas atividades antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante (LEE et al., 2007; MURALIDHAR et al., 2013). Até o presente, não foram encontrados relatos na literatura com relação à toxicidade do cumestrol administrado por via cutânea, tampouco sobre seu uso para prevenção do envelhecimento cutâneo ou da cicatrização. Nosso grupo de pesquisa tem se debruçado sobre estudos de avaliação da viabilidade tecnológica de utilização desta molécula na pele visando prevenção do envelhecimento cutâneo, tendo em vista suas propriedades estrogênicas e antioxidantes (FRANCO et al., 2009; ARGENTA et al., 2011).

Os resultados destes estudos demonstraram o potencial das ciclodextrinas ( $\beta$ CD e HP $\beta$ CD) para a viabilização da incorporação desta molécula bioativa pouco hidrossolúvel em formulações hidrofílicas, bem como para promover a sua penetração cutânea. Mais recentemente, estudos realizados *in vitro*, em parceria com a Dra. Cláudia O. Simões (UFSC), no âmbito da Rede de Nanobiotecnologia (Projeto Nanobiotec 902/2009), BIANCHI e colaboradores (2014) revelaram que o cumestrol associado à HP $\beta$ CD promovia a proliferação de fibroblastos, o que motivou a avaliação de suas propriedades cicatriciais em modelo animal numa etapa subsequente do

presente trabalho, numa colaboração com o grupo de pesquisa da Dra. Cristiana Lima Dora (FURG), no âmbito do Projeto PROCAD552457/2011-6.

Este conjunto de resultados revela o interesse desta molécula para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso tópico visando à cicatrização cutânea, sem descartar a sua potencialidade para outras aplicações. Neste contexto, a presente dissertação de mestrado tem como objetivo preparar e caracterizar associações de cumestrol com HP $\beta$ CD, por diferentes métodos (micro-ondas seguido de liofilização e *spray drying*), e incorporá-las em dois diferentes hidrogéis, com características diferentes um não iônico e outro catiônico, (respectivamente, hipromelose (HPMC) e quitosana) avaliar a liberação do cumestrol *in vitro*, selecionar o hidrogel com o melhor perfil de liberação e avaliar o efeito deste sobre a cicatrização em modelo animal.

A dissertação está estruturada em dois capítulos:

O capítulo I apresenta uma revisão da literatura relativa ao tema abordado, sintetizando os aspectos relevantes para a compreensão e desenvolvimento do presente trabalho: (i) pele: estrutura cutânea e processo cicatricial; (ii) flavonoides: atividade estrogênica e cicatrizante; (iii) cumestrol e sua associação a ciclodextrinas, incorporação em hidrogeis de hipromelose (HPMC) e quitosana.

O capítulo II apresenta os resultados experimentais realizados no que se refere à associação de cumestrol/hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Contempla a utilização de dois métodos de complexação, a caracterização físico-química e física da associação, sua incorporação em hidrogeis obtidos com polímero não iônico e catiônico e a avaliação do perfil de liberação *in vitro*. O hidrogel apresentando o melhor perfil de liberação foi selecionado e sua atividade de cicatrização cutânea foi avaliada em modelo animal.



## **OBJETIVOS**



## Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar associações de cumestrol com HP $\beta$ CD, por diferentes métodos de complexação, avaliando sua liberação *in vitro*, a partir de diferentes hidrogéis e sua atividade cicatrizante em modelo animal.

## Objetivos específicos

- Realizar estudos de complexação utilizando dois diferentes métodos, método de micro-ondas seguido de liofilização e *spray drying*, e as caracterizações das associações cumestrol:HP $\beta$ CD obtidas;
- Incorporar o cumestrol e suas associações com HP $\beta$ CD em hidrogéis de hipromelose (HPMC) ou de quitosana e determinar a concentração de cumestrol nos diferentes hidrogéis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Realizar estudo de liberação (*in vitro*) do cumestrol nas diferentes formas, livre ou associado à ciclodextrina, incorporado em hidrogéis de HPMC e/ou quitosana, selecionando o hidrogel de melhor perfil de liberação do cumestrol;
- Avaliar a atividade cicatrizante (*in vivo*) do cumestrol em diferentes formas: livre ou associada com HP $\beta$ CD, incorporados em hidrogel.



**CAPÍTULO I**  
**Revisão da literatura**

---



**Pele: estrutura e cicatrização.**

A pele é o maior órgão, em extensão, do corpo humano, sendo constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (ANISSIMOV et al., 2013; SIMON, 2013). Cada uma das camadas tem suas características e funções específicas. Além de revestimento corporal, a pele apresenta diversas outras funções como a de proteção frente a agentes químicos, físicos e biológicos, regulação térmica e excreção. Caracteriza-se também como um órgão provido de percepção tátil, capacidade de cicatrização, de síntese de vitamina D, absorção de radiações ultravioleta, dentre outras (REMINGTON et al., 2006; BAUMANN, 2009; SIMON, 2013).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, a qual é constituída por um epitélio multiestratificado de células achatadas justapostas, com cerca de 50 µm de espessura. Na medida em que envelhecem estas células tornam-se mais achatadas e passam a produzir e acumular queratina (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). Sob o prisma histológico e funcional a epiderme pode ser subdividida em quatro camadas, sendo elas: camada germinativa ou basal, camada espinhosa ou malpighiana, camada granulosa e camada córnea (JUNQUEIRA, 2008; KAMEL et al., 2013).

A camada germinativa ou basal é constituída por células basais e melanócitos, os quais, juntamente com os queratinócitos são responsáveis pela síntese da melanina que atua diretamente na proteção da pele contra as radiações ultravioleta. Na camada basal ocorre renovação celular constante devido à atividade mitótica intensa. A camada espinhosa ou malpighiana é composta por células que se achatam e tem como função conferir resistência ao atrito. Já a camada granulosa é constituída por células escuras, com presença de grânulos de querato-hialina envolvidos na queratinização da pele (MICHALANY e MICHALANY, 2002; GARTNER e HIATT, 2007; JUNQUEIRA, 2008; BEM et al., 2010; KAMEL et al., 2013). Quando as células mais superficiais tornam-se completamente queratinizadas estas passam a constituir um revestimento resistente ao atrito e impermeável à água, o estrato córneo (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; BAUMANN, 2009).

O estrato córneo situa-se, portanto, na porção mais externa da pele, sendo constituído de células mortas queratinizadas sobrepostas entre si,

representando a maior barreira para penetração de substâncias externas na pele. É formado por uma estrutura bifásica de lipídio-proteína, composto por corneócitos, que são células anucleadas dispersas em uma matriz rica em lipídios (GRATIERI et al., 2008). Dentre as principais funções do estrato córneo estão à redução da penetração de luz ultravioleta, o retardamento da perda de água pelos tecidos inferiores, barreira para a entrada de microrganismos, substâncias tóxicas e medicamentos (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; MAGNUSSON et al., 2001; REMINGTON et al., 2006).

Sob a epiderme está localizada a derme, constituída por tecido conjuntivo elástico, o qual contém: fibras proteicas, fibras de elastina, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações sensoriais e nervosas, glândulas e anexos como pêlos e unhas. Com espessura em torno de 250 µm apresenta como principal função a de proporcionar resistência física ao corpo, frente a choques mecânicos, de fornecimento de oxigênio e nutrientes para a epiderme por meio de difusão capilar, já que a mesma é desprovida de vasos sanguíneos (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; BEM et al., 2010).

A camada mais profunda da pele é composta pela hipoderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras e adipócitos (células que armazenam gordura). A hipoderme tem como função dar sustentação e união às camadas celulares superiores, proteção contra choques mecânicos, isolamento térmico e reserva energética (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; REMINGTON et al., 2006).

A ferida é considerada uma lesão que afeta a fisiologia da pele, em especial aquelas que acometem a camada dérmica. A cicatrização de feridas ocorre através da re-pavimentação e a reconstituição do tecido lesionado, onde há uma interação celular e molecular perfeita. Este evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos, com a finalidade de garantir a restauração tecidual. A cicatrização também depende de vários fatores como: localização anatômica, raça, tipo de pele e técnica cirúrgica, quando utilizada (MANDELBAUM et al., 2003).

Duas formas principais de reparação tecidual têm sido relatadas: a regeneração tecidual e a cicatrização (SCHREML et al., 2010). A regeneração é um processo que ocorre quando há uma lesão dita de espessura parcial (derme incompleta), a qual ocorre comumente após procedimentos

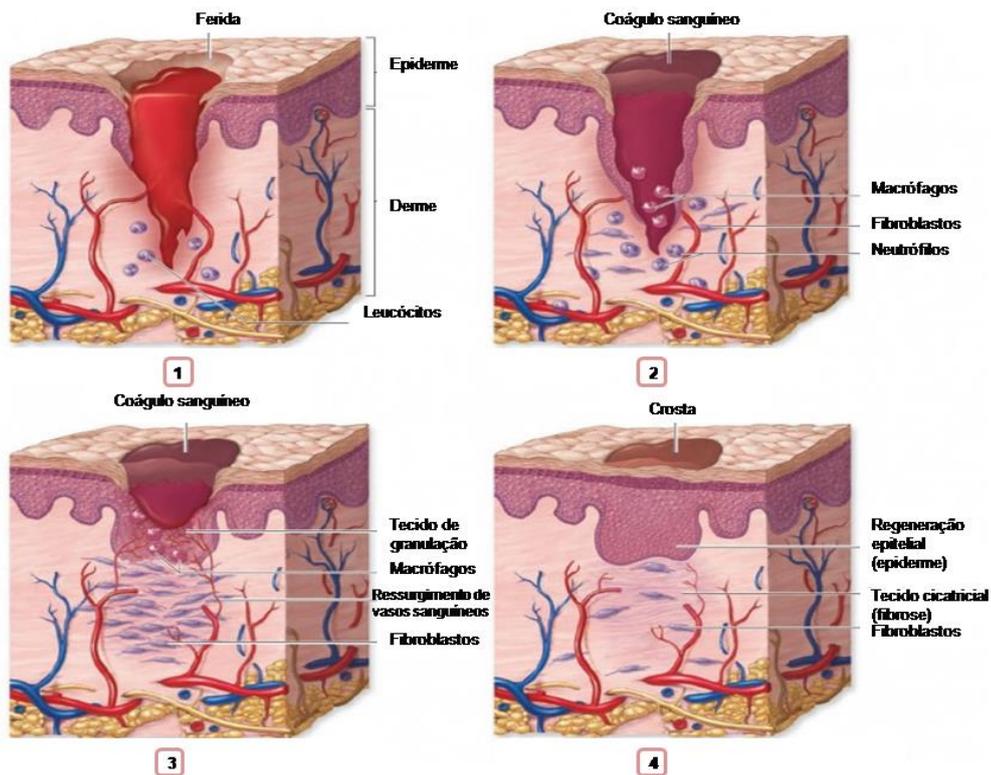
dermatológicos como *peeling* químicos e dermoabrasão, no qual já houve morte celular. Estas células são substituídas pelas células parenquimatosas do mesmo órgão. Já a cicatrização é uma lesão com espessura total (derme completa) através de cortes e/ou perfurações que necessitam da formação de um novo tecido. Neste processo as células que sofreram lesão, não são substituídas por células parenquimatosas, mas sim por tecido fibroso. Sabe-se que as cicatrizes cutâneas muitas vezes causam graves danos estéticos e até mesmo psicológicos. Após a lesão, no mesmo tecido, pode ocorrer um ou ambos os processos, regeneração e/ou cicatrização (MANDELBAUM et al., 2003; KONDO e ISHIDA, 2010; GANTWERKER e HOM, 2012).

O processo de cicatrização da pele é considerado extremamente complexo, visto que envolve várias linhagens celulares, matrizes e moléculas de sinalização, as quais atuam para atingirem a perfeita regeneração. A cicatrização normal é composta por três etapas sobrepostas, mas distintas, sendo elas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (ISAAC et al., 2010; SARNOFF, 2011). A fase inflamatória é o primeiro estágio do processo de cicatrização, que pode ser observada no período inicial da lesão até o terceiro dia, sendo considerado o processo mais importante (MANDELBAUM et al., 2003; BALBINO et al., 2005). Nesta primeira etapa ocorrem várias reações inflamatórias (edema, calor e dor), marcadas por células como neutrófilos, macrófagos e mastócitos, que se infiltram na lesão de forma gradativa. Os neutrófilos atuam eliminando todo corpo estranho e bactérias existentes na lesão (BALBINO et al., 2005; CAMPOS et al., 2007). Eles liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) que desempenha papel fundamental nos mecanismos bactericidas. A MPO está diretamente relacionada com os mecanismos bactericidas dependentes de  $O_2$ , sendo catalizadora do processo de formação de radicais altamente reativos como o ácido hipocloroso (HClO), a partir de  $H_2O_2$  e íons halogênicos, constituindo, portanto, importante mecanismo de defesa contra microorganismos patogênicos (VAN DER VEEN et al., 2009). Esta enzima é utilizada como indicativo da presença de neutrófilos no tecido analisado, constituindo assim, um importante marcador de inflamação. Além disso, os neutrófilos, também são responsáveis pela produção de citocinas e fatores de crescimento (DAVIES, 2010), de realizarem a eliminação bacteriana, os neutrófilos sofrem apoptose ou acabam sendo fagocitados por macrófagos

que estão presentes na lesão. Os macrófagos por sua vez fornecem o fator de crescimento para a granulação e posterior formação do tecido (SARNOFF, 2011). Já os mastócitos tendem a migrar até a lesão liberando fatores de crescimento pró-inflamatório, como o fator ativador de plaquetas (PAF) e várias citocinas para a formação da cicatriz (BALBINO et al., 2005).

A segunda etapa é a proliferativa, responsável pelo fechamento da lesão. Esta etapa é dividida em três fases: reepitelização, granulação e angiogênese. Inicialmente, ocorre o processo de reepitelização, que visa cobrir a superfície da lesão com uma camada de epitélio e baseia-se na diferenciação, proliferação e migração dos queratinócitos epidérmicos (ISAAC et al., 2010). Após o leito da ferida ter sido adequadamente estabelecido com fibroblastos em proliferação, uma nova matriz de colágeno se estabelece e o processo de reepitelização se inicia. Os queratinócitos são ativados e migram para o local da lesão, a partir das bordas (BALBINO et al., 2005). Os fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio. Em seguida, ocorre o processo de recrutamento e proliferação dos fibroblastos ou fibroplasia responsável pela formação da matriz, tecido de granulação (fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares). A formação do tecido de granulação depende dos fibroblastos, considerados células críticas na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). A última fase da segunda etapa é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização, na qual as células endoteliais migram para a área ferida (MANDELBAUM et al., 2003; ISAAC et al., 2010; SARNOFF, 2011).

E por fim, a remodelagem, última etapa do processo de cicatrização que envolve o colágeno e a matriz, que conferem resistência e redução do tamanho da cicatriz e do eritema. Este é considerado o processo mais longo, já que pode demorar meses até cessar. Nesta etapa há reabsorção de água, diminuição da neovascularização, aumento da espessura da cicatriz, que dependendo da profundidade da lesão poderá ser aparente ou não (MANDELBAUM et al., 2003).



**Figura 1.** Estágios da cicatrização da ferida. **1)** Momento da lesão, sangramento dos vasos sanguíneos; **2)** Forma-se o coágulo e os leucócitos limpam a ferida. **3)** Os vasos sanguíneos regridem e o tecido de granulação é formado. **4)** Regeneração do epitélio e formação de fibrose do tecido conjuntivo. (adaptado de "<http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=15063>").

As células por si só tem capacidade de cicatrizar feridas em todas as partes do corpo através da reparação e regeneração do tecido em seres humanos e animais. No entanto, sabe-se esta capacidade pode variar de acordo com fatores como sexo, idade, situações de estresse, obesidade, hábitos como alcoolismo e tabagismo, tamanho da lesão e gravidade da mesma, entre outras condições como baixa imunidade e problemas relacionados ao estado de saúde do paciente (GHOSH e GABA, 2013). Por exemplo, pacientes que fazem uso constantemente de álcool são mais suscetíveis a acidentes que causam lesões cutâneas. Estudo realizado por FITZGERALD e colaboradores (2007), revelou que as primeiras respostas

inflamatórias dérmicas, incluindo atividade da enzima MPO, eram prejudicadas em ratos que receberam quantidade de álcool antes da lesão o que, conseqüentemente, pode influenciar as etapas mais tardias da cicatrização.

A administração de moléculas bioativas visa a auxiliar e a promover o processo de cicatrização da pele. Neste caso, a principal barreira para a penetração, o estrato córneo, não está presente nos primeiros dias após a lesão, o que permite a distribuição das mesmas nos fluidos fisiológicos locais e a penetração nas membranas celulares mais facilmente. Sob este prisma, a dissolução das substâncias nesses fluidos e a sua disponibilidade para captação nas membranas celulares se revelam crucial para a promoção do efeito cicatrizante durante todo o processo de cicatrização. Daí decorre o interesse do uso de sistemas de liberação capazes de promover a veiculação das substâncias de baixa solubilidade, como é o caso do cumestrol, e de liberá-las junto às membranas celulares.

### **Flavonoides: atividade estrogênica e cicatrizante**

O corpo tem alta capacidade de reposição de células lesadas ou até mesmo mortas. A cicatrização cutânea ocorre por meio de processos biológicos, que inicialmente envolve hemostasia (processo de vasoconstrição e formação de coágulo), fase inflamatória, fase proliferativa e de remodelação da matriz (ISAAC et al., 2010), podendo esses processos serem influenciados por mediadores endógenos ou substâncias exógenas como é o caso de produtos a base de plantas medicinais (REUTER et al., 2009).

O estrogênio exerce sua função na pele por meio de sua ligação aos receptores estrogênicos (ER), os quais são subdivididos em alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ). Estes ER são expressos nos fibroblastos da pele humana (derme) regulando a ação de estrógenos em nível cutâneo. Na pele não tratada, o  $17\beta$ -estradiol, um estrogênio endógeno, exerce um papel importante na prevenção do envelhecimento e na cicatrização cutânea (THORNTON et al., 2003; VERDIER-SEVRAIN et al., 2004).

Os ER $\beta$  estão mais presentes na epiderme, fibroblastos dérmicos e vasos sanguíneos. Na epiderme, estes estão mais presentes nos queratinócitos das camadas basal e malpighiana e em menor proporção na camada granulosa estando envolvidos diretamente na cito proteção. Já os ER $\alpha$  são também expressos em queratinócitos epidérmicos, predominantemente na camada basal e camada malpighiana, mas agem especialmente na promoção da proliferação celular. Além disso, ambos os receptores estrogênicos são expressos também nas glândulas sebáceas (THORNTON et al., 2003; HALL e SCHWARTZ, 2004; VERDIER-SEVRAIN et al., 2004; SHU e MAIBACH, 2011).

Assim, o 17 $\beta$ -estradiol ao ativar os receptores (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) em fibroblastos dérmicos, aumenta os níveis do fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), responsável pela produção de colágeno, acelerando a cicatrização cutânea. Na menopausa, devido à redução dos níveis de estrogênio sistêmico, ocorre diminuição da cicatrização cutânea, visto que há um decréscimo da produção de colágeno e da proliferação celular (VERDIER-SÉVRAIN, 2007).

Os isoflavonoides, como os demais flavonoides são caracterizados, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano e se dividem em isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanas, pterocarpanos, coumestanos entre outros. De maneira geral os flavonóides são constituídos por três anéis, e os seus carbonos podem sofrer algumas variações químicas, como hidroxilação, metilação, glicosilação, acilação e sulfonação, possibilitando a formação de vários flavonóides, os quais são agrupados em diferentes classes (GEORGIEV et al., 2014). No reino vegetal, apresentam-se na forma de agliconas, glicosídeos, acetilglicosídeos e malonilglicosídeos. Dentre suas propriedades biológicas destacam-se a antibacteriana, antifúngica, atividade estrogênica e cicatrizante, sendo as duas últimas peculiares das subclasses de isoflavonas e coumestanos (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004; ANTONELLI et al., 2005; SEHN et al., 2009; ROUTRAY e ORSAT, 2012).

Os isoflavonoides na maioria das vezes encontram-se na forma de heterosídeo, ou seja, ligados a uma molécula de açúcar através de ligação 7- $\beta$ -D-glicosídica. A forma glicosídica das isoflavonas é inativa, por isso necessita da hidrólise da ligação heterosídica e a liberação da aglicona para exercer suas atividades biológicas, o que a diferencia da forma de aglicona (LEE et al., 2007). Administrados pela via oral enzimas do trato intestinal realizam a

hidrólise, o que não ocorre na administração pela cutânea (IOVINE et al., 2012).

Os isoflavonoides são capazes de interagir com receptores estrogênicos, por apresentarem estrutura química semelhante à do estradiol, presentes nos sistemas biológicos (SETCHELL et al., 2005). Os coumestanos são conhecidos por serem os compostos com a maior atividade estrogênica entre os flavonoides (KOUKI et al., 2005). São frequentemente incluídos na subclasse isoflavonas devido à semelhança estrutural e de atividade com essa classe de flavonoides (GANRY, 2005; KOUKI et al., 2005; MŁYNARCZUK et al., 2013).

O cumestrol é uma substância ativa isolada principalmente de plantas da família *Fabaceae* ou *Leguminosea*, abrange uma das maiores famílias encontradas em regiões subtropicais e temperada de ambos os hemisférios. É utilizado sob a forma de aglicona (fração biologicamente ativa). Além de atividade estrogênica (KOUKI et al., 2005), estudos relatam sua potente atividade antioxidante relacionada à doação de hidrogênio/elétrons da hidroxila fenólica (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004; LEE et al., 2007; SCOTTI et al., 2007).

Grande parte dos relatos na literatura sobre a atividade cicatrizante de isoflavonoides refere-se à flavonoides de uma forma geral, aos quais é atribuída capacidade de inibir uma variedade de enzimas, como é o caso das prostaglandinas-sintetases, enzimas que têm papel importante na inflamação e no reparo tecidual. Além disso, há referência de que os flavonoides atuam inibindo a enzima hialuronidase, mantendo os proteoglicanos do tecido conjuntivo, prevenindo a propagação bacteriana e diminuindo assim, o tempo de cicatrização (HAVSTEEN, 2002; VIEIRA et al., 2008). Os flavonoides também se destacam por possuírem atividade antimicrobiana e/ou antioxidante e antiinflamatória (GHOSH e GABA, 2013).

Em estudo realizado em ratos wistar, AMBIGA e colaboradores (2007), isolaram o kaempferol e seu derivado glicosilado (3-O-â-D), partir das flores de *Ipomoea carnea*, e avaliaram sua atividade cicatricial em feridas excisadas, na dose de 200 mg/Kg/dia. A atividade cicatrizante observada se mostrou potente frente ao controle positivo (sulfatiazol, um antimicrobiano derivado da sulfa), tanto para o kaempferol quanto para seu derivado glicosilado.

Já PANDA e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de diferentes extratos de folhas de *Crotalaria pallida*, da família *Fabaceae*, obtidos por sucessivas extrações em soxhlet com os solventes: etanol, acetato de etila, n-butanol e éter de petróleo, sobre a cicatrização de feridas excisadas em ratos wistar. O resultado do estudo indicou que o extrato etanólico de *Crotalaria pallida* foi o que mais promoveu a cicatrização, comparativamente aos extratos obtidos com os demais solventes. A cura da ferida com o extrato foi atribuída à presença de diversos constituintes químicos presentes no extrato e conhecidos por sua atividade antimicrobiana, como: flavonoides, fenóis, terpenoides, saponinas, esteróides e taninos, individualmente ou combinados, podendo exibir efeito sinérgico. Os autores reconhecem, no entanto, a necessidade de aprofundamento da investigação, com testes de atividade dos constituintes isolados.

No que se refere aos isoflavonóides, JOSÉ DACAMPORA e colaboradores (2007) realizaram um estudo de cicatrização de feridas cutâneas, submetidas à contaminação com 1 mL de cada inóculo (*S. aureus* e posteriormente *S. pyogenes*), administrando quercetina (dihidrato de quercetina) por via intraperitoneal, em ratos wistar, na dose de 50 mg/Kg/dia diluída em dimetilsulfóxido (P.A) e solução fisiológica suficiente para completar o volume de 0,5 mL, por sete dias. Os grupos foram diferenciados por número de aplicações de quercetina antes e após o procedimento cirúrgico (todos com inóculo), controle positivo (tratados somente com inóculo e sem quercetina) e controle negativo (tratados sem inóculo e sem quercetina). Os autores observaram um aumento na reepitelização nos grupos tratados por esta isoflavona, quando comparado com o grupo controle, e também constataram que havia uma menor separação entre as fibras musculares subcutâneas nos grupos tratados.

MURALIDHAR e colaboradores (2013) avaliaram a atividade cicatrizante de fração flavonoídica obtida através de extrato etanólico de cascas de *Butea monosperma* (Lam). No referido estudo, utilizaram como modelo ratos wistar e a aplicação tópica do extrato incorporado em pomada, comparada com os grupos controle (apenas a base-pomada) e pomada antibacteriana. A fração contendo flavonoides demonstrou atividade cicatrizante, que foi atribuída

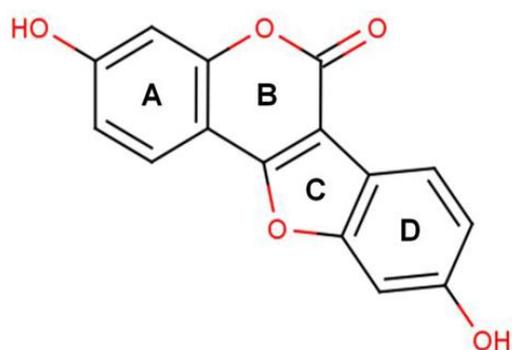
principalmente às isoflavonas prunetina e genisteína, presentes nas cascas de *Butea monosperma* (Lam).

### Cumestrol (COU)

O cumestrol é a substância bioativa que mais se destaca entre os coumestanos, sendo amplamente encontrado em brotos de alfafa e trevos, e têm sido estudado devido suas propriedades estrogênica e antioxidante (AL-MAHARIK e BOTTING, 2004; GANRY, 2005).

O cumestrol, descoberto em 1958 por Bickoff e colaboradores, possui fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> e massa molecular de 268,22 g, apresentando-se na forma de cristais que sublimam em 325 °C e, em alto vácuo, próximo dos 175°C. Apresenta máximos de absorção (em metanol) na região do ultravioleta em 208, 243 e 343 nm e exibe fluorescência azulada em meio alcalino forte.

Com relação a sua solubilidade, é praticamente insolúvel em água em pH ácido, neutro ou alcalino (pH entre 11-12) e em éter de petróleo; ligeiramente solúvel em metanol, clorofórmio e éter, além de ser solúvel em tetracloreto de carbono e benzeno (BICKOFF et al., 1960; WILLIAMS, 2006).



**Figura 2.** Estrutura química do cumestrol.

O cumestrol é classificado como um fitoestrógeno, devido a sua semelhança aos estrógenos naturais (AL-MAHARIK e BOTTING, 2004). É um

agonista estrogênico, tendo afinidade de ligação com os receptores (ER), mas também apresenta atividade antiestrogênica dose-dependente, pois em altas concentrações compete com o estrogênio (17 $\beta$ - estradiol) pela ligação com os receptores, bloqueando-os (BUROW et al., 2001; PINNELL, 2003). O cumestrol apresenta afinidade tanto pelos receptores ER $\alpha$  quanto pelos ER $\beta$ . É importante destacar que a forma livre (aglicona) é forma que interage com esses receptores (KRAZEISEN et al., 2001; POCOOCK et al., 2002).

A biossíntese do cumestrol se dá a partir dos fenilpropanoides: fenilalanina  $\rightarrow$  ácido p-hidroxicinâmico CoA  $\rightarrow$  7,4'-hidroxiflavanona  $\rightarrow$  daidzeína  $\rightarrow$  compostos intermediários  $\rightarrow$  cumestrol (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004; BRUNETON, 2008). Existem várias fontes vegetais de cumestrol, entre elas destacam-se: sementes, folhas (alfafa, e trevo vermelho) e brotos (alfafa, soja, feijão e trevo amarelo) (LAPČÍK et al., 2003; ANTONELLI et al., 2005; PATRI et al., 2006; KONAR et al., 2012).

As concentrações de cumestrol encontradas nas fontes vegetais podem variar de acordo com os fatores externos (condições ambientais e contaminação por microorganismos) e as condições de processamento. Tem se observado um aumento em sua concentração como mecanismo de defesa da planta (KONAR et al., 2012; JEON et al., 2013). LEUNER e colaboradores (2013), relatam um rendimento de 105 mg/Kg de cumestrol a partir do trevo amarelo (*Melilotus officinalis*), enquanto que PATRI e colaboradores (2006), obtiveram no trevo vermelho (*Trifolium pratense*) 5.611 mg/Kg e nas folhas de brotos de alfafa (*medicago sativa*), 1,2 e 720 mg/Kg, respectivamente.

Diversas atividades biológicas são atribuídas ao cumestrol, no entanto são encontrados poucos relatos para atividades relacionadas à pele.

Estudos recentemente realizados por nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo da Dra Cláudia O. Simões, da UFSC, BIANCHI, (2014), avaliaram a migração celular e a capacidade proliferativa em cultura de fibroblastos, através de ensaio por *scratch*, observando que a associação cumestrol associado à HP $\beta$ CD induziu um aumento do número de células, nas concentrações de 50  $\mu$ M (66,1 %) e na concentração de 10  $\mu$ M (56,3 %), sendo o efeito foi comparável ao controle positivo (PDGF). Resultados consideravelmente mais baixos foram atingidos para o coumestrol dissolvido em DMSO, 50  $\mu$ M a 10 $\mu$ M. Por outro lado, quando o cumestrol livre foi

dissolvido em DMSO numa concentração dez vezes maior, 100  $\mu\text{M}$ , observaram-se uma redução de 73,4 % da migração celular observada para o controle positivo, enquanto que quando dissolvido em DEMEM 50  $\mu\text{M}$  a redução foi de apenas 30,0%. Esse efeito negativo observado para cumestrol dissolvido em DMSO (100  $\mu\text{M}$ ) ainda não está devidamente elucidado, não se descartando a hipótese de toxicidade nesta concentração, ou diminuição da atividade estrogênica por níveis elevados de cumestrol, a exemplo do que ocorre com altas concentrações de estrogênio. Já o efeito observado para cumestrol disperso em DEMEM 50  $\mu\text{M}$  pode ser devido à baixa solubilidade do cumestrol neste meio, aspecto que foi superado pela sua associação à ciclodextrina.

Com relação à toxicidade do cumestrol, destacam-se alguns estudos. KULLING (1997), descreveram que o cumestrol exerce um efeito genotóxico (pela indução de micronúcleos em células V79) e mutagênico (no cromossomo X sobre o locus HPRT), em hamster. O cumestrol induziu quebras do DNA em células V79 (25 - 100  $\mu\text{M}$  de cumestrol), além disso, a frequência da mutação aumentou em até 10 vezes com relação ao controle em concentrações de 5-50  $\mu\text{M}$ .

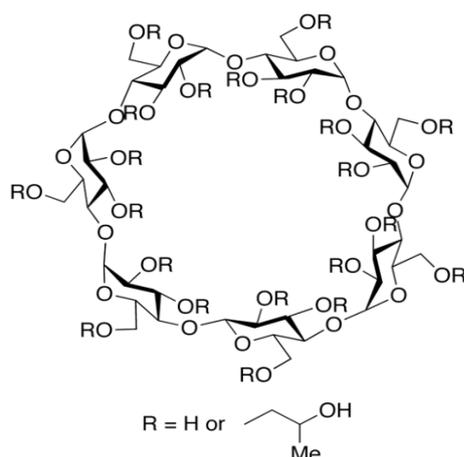
### **Ciclodextrinas (CD)**

O grande avanço científico na área farmacêutica tem sido resultado, dentre outros fatores, do surgimento de novas moléculas terapeuticamente ativas. No entanto, muitas destas moléculas apresentam limitações com relação a sua aplicabilidade, como por exemplo, baixa hidrossolubilidade, baixa biodisponibilidade ou até mesmo características sensoriais indesejáveis. Com o objetivo de superar estes obstáculos as ciclodextrinas têm espaço importante. Devido a sua natureza anfifílica são capazes de incluir moléculas ou grupamentos hidrofóbicos em sua cavidade, formando complexos de inclusão, assim como associar-se externamente a moléculas hidrofílicas resultando no aumento da sua hidrossolubilidade, estabilidade e biodisponibilidade

(LOFTSSON e BREWSTER, 1996; SINGH et al., 2002; MUNRO et al., 2004; SANTOS et al., 2015).

As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos de glicose, dispostos na forma de cone, unidos por ligação  $\alpha$ -(1,4), que encontra emprego em preparações cutâneas especialmente visando à promoção de algumas substâncias, na pele saudável (CAVALLI et al., 1999; FICARRA et al., 2002; MALPEZZI et al., 2004; TOMMASINI et al., 2004; XIE et al., 2015). As ciclodextrinas naturais diferenciam-se pela quantidade de unidades de glicose, sendo  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD que são compostas por seis, sete e oito unidades respectivamente (CHIN et al., 2015). Estas estruturas são obtidas por meio da degradação do amido através da ação da enzima ciclodextrinaglicosiltransferase, a qual é sintetizada por alguns microrganismos (FENELON et al., 2015).

A  $\beta$ -ciclodextrina é uma das ciclodextrinas mais empregadas por seu baixo custo, diâmetro de cavidade adequado à inclusão de inúmeras substâncias ativas ou parte de suas moléculas. Sua fórmula molecular é  $C_{42}H_{70}O_{35}$ , encontra-se na forma de cristais em paralelograma, com ponto de fusão entre 255 e 265°C (ARTHUR e PRICE, 2000; NEIL, 2006). Diferentes métodos de complexação com ciclodextrinas podem resultar em associações, que podem apresentar maior ou menor hidrossolubilidade. Sua principal desvantagem reside na sua nefrotoxicidade e baixa hidrossolubilidade, comparativamente a seus derivados hidrofílicos. Neste sentido, ao derivado hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), tem sido amplamente utilizado como agente solubilizante para moléculas hidrofóbicas. Além disto, ao contrário da  $\beta$ -ciclodextrina, a maior solubilidade em água e a baixa toxicidade da HP $\beta$ CD têm permitido sua utilização em ensaios que envolvem cultura celular, bem como administração parenteral, ocular nasal, pulmonar e outras vias, revelando a extrema vantagem de seu emprego em relação à ciclodextrina natural. (LOFTSSON e BODOR, 1988; OLIVIER et al., 1991; BELLRINGER et al., 1995). Além disto, a patente deste derivado sintético expirou, a mais de uma década, o que abre a perspectiva de sua utilização mais ampla.



**Figura 3.** Estrutura química da HP $\beta$ CD

As ciclodextrina, por meio de associações supramoleculares, são capazes de modificar as características de molécula hóspedes de diferentes formas, como aumentar a hidrossolubilidade de fármacos lipofílicos, mascarar sabores e odores desagradáveis e estabilizá-los contra possíveis degradações pela luz, calor e oxigênio, promover a penetração na pele e em mucosas (LOFTSSON e MASSON, 2001; DEL VALLE, 2004; PINHO et al., 2014).

Diversos métodos de obtenção de associações/complexos de inclusão entre a ciclodextrina e molécula hóspedes têm sido relatados. A seleção do método baseia-se, primordialmente, nas propriedades da molécula, facilidade de complexação e o custo envolvido (MARQUES, 2010). Dentre os métodos mais comumente relatados na literatura, estão: complexação em solução, pasta, extrusão, mistura a seco, evaporação, *freeze-drying*, *spray-drying*, micro-ondas, granulação, neutralização e co-precipitação (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; GIORDANO et al., 2001; DEL VALLE, 2004; YATSU et al., 2013).

Entre os métodos descritos para a obtenção de complexos com ciclodextrina, nosso grupo de pesquisa tem utilizado a complexação em meio aquoso (também conhecido como solução ou co-precipitação), seguida de secagem por liofilização (BIANCHI, 2014) e o método em meio organo-aquoso (hidroetanólico), seguido de secagem por *spray drying* (FRANCO et al., 2009; YATSU et al., 2013). A etapa de secagem tem como objetivo a produção de um produto final pulveréneo, mas não se pode descartar a possibilidade de ocorrer

complexação durante o processo de secagem (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2009; YATSU et al., 2013).

No método em solução a ciclodextrina é dissolvida em água e a molécula hóspede ( $\beta$ -ciclodextrina) é adicionada sob agitação constante, em excesso, à solução contendo ciclodextrina em diferentes proporções molares. Ainda que algumas ciclodextrinas apresentem baixa hidrossolubilidade, como é o caso da  $\beta$ -ciclodextrina (1,85 g/100 mL), com o aumento da temperatura sua concentração pode aumentar até 20 %. Todavia, deve-se analisar a estabilidade térmica da  $\beta$ -ciclodextrina (DEL VALLE, 2004).

As ciclodextrinas podem complexar moléculas de maneira parcial ou até mesmo total, através de interações não covalentes, formando estruturas supramoleculares. As forças que promovem a formação de complexos são a alta entalpia das moléculas de água, presentes na cavidade apolar da ciclodextrina; a saída da água da cavidade dá espaço à entrada de moléculas menos polares, sendo favorecida termodinamicamente. Além disto, no complexo há presença de forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A formação de complexos se dá por interação não covalente, constituindo um processo dinâmico no qual há associação e dissociação constantemente (BIBBY et al., 2000; ZARZYCKI e SMITH, 2001; SINGH et al., 2002).

Em nosso grupo de pesquisa, diversos trabalhos têm sido conduzidos com o uso de ciclodextrinas e flavonoides para a via cutânea. SCHWINGEL (2013) avaliou o perfil de penetração dos flavonoides 3-O-metilquercetina e quercetina nas camadas da pele a partir de hidrogéis de hipromelose e quitosana, observando que a presença de  $\beta$ -ciclodextrina aumentou a penetração dos dois flavonoides nas camadas da pele em ambos os hidrogéis. No entanto, o hidrogel com quitosana favoreceu a penetração da quercetina. Estudos de dinâmica molecular revelaram diferentes comportamentos estéricos, sendo a metila presente na 3-O-metilquercetina um grupo funcional que confere maior energia e impedimento estérico à molécula, comparativamente à quercetina.

Recentemente BIANCHI e colaboradores (2014), demonstraram por meio de estudo de permeação cutânea, utilizando cumestrol 1 % incorporado em hidrogel de HPMC 3,5 %, em célula de Franz, utilizando pele de orelha de

suíno, em que a presença de HP $\beta$ CD promoveu a penetração de cumestrol na pele e que houve formação de complexo de não-inclusão.

A associação de moléculas com ciclodextrina pode ser caracterizada por diferentes técnicas analíticas como: calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise térmica diferencial (DTA), espectroscopia no infravermelho (IR, FTIR), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-visível), diagrama de solubilidade, difração de raio-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), entre outros (GIORDANO et al., 2001; CALABRÒ et al., 2004; CRUPI et al., 2007; YATSU et al., 2013).

Quanto à possibilidade de absorção das ciclodextrinas, em aplicação tópica HP $\beta$ CD radiomarcada em ratos com pele intacta, 0,02 % da molécula radiomarcada foi absorvida, enquanto que no mesmo estudo, utilizando com pele lesionada (sem estrato córneo) houve absorção de 24 % (TANAKA et al., 1995), evidenciando o bem conhecido papel de barreira do estrato córneo e a baixa absorção do adjuvante através da pele.

## **Hidrogéis**

### *Hidrogel de Hipromelose (HPMC)*

Dentre as formulações tópica, os géis vem se destacando devido as grandes vantagens com relação aos outros produtos de uso tópico, seja com relação à produção, envase e aplicação. Normalmente proporcionam um aspecto agradável e boa aceitação pelos pacientes, além do seu baixo custo de produção e fácil aplicação.

Os hidrogéis ou géis hidrofílicos vêm sendo muito utilizados como base na produção de produtos dermatológicos, pois são facilmente manipulados, possuem grande capacidade de geleificação em meio aquoso, com relação à variabilidade na massa molecular e grau de substituição são capazes de produzir géis com diferentes viscosidades, não são oleosos, possuem ótima espalhabilidade, e podem ser utilizados para incorporar várias substâncias

ativas hidrossolúveis e lipossomas. A hipromelose (HPMC), pertence à família dos polímeros hidrofílicos não-iônicos, sendo amplamente empregada em formulações com administração por via tópica. Também é utilizado como espessante em formulações e é amplamente utilizado em produtos cosméticos por apresentar baixo potencial de irritação e toxicidade (ARTHUR e PRICE, 2000; EL-KATTAN et al., 2000; ROWE et al., 2009).

Estudos do incremento da hidrossolubilidade obtido através da complexação de quercetina com  $\beta$ CD ou HP $\beta$ CD, na presença ou ausência de HPMC, realizado por PETRY e colaboradores (2007), demonstraram que a associação quercetina: $\beta$ CD na ausência de HPMC teve um incremento de 4,6 vezes na hidrossolubilidade, enquanto que com a presença de HPMC a mesma associação apresentou um incremento de 6,5 vezes. No entanto, quando a  $\beta$ CD era substituída por HP $\beta$ CD nas mesmas associações com a quercetina, observou-se que: associação quercetina:HP $\beta$ CD na ausência de HPMC apresentou um incremento de 38 vezes na hidrossolubilidade, enquanto que, na presença de HPMC apresentou um incremento de 62 vezes na hidrossolubilidade. Enquanto que, a associação quercetina:HPMC apresentou um incremento de apenas 2,8 vezes. O estudo claramente evidencia um sinergismo entre as duas ciclodextrinas e a HPMC no que diz respeito à hidrossolubilidade da quercetina.

Em estudo realizado para avaliar as propriedades tixotrópicas em formulações farmacêuticas (LEE et al., 2009) observaram que a HPMC apresentava propriedade promotora de viscosidade quando combinada com ácido poliacrílico (PAA). Quando realizada a mistura aquosa HPMC 1,5 % e PAA 0,3 %, esta combinação exibiu características semelhantes à solução de PAA 2,0 %. Já o estudo reológico que continha uma combinação de HPMC e PAA na proporção 2:1 mostrou que a formulação apresentou maior viscosidade, e comportamento tixotrópico pseudoplástico aparente, mostrando-se adequado para a utilização em géis de uso tópico.

### *Hidrogel de quitosana*

A quitosana, um polissacarídeo catiônico obtido pela acetilação da quitina, vem sendo amplamente estudada devido suas propriedades como adjuvante farmacêutico e também terapêuticas (MADHUMATHI et al., 2009; ARAIN et al., 2013). A protonação de seus grupamentos amínicos lhe confere características catiônicas. Este grupamento está envolvido tanto na solvatação do polímero e consequente geleificação, quanto na atividade antimicrobiana que lhe é atribuída (KOIDE, 1998; SIMONCIC e TOMSIC, 2010).

É uma substância dispersível em meio aquoso e tem sido amplamente utilizada no preparo de géis e soluções. A formação de dispersões coloidais com a quitosana é realizada com a adição de ácidos, sendo a concentração de prótons necessária pelo menos igual à concentração de grupos  $\text{NH}_2$  envolvido na reação (RINAUDO et al., 1999).

Foram relatados em alguns estudos, que quando em presença de glicerol 2-fosfato, em pH neutro, a quitosana se mostrou solúvel em água. Em temperatura ambiente, com pH em torno de 7, obteve-se uma solução estável, enquanto que na presença de aquecimento, em torno de 40 °C, observou-se a formação de gel. Verificando-se assim, que da fase sol para gel foi depende da temperatura de geleificação e parcialmente reversível (CHENITE et al., 2000; CHENITE et al., 2001; MOLINARO et al., 2002; CHO et al., 2005).

A quitosana e a quitina destacam-se dentre os polissacarídeos, devido sua atividade antimicrobiana. Esses polímeros provocam a inibição de vários microorganismos, podendo ser explicado pelos grupos amínicos, que em contato com os fluidos fisiológicos (provavelmente protonados), ligam-se a grupos aniônicos desses microorganismos, resultando na inibição do crescimento, devido a aglutinação das células microbianas (SILVA et al., 2006).

Além das características de viscosidade dos géis empregados como base para preparações farmacêuticas e cosméticas, a bioadesão também se constitui numa característica relevante. Esta característica vem sendo amplamente explorada na administração de moléculas bioativas em mucosas, no entanto, pouco se conhece sobre este fenômeno em locais em que há ausência de muco, como é o caso da pele. Existem algumas características dos polímeros que vêm sendo consideradas importantes na bioadesão, como a

sua elevada massa molecular, facilidade de dispersão em água, a presença de elevado número de hidroxilas e/ou carboxilas, flexibilidade da cadeia polimérica, capacidade de formar ligações de hidrogênio e presença de carga negativa na superfície. Dentre os principais mucoadesivos encontram-se a quitosana, os carbômeros e derivados da celulose como a HPMC. Quando se trata de pele, deve-se levar em consideração que a mesma é livre de cargas, diferentemente do muco, portanto, esta característica não parece ser primordial para a adesão na pele (VILLANOVA et al., 2010; YOSHII, 2011).

Neste contexto, considerando as importantes atividades biológicas do cumestrol, especialmente os resultados preliminares obtidos por BIANCHI (2014) relativos aos indicativos de atividade de promoção da cicatrização observada em cultura de fibroblastos, bem como as pobres características biofarmacêuticas da molécula para administração em lesões cutâneas, a pesquisa de estratégias que promovam a sua hidrossolubilidade e permanência no local de aplicação se revela de grande interesse. Neste sentido, o presente trabalho propõe avançar nos estudos que vem sendo realizados por nosso grupo de pesquisa no PPGCF/UFRGS, propondo realizar um estudo de utilização de diferentes métodos de associação do cumestrol com HP $\beta$ CD, em meio organo-aquoso seguido de *spray drying* e por meio do método de micro-ondas seguido de liofilização, selecionando o método mais adequado. Na sequência, incorporação da associação em duas bases hidrofílicas (HPMC ou quitosana) e realização de estudos de liberação in vitro do cumestrol, comparando-se à simples mistura cumestrol:ciclodextrina e cumestrol livre. Finalmente, a proposta inclui a avaliação da atividade cicatrizante do hidrogel selecionado em modelo animal (ratos wistar), etapa que será junto à Instituição de origem da co-orientadora Dra. Cristiana Lima Dora, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, no âmbito (PROCAD - FURG/UFPEL/UFRGS Processo 552457/2011-6).



## **CAPÍTULO II**

**Associação de cumestrol/hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina:  
caracterização, incorporação em hidrogel , avaliação da liberação e da  
atividade cicatrizante.**

**Publicação a ser submetida à *Phytotherapy Research***

---



**Associação de cumestrol/hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina:  
caracterização, incorporação em hidrogel , avaliação da liberação e da  
atividade cicatrizante.**

Barbara E.K. Machado<sup>1</sup>, Sara E. Bianchi<sup>1</sup>, Marília G.C. da Silva<sup>2</sup>,  
Michelle Maidana<sup>2</sup>, Lidiane Dal Bosco<sup>2</sup>, Magno Marques<sup>3</sup>, Ana P.Horn<sup>3</sup>, Cristiana L.  
Dora<sup>2</sup>, Valquíria L. Bassani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil

## **Resumo**

O cumestrol (COU) é um dos constituintes que mais se destaca na classe dos coumestanos. O interesse por esta molécula está especialmente relacionado às propriedades estrogênicas e antioxidantes que apresenta. Uma das principais limitações para seu emprego farmacêutico ou cosmético se é sua baixa hidrossolubilidade. Recentes estudos do grupo revelaram o potencial de utilização de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP $\beta$ CD) para a promoção da solubilidade da molécula, bem como o potencial dessa associação para a promoção da cicatrização em cultura de fibroblastos. No presente trabalho são comparados dois métodos de obtenção da associação cumestrol: HP $\beta$ CD, em micro-ondas seguido de liofilização (COU:HP $\beta$ CD-MO-LI) e meio orgânico seguido de secagem por *spray dryer* (COU:HP $\beta$ CD-SD). As associações obtidas foram incorporadas em dois diferentes hidrogéis, gel de hipromelose (HPMC) e de quitosana e a liberação do cumestrol foi avaliada em célula de difusão do tipo Franz, utilizando tampão:etanol (50:50 v/v) como meio acceptor e membrana de éster de celulose de 0,05  $\mu$ m. O melhor perfil de

liberação do cumestrol foi obtido pela associação COU:HP $\beta$ CD-SD incorporado em hidrogel de HPMC, o qual foi utilizado no experimento de atividade cicatrizante *in vivo*, onde se destacou por ter melhor desenvoltura frente a cicatrização, visto que a contração da lesão parece ser harmônica. Além disso, em 12 dias de tratamento apresentou 99,05 % de contração da ferida.

**Palavras chave:** cumestrol, ciclodextrina, cicatrização cutânea, liberação do cumestrol e atividade cicatricial *in vivo*.

## Introdução

O cumestrol (COU) é uma substância bioativa isolada principalmente da família *Fabaceae*, na forma de aglicona. Estudos relatam sua potente atividade estrogênica e antioxidante (LEE et al., 2007; SCOTTI et al., 2007; CHANDSAWANGBHUWANA e BAKER, 2014). Este constituinte tem demonstrado ser capaz de ligar-se aos receptores de estrogênio ER $\alpha$  e ER $\beta$ , mesmo quando em reduzidas concentrações (OSENI et al., 2008; LÓRÁND et al., 2010), e por este motivo o cumestrol é considerado um fitoestrógeno (AL-MAHARIK e BOTTING, 2004).

No que tange aos efeitos benéficos do estrogênio sobre a cicatrização de feridas na pele, há indícios de que estes sejam mediados, principalmente, pela ativação do receptor por ER $\beta$ , uma vez que este sinaliza a produção de colágeno via TGF- $\beta$  (CAMPBELL et al., 2010). Por outro lado, a ativação do receptor ER $\alpha$  está envolvida na ativação da proliferação celular, portanto, também pode contribuir na promoção do processo de cicatrização (VERDIER-SÉVRAIN, 2007). Neste sentido, as atividades estrogênica e antioxidante atribuídas ao cumestrol são características que revelam seu potencial para a promoção da cicatrização. Em se tratando de molécula de reduzida hidrossolubilidade (WILLIAMS, 2006), a associação do cumestrol com HP $\beta$ CD revelou-se oportuna, (FRANCO et al., 2009; BIANCHI, 2014) visto que em estudos de solubilidade pelo método de HIGUCHI e CONNORS realizados anteriormente a proporção molar 1:1 (COU:HP $\beta$ CD) apresentou um incremento de solubilidade de 12 vezes (BIANCHI, 2014). Uma avaliação da atividade

cicatrizante da associação cumestrol:HP $\beta$ CD, em cultura de fibroblastos, utilizando o modelo experimental *scratch*, demonstrou aumentar a proliferação e a migração celular na cultura de fibroblastos, quando comparado com o controle positivo (PDGF)(BIANCHI, 2014).

O presente trabalho foi desenhado para comparar dois métodos de obtenção da associação cumestrol:HP $\beta$ CD, incorporar as associações obtidas em duas bases hidrofílicas utilizando, respectivamente, hipromelose (HPMC) e quitosana e avaliar os perfis de liberação do cumestrol a partir das mesmas, em células de difusão do tipo Franz. Ainda será avaliado o potencial de promoção da cicatrização *in vivo* do hidrogel que apresenta o melhor perfil de liberação do cumestrol.

## **Metodologia**

### **Obtenção da matéria prima**

Cumestrol (95 % de pureza) foi obtido da Sigma-Aldrich (Brasil). Acetonitrila (grau HPLC, Tedia, USA), ácido trifluoroacético (Vetec, Brazil) e água purificada (sistema Milli-QTM, Millipore, USA) foram utilizadas para compor a fase móvel nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência. Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) e quitosana (grau de desacetilação-80%) foram adquiridas, da Roquette Frères (França) e da Sigma-Aldrich (Brasil), respectivamente. Hidroxipropilmetilcelulose (hipromelose, HPMC, Methocel<sup>®</sup> K4M) foi gentilmente fornecida pela Colorcon (Brasil).

### **Associação do cumestrol com a HP $\beta$ CD**

#### *Método utilizando micro-ondas seguido de liofilização*

Foram dissolvidas quantidades de cumestrol e de HP $\beta$ CD (relação molar de 1:1) em etanol 66 % (v/v) a 60°C. A solução foi submetida ao aquecimento em forno micro-ondas, numa potência de 245 watts, a 60 °C, durante 30 segundos. O solvente foi evaporado sob vácuo, em rotaevaporador. O sólido

obtido foi refrigerado à -18 °C por 24 horas e seco utilizando o liofilizador Edwards EF4 MODULYO, resultando numa dispersão sólida denominada associação cumestrol:HP $\beta$ CD.

#### *Método de associação em meio organo-aquoso, seguido de spray drying*

Uma fração de cumestrol foi adicionada à HP $\beta$ CD (relação molar de 1:1) e posteriormente dissolvida em etanol 77% (v/v) a 60 °C. A solução resultante foi arrefecida até a temperatura ambiente e o solvente eliminado em mini *Spray Dryer* B-290 acoplado a *inert loop* B-295 (Büchi, Suíça). A secagem foi realizada nas seguintes condições: temperatura de entrada de 130 °C, temperatura de saída de 60 °C e o fluxo de alimentação 3 mL/min.

#### *Preparação da mistura física de cumestrol:HP $\beta$ CD*

Para fins de comparação, uma simples mistura de cumestrol e HP $\beta$ CD, designada mistura física, foi preparada (relação molar de 1:1), em gral de vidro, durante 30 minutos.

### **Caracterização das associações cumestrol:HP $\beta$ CD**

#### *Doseamento do cumestrol por CLAE*

As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com método previamente validado (BIANCHI et al., 2016), utilizando sistema Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão) equipado com detector UV/Visível com comprimento de onda variável SPD-20 AV, bomba LC-20AT e amostrador automático SIL-20A. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 PhenomenexGemini® (150 x 4,6 mm, id; de tamanho de partícula, de 5  $\mu$ m) que foi acoplada a uma pré-coluna Waters (20 x 3.9 mm ID; tamanho de partícula, 10  $\mu$ m) (Milford, MA, EUA). A fase móvel utilizada foi constituída de uma mistura de ácido trifluoroacético 0,1% em água e acetonitrila (40:60 v/v), eluída em fluxo

isocrático. Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de PVDF da Millipore (com diâmetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ). O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min, enquanto que o comprimento de onda de detecção e volume de injeção foram, respectivamente, 343 nm e 20  $\mu\text{L}$ .

#### *Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)*

O cumestrol e as associações cumestrol:HP $\beta$ CD e correspondente mistura física foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), na faixa 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , através de 20 scans de 4  $\text{cm}^{-1}$  cada, utilizando um espectro de BX FTIR.

#### *Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)*

A análise térmica foi realizada utilizando calorímetro diferencial exploratório (Shimadzu DSC-60). Amostras de 1 a 2 mg, exatamente pesadas, foram colocadas em painéis de alumínio e seladas. As amostras foram submetidas às seguintes condições: atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min taxa de aquecimento de 10°C/min (25 a 500 °C). Foram analisadas amostras de cumestrol, HP $\beta$ CD, associações e mistura física cumestrol:HP $\beta$ CD, na proporção molar 1:1. Os dados foram analisados por *software* TA-60 WS<sup>®</sup> sendo utilizada como referência uma panela de alumínio vazia selada.

#### *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As amostras foram depositadas sobre suporte (*stubs*) de alumínio, fixadas com fita adesiva dupla-face e recoberta por fina camada de ouro. As fotomicrografias foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV-JSM 6060), com voltagem de 10 kV. Foram analisadas amostras de cumestrol, HP $\beta$ CD, associações e mistura física cumestrol:HP $\beta$ CD na proporção molar 1:1.

## Preparação dos Hidrogeis

### *Hidrogel de Hipromelose (HPMC)*

Foram preparadas quatro formulações para este hidrogel. Primeiramente, dispersou-se 3,5% de HPMC em água. Posteriormente, amostras de cumestrol livre (Formulação 1- HPMC+COU), mistura física cumestrol:HP $\beta$ CD (Formulação 2- HPMC+COU:CD-MF), associação cumestrol:HP $\beta$ CD obtida pelo método de micro-ondas seguido de liofilização (Formulação 3- HPMC+COU:CD-MO-LI) e a obtida em meio organo-aquoso e secagem por *spray drying* (formulação 4- HPMC+COU:CD-SD) foram separadamente dispersas em propilenoglicol (1%), e incorporadas nos diferentes hidrogeis de HPMC. A concentração de cumestrol em todas as formulações foi de 0,1 % (m/m).

### *Hidrogel de quitosana*

Foram preparadas quatro formulações para este hidrogel. Primeiramente, dispersou-se 2,25 % de quitosana (PM= 171,26 g) em água e adicionou-se 0,76 % ácido acético. Posteriormente, amostras de cumestrol livre (Formulação 5- quitosana+COU), mistura física cumestrol:HP $\beta$ CD antes da (Formulação 6- quitosana+COU:CD-MF), associação cumestrol:HP $\beta$ CD obtida pelo método de micro-ondas seguido de liofilização (Formulação 7- quitosana+COU:CD-MO-LI) e a associação cumestrol: HP $\beta$ CD obtida em meio organo-aquoso e secagem por *spray drying* (formulação 8- quitosana+COU:CD-SD) foram separadamente dispersas em propilenoglicol (1%), e incorporadas nos diferentes hidrogeis de quitosana. A concentração de cumestrol em todas as formulações foi de 0,1 % (m/m).

Todas as formulações foram deixadas em repouso durante 24 horas antes do estudo de liberação. O perfil reológico dos hidrogeis de HPMC (3,5 %) e quitosana (2,25 %) foi analisado em viscosímetro rotativo (DV-II + Viscosímetro Brookfield, EUA). Também foram analisadas as características organolépticas e a espalhabilidade pelo método de placas.

### Ensaio de Liberação *in vitro*

As avaliações da liberação do cumestrol a partir das formulações 1, 2, 3 e 4, preparadas para hidrogel de HPMC e formulações 5, 6, 7 e 8 para hidrogel de quitosana, foram realizadas em células de difusão do tipo Franz, por 12 horas em temperatura de 37 °C, utilizando membrana de éster de celulose (Millipore) com abertura nominal de poro de 50 µm, e solução tampão:etanol (50:50 v/v) como fluido acceptor. A coleta de amostras do fluido acceptor foi realizada a cada hora, sendo o volume correspondente de meio acceptor adicionado a cada coleta, de forma a manter o seu volume constante, com o intuito de manter a condição sink. A concentração de cumestrol foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas amostras coletadas utilizando-se o método descrito por (BIANCHI, 2014).

#### *Modelo matemático*

Os resultados da liberação foram analisados utilizando a modelagem matemática com o *software micromath scientist*<sup>®</sup>. Para a escolha do modelo matemático que melhor se enquadram aos pontos experimentais foram analisados os melhores ajustes gráficos e os coeficientes de variação obtidos.

A descrição matemática das curvas foram realizadas pelo ajuste dos dados experimentais aos modelos monoexponencial (Eqn 1) e biexponencial (Eqn2).

$$\text{Conc} = 100e^{(-kt)} \quad \text{(Eqn 1)}$$

$$\text{Conc} = 100(1 - A^{(-\alpha)} + B^{(-\beta)}) \quad \text{(Eqn 2)}$$

## **Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo***

### *Animais*

Ratos Wistar, machos, com 10 semanas de idade, pesando  $300 \pm 50$ g, adquiridos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram utilizados neste estudo. Os animais foram colocados em gaiolas individuais, junto ao Biotério da FURG, permanecendo em macro ambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade  $55 \pm 10\%$ ) com fornecimento *ad libitum* de água e ração. As gaiolas foram mantidas em estantes, a pelo menos 50 cm do chão e 50 cm do teto, com espaço suficiente entre as prateleiras para aeração adequada das gaiolas. A cada 48 h ou 72 h, conforme a condição sanitária da gaiola foi trocada a maravalha. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) sob número 23116.003350/2015-11 de acordo com as normas nacionais e internacionais.

### *Protocolo Experimental*

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo eles: o que recebeu tratamento com Dersani<sup>®</sup> (controle positivo), tratamento com hidrogel de HPMC (controle negativo), associação cumestrol:HP $\beta$ CD por método de *spray drying* incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU:CD-SD) e cumestrol livre incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU). Os animais receberam tratamento, diariamente, por 12 dias, de acordo com o definido por SÜNTAR e colaboradores (2011). Com intuito de analisar cada uma das fases de cicatrização das feridas (fase inflamatória: após 2 dias; fase proliferativa: do 2º ao 7º dia e fase de maturação: do 8º ao 12º dia), foram utilizados 18 animais por grupo, sendo n=6 para cada uma das fases da cura da ferida (2 dias, 7 dias e 12 dias).

**Tabela 1.** Constituição dos grupos, dose e modo de administração dos grupos para realização do ensaio de cicatrização *in vivo*.

Grupos	Dose	Modo de administração
1. DERSANI® (ácidos graxos essenciais)	15 µL	Tópica
2. HPMC	15 µL	Tópica
3. HPMC+COU:CD-SD	15 µL	Tópica
4 HPMC +COU	15 µL	Tópica

O experimento foi dividido em dois momentos, devido ao grande número de animais envolvido nos ensaios e à necessidade da utilização de uma gaiola por animal.

#### *Ensaio de atividade cicatrizante in vivo*

Os animais ficaram aclimatando por quinze dias no Biotério de Animais Convencionais do Instituto de Ciências Biológicas da FURG após sua chegada e antes dos experimentos foram identificados e pesados.

Para realização do ensaio, primeiramente realizou-se o procedimento de analgesia dos animais com carprofeno 5 % (5mg.Kg<sup>-1</sup>), por via subcutânea e posteriormente os ratos foram anestesiados com quetamina 10 % (90 mg.Kg<sup>-1</sup>) e xilazina 2 % (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) pela via intraperitoneal. Em seguida cada animal foi tricotomizado na região dorsal e realizada a assepsia utilizando iodopovidona 1 %.

A ferida cutânea foi produzida com auxílio de um *punch* metálico descartável de 8,0 mm de diâmetro (Kruuse) delimitando uma área na região dorsal do tórax. O segmento circular de pele foi removido com o auxílio de pinça de dissecação e tesoura de pontas tipo fina/fina, até sua dissecação, expondo as fáscias musculares. O tratamento dos animais foi realizado aplicando 15 µL dos hidrogeis (contendo 10µg de cumeestrol) em cada lesão com o auxílio de pipeta para semi-sólidos (Brand®) ou 15 µL de Dersani® com pipeta automática (Brand®).

Diariamente, durante 12 dias, os animais foram pesados, a temperatura foi medida (Minipa-MT320), as lesões foram avaliadas clinicamente e o raio

maior e menor da lesão foi medido com o auxílio de um paquímetro digital (King tools).

A área da lesão foi calculada pela equação 3 formulada por Prata e colaboradores (1998):

$$A = \pi \cdot R \cdot r \quad (\text{Eqn 3})$$

Onde:

“A” é a área (cm<sup>2</sup>);

“R”, o raio maior;

“r”, o raio menor.

Já a contração da ferida foi calculada de acordo com a equação 4:

$$\text{Contração da ferida (\%)} = \frac{\text{Área inicial da lesão} - \text{Área final da lesão}}{\text{Área inicial da lesão}} \times 100 \quad (\text{Eqn 4})$$

No 2º, 7º e 12º dias do pós-operatório os animais foram escolhidos aleatoriamente, de cada um dos grupos, anestesiados e mortos por injeção via intraperitoneal de uma dose letal de tiopental (100 mg.Kg<sup>-1</sup>). Em seguida, foram realizadas biópsias das feridas retirando-se fragmentos de pele através de incisão, abrangendo pele íntegra e área da ferida. Este fragmento foi dividido em duas partes, uma para análise histológica e outra para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

### *Avaliação histológica*

Os fragmentos de pele foram fixados em formaldeído 10 % por 12 horas e posteriormente desidratados em álcoois com concentrações crescentes (70 a 100 %), diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma). Foram confeccionadas lâminas histológicas em cortes seriados com 5 µm de espessura. Para a análise histológica foi realizada a coloração com tricômico de Mallory (onde o colágeno da pele pode ser visualizado em azul). A análise quantitativa dos vasos foi realizada por meio da contagem manual. Em cada lâmina foi analisado um campo central, utilizado objetiva de 20x (aumento total 200x de 100 µm) e nesse campo foram contados os vasos. Já as medidas da espessura do epitélio foram realizadas com auxílio do *software* do microscópio ótico (Olympus Bx51). Foi capturada e captada toda a extensão da epiderme das lâminas histológicas. Para a análise do epitélio foi utilizada a objetiva de 20x (aumento total 200x de 100 µm). A medida da espessura da camada foi expressa em µm e estimada realizando-se quatro medidas, sendo duas centrais e duas nas extremidades.

### *Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) em feridas cutâneas*

A determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada no 2º e 7º dias. Após a eutanásia, foi realizado um retalho cutâneo no local da ferida. As amostras foram pesadas e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C).

Os tecidos ainda congelados foram cortados e pulverizados com a adição de N<sub>2</sub> líquido, com o auxílio de um biopulverizador. Foi acrescentado tampão NaCl/EDTA na proporção de 1:20, e a amostra foi homogeneizada.

Para extração da enzima, o conteúdo obtido foi transferido para tubo falcon contendo 2 mL de tampão NaCl/EDTA. As amostras foram submetidas a três ciclos de choque térmico (banho-maria 37°C - nitrogênio líquido), submetidas ao banho de ultrassom por 15 segundos e centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C durante 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas para a realização do ensaio enzimático.

O ensaio enzimático foi realizado em microplaca, ao abrigo da luz. Para isso, foi preparada uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) em DMSO na concentração 1,6 mM. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% foi diluída em 90  $\mu\text{L}$  de solução tampão  $\text{NaPO}_4$  (0,08M). Uma alíquota de 6,94  $\mu\text{L}$  desta solução foi diluída em 12,5 mL de solução tampão  $\text{NaPO}_4$  (0,08M) resultando numa solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 mM. Em placa de 96 poços, adicionou-se, em triplicata 25  $\mu\text{L}$  do tampão  $\text{NaPO}_4$  0,08M (branco) e, na sequência, 25  $\mu\text{L}$  das amostras também em triplicata. Foi adicionado em todos os poços, 25  $\mu\text{L}$  da solução de TMB (1,6 mM) e a placa foi incubada em estufa (37°C), durante 5 minutos. Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 mM e a placa foi incubada novamente a 37 °C, durante 5 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro com leitor de placas, no comprimento de onda de em 650 nm, nos tempos 0, 1, 5 e 10 minutos subsequentes à incubação da amostra.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise por ANOVA, seguidos do *post-hoc* de Bonferroni. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ .

### **Aspectos éticos**

A etapa de avaliação *in vivo* do efeito cicatrizante do cumestrol e suas associações com HP $\beta$ CD foi realizada na Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG), numa colaboração com a Profa. Dra. Cristiana Lima Dora, no âmbito do projeto PROCAD /Casadinho processo nº 552457/2011-6, com vínculo ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/FURG. O projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA/FURG, processo nº 23116.003350/2015-11.

## **Descarte de resíduos**

### *Químicos*

Foram seguidas as normas preconizadas pela Comissão de Segurança do Trabalho da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS (COAST) para o descarte e separação de resíduos produzidos nos experimentos realizados.

### *Biológicos*

Após a eutanásia, as carcaças dos ratos foram armazenadas em freezer no Biotério Setorial do ICB da FURG. O recolhimento pela empresa Rio Grande Ambiental e o material biológico foram mantidos em containers refrigerados. Posteriormente, a empresa Aborgama (Sapucaia do Sul) realizou o recolhimento do material para autoclavagem e posterior depósito em aterro sanitário localizado em Sapucaia do Sul.

## **Resultados e Discussão**

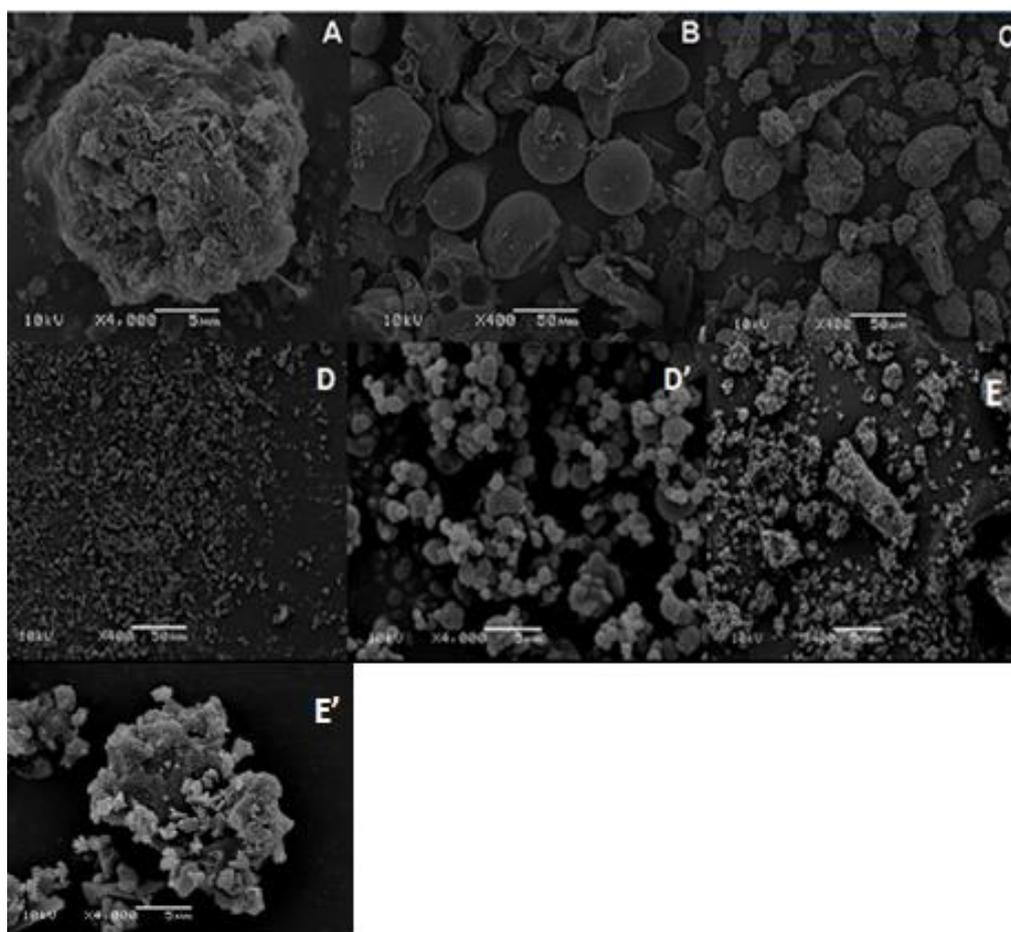
Após a realização das associações cumestrol:HP $\beta$ CD pelo método de micro-ondas seguido de liofilização (COU:CD-MO-LI), método organo-aquoso seguido de *spray drying* (COU:CD-SD) e mistura física (COU:CD-MF) para simples comparação; as caracterizações das associações foram realizadas através de rendimento, análise macroscópica e microscópica por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Após a caracterização as associações foram incorporadas em hidrogeis de (HPMC e quitosana) e foram realizados ensaios de liberações *in vitro*, em célula de difusão do tipo Franz.

Foram realizados diferentes métodos de associações com ciclodextrinas. Dentre os utilizados com o cumestrol está o empregado por BIANCHI e colaboradores (2014), onde se utilizou o método em solução seguido de

liofilização. Esta associação apresentou maior permeabilidade à pele, atingindo a derme, demonstrou poder ter potencial como um agente de cicatrização de feridas, uma vez que em estudos realizados em cultura de fibroblastos onde apresentou ótimos resultados com relação a proliferação e migração celular. A fim de aperfeiçoar as técnicas de associações cumestrol:HP $\beta$ CD o presente trabalho propôs utilizar o método de micro-ondas como aprimoramento após a etapa inicial da solução e o processo posterior manteve-se o mesmo. Para comparar a este método foi proposta a técnica de *spray drying* para a complexação, já utilizada anteriormente em associações utilizando ciclodextrina (YATSU et al., 2013).

Observou-se que o rendimento da associação COU:CD-MO-LI foi de 86,07 % e caracterizado como um pó levemente amarelado, com aspecto de “nuvem”. Enquanto que COU:CD-SD teve um rendimento de 45,71 %, sendo caracterizado como um pó branco, fino e característico de pó seco por aspensão.

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do cumestrol, HP $\beta$ CD, e das associações COU:CD-MF, COU:CD-MO-LI e COU:CD-SD (razão molar 1:1) estão apresentadas na Figura 1. O cumestrol apresentou-se na forma de partículas esferoidais de diâmetro aproximado de 20  $\mu$ m, superfície rugosa e presença de fissuras, enquanto que as partículas de HP $\beta$ CD apresentaram diâmetro na ordem de 50  $\mu$ m superfície lisa e arredondada, com depressões e pequenas irregularidades. Na mistura física (COU:CD-MF) não é possível distinguir as partículas do cumestrol das partículas de HP $\beta$ CD, a associação apresentou diâmetro em torno de 50  $\mu$ m. A associação COU:CD-SD, revelaram partículas esferoidais e uniformes de diâmetro na ordem de 2  $\mu$ m, enquanto que, na associação COU:CD-MO-LI as partículas apresentam-se como aglomerados amorfos, de forma e dimensão variadas.



**Figura 1.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (A) COU, (B) HP $\beta$ CD, (C) COU:CD-MF, (D) COU:CD-SD, (D') COU:CD-SD, (E) COU: CD-MO-LI e (E') COU: CD-MO-LI.

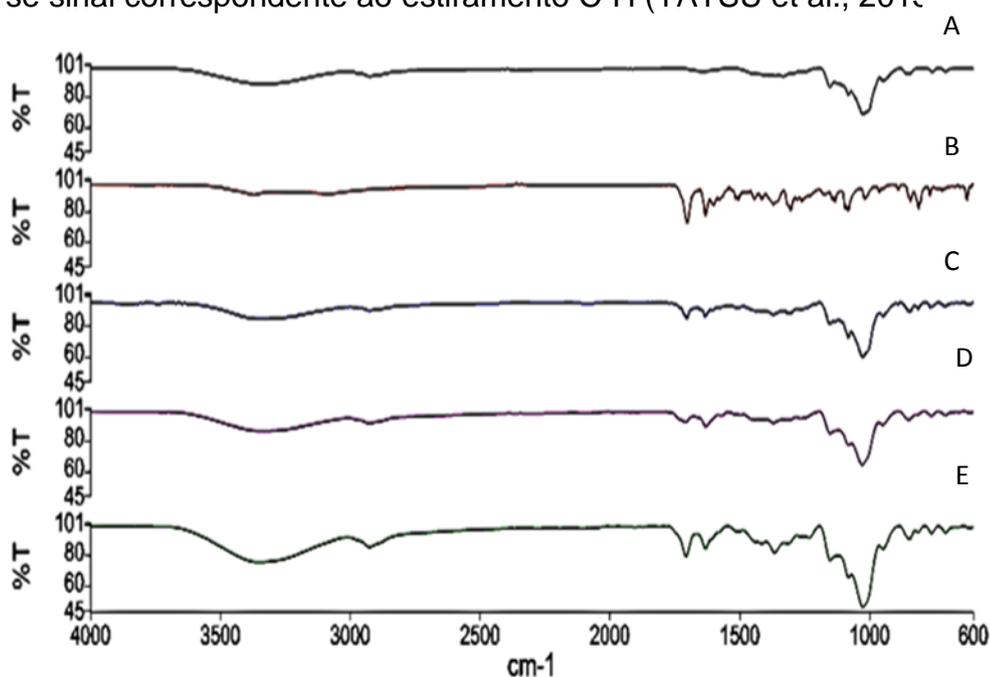
Resultados similares foram relatados em estudo realizado com miconazol associado metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) na proporção 1:1, que utilizaram comparativamente os métodos de liofilização e *spray drying* para a secagem dos complexos de inclusão obtidos. Os autores observaram na análise por MEV dos pós, a presença de estruturas esféricas e agregados amorfos, mostrando-se homogêneo, para o produto seco por *spray drying*. Contrariamente, o método de liofilização mostrou a formação de partículas e agregados de forma e tamanho variável (RIBEIRO et al., 2008).

A análise por espectroscopia no infravermelho (FTIR) tem sido utilizada para auxiliar a detecção de interações entre grupos funcionais de moléculas hóspedes e ciclodextrinas (SPRICIGO et al., 2008). A comparação entre os espectros da molécula na forma livre e associada à ciclodextrina permite verificar

ocorrência de alterações na posição e na forma das bandas de absorbância das mesmas, no presente trabalho, entre o cumestrol e a HP $\beta$ CD, na mistura física e nas associações (cumestrol:HP $\beta$ CD). A análise foi aplicada às associações obtidas, tanto pelo método de micro-ondas seguido de liofilização, quanto pelo método de mistura em meio organo-aquoso, seguido de *spray drying*. A figura 2 apresenta espectros de FTIR correspondentes.

O espectro correspondente aos diferentes grupamentos funcionais da molécula de cumestrol tem bandas de absorção na faixa de 1800 a 1100  $\text{cm}^{-1}$  (CANNAVÀ et al., 2008). A banda de absorção na região entre 3450-3000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial da ligação OH e à ligação de hidrogênio intramolecular. A banda 1701.1  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao alongamento C=O, enquanto que a banda 1370.9  $\text{cm}^{-1}$  à vibração de flexão de OH. Já a absorção correspondente ao alongamento da ligação C=C do grupo fenila pode ser observada nas bandas 1632.1 e 1628.1  $\text{cm}^{-1}$ . Os estiramentos das ligações C-C absorvem no comprimento de onda de 1442.2  $\text{cm}^{-1}$ , das ligações C-O-C em 1301.0  $\text{cm}^{-1}$  e C-O em 1273.2 e 1258.8  $\text{cm}^{-1}$ .

Com relação ao espectro FTIR da HP $\beta$ CD, identifica-se uma banda correspondente ao estiramento vibracional do grupamento OH primário e secundário, situada entre 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$ . Já no intervalo de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se sinal correspondente ao estiramento C-H (YATSU et al., 2012<sup>1</sup>)



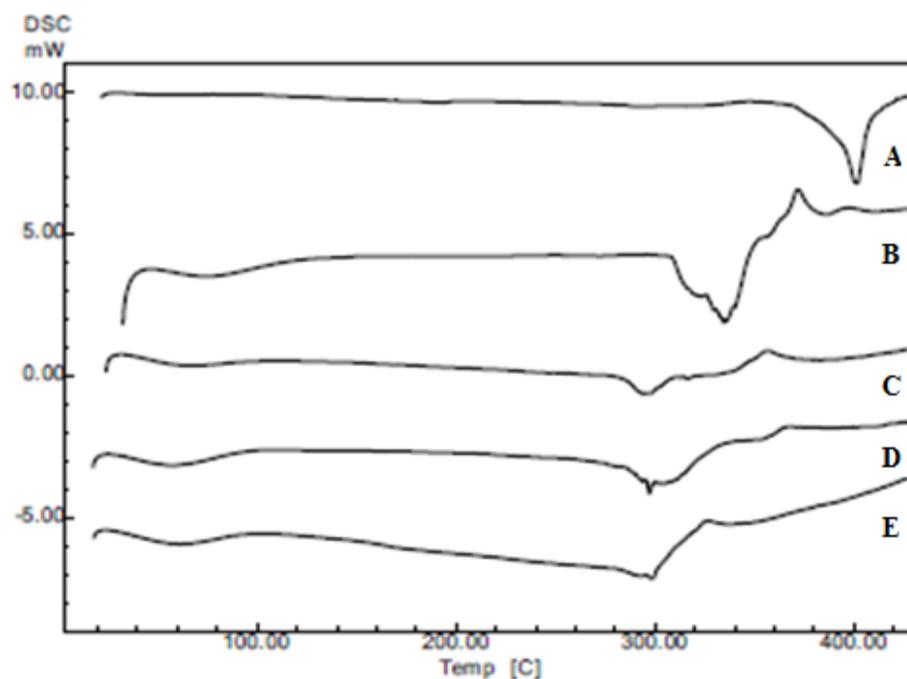
**Figura 2.** Espectro FTIR (A) HP $\beta$ CD, (B) COU, (C) COU:CD-MF,

(D)COU:CD-SD e (E) COU:CD-MO-LI.

Comparando-se os espectros de infravermelho do cumestrol, HP $\beta$ CD, das associações (COU:CD-MF; COU:CD-MO-LI e COU:CD-SD) pode-se observar que as bandas encontradas em 3400-2900  $\text{cm}^{-1}$  eram semelhantes às bandas da HP $\beta$ CD, no entanto apresentaram maior intensidade. Já a banda de 1750  $\text{cm}^{-1}$  indicou a presença de cumestrol nos espectros das associações, sendo todos com menor intensidade. A partir da banda de 1200  $\text{cm}^{-1}$  em todos os espectros, as bandas se tornaram semelhante as da HP $\beta$ CD, sendo todas com maior intensidade. Sumarizando, a análise demonstra que o cumestrol e a HP $\beta$ CD estiveram presentes em todos os espectros de associações (cumestrol:HP $\beta$ CD), no entanto não há como inferir sobre a ocorrência de interação entre os mesmos.

A existência de interações na formação de complexos ou associações pode ser identificada nos perfis de DSC, pelas variações de entalpia e pelo desaparecimento de picos endotérmicos e exotérmicos, comparando-se as moléculas livres com as associadas (FIGUEIRAS et al., 2007). Esta técnica vem sendo amplamente utilizada na caracterização das interações da ciclodextrina com o ativo estudado pela rapidez de análise e por necessitar de quantidade reduzida de amostra. Representa uma contribuição para a caracterização dos complexos e, normalmente, vem sendo complementada pela análise de ressonância nuclear de prótons (RIBEIRO et al., 2008). A Figura 3 mostra os termogramas obtidos para o cumestrol, HP $\beta$ CD e associações (COU:CD-MF; COU:CD-MO-LI e COU:CD-SD) na razão molar 1:1.

Todas as amostras apresentaram evento endotérmico relativo à perda de água residual, até cerca de 100 °C. O cumestrol utilizado, caracterizado como pó amorfo, apresenta um evento endotérmico em 385 °C relativo à sua fusão e HP $\beta$ CD apresenta um pico endotérmico largo, em torno de 318.22 °C. Nas associações (COU:CD-MF; COU:CD-MO-LI e COU:CD-SD), o pico endotérmico em 385 °C correspondente ao ponto de fusão do cumestrol desapareceu, indicando possível associação. Também se observa, tanto na mistura física quanto na associação (cumestrol:HP $\beta$ CD) o deslocamento da banda endotérmica da HP $\beta$ CD sugerindo uma possível interação entre as moléculas.



**Figura 3.** Curvas de calorimetria diferencial exploratória de (A) COU, (B) HPβCD, (C) COU:CD-MF, (D) COU:CD-SD e (E) COU:CD-MO-LI.

O incremento de solubilidade aportado pela associação de moléculas de baixa hidrossolubilidade com ciclodextrina depende da característica da associação formada. A afinidade da molécula hóspede pela ciclodextrina, a capacidade de formação de complexos de inclusão (p.ex. conformação e tamanho do grupo hidrofóbico), tipo de ciclodextrina empregada e potencial de formação de agregados são alguns aspectos determinantes do incremento de solubilidade obtido. A escolha da ciclodextrina a ser utilizada deve considerar, além de sua capacidade de incremento da solubilidade (ou melhora de estabilidade) da molécula ativa, mas também de sua compatibilidade com a via de administração e o custo.

O primeiro trabalho que relata a complexação do cumestrol com ciclodextrina foi publicado por FRANCO e colaboradores (2009), empregando βCD e o método de complexação em solução. A complexação resultou num aumento de solubilidade do cumestrol de 4 vezes, que foi limitado pela baixa solubilidade da própria ciclodextrina. Recentemente, por BIANCHI e colaboradores (2015) empregou a HPβCD para a complexação, evidenciando

que a presença dos substituintes hidroxipropila representou impedimento para a inclusão do cumestrol na cavidade. No entanto, a formação de complexo de não inclusão (1:1) também resultou em aumento de solubilidade do cumestrol (12 vezes), bem como na melhora de seu efeito biológico, promovendo significativamente a proliferação e migração celular em cultura de fibroblastos.

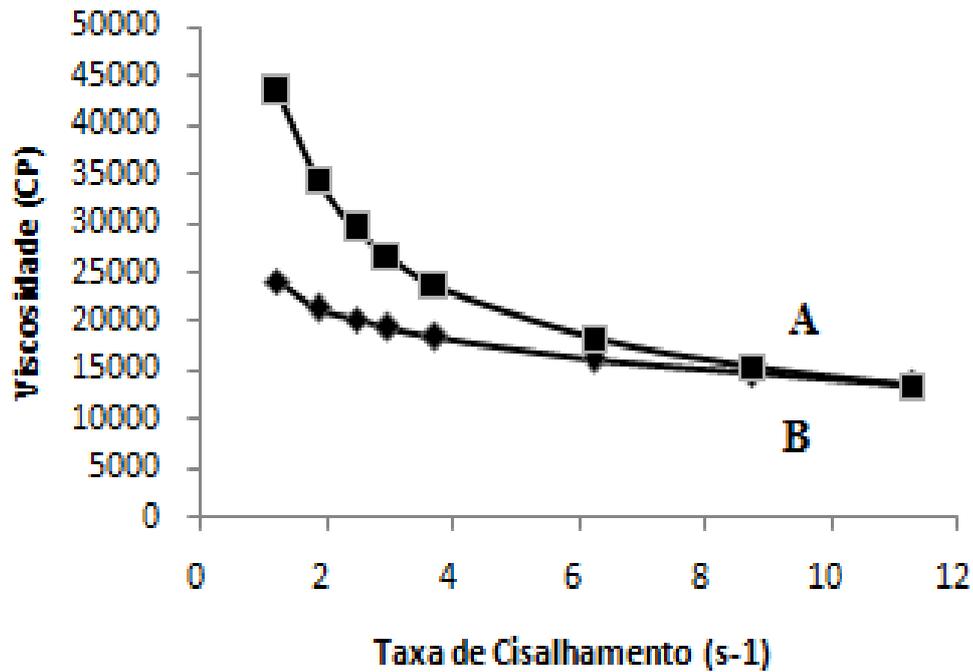
### *Caracterização dos hidrogéis*

A caracterização dos hidrogéis utilizados como base para a incorporação do cumestrol e suas associações foi realizada por meio das características organolépticas, avaliação do perfil reológico e espalhabilidade.

Observou-se que o hidrogel de quitosana apresentou coloração levemente amarelada, odor característico e translúcido. Enquanto que o hidrogel de HPMC se mostrou incolor, inodoro e transparente.

As duas bases hidrofílicas foram preparadas de forma a apresentar perfis reológicos próximos, com vistas a eliminar este parâmetro como determinante da liberação do cumestrol no estudo comparativo. Desta forma os hidrogéis foram preparados contendo 3,5 % de HPMC e 2,25 % de quitosana.

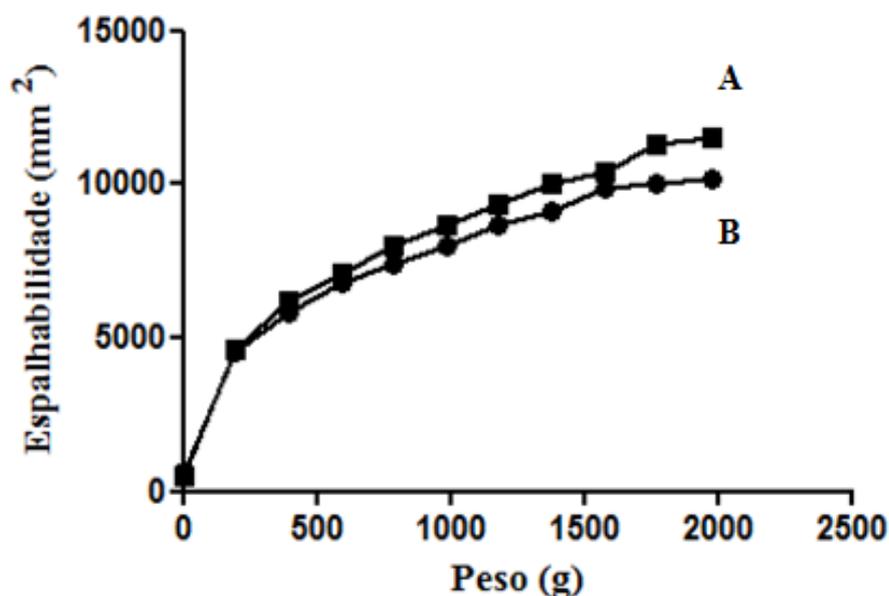
A Figura 4 apresenta os perfis reológicos dos hidrogéis de HPMC (3,5 %) e quitosana (2,25 %). Os hidrogéis demonstraram que à medida que a taxa de cisalhamento aumenta há um decréscimo da viscosidade, que caracterizam um comportamento pseudoplástico não newtonianos, para ambos, sendo também verificado por BRANGEL (2011). Este resultado vem ao encontro do preconizado por CHEN e colaboradores (2008), que se refere às dispersões coloidais de polímeros como o HPMC na concentração em torno de 2 % apresenta, em geral, comportamento pseudoplástico. Concentrações de polímeros superiores a 2 % apresentaram aumentada viscosidade e a transição para um comportamento não newtoniano (ROMANSKI et al., 2011).



**Figura 4.** Perfil reológico dos hidrogéis: (A) quitosana 2,25 % e (B) HPMC 3,5 %.

Os testes de espalhabilidade foram realizados utilizando o método de placas paralelas, amplamente empregado na avaliação de preparações semissólidas. Este parâmetro é afetado significativamente pela concentração do polímero e pela viscosidade da formulação.

Com relação à espalhabilidade dos hidrogéis preparados (Figura 5) observa-se que o hidrogel de HPMC 3,5 %, apresentou boa espalhabilidade. Enquanto que o hidrogel de quitosana 2,25 %, além de apresentar odor desagradável, apresentou espalhabilidade inferior ao hidrogel de HPMC.



**Figura 5.** Curva de espalhabilidade em função do peso adicionada (A) HPMC e (B) quitosana.

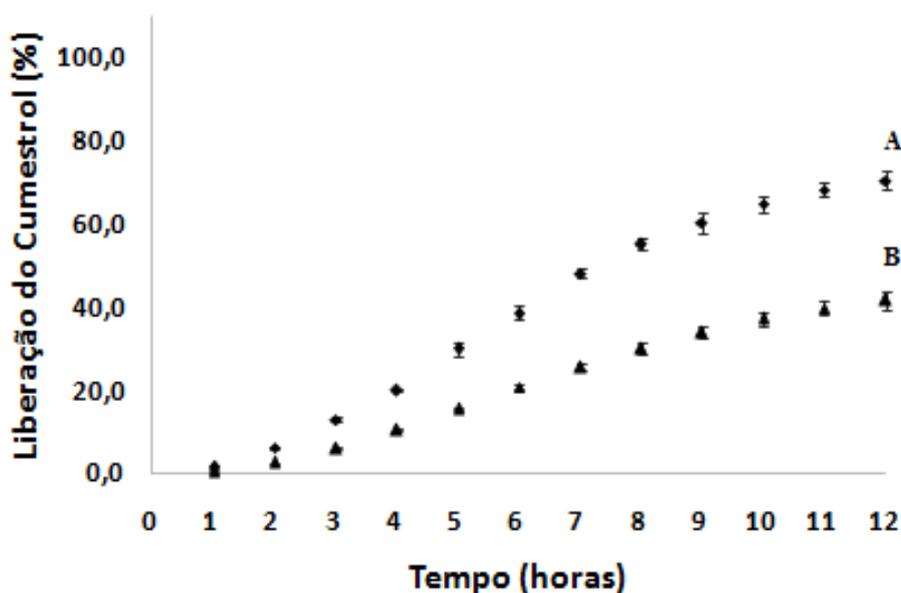
Os hidrogéis de HPMC e quitosana apresentaram resultados semelhantes com relação à viscosidade, no entanto, o hidrogel de HPMC demonstrou ter vantagens em relação à espalhabilidade.

#### *Liberação in vitro*

A liberação de fármacos é um processo no qual a substância ativa deixa a forma farmacêutica e fica disponível para absorção (SINKO, 2008). Células de difusão do tipo Franz, são dispositivos que vem sendo amplamente utilizados para avaliar a liberação *in vitro* (SIEWERT et al., 2003; THAKKER e CHERN, 2003) de produtos semissólidos, entre outros. No presente trabalho foram avaliados os perfis de liberação do cumestrol livre, e associações (COU:CD-MF; COU:CD-MO-LI e COU:CD-SD) todos previamente incorporados aos hidrogéis de HPMC ou quitosana.

Comparando-se os perfis de liberação do cumestrol livre a partir do hidrogel de HPMC e quitosana (figura 6) observa-se que, ao final de 12 horas, 72,47 % do cumestrol (formulação 1- HPMC+COU) foi liberado, enquanto que o

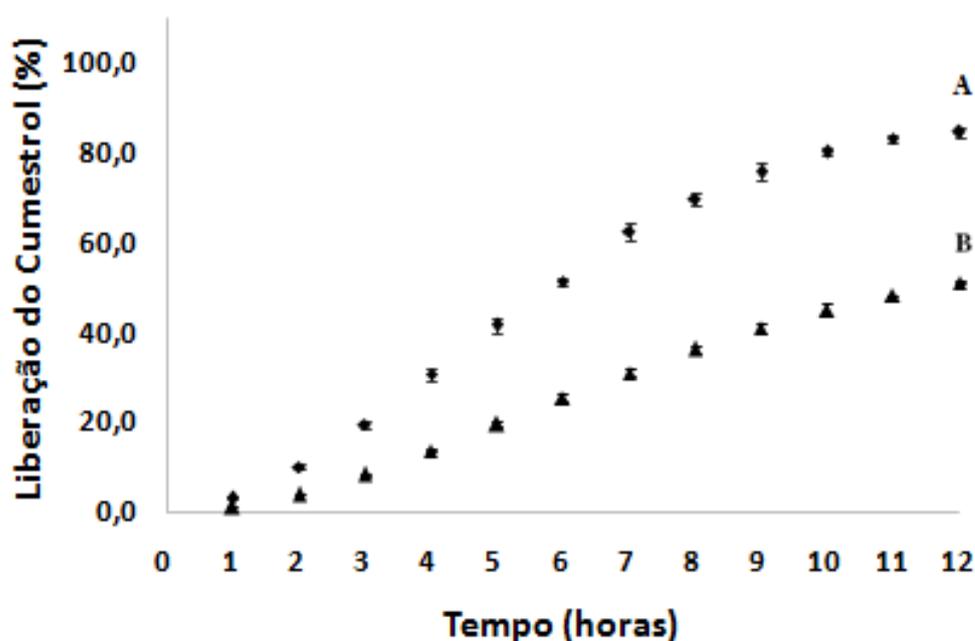
cumestrol (formulação 5- quitosana+COU) teve liberação de apenas 42,24 %. A baixa hidrossolubilidade do cumestrol, se por um lado deveria favorecer a sua liberação a partir de matrizes hidrofílicas, como é o caso de hidrogéis, por outro, não apresenta afinidade pelo meio acceptor, resultando numa liberação pouco efetiva. A hipótese que formulamos para explicar a retenção do cumestrol livre pela matriz mais pronunciada para o hidrogel de quitosana é a presença de interações entre os grupamentos polares do cumestrol, como as hidroxilas fenólicas com os grupamentos catiônicos da quitosana. Ambos hidrogéis apresentam mecanismo de liberação de substâncias ativas por difusão, mas para o hidrogel de quitosana também pode ocorrer o fenômeno de erosão do polímero (QUINTASA et al.; BHATTARAI et al., 2010). O esclarecimento deste fenômeno requer o aprofundamento dos estudos especialmente no que tange o mecanismo de liberação envolvido para esta molécula ativa, uma vez que a viscosidade das duas bases hidrofílicas é semelhante.



**Figura 6.** Liberação do cumestrol livre incorporado em hidrogel: (A) HPMC+COU e (B) quitosana+COU.

O perfil de liberação do cumestrol a partir dos hidrogéis contendo a mistura física (figura 7) revela tendência idêntica à liberação do cumestrol na

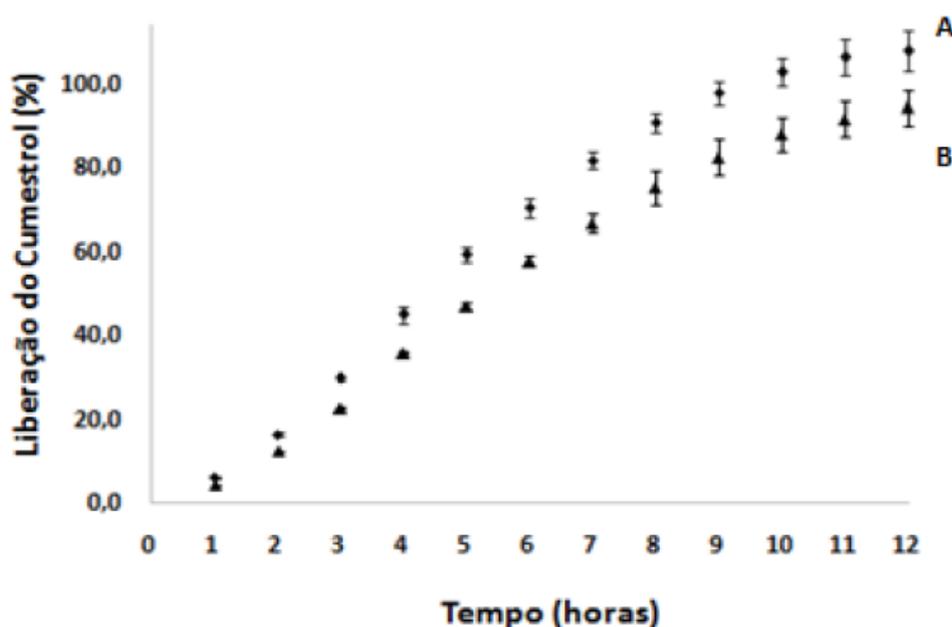
forma livre, no entanto percebe-se o efeito da ciclodextrina na promoção da liberação, mesmo incorporada na forma de mistura física. Na figura 7 observa-se que, no final de 12 horas, houve liberação 85,52% do cumestrol presente no hidrogel de HPMC (formulação 2- HPMC+COU:CD-MF) e de 51,43 % do cumestrol presente no hidrogel de quitosana (formulação 6- quitosana+COU:CD-MF). Mesmo que a ciclodextrina tenha sido incorporada como uma simples mistura, os hidrogéis constituem-se num meio hidrofílico que pode propiciar a maior interação entre a ciclodextrina e o cumestrol, promovendo sua solubilização e liberação da matriz. Mesmo assim, o efeito da matriz catiônica na retenção do cumestrol parece preponderar.



**Figura 7.** Liberação da mistura física (COU:CD) incorporado em com hidrogel: (A)HPMC+COU:CD-MF e (B) quitosana+COU:CD-MF.

Já a liberação para a associação (COU:CD-MO-LI) demonstrada na Figura 8, incorporada em hidrogel de HPMC e quitosana resultou, ao final de 12 horas, na liberação da totalidade do cumestrol da formulação 3- HPMC+COU:CD-MO-LI (104,05 %) e de 93,09 % do cumestrol da formulação 7 (quitosana+COU:CD-MO-LI). A mesma hipótese formulada para a liberação da mistura física a partir destas matrizes poderia ser aplicada a estas formulações,

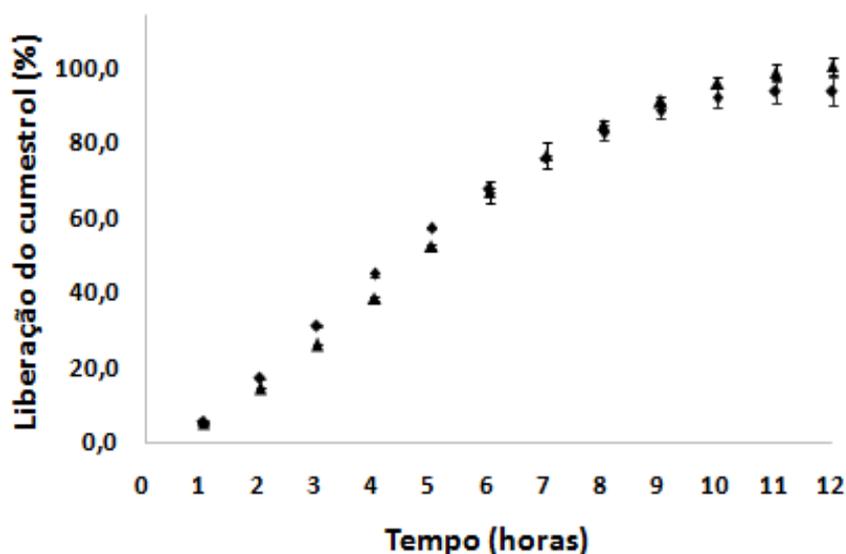
no entanto, com um efeito de solubilização maior propiciado por maior interação do cumestrol com a ciclodextrina. No entanto, mesmo que menor a diferença na liberação da associação a partir da matriz HPMC e quitosana dá indicações de efeito menor da matriz catiônica sobre a retenção do cumestrol, mas ainda presente.



**Figura 8.** Liberação da associação (COU:CD) pelo método de micro-ondas seguido de liofilização incorporado em hidrogel: (A) HPMC+COU:CD-MO-LI e (B) quitosana+COU:CD-MO-LI.

O estudo de liberação da associação COU:CD-SD, incorporada nos hidrogéis de HPMC e quitosana (figura 9), demonstra que, ao final de 12 horas o hidrogel de HPMC liberou 101,14 % do cumestrol incorporado e o hidrogel de quitosana 101,29 %. O modelo matemático monoexponencial foi que melhor explicou o comportamento de liberação do cumestrol de ambos os hidrogéis, apresentando coeficiente de correlação de respectivamente  $R^2 = 0.9938$  e  $R^2 = 0.9898$ , não sendo esta diferença significativa sob o prisma estatístico. Observando-se neste caso, além do efeito de solubilização da ciclodextrina, que o efeito de retenção do cumestrol pela quitosana foi anulado, alcançando liberação em patamar semelhante ao hidrogel não iônico de HPMC,

característica que pode estar relacionada com o método de obtenção por *spray drying*, que resultou em partículas esferoidais homogêneas, de forma diversa aos demais métodos empregados na obtenção da associação com ciclodextrina (mistura física, micro-ondas seguido de liofilização e *spray drying*).



**Figura 9.** Liberação da associação (COU:CD) pelo método de *spray drying* incorporado em hidrogel: (A) quitosana+COU:CD-SD e (B) HPMC+COU:CD-SD.

Em suma, os resultados obtidos no estudo de liberação apontam para a seleção da associação cumestrol:HP $\beta$ CD obtida em meio orgânico aquoso seguido por secagem por *spray drying* (COU:CD-SD) para ser incorporada em hidrogéis, uma vez que apresenta nítida e significativa promoção da liberação do cumestrol a partir de matrizes hidrofílicas tanto em matriz não iônica (hidrogel de HPMC) quanto em matriz catiônicas (hidrogel de quitosana). Assim, para a realização dos testes de atividade cicatrizante em modelo animal, selecionou-se como base para incorporação desta associação o hidrogel de HPMC, por tratar-se de matéria prima mais barata e com características menos variáveis do que a quitosana, a qual necessita de controle de massa molecular e grau de substituição a cada compra realizada. Além disso, o aspecto sensorial do hidrogel de quitosana revelou-se pouco atrativo denotando pouca probabilidade de adesão ao seu uso.

### *Ensaio de atividade cicatrizante in vivo*

Neste ensaio foi investigada a atividade cicatrizante de hidrogeis contendo cumestrol livre ou associado com ciclodextrina em feridas excisadas. Para esta análise foram feitos diferentes tratamentos, sendo eles: Dersani<sup>®</sup> (controle positivo), hidrogel de HPMC (controle negativo), associação COU:HP $\beta$ CD pelo método de *spray drying* incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU:CD-SD) e cumestrol incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU). O peso dos animais, a área das feridas excisadas e a temperatura das feridas, foram avaliadas ao longo dos 12 dias de experimento. A análise histológica foi realizada no 2<sup>o</sup> dia, durante a fase inflamatória, no 7<sup>o</sup> dia, durante a fase proliferativa e no 12<sup>o</sup> dia durante a fase de maturação. Já a atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada nos 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias, onde pode ser observado o processo inflamatório.

A Tabela 2 demonstra os valores dos pesos dos animais antes do início do experimento (T<sub>0</sub>) e no 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias de tratamento. Pode se observar que o peso dos ratos não foi influenciado pelos tratamentos uma vez que os animais aumentaram de peso durante o experimento. Este dado indica que nenhum tratamento causou dano aos ratos que pudesse fazer com que os mesmos deixassem de se alimentar. A alimentação dos ratos tem papel importante na cicatrização, visto que uma nutrição deficitária pode afetar os mecanismos de defesa, diminuindo assim a resistência à infecção (MARTINS et al., 2006).

**Tabela 2.** Evolução do peso dos ratos ao longo do tratamento

Tratamento/ Tempo (dias)	Peso dos ratos (média (g) $\pm$ erro padrão)			
	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>12</sub>
DERSANI <sup>®</sup>	323,9 $\pm$ 43,5	326,7 $\pm$ 29,3	339,5 $\pm$ 24,0	366,5 $\pm$ 18,8
HPMC	309,0 $\pm$ 47,2	319,7 $\pm$ 46,4	334,5 $\pm$ 44,4	345,6 $\pm$ 42,7
HPMC+COU:CD-SD	321,9 $\pm$ 24,5	320,0 $\pm$ 28,4	331,9 $\pm$ 29,3	341,5 $\pm$ 23,9
HPMC+COU	299,8 $\pm$ 41,0	315,6 $\pm$ 52,2	333,3 $\pm$ 49,8	342,3 $\pm$ 44,8

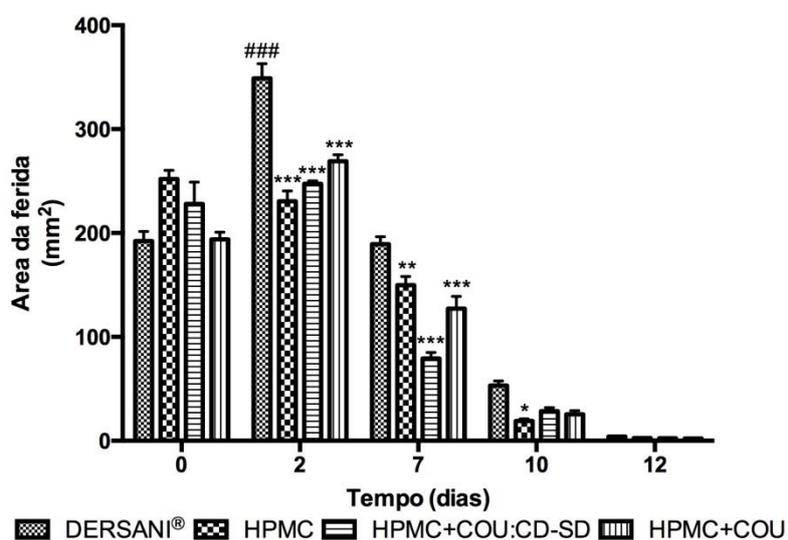
A temperatura das feridas foi avaliada para tentar identificar se algum tratamento teria efeito no processo inflamatório, uma vez que este se caracteriza por alguns sinais como: edema, dor, calor e rubor (CARNEIRO e JUNQUEIRA, 2008). Neste caso, pode-se observar na tabela 3 que todos os grupos tiveram a temperatura da ferida aumentada, quando comparado a temperatura inicial verificada ( $T_0$ ), mas que essa temperatura foi maior no 2<sup>o</sup> dia.

A reação inflamatória é um evento complexo, que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de novos tecidos (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imunológico, resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios, que são responsáveis pela vasodilatação, extravasamento do plasma e migração de leucócitos (CORSINI et al., 2005; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). Na primeira fase da cicatrização, a vasculatura ao redor do local da lesão reage para recrutar as células do sistema imunológico ocasionando a dilatação das arteríolas e vênulas e levando a um aumento do fluxo sanguíneo para o local da lesão, produzindo os sinais clínicos de vermelhidão e calor. Desta forma, este aumento da temperatura observado, especialmente no 2<sup>o</sup> dia, parece estar relacionado com o processo inflamatório da ferida no estágio inicial da cicatrização. É importante salientar que entre os grupos não houve diferença estatística para este parâmetro (Tabela 3).

**Tabela 3.** Evolução da temperatura das lesões ao longo do tratamento

Tratamento/ Tempo (dias)	Temperatura das lesões (média(C°) ± erro padrão)			
	$T_0$	$T_2$	$T_7$	$T_{12}$
<b>DERSANI<sup>®</sup></b>	32,3± 2,3	35,8 ± 0,5	35,8± 0,4	34,5± 1,0
<b>HPMC</b>	32,7±0,3	35,7±1,3	36,4±0,6	34,9±1,8
<b>HPMC+COU:CD-SD</b>	33,0±0,6	36,2±2,0	35,4±1,4	35,3±1,0
<b>HPMC+COU</b>	32,7±0,4	35,4±1,8	35,4±1,3	35,4±1,3

A medida da área das feridas foi avaliada ao longo dos 12 dias de tratamento, podendo ser observada na figura 10. Nos primeiros dois dias de tratamento o tamanho da ferida se manteve igual ao tempo zero ou apresentou uma leve diminuição nos grupos tratados com hidrogel contendo ou não COU livre ou associada à ciclodextrina. No entanto, o grupo tratado com Dersani<sup>®</sup> (controle positivo) apresentou um aumento significativo da ferida ( $p < 0,001$ ) em relação ao tamanho inicial ( $T_0$ ). Desta forma, em 2 dias todos os grupos tiveram o tamanho da ferida menor ( $p < 0,001$ ), se comparado com o grupo tratado com o controle positivo.

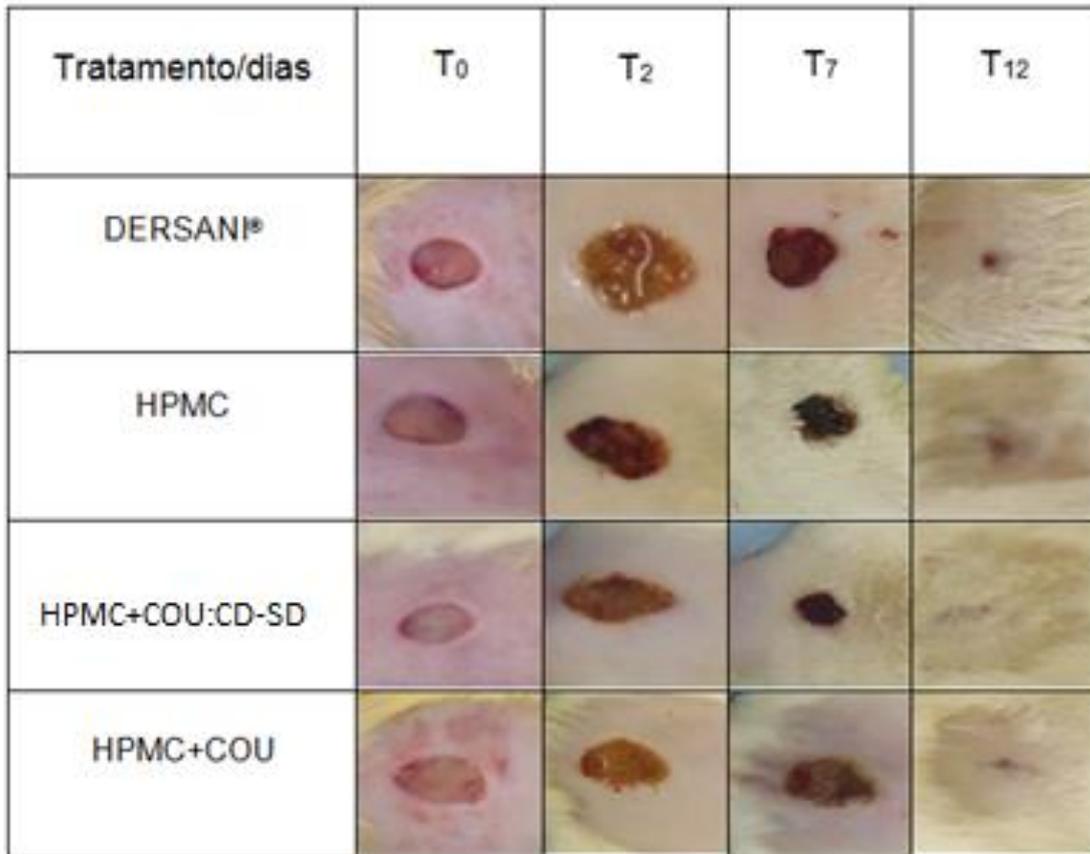


**Figura 10.** Área da ferida ao longo do tratamento. Análise estatística realizada por ANOVA, sendo estatisticamente significativo comparando o grupo Dersani<sup>®</sup> no tempo de 2 dias com o tempo zero (### $p < 0,001$ ) e estatisticamente significativo comparando todos os grupos com o controle positivo de cada tempo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Sabe-se que em alguns casos, nos primeiros dias pode ocorrer um aumento do tamanho da lesão ao invés da diminuição. Este fato parece estar relacionado a inúmeros fatores, dentre eles o grau do processo inflamatório gerado nos primeiros dias após a cirurgia. Segundo MARTINS e colaboradores

(2006), em estudo de cicatrização em ratos, utilizando-se extrato aquoso de babaçu, por via intraperitoneal, a diminuição da lesão do grupo controle e do grupo experimental ocorreu somente a partir do 7º dia, sendo um aumento também observado nos primeiros dias. As lesões tiveram tamanho inicial médio de 0,52 cm<sup>2</sup> e 0,43 cm<sup>2</sup> para o grupo experimental e o controle, respectivamente, e ambas chegaram a atingir um tamanho de aproximadamente 1,3 cm<sup>2</sup> para depois passar para a fase proliferativa, havendo a contração do tamanho da lesão.

O Dersani<sup>®</sup> é composto por uma mistura de triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico, óleo de girassol clarificado, lecitina, palmitato de retinol, acetato de tocoferol e alfa-tocoferol e apresenta potencialidade na aceleração da cicatrização de feridas abertas e limpas. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado à capacidade quimiotática dos ácidos graxos para ajudar no recrutamento das células mono e polimorfonucleares (DE NARDI et al., 2004). Também age facilitando a ação de fatores de crescimento, mantém o ambiente úmido e estimula a formação de tecidos de granulação, acelerando o processo de cicatrização (MARQUES et al., 2004). Esta característica do Dersani<sup>®</sup>, de manter o ambiente da ferida úmido, foi observada até o 7º dia de tratamento (Figura 11). Enquanto que para os demais grupos, a ferida apresentou formação de uma crosta seca, já a partir do 2º dia de avaliação.

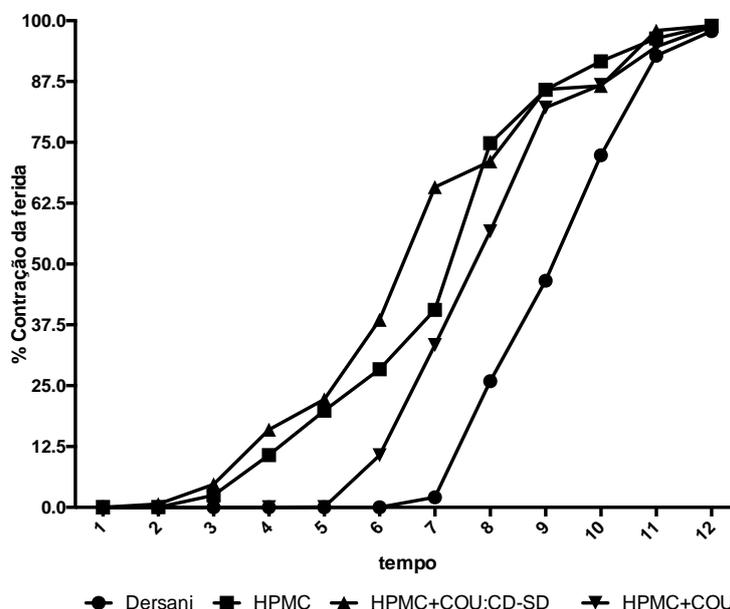


**Figura 11.** Fotografias representando a contração da ferida nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Observou-se também que o tamanho da ferida começou a reduzir com o passar dos dias. No 7º dia, quando começa a fase proliferativa, a maioria dos tratamentos apresentou uma redução no tamanho da ferida se comparado com o tempo inicial. O melhor desempenho frente à contração da ferida no 7º dia foi observado pelo tratamento HPMC+COU:CD-SD, se mostrando diferente estatisticamente do grupo que recebeu Dersani® ( $p < 0,001$ ) e dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). O único tratamento que neste tempo não apresentou redução do tamanho da ferida, foi o tratado com Dersani®, visto que neste grupo, o tamanho da lesão aumentou muito durante a fase inflamatória.

A Figura 12 indica a porcentagem de contração das feridas ao longo do experimento. Constatou-se que todos os grupos foram eficazes para resolver a lesão em 12 dias de análise. No entanto, o grupo que foi tratado com HPMC+COU:CD-SD foi o mais eficiente, uma vez que 50% da contração da

ferida foi alcançada a partir do 6º dia, enquanto que para o grupo Dersani® este valor foi verificado apenas a partir do 10º dia e os outros tratamentos a partir do 7º dia.



**Figura 12.** Porcentagem de contração das feridas ao longo do experimento

O resultado encontrado neste ensaio indica que o processo de reparo tecidual com tratamento realizado com a associação do cumestrol com ciclodextrina (HPMC+COU:CD-SD) pode interferir na fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas, reduzindo seu tempo e permitindo que a fase proliferativa inicie antes do 7º dia.

Normalmente o tempo para o fechamento da ferida encontrado na literatura é de 14 à 22 dias (MURTHY et al., 2013), porém as lesões tratadas com nosso protocolo experimental apresentaram um fechamento significativo em 12 dias de experimento. Porém, foi verificado que o grupo tratado apenas com hidrogel de HPMC também teve um efeito cicatrizante interessante.

Hidrogéis contendo carboximetilcelulose, propilenoglicol e pectina (Curatec®) são utilizados para o tratamento de feridas, assim como o Dersani®. A indicação do seu uso parece estar associada a melhoria do grau de hidratação e ao amolecimento e remoção do tecido desvitalizado através do desbridamento autolítico. Desta forma, a incorporação do complexo neste

veículo pareceu apresentar um efeito sinérgico para o tratamento das lesões. Por outro lado, não pudemos comparar os resultados encontrados com um tratamento sem nenhum efeito na lesão, assim, para próximos ensaios seria interessante manter um o grupo sendo tratado com salina para comparar estas diferenças.

Não existem relatos avaliando o uso de cumestrol livre ou associado em ciclodextrinas em modelo de cicatrização *in vivo*. Mas estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo da Dra Claudia Simões, da UFSC, BIANCHI, (2014), avaliaram a migração celular e a capacidade proliferativa em cultura de fibroblastos, através de ensaio por *scratch*. Como resultado foi observado que o cumestrol associado à ciclodextrina induziu a proliferação das células, nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  (66,1 %) e na concentração de 10  $\mu\text{M}$  (56,3 %), sendo o efeito comparável ao do controle positivo utilizado (PDGF), corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

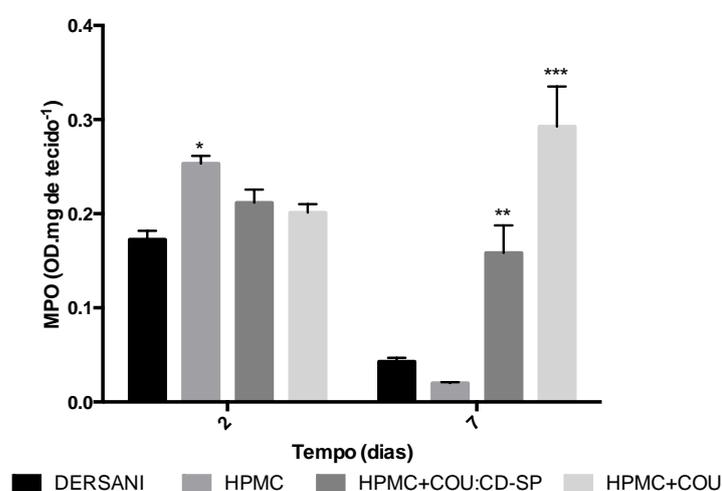
#### *Atividade da mieloperoxidase (MPO)*

Com intuito de avaliar o grau de processo inflamatório nas feridas nos diferentes grupos, a quantidade de neutrófilos presentes na área da lesão foi determinada indiretamente pelo ensaio enzimático de mieloperoxidase (MPO). Como a inflamação pode ser observada nos primeiros dias de tratamento, as análises foram realizadas em amostras de ferida em 2 e 7 dias.

Como pode ser observado na figura 13, 2 dias após a indução das feridas, todos os grupos testados apresentaram um quantidade alta de mieloperoxidase no local da lesão, indicando a presença de neutrófilos e de inflamação local. Mas apenas o grupo que foi tratado com HPMC (controle negativo) apresentou maior atividade quando comparado com o controle positivo ( $p < 0,05$ ). A presença elevada de MPO nos primeiros dias já era esperada, sendo anteriormente descrita por outros autores (SONG et al., 2008; MURTHY et al., 2013).

No entanto, no 7<sup>o</sup> dia foi verificado que houve uma diminuição da quantidade de enzima tanto no grupo tratado com Dersani<sup>®</sup> como com HPMC e no grupo tratado com HPMC+COU:CD-SD a quantidade se manteve

praticamente igual. Por outro lado, no grupo que continha cumestrol livre incorporado em HPMC (HPMC+COU) foi observado um aumento significativo da quantidade da enzima. Desta forma, em 7 dias ambos tratamentos que continham cumestrol foram diferentes quando comparados com o Dersani<sup>®</sup>. Este fato pode indicar uma atividade pró-inflamatória do cumestrol na dose testada, sendo este efeito mais pronunciado quando este composto encontra-se na forma livre. Este efeito do cumestrol livre pode também estar relacionado a sua falta de solubilidade, gerando uma maior reação inflamatória no local de aplicação.



**Figura 13.** Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) ao longo do experimento. Análise estatística realizada por ANOVA, sendo estatisticamente significativo comparando todos os grupos com o controle positivo de cada tempo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Na literatura é relatado que a atividade cicatrizante de isoflavonoides pode ser atribuída a capacidade destes em inibir uma variedade de enzimas, como é o caso das prostaglandinas-sintetases, enzimas que têm papel importante na inflamação e no reparo tecidual (HAVSTEEN, 2002; VIEIRA et al., 2008). Por outro lado, outros trabalhos indicam que uma ação pró-inflamatória pode também ser interessante para a cicatrização. Se a fase inflamatória for acelerada, tendo maior formação de crosta e re-epitelização em menor tempo, as feridas apresentam maior retração cicatricial nos primeiros

dias, acelerando o processo de reparo tecidual (RIBEIRO BARROS CARDOSO et al., 2004).

Na avaliação da área das feridas foi verificada uma maior contração da ferida durante a fase inflamatória (até 7 dias), especialmente no grupo tratado com a associação do cumestrol com a ciclodextrina (HPMC+COU:CD-SD), indicando que este tratamento interferia de alguma forma no processo inflamatório, corroborando com os dados encontrados nesta análise. No entanto, ensaios avaliando mediadores da inflamação são necessários para confirmar este resultado.

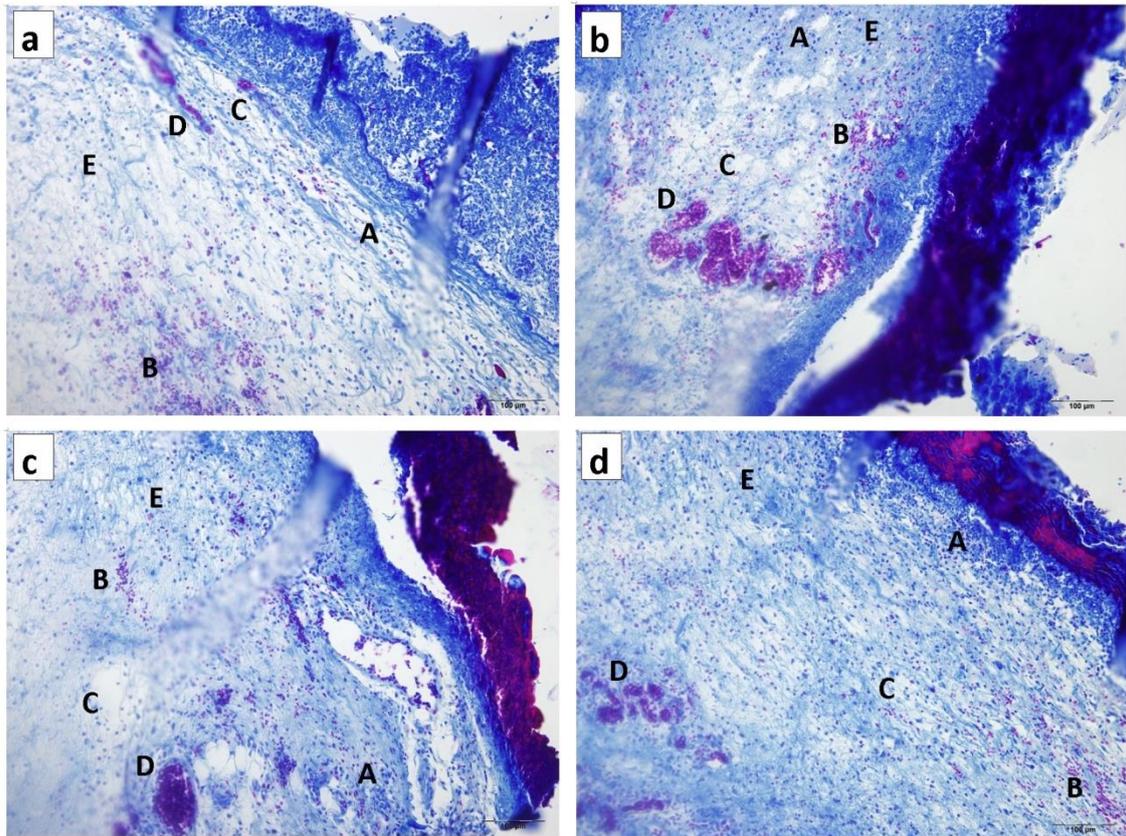
### *Procedimento histológico*

A análise histológica foi avaliada através da observação de vários parâmetros nos tempos de 2 dias (Tabela 4, Figura 14), 7 dias (Tabela 5, Figura 15) e 12 dias de tratamento (Tabela 6, Figura 16).

**Tabela 4.** Análise histológica em 2 dias após a lesão.

Histologia	2 dias							
	Dersani®		HPMC		HPMC+COU:CD-SD		HPMC+COU	
<b>Processo inflamatório</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Hemorragia</b>	6 (6)	100 %	5 (6)	83 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Edema</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Neoangiogênese</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Fibroblastos</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Depósito de colágeno</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Re-epitelização</b>	1 (6)	17 %	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %
<b>Apêndices</b>	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %

Na análise histológica após 2 dias de tratamento (Tabela 4 – Figura 14) pode-se observar que o edema, o processo inflamatório e a hemorragia estavam presentes em todos os grupos. Estes resultados eram esperados para a fase inflamatória, da mesma forma que verificado por MARTINS (2006) utilizando extrato de *Orbignya phaerata* (babaçu).



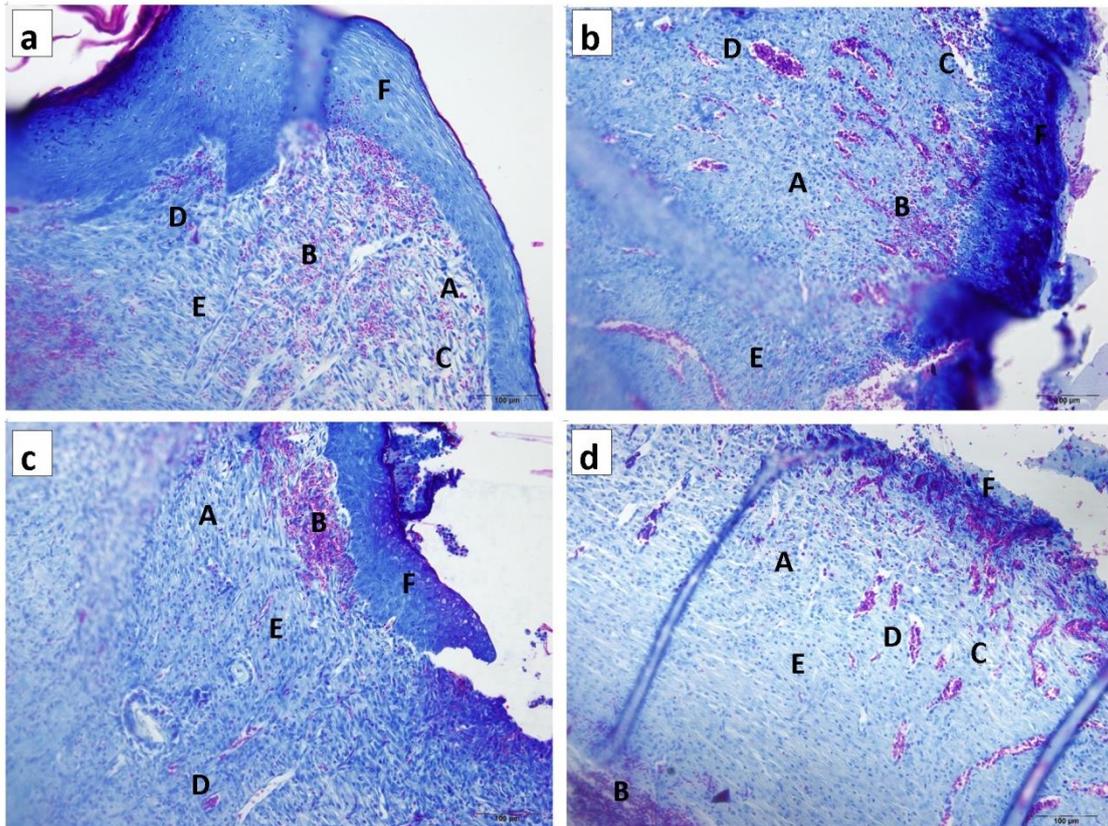
**Figura 14.** Aspecto histológico das peles coletadas após 48 horas do tratamento. a,b,c,d: respectivamente, DERSANI<sup>®</sup>, HPMC, HPMC+COU:CD-SD, HPMC+COU. (A: processo inflamatório, B: hemorragia, C: edema, D: neoangiogênese, E: colágeno, F: re-epitalização). Coloração tricômico de Mallory. Aumento: 200X (100 µm).

No 7<sup>o</sup> dia de tratamento, em todos os grupos ainda há presença de processo inflamatório, estando presente em 100 % dos ratos. No entanto, não foi possível identificar o número de células inflamatórias para comparar com os dados encontrados na avaliação da enzima mieloperoxidase.

**Tabela 5.** Análise histológica em 7 dias após a lesão.

Histologia	7 dias							
	Dersani <sup>®</sup>		HPMC		HPMC+COU:CD-SD		HPMC+COU	
<b>Processo inflamatório</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Hemorragia</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	5 (6)	83 %	6 (6)	100 %
<b>Edema</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Neoangiogênese</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Fibroblastos</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Depósito de colágeno</b>	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
<b>Re-epitelização</b>	6 (6)	100 %	4 (6)	67 %	6(6)	100 %	1 (6)	17 %
<b>Apêndices</b>	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %	1 (6)	17 %	0 (6)	0 %

A hemorragia estava presente 83 % dos ratos tratados com HPMC+COU:CD-SD enquanto que para os demais grupos este parâmetro foi ainda de 100 %. Por outro lado, a re-epitelização foi observada no grupo tratado com Dersani<sup>®</sup> e HPMC+COU:CD-SD, assim como a presença de queratina, o que indica um epitélio em funcionamento. Ainda, apêndices foram observados em 17% do grupo tratado com a associação de cumestrol com ciclodextrina. Estes dados corroboram com os resultados observados na análise da contração das feridas, em que foi verificado que no 7<sup>o</sup> dia o grupo tratado com HPMC+COU:CD-SD apresentou a menor lesão, demonstrando que este tratamento permite que a fase proliferativa da cicatrização da ferida inicie antes se comparada com os outros tratamentos.



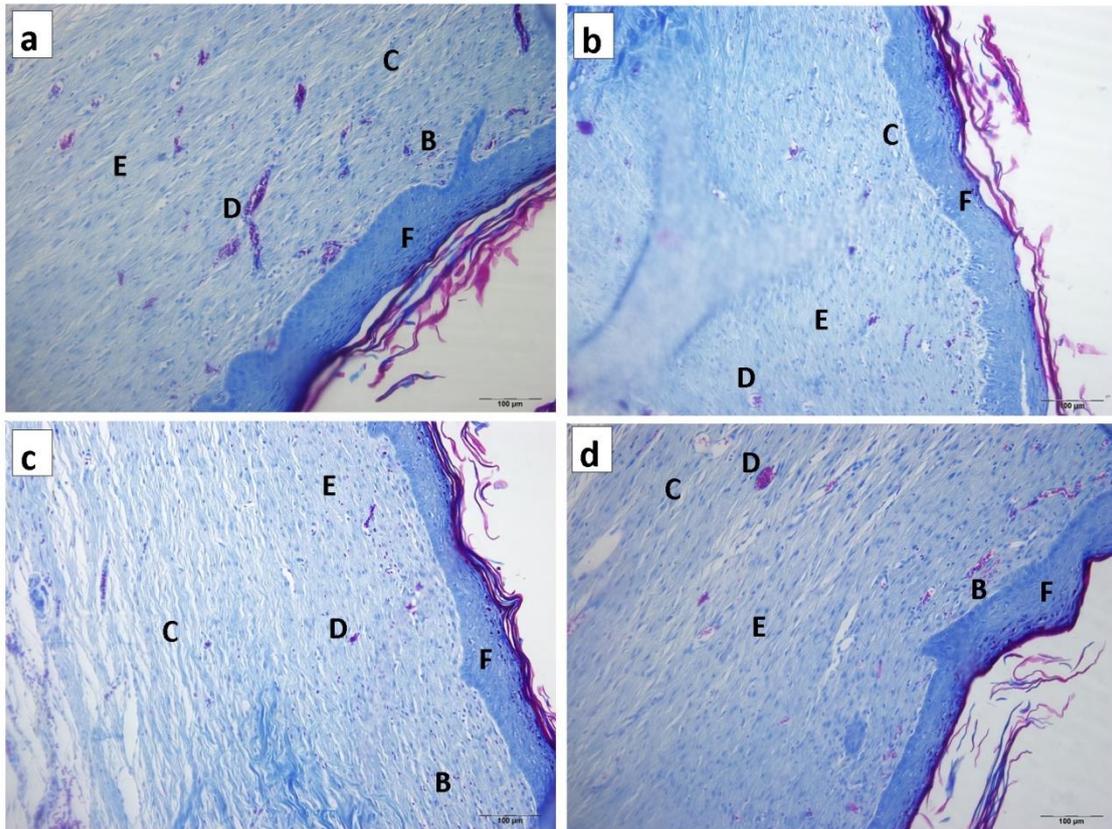
**Figura 15.** Aspecto histológico das peles coletadas após 7 dias do tratamento. a,b,c,d: respectivamente, DERSANI<sup>®</sup>, HPMC, HPMC+COU:CD-SD, HPMC+COU. (A: processo inflamatório, B: hemorragia, C: edema, D: neoangiogênese, E: colágeno, F: re-epitalização). Coloração tricômico de Mallory. Aumento: 200X (100 µm).

No 12<sup>o</sup> dia nenhum dos grupos tratados apresentou processo inflamatório. Além disso, o grupo tratado com Dersani<sup>®</sup> ainda apresentou hemorragia e edema nas lesões de 5 ratos. Por outro lado, no grupo tratado com HPMC+COU:CD-SD também foi observado a presença de hemorragia nas lesões de 5 ratos, mas o edema foi verificado em apenas 4 ratos.

**Tabela 6.** Análise histológica em 12 dias após a lesão.

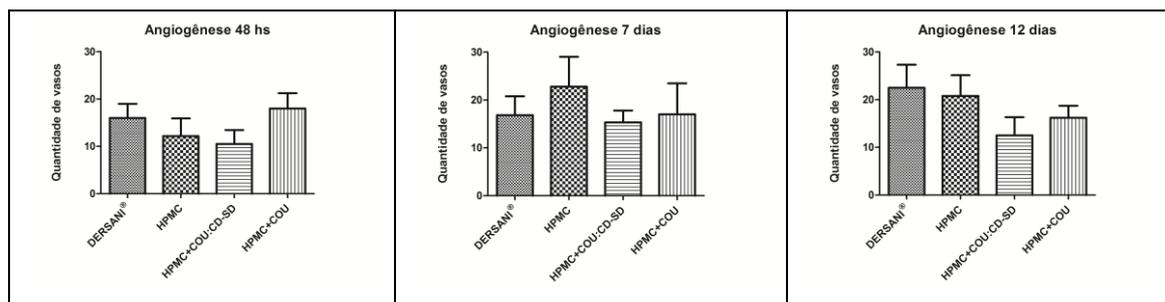
Histologia	12 dias							
	Dersani®		HPMC		HPMC+COU:CD-SD		HPMC+COU	
Processo inflamatório	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %	0 (6)	0 %	0(6)	0 %
Hemorragia	5 (6)	83 %	6 (6)	100 %	5 (6)	83 %	4 (6)	67 %
Edema	5 (6)	83 %	6 (6)	100 %	4 (6)	67 %	6 (6)	100 %
Neoangiogênese	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
Fibroblastos	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
Depósito de colágeno	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
Re-epitelização	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6(6)	100 %	6 (6)	100 %
Apêndices	3(6)	50 %	0 (6)	0 %	2 (6)	33 %	0 (6)	0 %

Todos animais tiveram 100 % de re-epitelização, mas os apêndices foram observados apenas nas lesões tratadas com HPMC+COU:CD-SD e Dersani, evidenciando que estes tratamentos foram mais efetivos. ROGALSKI (2008) verificou a presença de re-epitelização somente a partir do 14º dia, demonstrando que os hidrogeis utilizados em nosso estudo tem a capacidade de cicatrizar as lesões em menor tempo que uma pomada contendo 2 % de extrato de *Ilex paraguariensis*.



**Figura 16.** Aspecto histológico das peles coletadas após 12 dias do tratamento. a,b,c,d: respectivamente, DERSANI<sup>®</sup>, HPMC, HPMC+COU:HP $\beta$ CD-SD, HPMC+COU. (B: hemorragia, C: edema, D: neoangiogênese, E: colágeno, F: re-epitalização). Coloração: tricômico de Mallory. Aumento: 200X (100  $\mu$ m).

Sabe-se que a presença de vascularização pode auxiliar no processo de cicatrização nas primeiras fases do processo. Desta forma, a quantidade de novos vasos foi quantificada e avaliada (Figura 17). No entanto, não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos nos tempos analisados.



**Figura 17.** Análise da quantidade de vasos após a lesão nos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Análise estatística realizada por ANOVA.

Os dados apresentados no ensaio *in vivo* indicaram que o tratamento realizado com a associação do cumestrol com ciclodextrinas (HPMC+COU:HP $\beta$ CD-SD) apresentou resultados interessantes frente ao processo de cicatrização, sendo semelhante em eficácia, se comparado com o controle positivo (Dersani<sup>®</sup>), mas mais eficiente que o mesmo, uma vez que o fechamento de 50% da ferida foi alcançado em menos tempo. Ainda foi verificado que o tratamento apenas com o hidrogel também apresentou um efeito cicatrizante e que, portanto, a utilização dessa base para veicular a associação do cumestrol com ciclodextrinas é adequada. Por mais que os tratamentos apenas com hidrogel ou com hidrogel contendo cumestrol livre também tenham tido um bom desfecho do problema em 12 dias, as análises histológicas demonstraram que o tecido estava melhor organizado, apresentando apêndices apenas após o tratamento com Dersani ou com HPMC+COU:HP $\beta$ CD-SD.

A cicatrização cutânea ocorre por meio de processos biológicos, podendo esses processos ser influenciados por mediadores endógenos ou substâncias exógenas, como é o caso de produtos a base de plantas medicinais (REUTER et al., 2009). Conforme dito anteriormente, o estrogênio exerce sua função na pele por meio de sua ligação aos receptores estrogênicos (ER), alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) que são expressos na pele humana (derme) regulando a ação de estrógenos em nível cutâneo, sendo que o 17 $\beta$ -estradiol exerce um papel importante na prevenção do envelhecimento e na cicatrização cutânea (THORNTON et al., 2003; VERDIER-SEVRAIN et al.,

2004). Os ER $\beta$  estão mais presentes nos fibroblastos dérmicos sendo relacionados a produção de colágeno. Já os ER $\alpha$  agem especialmente na promoção da proliferação celular (THORNTON et al., 2003; HALL e SCHWARTZ, 2004; VERDIER-SEVRAIN et al., 2004; SHU e MAIBACH, 2011).

O cumestrol, como análogo do 17 $\beta$ -estradiol, ao ativar os receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ , pode ter aumentado a produção de colágeno e a proliferação celular (evidenciado na análise da contração da ferida) ainda durante a fase inflamatória da lesão, acelerando o processo de cicatrização cutânea. Além disso, conforme dito anteriormente, os flavonoides podem apresentar uma atividade pró-oxidante, relacionada a dose, podendo influenciar na fase inflamatória do processo, acelerando esta etapa e diminuindo o tempo necessário para o reparo. Contudo, neste caso, é necessário ter cuidado em aplicações a longo prazo uma vez que essa atividade implica na persistência de células inflamatórias, retardando o processo de remodelação, no entanto, para esclarecer esses resultados, ensaios avaliando os mediadores inflamatórios são necessários.

Desta forma, conclui-se que utilização de cumestrol associado a ciclodextrinas incorporado em gel de HMPC parece ser interessante para o tratamento para feridas abertas e extensas e com risco de contaminação, visando à aceleração do processo cicatrizante inicial e a formação da crosta como barreira protetora.



**CONCLUSÕES**

---



- A avaliação das associações cumestrol:HP $\beta$ CD por espectroscopia no infravermelho (FTIR), calorimetria diferencial exploratória (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstram existir interação entre os constituintes nas associações, no entanto não puderam ser evidenciadas. Com relação à microscopia eletrônica de varredura revelam a formação de pó homogêneo, com partículas esferoidais, na ordem de 2 $\mu$ m quando o método de associação em meio organo-aquoso seguido de secagem por *spray dryer* foi empregado, ao contrário do emprego do método de micro-ondas seguido de liofilização.
- Os hidrogéis de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC Methocel<sup>®</sup> K4) na concentração de 3,5 % e quitosana concentração de 2,25 % apresentaram comportamento do tipo não newtoniano pseudoplástico.
- As formulações utilizando hidrogel de HPMC apresentaram maior liberação do cumestrol quando este foi incorporado na forma livre ou de mistura física cumestrol:HP $\beta$ CD, bem como na forma associada obtida pelo método de micro-ondas seguido de liofilização. Quando a associação cumestrol:HP $\beta$ CD obtida em meio organo-aquoso seguida de secagem por *spray drying* não se observa diferença estatística na liberação do cumestrol a partir de hidrogel de HPMC e quitosana, denotando o efeito do método de associação sobre a liberação do cumestrol.
- A comparação entre a liberação por difusão do tipo Franz demonstrou que a maior liberação nas 12 horas foi a formulação contendo a associação COU:HP $\beta$ CD pelo método de micro-ondas seguido de liofilização incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU:CD-MO-LI). No entanto esta associação demonstrou-se heterogênea conforme análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por isso optou-se por utilizar a associação por método de *spray drying*, que se mostrou mais homogêneo por microscopia eletrônica (MEV), e por ser uma técnica com menor custo, incorporada em hidrogel de HPMC. Já que não houve diferença estatística com relação ao hidrogel de quitosana e o HPMC teve melhor resultado com relação à espalhabilidade e melhor aspecto optou-se pela utilização deste hidrogel como veiculação.

- Nos ensaios *in vivo* foi verificado que o tratamento realizado com a associação do cumestrol HP $\beta$ CD pelo método de *spray drying* incorporado em hidrogel de HPMC (HPMC+COU:CD-SD) apresentou resultados interessantes frente ao processo de cicatrização, sendo semelhante em eficácia, se comparado com o controle positivo (Dersani<sup>®</sup>), mas mais eficiente que o mesmo, uma vez que o fechamento no período inicial foi mais rápido. Foi verificado também que o tratamento apenas com o hidrogel apresentou um efeito cicatrizante e, portanto, a utilização dessa base para veicular a associação do cumestrol com ciclodextrinas é adequada para ampliar o efeito farmacológico.
- Nas análises histológicas foi verificado que o hidrogel desenvolvido (HPMC+COU:CD-SD) apresentou resultados semelhantes ao grupo controle positivo, se mostrando eficaz para a reparação tecidual;
- A presença da ciclodextrina (HP $\beta$ CD) foi fundamental para melhorar a eficácia do cumestrol, frente à hidrossolubilidade, liberação *in vitro* e atividade cicatrizante *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

---



AL-MAHARIK, N.; BOTTING, N. P. A new short synthesis of coumestrol and its application for the synthesis of [6, 6a, 11a-13 C 3] coumestrol. **Tetrahedron**, v. 60, n. 7, p. 1637-1642, 2004. ISSN 0040-4020.

AMBIGA, S. et al. Evaluation of wound healing activity of flavonoids from Ipomoea carnea jacq. **Ancient science of Life**, v. 26, n. 3, p. 45, 2007.

ANISSIMOV, Y. G. et al. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 169-190, 2013. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12001378> >.

ANTONELLI, M. L. et al. Simultaneous quantitation of free and conjugated phytoestrogens in Leguminosae by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 66, n. 4, p. 1025-1033, 2005. ISSN 0039-9140.

ARAIN, R. A. et al. Antibacterial property and characterization of cotton fabric treated with chitosan/AgCl–TiO<sub>2</sub> colloid. **Carbohydrate polymers**, v. 96, n. 1, p. 326-331, 2013. ISSN 0144-8617.

ARGENTA, D. et al. LC analysis of coumestrol incorporated into topical lipid nanoemulsions. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 12, p. 929-932, 2011. ISSN 0031-7144.

ARTHUR, H.; PRICE, J. Handbook of pharmaceutical excipients. **American Pharmaceutical Association, London**, v. 271, n. 297, p. 463-464, 2000.

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.

BAUMANN, L. **Cosmetic Dermatology: Principles and Practice: Principles & Practice**. McGraw Hill Professional, 2009. ISBN 0071641289.

BELLRINGER, M. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Food and chemical toxicology**, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995. ISSN 0278-6915.

BEM, D. M. D. et al. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (in vivo) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. **Revista Brasileira Fisioterapia**, v. 14, n. 2, p. 114-20, 2010.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010. ISSN 0169-409X.

BIANCHI, S. E. **Associação de cumestrol à hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: desenvolvimento, caracterização, avaliação da permeação cutânea e do efeito cicatrizante**. 2014. 117 (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BIANCHI, S. E. et al. A bioanalytical HPLC method for coumestrol quantification in skin permeation tests followed by UPLC-QTOF/HDMS stability-indicating method for identification of degradation products. **Journal of Chromatography B**, v. 1020, p. 43-52, 2016. ISSN 1570-0232.

BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 197, n. 1, p. 1-11, 2000. ISSN 0378-5173.

BICKOFF, E.; LIVINGSTON, A.; BOOTH, A. Estrogenic activity of coumestrol and related compounds. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 88, n. 2, p. 262-266, 1960. ISSN 0003-9861.

BRANGEL, L. M. Desenvolvimento de hidrogéis a base de quitosana e ácido lactobiônico com adição de nanoelementos. 2011.

BRUNETON, J. **Phytochemistry Medicinal Plants**. . New York:Editons Ted &Doc, 2008.

BUROW, M. E. et al. Phytochemical Glyceollins, Isolated from Soy, Mediate Antihormonal Effects through Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 4, p. 1750-1758, 2001. ISSN 0021-972X.

CALABRÒ, M. et al. Effects of  $\alpha$ -and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n. 2, p. 365-377, 2004. ISSN 0731-7085.

CAMPBELL, L. et al. Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor  $\beta$  independent of its antiinflammatory activities. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 9, p. 1825-1833, 2010. ISSN 0022-1007.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD arq. bras. cir. dig**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007. ISSN 0102-6720.

CANNAVÀ, C. et al. Physicochemical characterization of coumestrol/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 48, n. 2, p. 172-178, 2008. ISSN 0924-2031. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203108000039> >.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. **Histologia básica: texto, atlas**. Guanabara-Koogan, 2008. ISBN 9687535695.

CAVALLI, R. et al. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with  $\beta$ -cyclodextrins. **International journal of pharmaceutics**, v. 182, n. 1, p. 59-69, 1999. ISSN 0378-5173.

CHANDSAWANGBHUWANA, C.; BAKER, M. E. 3D models of human ER $\alpha$  and ER $\beta$  complexed with coumestrol. **Steroids**, v. 80, p. 37-43, 2014. ISSN 0039-128X.

CHEN, H.-H.; HUANG, Y. C. Rheological properties of HPMC enhanced surimi analyzed by small-and large-strain tests—II: Effect of water content and ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 2, p. 313-322, 2008. ISSN 0268-005X.

CHENITE, A. et al. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. **Carbohydrate polymers**, v. 46, n. 1, p. 39-47, 2001. ISSN 0144-8617.

CHENITE, A. et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, n. 21, p. 2155-2161, 2000. ISSN 0142-9612.

CHIN, Y. P. et al. Inclusion complex of Alizarin Red S with  $\beta$ -cyclodextrin: Synthesis, spectral, electrochemical and computational studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1083, p. 236-244, 2015. ISSN 0022-2860.

CHO, J. et al. Physical gelation of chitosan in the presence of  $\beta$ -glycerophosphate: the effect of temperature. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3267-3275, 2005. ISSN 1525-7797.

CORSINI, E. et al. Age-related decline in RACK-1 expression in human leukocytes is correlated to plasma levels of dehydroepiandrosterone. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 2, p. 247-256, 2005. ISSN 0741-5400.

CRUPI, V. et al. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with  $\beta$ -cyclodextrins. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 1, p. 110-117, 2007. ISSN 0731-7085.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009. ISSN 2179-443X.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 48, n. 1, p. 8-19, 2010. ISSN 0912-0009.

DE NARDI, A. et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, 2004. ISSN 1517-784X.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004. ISSN 1359-5113.

EL-KATTAN, A. F.; ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 198, n. 2, p. 179-189, 2000. ISSN 0378-5173.

FENELON, V. et al. Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 7, p. 1291-1301, 2015/07/01 2015. ISSN 1615-7591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1369-8> >.

FICARRA, R. et al. Study of flavonoids/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 29, n. 6, p. 1005-1014, 2002. ISSN 0731-7085.

FIGUEIRAS, A. et al. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 2, p. 531-539, 2007. ISSN 0939-6411.

FITZGERALD, D. J. et al. Effects of acute ethanol exposure on the early inflammatory response after excisional injury. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 2, p. 317-323, 2007. ISSN 1530-0277.

FRANCO, C. et al. Studies on coumestrol/ $\beta$ -cyclodextrin association: Inclusion complex characterization. **International journal of pharmaceutics**, v. 369, n. 1, p. 5-11, 2009. ISSN 0378-5173.

GANRY, O. Phytoestrogens and prostate cancer risk. **Preventive medicine**, v. 41, n. 1, p. 1-6, 2005. ISSN 0091-7435.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85-97, 2012. ISSN 0094-1298. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094129811001271> >.

GARTNER, L.; HIATT, J. Atlas colorido de Histologia. 4a edição. **Rio de Janeiro: Guanabara**, 2007.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 760-820, 2013. ISSN 1482-1826.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001. ISSN 0040-6031.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

HALL, H.; SCHWARTZ, G. E. Rapid wound healing: A Sufi perspective. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 116-123, 2004. ISSN 1543-1150. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1543115004000444> >.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002. ISSN 0163-7258.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. Manual de cosmetologia. **Rio de Janeiro: Revinter**, 1999.

IOVINE, B. et al. A comparative analysis of the photo-protective effects of soy isoflavones in their aglycone and glucoside forms. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 16444-16456, 2012.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, 2010. ISSN 1679-9836.

JEON, H. Y. et al. **Cosmetic composition comprising coumestrol or a bean extract containing coumestrol for skin care**: Google Patents 2013.

JOSÉ DACAMPORA, A. et al. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 1, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. C., J. **Histologia Básica**. 11. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAMEL, R. A. et al. Tissue engineering of skin. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 3, p. 533-555, 2013. ISSN 1072-7515.

KOIDE, S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1091-1101, 1998. ISSN 0271-5317.

KONAR, N. et al. Effect of different sample preparation methods on isoflavone, lignan, coumestan and flavonoid contents of various vegetables determined by triple quadrupole LC–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1, p. 26-35, 2012. ISSN 0889-1575.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, n. 1–3, p. 93-98, 2010. ISSN 0379-0738. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073810003336> >.

KOUKI, T. et al. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. **Brain research bulletin**, v. 64, n. 5, p. 449-454, 2005. ISSN 0361-9230.

KRAZEISEN, A. et al. Phytoestrogens inhibit human  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 151-162, 2001. ISSN 0303-7207.

KULLING, S.; METZLER, M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. **Food and chemical toxicology**, v. 35, n. 6, p. 605-613, 1997. ISSN 0278-6915.

LAPČÍK, O. et al. Synthesis of hapten and conjugates of coumestrol and development of immunoassay. **Steroids**, v. 68, n. 14, p. 1147-1155, 2003. ISSN 0039-128X.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of controlled release**, v. 136, n. 2, p. 88-98, 2009. ISSN 0168-3659. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365909001254> >.

LEE, S.-H. et al. Enhanced bioavailability of soy isoflavones by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 71, n. 12, p. 2927-2933, 2007. ISSN 1347-6947.

LEUNER, O. et al. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 575-579, 2013. ISSN 1097-0010.

LOFTSSON, T.; BODOR, N. Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the aqueous solubility of drugs and transdermal delivery of  $17\beta$ -estradiol. **Acta pharmaceutica nordica**, v. 1, n. 4, p. 185-194, 1988. ISSN 1100-1801.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996. ISSN 0022-3549.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International journal of pharmaceutics**, v. 225, n. 1, p. 15-30, 2001. ISSN 0378-5173.

LÓRÁND, T.; VIGH, E.; GARAI, J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 30, p. 3542-3574, 2010. ISSN 0929-8673.

MADHUMATHI, K. et al. Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 1, p. 12-15, 2009. ISSN 0141-8130.

MAGNUSSON, B. M.; WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 205-227, 2001. ISSN 0169-409X.

MALPEZZI, L. et al. Crystal architecture and conformational properties of the inclusion complex, neohesperidin dihydrochalcone–cyclomaltoheptaose ( $\beta$ -cyclodextrin), by X-ray diffraction. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 12, p. 2117-2125, 2004. ISSN 0008-6215.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313-326, 2010. ISSN 1099-1026.

MARQUES, S. R. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 196-209, 2004. ISSN 0102-8650.

MARTINS, N. L. P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbiginya phalerata* (babaçu): estudo controlado em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. Suppl 3, p. 66-75, 2006.

MENDONÇA, R. J. D.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MICHALANY, J.; MICHALANY, N. S. **Anatomia e histologia da pele**. Lemos, 2002. ISBN 8574500852.

MŁYNARCZUK, J.; WRÓBEL, M.; KOTWICA, J. Adverse influence of coumestrol on secretory function of bovine luteal cells in the first trimester of pregnancy. **Environmental toxicology**, v. 28, n. 7, p. 411-418, 2013. ISSN 1522-7278.

MOLINARO, G. et al. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2717-2722, 2002. ISSN 0142-9612.

MUNRO, I. et al. Safety assessment of  $\gamma$ -cyclodextrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 3-13, 2004. ISSN 0273-2300.

MURALIDHAR, A. et al. Wound healing activity of flavonoid fraction isolated from the stem bark of *Butea monosperma* (Lam) in albino wistar rats. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 6, p. 1-6, 2013.

MURTHY, S. et al. Evaluation of in vivo wound healing activity of *Bacopa monniera* on different wound model in rats. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

NEIL, M. J. The Merck Index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck Research Laboratories, Merck and Co. Inc, **Whitehouse station, New Jersey**, v. 319, 2006.

OLIVIER, P.; VERWAERDE, F.; HEDGES, A. R. Subchronic toxicity of orally administered beta-cyclodextrin in rats. **International Journal of Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 407-419, 1991. ISSN 1091-5818.

OSENI, T. et al. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. **Planta medica**, v. 74, n. 13, p. 1656, 2008.

PANDA, S. K. et al. EVALUATION OF WOUND HEALING POTENTIAL OF CRUDE LEAVE EXTRACTS OF *CROTALARIA PALLIDA* AITON. IN WISTAR RATS. 2015.

PATRI, G.; SILANO, V.; ANTON, R. **Plantes Dans Les Cosmétiques**. Council of Europe, 2006. ISBN 9287159122.

PETRY, M.; BORGHETTI, G. S.; BASSANI, V. L. Influência de ciclodextrinas e polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina. **Lat Am J Pharm**, v. 26, p. 831-836, 2007.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014. ISSN 0144-8617.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2003. ISSN 0190-9622.

POCOCK, S. J. et al. Subgroup analysis, covariate adjustment and baseline comparisons in clinical trial reporting: current practice and problems. **Statistics in medicine**, v. 21, n. 19, p. 2917-2930, 2002. ISSN 0277-6715.

QUINTASA, M. A. et al. Diffusion mechanisms of solutes in chitosan-based edible films—behaviour in liquid and solid media and comparison between macro and nano scale.

REMINGTON, J. P.; TROY, D. B.; BERINGER, P. **Remington: The science and practice of pharmacy**. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 0781746736.

REUTER, J. et al. Botanicals in dermatology and skin health. **Botanical medicine. From bench to bedside. Mary Ann Liebert Inc., New Rochelle, NY, USA**, p. 33-65, 2009.

RIBEIRO, A. et al. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1102-1109, 2008. ISSN 1530-9932.

RIBEIRO BARROS CARDOSO, C. et al. Influence of topical administration of n- 3 and n- 6 essential and n- 9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 2, p. 235-243, 2004. ISSN 1524-475X.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029-7032, 1999. ISSN 0032-3861.

ROGALSKI, G. **CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS COM POMADAS DE**

**Ilex paraguariensis St. Hill: UMA ANÁLISE HISTOLÓGICA**. 2008. URI-CAMPUS DE ERECHIM CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE CURSO DE FARMÁCIA BIOQUÍMICA CLÍNICA

ROMANSKI, F. S. et al. Important factors in the size reduction of polymer-stabilized drug particle suspensions using high-pressure homogenization.

**Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 6, n. 2, p. 97-106, 2011. ISSN 1872-5120.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 409-424, 2012/02/01 2012. ISSN 1935-5130. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z> >.

ROWE, R. C. et al. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Pharmaceutical press London, 2009.

SANTOS, E. H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 583-592, 2015. ISSN 0023-6438.

SARNOFF, D. S. A comparison of wound healing between a skin protectant ointment and a medical device topical emulsion after laser resurfacing of the perioral area. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 3, Supplement 1, p. S36-S43, 2011. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962210021146> >.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-151, 2006. ISSN 1523-9829.

SCHREML, S. et al. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866-881, 2010. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962209014996> >.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 3-12, 2007.

SEHN, E. et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 115-120, 2009. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009000919> >.

SETCHELL, K. D. et al. Pharmacokinetics of a slow-release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1938-1944, 2005. ISSN 0021-8561.

SHU, Y. Y.; MAIBACH, H. I. Estrogen and skin: therapeutic options. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 12, n. 5, p. 297+, 2011 September-October 2011. ISSN 11750561. Disponível em: <<http://go.galegroup.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?id=GALE%7CA265104221&v=2.1&u=capes&it=r&p=AONE&asid=23416aab25fddebd7c526bf5b8ede973>>. Acesso em: 2015/11/2/.

SIEWERT, M. et al. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 1, p. 43-52, 2003. ISSN 1530-9932.

SILVA, H.; DOS SANTOS, K.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006. ISSN 0100-4042.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Flórianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS., 2010.

SIMON, M. La dermatite atopique est-elle toujours associée à une altération de la barrière épidermique ? **Revue Française d'Allergologie**, v. 53, n. 3, p. 125-128, 2013. ISSN 1877-0320. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877032013000407>>.

SIMONCIC, B.; TOMSIC, B. Structures of novel antimicrobial agents for textiles-a review. **Textile Research Journal**, 2010. ISSN 0040-5175.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology advances**, v. 20, n. 5, p. 341-359, 2002. ISSN 0734-9750.

SINKO, P. J. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SONG, H. S. et al. The effect of caffeic acid on wound healing in skin-incised mice. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 343-347, 2008. ISSN 1226-4512.

SPRICIGO, R. et al. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemda com  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 27, n. 5, p. 645-53, 2008.

SÜNTAR, İ. et al. Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 1, p. 63-70, 2011. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111001085> >.

TANAKA, M. et al. Effect of 2- Hydroxypropyl-  $\beta$ - cyclodextrin on Percutaneous Absorption of Methyl Paraben. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 47, n. 11, p. 897-900, 1995. ISSN 2042-7158.

THAKKER, K. D.; CHERN, W. H. Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms-case study. **Dissolution Technologies**, v. 10, n. 2, p. 10-16, 2003. ISSN 1521-298X.

THORNTON, M. et al. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Experimental dermatology**, v. 12, n. 2, p. 181-190, 2003. ISSN 1600-0625.

TOMMASINI, S. et al. Comparative photodegradation studies on 3-hydroxyflavone: influence of different media, pH and light sources. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n. 2, p. 389-397, 2004. ISSN 0731-7085.

VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899-2937, 2009. ISSN 1523-0864.

VERDIER-SÉVRAIN, S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. **Climacteric**, v. 10, n. 4, p. 289-297, 2007. ISSN 1369-7137.

VERDIER-SEVRAIN, S. et al. Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. **The FASEB journal**, v. 18, n. 11, p. 1252-1254, 2004. ISSN 0892-6638.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008. ISSN 1679-0367.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010. ISSN 0104-1428.

WILLIAMS, M. The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck Inc., Whitehouse Station/Rahway, New Jersey, October 2006. Cloth 0- 911910- 00X. \$125. pp. 2564. **Drug Development Research**, v. 67, n. 11, p. 870-870, 2006. ISSN 1098-2299.

XIE, H. et al. Host–guest inclusion system of artesunate with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives: Characterization and antitumor activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1085, p. 90-96, 2015. ISSN 0022-2860. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286014013052> >.

YATSU, F. K. et al. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 726-735, 2013. ISSN 0144-8617.

YOSHII, A. C. Hidrogéis do ácido acrílico: correlação das propriedades bioadesivas e lereação in vitro do metronidazol. 2011.

ZARZYCKI, P. K.; SMITH, R. Separation of steroids using temperature-dependent inclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 45-52, 2001. ISSN 0021-9673.

ZUANAZZI, J. D. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 577-614, 2004.