

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNA CARLETTO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO COM MODIFICADORES DE
SUPERFÍCIE EM MODELO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

PONTA GROSSA

2021

BRUNA CARLETTO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO COM MODIFICADORES DE
SUPERFÍCIE EM MODELO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski

PONTA GROSSA

2021

C281 Carletto, Bruna
Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocápsulas poliméricas contendo ácido ursólico com modificadores de superfície em modelo de cicatrização de feridas / Bruna Carletto. Ponta Grossa, 2021.
122 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski.

1. Nanotecnologia. 2. Pla. 3. Modificação de superfície. 4. Colágeno. 5. Envelhecimento. I. Farago, Paulo Vitor. II. Lipinski, Leandro Cavalcante. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 613.321



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ponta Grossa, 08 de junho de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 06/2021 DA DOUTORANDA **BRUNA CARLETTO** REALIZADA NO DIA 08 DE JUNHO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao oitavo dia de junho de dois mil e vinte e um, às 8 horas, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Leandro Cavalcante Lipinski reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Bruna Carletto, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor Leandro Cavalcante Lipinski (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Priscileila Colerato Ferrari (UEPG/PR), Rubiana Mara Mainardes (UNICENTRO/PR), Eliane Aparecida Campesatto (UFAL/AL) e Fabio Celidonio Pogliani (USP/SP). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO COM MODIFICADORES DE SUPERFÍCIE EM MODELO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS”**.

Encerrada a defesa, a banca considerou Aprovada a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Leandro Cavalcante Lipinski 1 - (UEPG - PR) Presidente

Priscileila Colerato Ferrari 2 - (UEPG - PR) – Titular

Rubiana Mara Mainardes 3 - (UNICENTRO - PR) – Titular

Eliane Aparecida Campesatto 4 – (UFAL - AL) – Titular

Fabio Celidonio Pogliani 5 - (USP - SP) – Titular

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua presença constante, por toda força que sempre me transmitiu e por me auxiliar e proteger durante este período assim como tem feito por toda a minha vida.

Aos meus Pais Balduir e Marciah, toda gratidão do mundo! Por serem meus maiores apoiadores, sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada por serem esse exemplo constante, de competência, perseverança, fé e amor. Por confiarem em mim, e me encorajarem até mesmo quando eu não acreditava. Eu amo muito vocês!

Ao meu irmão Rodolfo e minha cunhada Mirian que nos deram o maior presente, a doce Alice, que foi nossa calma em meio à turbulência de sentimentos que foi esse último ano, nos trouxe amor, alegria e esperança. Obrigada por todo carinho e apoio.

Aos meus tios Joseli e Vespasiano, por sempre torcerem por mim, por suas orações e incentivos constantes.

Ao meu orientador Dr. Paulo Vitor Farago, pelas numerosas lições acadêmicas e de vida que conduziram o meu caminhar como profissional e ser humano durante essa convivência. Obrigada por acreditar nas minhas potencialidades e por todas as oportunidades que sempre me proporcionou.

Ao meu coorientador Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, por ter aberto as portas do seu laboratório pra mim, por todas as oportunidades que me deu de crescimento pessoal e profissional e pelo incentivo e compreensão nos momentos de dificuldade.

À professora Dra. Rubiana Mara Mainardes pelo apoio que me deu desde o mestrado, me auxiliando sempre que necessitei, muito obrigada!

Às professoras Dra. Jessica Mendes Nadal e Dra. Andressa Novatski, por todo auxílio e ensinamentos.

Aos meus colegas do laboratório de pesquisa Adriana, Guilherme, Loanda e Amanda por todo apoio durante o curso, que encararam junto comigo as dificuldades e angustias da rotina na pesquisa, e sempre me ajudaram muito. Além de tornar a caminhada mais leve.

Aos demais colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Às minhas amigas Ana Paolla, Annelise, Brenda, Fabiane, Francistiele e Milena pela amizade, disponibilidade e pelas oportunas manifestações de companheirismo, encorajamento e apoio.

Aos funcionários e técnicos de laboratório que sempre me atenderam com muito respeito, pela ajuda no decorrer deste trabalho, em especial, a Ester, Lucas, Oscar e Marilene.

Ao CLABMU e CLABMU-SEBISA, e seus técnicos, pelo auxílio na realização das análises.

À Bioclin-Quibasa pela doação dos kits de avaliação bioquímica.

Aos professores da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEPG/ Unicentro pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos e pela dedicação nas disciplinas ministradas.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

E, à todos aqueles que, de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“Nenhuma mente que se abre para uma
nova ideia voltará a ter o tamanho
original.”

ALBERT EINSTEIN

RESUMO

O aumento do número de idosos em todo o mundo tem sido acompanhado por níveis crescentes de preocupação com a manutenção da qualidade de vida. Esta perspectiva inclui combater os sinais do envelhecimento cutâneo, com compostos que auxiliem a minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres e do processo inflamatório desencadeado pelo envelhecimento, como é o caso do ácido ursólico. No entanto, sua utilização clínica é bastante reduzida, devido à sua baixa solubilidade aquosa. Por esse motivo é necessário o estudo de alternativas tecnológicas que consigam sanar as limitações e otimizar suas ações. E para que estas partículas tenham sua ação otimizada no organismo estão sendo utilizados modificadores de superfície que além de contribuir com a permanência no organismo, possibilitam uma interação mais eficiente com as células. Assim, o objetivo deste trabalho foi sintetizar o polímero poli(ácido láctico) (PLA) e produzir nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido ursólico (AU) por meio dele, com diferentes modificações de superfície utilizando polietilenoglicol (PEG) e ácido siálico (AS) e avaliar essas partículas em um modelo de cicatrização em animais ooforectomizados para investigar a síntese de colágeno. As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, espectroscopia de infravermelho, difração de raios X e morfologia. Foram realizados o ensaio de estabilidade e a validação de um método analítico em UHPLC. Em um modelo *in vivo* de cicatrização foi avaliada a retração da lesão, avaliação histológica da espessura da pele, contagem de neutrófilos, macrófagos, angiogênese e avaliação da síntese de colágeno, além da avaliação da toxicidade. As nanocápsulas apresentaram características adequadas de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, além de não terem apresentado na espectroscopia de infravermelho o surgimento de interações químicas após a nanoencapsulação, no entanto esse processo levou a uma amorfização do sistema. O estudo de estabilidade revelou que a melhor condição de armazenamento é em geladeira. Também foi comprovado que o AU apresenta atividade de inibição da collagenase. A avaliação da atividade *in vivo* demonstrou que as nanocápsulas contendo AU e AU-AS levam a uma retração mais acelerada, com modulação do processo inflamatório e estimulação macrofágica, aumento da angiogênese, e estímulo da síntese de colágeno tipo I. Os tratamentos com as nanocápsulas não apresentaram sinais de toxicidade. Em resumo, esses dados evidenciam que o encapsulamento de UA usando nanocápsulas de núcleo de lipídio e o recobrimento com AS foram abordagens adequadas para contornar a baixa solubilidade em água do UA, melhorar o efeito farmacológico do composto quando usado por via intradérmica e para fornecer uma melhor resolução do processo de cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Nanotecnologia, PLA, modificação de superfície, colágeno, envelhecimento

ABSTRACT

The increasing numbers of elderly people worldwide has been accompanied by rising levels of concern regarding the maintenance of quality of life. These concerns include combating the signs of skin aging by using active ingredients that help to minimize the harmful effects of free radicals and the inflammatory process triggered by aging. Ursolic acid has been used for this purpose; however, its clinical use is limited due to its low aqueous solubility. For this reason, it is necessary to study technological alternatives that can overcome this limitation and improve the action of ursolic acid. Surface modifiers have been utilized to optimize the action of particles in the organism; in addition to contributing to the permanence of these particles in the organism they provide more efficient interaction with cells. Thus, the objectives of this study were to synthesize poly (lactic acid) polymer (PLA) and to produce lipid core nanocapsules containing ursolic acid (UA) with different surface modifications using polyethylene glycol (PEG) and sialic acid (SA); and also to evaluate these particles in a healing model in oophorectomized animals to investigate collagen synthesis. The nanocapsules were prepared by the interfacial deposition method of the preformed polymer and were characterized in terms of particle size, polydispersity index, zeta potential, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and morphology. The stability test and the validation of an analytical method using UHPLC were performed. An in vivo healing model was used to evaluate the retraction of the lesion. The following were evaluated: histological skin thickness; neutrophil count; macrophages; angiogenesis; collagen synthesis; and toxicity. The nanocapsules showed adequate characteristics in relation to particle size, polydispersity index, and zeta potential. There was no appearance of chemical interactions in the infrared spectroscopy after nanoencapsulation; however, this process led to an amorphization of the system. The stability study revealed that the best storage condition was under refrigeration. It was shown that UA had collagenase-inhibiting activity. The evaluation of in vivo activity demonstrated that the nanocapsules containing UA and UA-SA had a more accelerated retraction, with modulation of the inflammatory process and macrophage stimulation, increased angiogenesis, and stimulation of type I collagen synthesis. The treatments with the nanocapsules showed no signs of toxicity. In summary, these data show that UA encapsulation using lipid core nanocapsules and SA coating were appropriate approaches to circumvent UA's low water solubility, improve the drug's pharmacological effect when used intradermally, and to provide an better resolution of the wound healing process.

Keywords: nanotechnology; PLA; surface modification; collagen; aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do ácido ursólico	25
Figura 2- Esquema nanocápsula de núcleo lipídico	28
Figura 3- Estrutura do poli(ácido láctico)	30
Figura 4- Estrutura química do polietilenoglicol	33
Figura 5- Estrutura química do ácido siálico	34
Figura 6- Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa. ...	36
Figura 7- Esquema de aplicação do tratamento nas lesões.....	46
Figura 8- Espectro na região do infravermelho do poli(ácido láctico) –PLA.	49
Figura 9- Cromatogramas da nanocapsula preparada sem o fármaco: NPLA-0 (B); em comparação com o ácido ursólico para seletividade	51
Figura 10- Curva analítica do ácido ursólico. Fase móvel acetonitrila:água (92:08, v/v) em 203 nm (n=3). Equação da reta: $y = 8065,1x - 6096$	52
Figura 11- Espectro na região do infravermelho do PLA, ácido ursólico, mistura física (PLA:ácido ursólico), nanopartículas de PLA controle e nanopartículas de PLA contendo ácido ursólico.	61
Figura 12- Espectro na região do infravermelho do PLA, ácido ursólico, ácido siálico, mistura física (PLA:ácido ursólico:ácido siálico), nanopartículas de PLA – ácido siálico controle e nanopartículas de PLA – ácido siálico contendo ácido ursólico.....	62
Figura 13- Espectro na região do infravermelho do PLA, ácido ursólico, polietilenoglicol, mistura física (PLA:ácido ursólico: polietilenoglicol), Nanopartículas de PLA – polietilenoglicol controle e nanopartículas de PLA-polietilenoglicol contendo ácido ursólico.	63
Figura 14- Difrátogramas do ácido ursólico puro, do PLA e das nanocápsulas NPLA-AU e NPLA-0	64
Figura 15- Difrátogramas do ácido ursólico puro, do PLA, PEG e das nanocápsulas NPLA-PEG-AU e NPLA-PEG-0.....	65
Figura 16- Difrátogramas do ácido ursólico puro, do PLA, do ácido siálico e das nanocápsulas NPLA-AS-AU e NPLA-AS-0.	66
Figura 17- Fotomicrografias das nanocápsulas obtidas por FEG: A) NPLA-0 (aumento de 17Kx); B) NPLA-AU (aumento de 7.90Kx); C) NPLA-PEG-0 (aumento 37Kx); D) NPLA-PEG-AU (aumento 21Kx); E) NPLA-AS-0 (aumento 8Kx); F) NPLA-AS-AU (aumento 90Kx). Continua na página 66.....	67

Figura 18- Porcentagem de inibição da collagenase pelo ácido ursólico (AU) nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg/mL. 69

Figura 19- Imagens das lesões nos dias de biópsia dos grupos veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) nos dias 0, 7, 14 e 21. 76

Figura 20- Porcentagem de retração das lesões nos dias 7, 14 e 21, para os grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 77

Figura 21- Dosagem de fibrinogênio nos dias 7,14 e 21 nos grupos de animais tratados com veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 78

Figura 22- Medida da espessura da epiderme (A) e da derme (B) no dia 21, para os grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 80

Figura 23- Contagem de neutrófilos nos dias 7 (A), 14 (B) e 21 (C), nos grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 83

Figura 24- Contagem de macrófagos nos dias 7 (A), 14 (B) e 21 (C), nos grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 85

Figura 25- Número de novos vasos nos dias 7 (A), 14 (B) e 21 (C), nos animais controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) 88

Figura 26- Imagens das fibras de colágeno I (vermelho) e III (verde) dos grupos veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) nos dias 14 e 21. Coloração Picrosirius Red, aumento 200X..... 91

Figura 27- Porcentagem em pixels de colágeno tipo III nos dias 14 (A) e 21 (B) dos grupos controles (CTRL e CTRL OVX), tratados com ácido ursólico livre (AU Livre) e nanocápsulas vazias (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas com a presença do ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 92

Figura 28- Porcentagem em pixels de colágeno tipo I nos dias 14 (A) e 21 (B) dos grupos controles (CTRL e CTRL OVX), tratados com ácido ursólico livre (AU Livre) e nanocápsulas vazias (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas com a presença do ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU). 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das formulações de nanocápsulas contendo ácido ursólico.....	38
Tabela 2- Divisão de grupos experimentais	44
Tabela 3- Condições cromatográficas utilizadas para validação do método analítico por UHPLC.....	52
Tabela 4- Resultados de ANOVA para linearidade do método	53
Tabela 5- Parâmetros da curva analítica do ácido ursólico.....	53
Tabela 6- Dados da repetitividade e precisão intermediária para amostras de ácido ursólico	54
Tabela 7- Dados obtidos na análise de exatidão pelo método de recuperação para o ácido ursólico.	55
Tabela 8- Variações do método para avaliação da robustez para o ácido ursólico.....	56
Tabela 9- Diâmetro médio e índice de polidispersão* nas nanopartículas de PLA nas suas diversas formulações.	57
Tabela 10- Valores de Potencial Zeta* das nanocápsulas de PLA e suas diversas formulações.	58
Tabela 11- Eficiência de encapsulação* do ácido ursólico nas nanocápsulas de núcleo lipídico.....	59
Tabela 12- Valores de tamanho de partícula das nanosuspensões submetidas a diferentes condições de temperatura como: Temperatura ambiente (TA), geladeira (G) e congelador (C), nos tempos de 30, 60, 90 e 180.....	72
Tabela 13- Valores de potencial zeta das nanosuspensões submetidas a diferentes condições de temperatura como: temperatura ambiente (TA), geladeira (G) e congelador (C), nos tempos de 30, 60, 90 e 180.....	74
Tabela 14- Contagem de células brancas (WBC), neutrófilos (NEUT) e linfócitos (LYN) nos animais tratados com veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) nos dias 7, 14 e 21.....	96
Tabela 15- Efeito dos tratamentos com veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e	

NPLA-PEG-AU) na atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CREAT) nos dias 7, 14 e 21..... 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ANOVA	Análise de variância
AS	Ácido siálico
AU	Ácido ursólico
C	Congelador
COX-2	Ciclo-oxigenases 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X
EE	Eficiência de encapsulamento
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FEG	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo
FTIR	Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier
G	Geladeira
HE	Hematoxilina e Eosina
ICH	Conselho internacional para a harmonização dos requisitos técnicos para produtos farmacêuticos para uso humano
IgM	Imunoglobulina M
IPD	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LNC	Nanocápsulas de núcleo lipídico
LOX	Lipo-oxigenases
LQ	Limite de quantificação
MEC	Matriz extracelular
MMP's	Metaloproteinases de matriz
NAEVI	Núcleo avançado de estudo da vida
NF- κ β	Fator nuclear kappa β
NPLA-0	Nanocápsulas de poli(ácido láctico) controle
NPLA-AS-0	Nanocápsulas de poli(ácido láctico) com ácido siálico controle

NPLA-AS-AU	Nanocápsulas de poli(ácido láctico) com ácido siálico contendo ácido ursólico
NPLA-AU	Nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo ácido ursólico
NPLA-PEG-0	Nanocápsulas de poli(ácido láctico) com polietilenoglicol controle
NPLA-PEG-AU	Nanocápsulas de poli(ácido láctico) com polietilenoglicol contendo ácido ursólico
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
RES	Sistema reticulo endotelial
RDC	Resolução de diretoria colegiada
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
TA	Temperatura ambiente
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
UVB	Radiações ultravioletas tipo B
NF-AT	Fator nuclear de células T ativadas
AP-1	Proteína ativadora-1
DP	Desvio padrão
CTRL	Grupo controle – animais não ooforectomizados
CTRL OVX	Grupo controle – animais ooforectomizados
AU Livre	Grupo de animais tratados com ácido ursólico livre
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador- β 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
HIF-1 α	Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa
AP-1	Proteína ativadora-1
MAPKs	Proteína ativada por mitógenos quinases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 PELE	22
3.2 ENVELHECIMENTO	23
3.3 ÁCIDO URSÓLICO	25
3.4 NANOTECNOLOGIA.....	27
3.5 POLI(ÁCIDO LÁCTICO) – PLA	29
3.6 MODIFICADORES DE SUPERFÍCIE.....	30
3.6.1 Polietilenoglicol (PEG).....	32
3.6.2 Ácido siálico	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	36
4.2 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁCTICO) – PLA.....	37
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO E MEDIDA DA MASSA MOLAR.....	37
4.4 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO (AU)	38
4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA (<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography- UHPLC</i>).....	39
4.5.1 Equipamento e condições cromatográficas.....	39
4.5.2 Preparo das soluções padrão.....	39
4.5.3 Desenvolvimento e validação do método	40
4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	41
4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO	42
4.7.1 Espectrometria de difração a laser	42
4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy – FEG-SEM</i>)	42
4.7.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR</i>)	42
4.7.4 Difração de raios X (<i>X Ray Diffraction – DRX</i>)	43
4.8 ESTABILIDADE.....	43

4.9 ENSAIO ENZIMÁTICO.....	43
4.9.1 Verificação da inibição da atividade da enzima collagenase.....	43
4.10 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	44
4.10.1 Técnica de ooforectomia	45
4.10.2 Produção das lesões	45
4.10.3 Tratamento das lesões	45
4.10.4 Avaliação da retração da lesão	46
4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	46
4.11.1 Hematoxilina Eosina.....	46
4.11.2 <i>Picrosirius red</i>	47
4.12 ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA.....	47
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁCTICO).....	49
5.1.1 Caracterização do poli(ácido láctico) – PLA	49
5.2 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO	50
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR UHPLC PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO URSÓLICO EM NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO	50
5.3.1 Linearidade.....	52
5.3.2 Precisão	54
5.3.3 Exatidão	55
5.3.4 Robustez	55
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	56
5.4.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão.....	56
5.4.2 Potencial zeta.....	58
5.4.3 Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco	59
5.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	60
5.4.5 Difração de raios X (DRX)	63
5.4.6 Análise Morfológica de superfície.....	67
5.4.7 Verificação da inibição da atividade da enzima collagenase.....	68
5.4.8 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo ácido ursólico	70
5.5 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	75
5.5.1 Análise de retração da lesão	77
5.5.2 Dosagem de fibrinogênio.....	79

5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	79
5.6.1 Resposta inflamatória.....	80
5.6.2 <i>Picrosirius red</i>	90
5.7 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	95
5.8 ANALISE BIOQUIMICA.....	97
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXO A- CARTAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	117
ANEXO B- ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES À TESE	120

1 INTRODUÇÃO

Institutos de pesquisa vem demonstrando a inversão da pirâmide etária: estatísticas das Nações Unidas relatam que a população com idade superior a 65 anos quase triplicará nos próximos 50 anos. Estima-se que esse valor passe de 730 milhões para cerca de 2 bilhões nesse período (UNITED NATIONS, 2019). Assim, novas medidas efetivas devem ser tomadas para que essa população envelhecida mantenha sua qualidade de vida (SUZMAN *et al.*, 2015).

Sabe-se que o envelhecimento cutâneo é um processo complexo e natural, que é influenciado pela associação de fatores intrínsecos e extrínsecos, provocando alterações cumulativas tanto estruturais como fisiológicas na pele (AFORNALI; LORENCINI, 2016). O aumento desta faixa da população leva, possivelmente, a um crescimento na utilização de produtos que atenuem os danos causados pelo processo de envelhecimento e levem a uma intensificação da busca por produtos dermatofarmacológicos, especialmente os voltados para a prevenção do envelhecimento cutâneo (SINGH; AGARWAL, 2009).

Além disso, percebe-se um maior interesse dos consumidores por produtos sustentáveis, e também uma maior busca por produtos que reduzam os sinais do envelhecimento desenvolvidos a partir de fitocompostos, por possuírem potencial biológico confirmado (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Nessa perspectiva, o ácido ursólico (AU) que é um composto de origem natural vem se destacando, principalmente devido a sua ampla gama de atividades farmacológicas, dentre elas, o efeito antioxidante, que pode contribuir para redução dos danos causados pelos radicais livres (BERTONCELLO *et al.*, 2016). E a atividade anti-inflamatória que auxilia na redução da secreção de citocinas pró inflamatórias (CHECKER *et al.*, 2012), podendo contribuir com a diminuição da inflamação crônica observada em decorrência do envelhecimento. Apesar disso este composto possui características que limitam a sua utilização e reduzem a sua eficácia, como a baixa solubilidade que limita a sua biodisponibilidade a cerca de 8% (ZHANG *et al.*, 2017), sendo fundamental o estudo de novas tecnologias que aperfeiçoem e sanem esse problema.

Diante disso, a nanotecnologia pode ser empregada como uma alternativa para a resolução dessas limitações por otimizar o seu efeito, pois as nanopartículas alteram algumas características inerentes ao fármaco possibilitando: diminuição da

dosagem, seletividade para tecidos e células, aumento da biodisponibilidade, redução dos efeitos colaterais e liberação controlada (ASAI, 2012).

No entanto, existe uma preocupação em relação a estas partículas, pois são muitas vezes eliminadas do organismo rapidamente pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) ou não conseguem interagir de maneira eficiente com o organismo. Por isso, novas estratégias têm sido estudadas para que estas partículas permaneçam por mais tempo no organismo e consigam exercer de maneira eficiente sua ação no tecido, nesse contexto, a funcionalização de superfície vem ganhando muita atenção (PAPAKOSTAS *et al.*, 2011).

O polímero mais utilizado com essa finalidade é o polietilenoglicol (PEG). Porém, atualmente, a sua interação com o sistema imune é percebida, levando à produção de anticorpos anti-PEG, o que faz com que ele perca a sua característica furtiva (GRENIER *et al.*, 2018). Por essa razão, novas estratégias têm sido estudadas como alternativa ao PEG, sendo uma delas, o ácido siálico.

Os ácidos siálicos (AS) são monossacarídeos localizados na superfície celular e possuem a capacidade de atuar como sítios de reconhecimento biológico e também como agentes anti-reconhecimento, por apresentarem a habilidade de interagir com a família das lectinas (Siglec) que são uma família de receptores reguladores imunológicos (BÜLL *et al.*, 2017), devido a essas características é um composto que vem sendo discutido para utilização como modificador de superfície, pelo fato de favorecer a interação da partícula com as células, possuir capacidade de direcionamento e reduzir a interação com os fagócitos (GHOSH, 2020).

O polímero de escolha para desenvolver as nanocápsulas foi o poli(ácido láctico) (PLA) que é um polímero de características ideais para o encapsulamento de substâncias lipofílicas, e possuidor de ótimas propriedades para uso como biomaterial, podendo favorecer a ação do ácido ursólico devido a sua condição de bioestimulador dérmico (TYLER *et al.*, 2016), pois quando implantado o PLA promove uma reação inflamatória que desencadeia o recrutamento de macrófagos estimulando a síntese de colágeno pelos fibroblastos (RAY; TA, 2020).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi realizar a síntese do poli(ácido láctico), desenvolver e avaliar nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido ursólico e tendo como modificadores de superfície o PEG e o ácido siálico, visando a aplicação intradérmica, e avaliar a ação destas partículas na cicatrização de feridas e na síntese de colágeno em um modelo *in vivo* de ratas ooforectomizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar *in vivo* nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo ácido ursólico e com recobrimentos de superfície com PEG e ácido siálico em um modelo de cicatrização de feridas em ratas ooforectomizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a síntese do poli(ácido láctico) pelo método de policondensação;
- Realizar a caracterização espectroscópica do material polimérico obtido;
- Obter as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico de PLA, PLA-AS e PLA-PEG, contendo ácido ursólico;
- Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de ultra alta eficiência – UHPLC para quantificação do ácido ursólico;
- Determinar a eficiência de encapsulação (EE) nas nanocápsulas, pelo método de UHPLC;
- Caracterizar os sistemas poliméricos obtidos por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos;
- Avaliar a estabilidade das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico;
- Verificar a bioatividade do ácido ursólico por meio da avaliação da ação inibidora da enzima colagenase;
- Avaliar *in vivo* em um modelo de cicatrização utilizando ratas ooforectomizadas o efeito das nanocápsulas nas alterações macroscópicas;
- Avaliar as alterações histológicas nos tecidos das lesões tratadas com as nanocápsulas de núcleo lipídico;
- Avaliar o efeito dos tratamentos nos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais e hematológicos;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE

A pele é tida como o maior órgão do corpo humano, abrangendo como área de superfície em torno de 1,5 a 2,0 m² o que representa aproximadamente 8 a 17% do peso corporal (EKLOUH-MOLINIER *et al.*, 2015; MIKESH *et al.*, 2013). É constituída por uma estrutura extremamente organizada e especializada que tem como função proteger contra a entrada de patógenos, agentes nocivos químicos ou físicos, evitar a perda de água e fluidos extracelulares e regular a temperatura corporal, também atua na percepção sensorial, reações imunológicas e síntese de hormônios (GILABERTE *et al.*, 2016).

A epiderme, derme e a hipoderme formam as três camadas que compõe a pele, sendo que a epiderme é constituída por um epitélio estratificado formado por queratinócitos (85% do total de células), células de Langerhans e células de Merkel, organizados em camadas denominadas de acordo com a sua posição e propriedade estrutural (AFORNALI; LORENCINI, 2016).

A camada mais externa é a córnea que é composta por células anucleadas achatadas, que se organizam em lamelas e são envolvidas por uma matriz lipídica contínua, seguida da camada granulosa onde são produzidos constituintes estruturais; depois dela temos a camada espinhosa que contém células com formato poliédrico, núcleo arredondado, que possuem grandes feixes de queratina, nesta camada formam-se anexos intercelulares chamados desmossomos; por fim temos, a camada basal que é formada por queratinócitos em forma de coluna, cujas células são mitoticamente ativas e se ligam por meio de filamentos de queratina (CHU, 2008; LOSQUADRO, 2017).

A derme está situada abaixo da epiderme, e é constituída essencialmente de tecido conjuntivo formado por fibras colágenas, elásticas e substância amorfa, sendo esses constituintes os responsáveis por proporcionar força, elasticidade, viscosidade e hidratação à pele (GILABERTE *et al.*, 2016), ela promove a entrega de nutrientes e oxigênio além da capacidade de remover produtos tóxicos (MARWAH *et al.*, 2014).

O tipo celular que está presente em maior quantidade na derme é o fibroblasto, sendo ele o responsável pela secreção de muitas das proteínas da matriz extracelular (MEC), também estão presentes outros tipos celulares como macrófagos

e linfócitos; bem como vasos sanguíneos, nervos e anexos cutâneos como: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (LAI-CHEONG, 2013, PEREIRA *et al.*, 2013; WOLK; WITTE; SABAT, 2010).

O colágeno é o principal constituinte da derme, pertence a uma família de proteínas presentes em toda pele e tecido conjuntivo do corpo humano. Os tipos que estão presentes em maior quantidade na pele são o colágeno tipo I que abrange aproximadamente 80% da derme conferindo resistência a tração e o colágeno tipo III que representando aproximadamente 15% é responsável pela flexibilidade da pele (LOSQUADRO, 2017).

Já a hipoderme, é formada por células adiposas envolvidas por tecido conjuntivo frouxo que possuem como função a reserva de energia, isolamento e proteção contra choques físicos (PEREIRA *et al.*, 2013; WOLK; WITTE; SABAT, 2010).

Por ser um órgão de proteção e devido a sua exposição contínua, a pele acumula os efeitos deletérios gerados pelo meio ambiente, ocasionando alterações no seu desempenho normal com mudanças físicas, químicas e mecânicas – incluindo o envelhecimento (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011).

3.2 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento cutâneo é um processo biológico natural e complexo que é influenciado por uma associação de fatores que agem sinergicamente, e são responsáveis por causar alterações estruturais e fisiológicas cumulativas na pele, este processo pode ser acelerado devido a fatores externos principalmente pela radiação ultravioleta; ele é classificado em intrínseco ou extrínseco (AFORNALI; LORENCINI, 2016; MINE *et al.*, 2008).

O envelhecimento extrínseco é um processo cumulativo e que pode ser atenuado, ele se dá por meio da exposição da pele à poluição, do consumo excessivo de álcool e fumo, vida sedentária e má alimentação, além da radiação ultravioleta que é a principal causa relacionada ao envelhecimento extrínseco sendo chamado de fotoenvelhecimento, pois estimula o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO's) causando um dano oxidativo às células (GIANETI; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2013; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011).

O acúmulo de ERO's e o estresse oxidativo favorece o desenvolvimento de um fenótipo de pele senil que possui como característica rugas grosseiras e profundas, pele áspera, melanoses, queratoses actínicas e um decréscimo intenso da elasticidade (AFORNALI; LORENCINI, 2016). Além do mais, apresenta aumento da síntese e da atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), da expressão de citocinas pró-inflamatórias assim como estimula a inflamação crônica de baixo grau o que provoca alterações prejudiciais a pele (THORNTON, 2013).

Já o envelhecimento natural, geneticamente programado que ocorre com o passar da idade é conhecido como intrínseco, as alterações nele observadas são: rugas finas, perda da elasticidade, redução da densidade e da MEC, afinamento da derme e da epiderme, assim como o achatamento da junção dermoepidermica em decorrência da síntese diminuída ou defeituosa tanto do colágeno como da elastina (AFORNALI; LORENCINI, 2016; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011). A pele intrinsecamente envelhecida apresenta disfunção endotelial, o que acarreta em uma diminuição da função da microvasculatura, redução da capacidade angiogênica, expressão aberrante de moléculas de adesão e função vasodilatadora prejudicada (ZHANG; DUAN, 2018).

Além dos resultados do envelhecimento cronológico, as mulheres são também acometidas pelos efeitos do envelhecimento climatérico, que está relacionado a redução da secreção de estrogênios (TONČLÍČ *et al.*, 2018). Este hormônio já é conhecido por possuir a capacidade de modular naturalmente as MMPs, inibindo as que possuem como função degradar colágeno, aumentam a umidade e o turgor cutâneo, estimulam a proliferação de queratinócitos e o aumento da viabilidade dos fibroblastos, o que favorece uma melhor qualidade da cicatrização de feridas, além do mais agem como antioxidantes naturais preservando do estresse oxidativo e da inflamação (ARCHER, 2012; LEPHART, 2018; THORNTON, 2013).

Desse modo o declínio de estrogênio impacta profundamente na saúde e qualidade da pele, quer pelo envelhecimento cronológico ou pela menopausa induzida por cirurgia (TÖZ *et al.*, 2016). A sua deficiência intensifica muitas das alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento extrínseco e intrínseco compreendendo alterações na função de barreira da pele com uma redução da percepção sensorial e da dor, decréscimo da função imunitária e também da produção de vitamina D (THORNTON, 2013).

O percentual de redução de colágeno ao ano nas mulheres pós-menopausadas chega a 2%, e sabe-se que o colágeno tipo I e III presente na pele é reduzido em até 30% durante os 5 primeiros anos após a menopausa, em consequência ocorre uma redução da espessura da pele a uma taxa de 1,13% ao ano (MONTELEONE *et al.*, 2018; THORNTON, 2013).

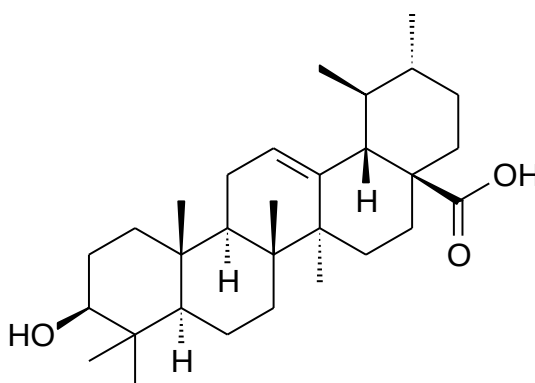
As mulheres estão apresentando um aumento da longevidade, mas mantem-se estável a idade de início da menopausa, devido a isso uma fração cada vez maior da vida da mulher acontece no estado pós-menopausa (LABRIE, 2015). Segundo o Relatório sobre o Envelhecimento da População Mundial das Nações Unidas o número de pessoas com idade maior que 60 anos irá duplicar e maiores que 80 anos quadruplicar até 2100 (UNITED NATIONS, 2019).

Devido a estes dados, fica mais evidente a importância de manter a integridade funcional e anatômica da pele, por isso está sendo observado um crescente aumento dos estudos sobre substâncias extraídas de plantas e com ação antioxidante e anti-inflamatória que tem como objetivo atenuar os processos envolvidos no envelhecimento (KO *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2010), como é o caso do ácido ursólico que será tratado a seguir.

3.3 ÁCIDO URSÓLICO

Os triterpenoides pentacíclicos compõe uma classe importante de fitoquímicos que estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o ácido ursólico (3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico) um importante representante desta classe (XIANG *et al.*, 2015), sua estrutura química está representada na figura 1.

Figura 1 - Estrutura química do ácido ursólico



Fonte: O autor.

Possui como característica ser um sólido cristalino branco, que tem como ponto de fusão o intervalo entre 285 - 288 °C, peso molecular 456,68 g.mol⁻¹, pKa 5,29, log *P* = 6,5 e fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃ (ELOY; MARCHETTI, 2014; MLALA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015).

O ácido ursólico é um metabólito secundário das plantas, e normalmente é encontrado nas cascas das frutas e no caule ou nas folhas (WOŨNIAK; SKAPSKA; MARSZALEK, 2015).

Dentre as plantas que apresentam alto teor de ácido ursólico e com significância como fonte deste composto, podemos incluir o ginseng (*Panax ginseng* CA Mey.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), calêndula (*Calendula officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e melaleuca (*Melaleuca dendron* F.Muell.), e na camada cerosa de frutos comestíveis como a maçã (*Malus domestica* Borkh.), pêra (*Pyrus pyrifolia* Nakai.), ameixa (*Prunus domestica* L.) e outras (NGO; WILLIAMS; HEAD, 2011; SZAKIEL *et al.*, 2012).

Apresenta baixa toxicidade tendo então um perfil farmacológico seguro (CHEN *et al.*, 2011; ANTONIO *et al.*, 2016), uma diversidade de estudos vem relatando seus efeitos farmacológicos principalmente os que tangem à atividade antioxidante, anti-inflamatória e o seu efeito antitumoral (LIU, 1995; LU *et al.*, 2010 (HABTEMARIAM, 2019; YANG *et al.*, 2021).

Outros estudos vêm relatando suas propriedades antialérgicas e analgésicas (LIU, 1995), atividade antimicrobiana (HORIUCHI *et al.*, 2007), bem como seu potencial em inibir a atrofia muscular (KUNKEL *et al.*, 2011) e diminuir a expressão das metaloproteinases de matriz (BOTH, 2002).

Está sendo relatado que o AU diminui a produção de EROs intracelulares, normaliza o efeito oxidativo da radiação UVB em decorrência da inibição da peroxidação lipídica e contribui para um melhor mecanismo de reparo de DNA devido a sua ação antioxidante (LÓPEZ-HORTAS *et al.*, 2018; RAMACHANDRAN *et al.*, 2008, RAMOS; PEREIRA-WILSON; COLLINS, 2010)

Já o efeito anti-inflamatório atribuído ao AU decorre da supressão do NF-κB (fator nuclear kappa B), e de genes regulados por esse fator como citocinas pró-inflamatórias, ciclooxigenases-2 (COX-2) e lipooxigenases (LOX), seu mecanismo também está ligado à inibição da liberação de histamina dos mastócitos e da atividade da óxido nítrico sintase induzida (CHECKER *et al.*, 2012), além de também possuir a

capacidade de inibir fatores que são importantes para regulação da resposta imune induzida por antígeno como NF-AT (fator nuclear de células T ativadas), AP-1 (proteína ativadora-1) e também MAPKinases (CHECKER *et al.*, 2012).

Na pele sua ação está associada ao aumento da expressão de proteínas fundamentais para a diferenciação terminal dos queratinócitos (involucrina, loricrina e filagrina), e a capacidade de aumentar os lípidos intercelulares, principalmente a ceramida, fatos estes que levam a uma melhora da recuperação da barreira epidérmica (BOTH *et al.*, 2002, FARWICK *et al.*, 2014).

Mas apesar do ácido ursólico ser altamente estudado quanto às suas propriedades farmacológicas, ele se caracteriza como um desafio tecnológico por possuir baixa solubilidade aquosa (aproximadamente $5,6 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), o que leva a uma fraca farmacocinética e causa baixa biodisponibilidade, o que pode reduzir a sua interação com o organismo a cerca de 8%, essas características acabam por restringir a sua potencial aplicação clínica (SILVA; OLIVEIRA; DUARTE, 2016; WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017)

Por isso novas estratégias são necessárias para desenvolver e explorar sistemas eficientes de administração de fármacos que consigam melhorar a sua eficácia terapêutica (BAISHYA *et al.*, 2016), como o uso da nanotecnologia.

3.4 NANOTECNOLOGIA

Atualmente, um dos maiores desafios da indústria farmacêutica é desenvolver fármacos com o máximo de seu efeito terapêutico e com redução de seus efeitos adversos (KINGSLEY *et al.*, 2006), pois aproximadamente 40% das substâncias descobertas são deixadas de lado, principalmente, por apresentarem baixa solubilidade e biodisponibilidade (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

A fim de sanar esses problemas, a utilização da nanotecnologia alterou o panorama das indústrias farmacêuticas por possibilitar o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes, com maior biocompatibilidade e aproveitamento de todo seu potencial de ação (FIGUEIRAS *et al.*, 2014; KAMALY, 2012).

As nanopartículas são uma das mais importantes tecnologias dentre os sistemas de liberação de fármacos, uma vez que possuem estabilidade coloidal, atravessam barreiras fisiológicas, tem a capacidade de se ligar a sítios específicos e são de fácil produção (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

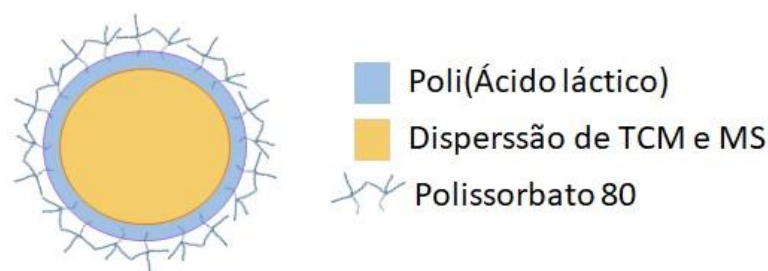
Também possuem a capacidade de reduzir a toxicidade dos compostos, proporcionam uma liberação contínua e controlada do fármaco apresentando também a capacidade de modificar as suas propriedades físico-químicas, aumentando sua biodisponibilidade e protegendo-os de processos de degradação e inativação (FRANK *et al.*, 2015).

Na área da nanomedicina, estas partículas são caracterizadas por apresentar diâmetros que variam de 1 nm até 1000 nm, podendo ser constituídas por material biodegradável como polímeros naturais ou sintéticos, lipídeos, fosfolipídios e metais (SU *et al.*, 2017).

Uma diversidade de tipos de nanocarreadores estão relatados na literatura e possuem diferentes aplicações incluindo: nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanotubos de carbono, nanopartículas lipídicas, dendrímeros e nanopartículas metálicas (SU *et al.*, 2017), as nanopartículas poliméricas são classificadas segundo a sua morfologia em nanocápsulas e nanoesferas (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

As nanocápsulas de núcleo lipídico são um tipo particular de nanocápsulas poliméricas, em que sua fase interna é composta por um organogel formado no núcleo pela combinação do monoestearato de sorbitano (MS) e triglicerídeos de cadeia média (TCM) (Figura 2) (VENTURINI *et al.*, 2011).

Figura 2- Esquema nanocápsula de núcleo lipídico



Fonte: O autor.

E esta característica confere ao nanocarreador uma maior capacidade de carregamento quando comparado com formulações de nanocápsulas que não utilizaram monoestearato de sorbitano (CÉ *et al.*, 2016), além disso tem sua estabilidade favorecida devido a presença de micelas de polisorbato 80 na sua superfície (VENTURINI *et al.*, 2011).

O interesse na utilização de nanopartículas para aplicação dermatológica vem crescendo nos últimos anos, estando presente em diversas áreas, como por exemplo, em cosméticos na forma de nanoemulsões, nanopigmentos e na veiculação de fármacos, no auxílio de diagnóstico não-invasivo de neoplasias, no tratamento de doenças inflamatórias e cicatrização de feridas (MORDORSKI; LANDRISCINA; FRIEDMAN, 2016).

No entanto, sabe-se que a permeação cutânea é prejudicada por um grande número de fatores, o que gera uma redução da absorção de compostos de aplicação tópica e como resultado uma perda da sua biodisponibilidade (FORTENBACH; MAIBACH, 2008; SWART *et al.*, 2005).

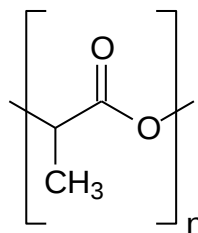
Esses fatores podem ser referentes às características fisiológicas ou fisiopatológicas da pele, bem como às propriedades físico-químicas, excipientes e à forma farmacêutica a que estes compostos são vinculados (FORTENBACH; MAIBACH, 2008; SWART *et al.*, 2005).

Por esses motivos, nanopartículas que são formadas por polímeros são transportadores apropriados para veiculação de compostos na pele, como antioxidantes, pois estas partículas conferem alta estabilidade ao princípio ativo, também proporcionam uma maior taxa de absorção, reduzindo a irritação da pele o que é interessante a uma grande gama de compostos (MIHRANYAN; FERRAZ; STRØMME, 2012).

3.5 POLI(ÁCIDO LÁCTICO) – PLA

Dentre os polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis temos o poli(ácido láctico), um poliéster alifático termoplástico que é formado por meio da polimerização de monômeros do ácido láctico (Figura 3) (LASPRILLA *et al.*, 2012). Sua massa molar pode variar em decorrência do seu método de produção, no entanto as mais comumente comercializadas variam de 5.000 a 20.000 g/mol (SIGMA-ALDRICH, 2020).

Figura 3- Estrutura do poli(ácido láctico)



Fonte: O autor.

É um polímero que é produzido por processos renováveis, pois o seu monômero é oriundo da fermentação de açúcares como a cana de açúcar (LASPRILLA *et al.*, 2012). Por esse motivo é classificado como um biopolímero, devido a sua produção utilizar um subproduto da manufatura do açúcar, que é disponível em grande quantidade no Brasil, fazendo dele um produto sustentável e ambientalmente correto (LASPRILLA *et al.*, 2012).

A degradação do poli(ácido láctico) acontece principalmente por hidrólise, produzindo ácido láctico que é metabolizado pelo ciclo do ácido tricarboxílico gerando subprodutos atóxicos que são eliminados na forma de gás carbônico e água (CIFUENTES *et al.*, 2016).

A utilização do PLA está aumentando mais de 10% ao ano, fazendo dele um dos polímeros mais importantes para o uso biomédico, devido também à sua capacidade de adaptação para diferentes necessidades da área (SILVA *et al.*, 2018), como em próteses, suturas, parafusos reabsorvíveis, stents, na engenharia de tecidos, na liberação modificada de fármacos, como preenchedor e bioestimulador dérmico semipermanente entre outros (TYLER *et al.*, 2016).

Em 2004, teve sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da lipoatrofia facial associada ao HIV e, mais tarde em 2009 para o tratamento do envelhecimento cutâneo (STEIN *et al.*, 2015). Hoje em dia, vem sendo muito utilizado na forma de micropartículas para promover a síntese de colágeno dérmico, por meio da indução de uma resposta inflamatória subclínica de corpo estranho, que leva a formação de tecido conjuntivo fibroso e neocolagênese (FITZGERALD *et al.*, 2018).

Existem poucos trabalhos relatando a utilização de nanopartículas poliméricas carregadas com ácido ursólico, e apenas dois que estudam nanopartículas de PLA

contendo o fármaco, no primeiro estudo foi avaliada a ação de eliminação de radical e também a citotoxicidade frente a células tumorais B16-F10 e eritrócitos, Antônio e colaboradores (2016) observaram que as nanopartículas apresentaram atividade antioxidante e antitumoral com uma pequena atividade hemolítica, confirmando a possível utilização para o tratamento do câncer. No segundo estudo, Antônio *et al.* (2021) demonstraram o aumento da biodisponibilidade oral do ácido ursólico nanoencapsulado em partículas de PLA modificadas com quitosana, apresentando melhora significativa dos seus parâmetros farmacocinéticos.

No entanto, as nanopartículas apresentam um empecilho à sua utilização, pois muitas vezes elas são rapidamente removidas do organismo pelo sistema reticular endotelial (RES), impossibilitando a sua interação com o organismo de maneira satisfatória. Devido a isso, estratégias de modificação de superfície estão sendo estudadas, para que estas partículas não sejam identificadas, e possam permanecer no organismo por mais tempo e possibilitar uma maior duração da sua ação (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

3.6 MODIFICADORES DE SUPERFÍCIE

Após a produção e caracterização do nanocarreador ele deve ter sua atividade confirmada no organismo, e para que estas partículas consigam de forma eficiente exercer todo seu potencial de ação devem possuir algumas características como, ser capaz de proteger seu composto e manter a carga terapêutica, não devem ser tóxicas nem imunogênicas, ter resistência a contaminação microbiana, devem possuir uma duração satisfatória, e não ser eliminadas precocemente do organismo. Para tanto devem dificultar a captura pelo RES que também é conhecido como sistema fagocitário mononuclear (SFM) (HORNYAK; RAO, 2016).

Sendo esse último um dos obstáculos mais prevalentes na utilização das nanopartículas poliméricas, pois os macrófagos do SFM possuem a habilidade de remove-las da circulação sanguínea em minutos após a sua administração endovenosa. Embora, esses macrófagos não possuam a capacidade de identificar diretamente as nanopartículas eles reconhecem as opsoninas ligadas à superfície das partículas, o que as torna visíveis para as células fagocíticas (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SINGH, R.; LILLARD JR, 2009).

A pele já possui como função ser uma barreira biológica ao ambiente externo, contando com uma rede eficaz de células imunológicas que podem desencadear diferentes reações em resposta a partículas que se comportam como antígenos ou haptenos (FADEEL, 2012), estas partículas podem ser interceptadas por células de Langherans na epiderme, assim como macrófagos e células dendríticas na derme (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007). Por isso a modificação de superfície de nanocarreadores tem ganhado cada vez mais importância e atenção, visto que podem atenuar as interações que ocorrem entre as células do SFM (RANCAN, 2016).

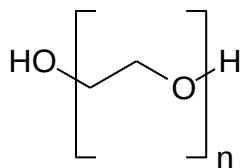
Diversos métodos de modificação de superfície estão sendo relatados, como por exemplo, a utilização de tensoativos como o polissorbato 80 que por apresentar característica anfifílica, diminui a tensão superficial e aumenta o contato entre a partícula e a célula. Além disso tem como função prevenir a agregação das partículas mantendo a sua estabilidade (KAUR *et al.*, 2008; KREUTER *et al.*, 1997). Também, estão sendo estudados ligantes de reconhecimento, que consigam mascarar a sua presença no organismo e interagir com um local específico de ação, dentre eles temos as lecitinas, peptídeos, anticorpos, biomiméticos de membrana de hemácias e polissacarídeos como o ácido siálico (BATISTA *et al.*, 2007; EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

As nanopartículas podem ser revestidas com moléculas que modifiquem a sua hidrofobicidade, formando uma camada hidrofílica na superfície da partícula. Esta característica hidrofílica faz com que as proteínas opsoninas sejam repelidas devido à repulsão estérica, desse modo bloqueando e atrasando o processo de opsonização. O método mais comum para essa modificação é a utilização de polímeros hidrofílicos, o polímero que é largamente utilizado para essa função é o polietilenoglicol (PEG) (CHAUDHARI *et al.*, 2012; OWENS; PEPPAS, 2006).

3.6.1 Polietilenoglicol – PEG

Os polietilenoglicóis são polímeros anfifílicos constituídos de repetições de subunidades de óxido de etileno contendo dois grupos hidroxilas terminais (Figura 4), tendo como característica serem inertes e não tóxicos (BAILON; BERTHOLD, 1998). Atualmente são considerados os materiais mais populares quando se fala em modificação de superfície e no campo da entrega de medicamentos, devido ao seu baixo custo e facilidade de manipulação (KIM *et al.*, 2017; SUK *et al.*, 2016).

Figura 4- Estrutura química do polietilenoglicol (PEG)



Fonte: O autor.

Neste âmbito nanotecnológico sabe-se que a natureza hidrofílica do PEG proporciona a formação de uma zona de hidratação ao redor da superfície dos nanocarreadores, o que dificulta a ligação das proteínas plasmáticas (opsonização) prolongando o tempo de circulação *in vivo* por diminuir o reconhecimento e absorção pelas células do sistema fagocitário mononuclear (GRENIER *et al.*, 2018).

As partículas PEGiladas também, possuem a capacidade de reduzir a captação dos macrófagos, diminuir o acúmulo de nanopartículas no fígado e baço, e favorecer o acúmulo no tecido tumoral pelo efeito de permeabilidade e retenção (ZHANG *et al.*, 2014).

No entanto, apesar de ser considerado não imunogênico, está sendo relatado que o PEG tem a capacidade de induzir uma resposta imune tanto em modelos animais como em humanos (SEMPLE, 2004), pois após aplicações repetidas as nanopartículas PEGiladas produzem extensivamente IgM anti-PEG fazendo com que o nanocarreador perca sua propriedade furtiva sendo reconhecido pelos linfócitos B levando a um aumento da sua eliminação sanguínea pelo fenômeno conhecido como depuração acelerada do sangue (ZHANG *et al.*, 2014).

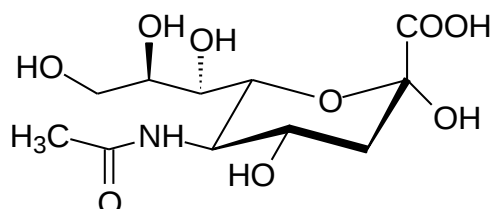
Além do citado acima o PEG pode induzir uma toxicidade celular, devido a sua difícil degradação e consequente acúmulo nos lisossomos, podendo gerar produtos de oxidação (CALICETI, 2003), sabendo disso aumenta a importância e necessidade de estudar substâncias que consigam atuar de maneira semelhante ao PEG sem os seus efeitos negativos.

3.6.2 Ácido siálico

Os ácidos siálicos (AS) são uma família de carboidratos complexos, constituídos por nove carbonos que estão presentes, principalmente, nos glicoconjugados de membrana (Figura 5). Estão presentes na natureza em cerca de

50 tipos que diferem entre si por variações de substituição e oxidação do esqueleto carbônico. O mais abundante no organismo humano é o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) (ANGATA; VARKI, 2002; YU *et al.*, 2006).

Figura 5- Estrutura química do ácido siálico



Fonte: O autor.

Estão envolvidos em diversas funções biológicas, como: renovação celular, mediação da adesão célula-célula, e na comunicação intercelular. Também, encontram-se presentes nos receptores para bactérias e vírus, protegem de ataques enzimáticos e possuem efeito anti-reconhecimento (VARKI E VARKI, 2007).

Nas células, participam da interação carboidrato-proteína mediando o fenômeno de reconhecimento, sendo que suas interações mais específicas acontecem com receptores de ligação a ácido siálico como selectinas, fator H e siglecs, podendo também carrear substâncias para dentro da célula por endocitose mediada por receptor o que contribui para resolução de limitações como captação celular bloqueada (BÜLL *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014).

Além de atuar nos processos de reconhecimento por células imunológicas através da regulação negativa do sistema imune, também participam reduzindo processos inflamatórios e a produção de EROs (BORNHÖFFT *et al.*, 2019), nas células dendríticas o ácido siálico apresenta o potencial de influenciar as funções de processamento, apresentação de antígenos e captação (CRESPO; LAU; VIDEIRA, 2013).

E assim como o PEG o ácido siálico possui como característica ser altamente hidrofílico, formando uma barreira na superfície das partículas, o que faz com que ocorra uma redução da interação das mesmas com as proteínas plasmáticas diminuindo a sua captação pelo SFM (FERNANDES; GREGORIADIS, 2001).

O poli(ácido siálico), um homopolímero do AS tem sido estudado como uma estratégia equivalente ao PEG para cobertura de sistemas nanoparticulados,

conferindo às partículas uma característica furtiva, apresenta uma maior capacidade de carga e uma mínima possibilidade de modificar a atividade do fármaco em relação aos conjugados (BADER; WARDWELL, 2014).

Bondioli e colaboradores (2010) desenvolveram partículas de PLGA recobertas com AS e glicopeptídeos. Eles sugeriram que as partículas modificadas interagem com os receptores cerebrais do AS e, devido a isso, seu tempo de permanência aumentou e estendeu sua atividade no organismo.

No seu estudo Wu e colaboradores (2017) demonstraram que a utilização de um copolímero de ácido siálico e ácido hialurônico apresenta capacidade de utilização como enchimento dérmico, por reduzir a irritação e estender a duração do ácido hialurônico na pele.

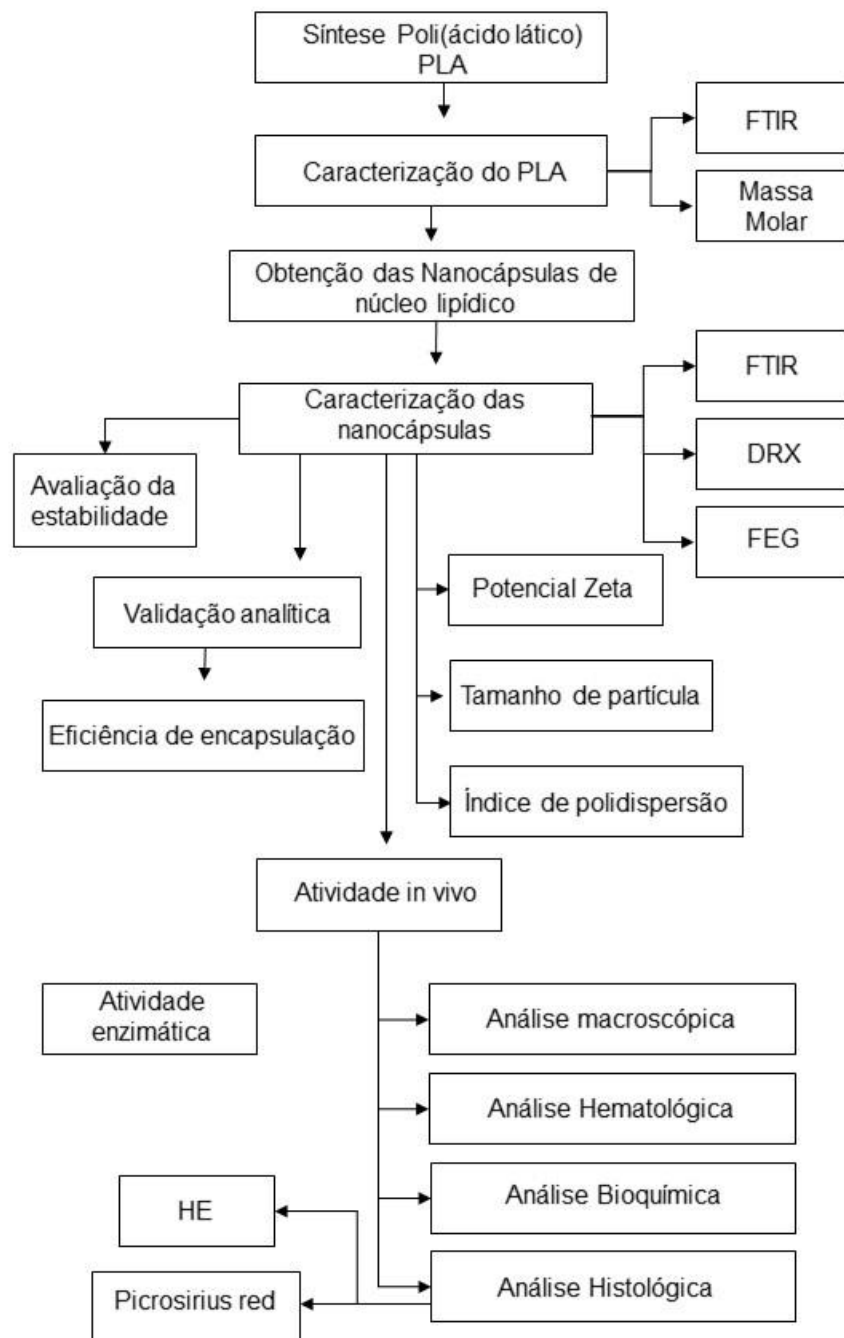
Configurando então o ácido siálico como uma estratégia promissora para a sua utilização como modificador de superfície, no desenvolvimento de partículas para circulação prolongada, e na interação com o sistema imunológico (KIM *et al.*, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas realizadas na parte experimental estão apresentadas na figura 6.

Figura 6- Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa



Fonte: O autor.

4.2 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁTICO) – PLA

A elaboração do α -hidroxi- ω -carboxi-poli(ácido láctico) foi conduzida por meio da reação de policondensação do ácido láctico em solução a 90% (VETEC), fundamentada na literatura (CHEN *et al.*, 2006; HYON *et al.*, 1997), mediante a modificação de algumas condições experimentais.

Para a síntese, foram colocados 200 mL de ácido láctico (90% m/V) em balão de duas bocas com capacidade de 500 mL, ao qual foi adaptado um sistema de destilação para a condensação da água vaporizada. O balão foi mantido em banho de óleo a 180° C por 8 horas, sob agitação magnética constante, empregando uma placa de aquecimento FISATOM (modelo 752A). Ao sistema de destilação foi aplicada uma pressão reduzida de -350 ± 10 mmHg, utilizando uma bomba de vácuo PRISMATEC (modelo 131).

Após a síntese, cada α -hidroxi- ω -carboxi-poli(ácido láctico) obtido, foi dissolvido em acetona P.A. e precipitado, por duas vezes, em água purificada. Posteriormente, foram colocados em estufa, mantida em 30 °C, para secagem.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO E MEDIDA DA MASSA MOLAR

Os produtos obtidos foram caracterizados por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). E a sua massa molar foi mensurada por viscosimetria capilar, utilizando um viscosímetro de Ostwald, como padrão de comparação foi utilizado o clorofórmio. A massa molar foi calculada através da equação de Mark-Houwink.

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_o} \text{ (adimensional)} \quad (1)$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{(t - t_o)}{t_o} \quad (2)$$

$$[\eta] = K (\overline{M}_v)^a \quad (3)$$

Onde, t = tempo de escoamento da solução; no viscosímetro
 to = tempo de escoamento do solvente puro; no viscosímetro
 c = concentração em gramas de polímero em 100 ml de solução.
 K é a constante que depende do polímero, do solvente e da temperatura.

4.4 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO (AU)

Suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico foram obtidas a partir do polímero PLA contendo ácido ursólico, preparadas por meio de um método de deposição interfacial do polímero pré-formado, conforme tabela 1.

Tabela 1- Composição das formulações de nanocápsulas contendo ácido ursólico

Composição	Formulações					
	NPLA-0	NPLA-AU	NPLA-AS-0	NPLA-AS-AU	NPLA-PEG-0	NPLA-PEG-AU
Fase Aquosa						
Tween 80 (g)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
H2O destilada (mL)	60	60	60	60	60	60
Fase orgânica						
Poli(ácido láctico) (g)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Ácido ursólico (g)	-	0,100	-	0,100	-	0,100
Span 60 (g)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
TCC (g)	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
PEG (g)	-	-	-	-	0,020	0,020
Acetona (mL)	20	20	20	20	20	20
Etanol (mL)	10	10	10	10	10	10
Final						
Ácido siálico (g)	-	-	0,1	0,1	-	-
H2O destilada (mL)	-	-	1	1	-	-

Resumidamente, o polímero PLA (Mw 1070 g/mol) (100 mg) foi solvatado em acetona (20 mL) e etanol (10 mL) em presença de Monoestearato de sorbitano - Span® 60 (80 mg), ácido ursólico 98% (100 mg), triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCC, 300 mg) e PEG (Mw 6.000 g/mol) nas formulações NPLA-PEG-0 e NPLA-PEG-AU, constituindo assim a fase orgânica. Em seguida, foi gotejado lentamente na fase aquosa contendo água (60 mL) e polissorbato 80 (80 mg), previamente preparada e mantida sob agitação magnética vigorosa e temperatura de 40°C. A agitação magnética foi mantida por mais 10 minutos após o término do gotejamento e o solvente foi, então, eliminado por rotaevaporação, atingindo um volume final de 10 mL

e concentração de fármaco de 10 mg.mL^{-1} (NPLA-AU) (NPLA-AS-AU) (NPLA-PEG-AU). Nas formulações NPLA-AS-0 e NPLA-AS-AU ao final foi adicionado ácido siálico (100 mg) dissolvido em água destilada (1 mL) e foi mantido em agitação magnética por 4 horas.

Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico sem a adição do fármaco (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0), como controle negativo. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography- UHPLC*)

4.5.1 Equipamento e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu Nexera X2 (Quioto, Japão), equipado com detector DAD SPD-M20A, degaseificador DGU-20A5RA, bomba LC-30AD, amostrador automático SIL-30AC, forno CTO-20A, módulo comunicador CBM-20A e software Labsolutions versão 5.73.

Foi utilizada coluna de fase reversa C18 Shim-pack XR-ODS III, 200x2 mm, com tamanho de partícula $2,2 \mu\text{m}$, acoplada a pré-coluna. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ e a eluição foi realizada em modo isocrático, sendo a fase móvel acetonitrila:água 92:8 (V/V), com fluxo de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$, a 50°C . O tempo de corrida foi de 2,1 minutos e o comprimento de onda selecionado para determinação foi 203 nm.

4.5.2 Preparo das soluções padrão

A solução padrão estoque de AU foi preparada em acetonitrila:água, a $500,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Diluições foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre $10,0$ e $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde a concentração de $60,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi definida como 100%. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil® Xtra, $0,2 \mu\text{m}$ x 13 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

4.5.3 Desenvolvimento e validação do método

Para obter a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, para tanto foram realizadas diversas corridas, variando a concentração de acetonitrila de 5 a 100% em 20 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução do pico para AU. Uma amostra contendo os polímeros foi injetada como controle negativo.

A validação do método analítico por UHPLC foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2017). Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi determinada por análise dos cromatogramas do sobrenadante das nanosuspensões com fármaco em comparação àqueles obtidos com as formulações sem fármaco, com o objetivo de confirmar que nenhum componente da formulação interfere na quantificação do AU.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas, nas concentrações de: 10,0; 30,0; 40,0; 60,0; 70,0; 80,0 e 100,0 µg.mL⁻¹. A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). Avaliação de cada ponto foi realizada em triplicata. A análise de resíduos foi realizada com o auxílio do *software* Statistica 8.0 (STATSOFT).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos com base nos parâmetros das curvas. O LD e o LQ foram calculados por meio das Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (5)$$

Onde, DP: desvio padrão do coeficiente linear. S: coeficiente angular da curva.

A precisão do método foi determinada seguindo o guia do ICH (2005) e a resolução 166/17 (BRASIL, 2017). A precisão foi avaliada em dois níveis:

repetitividade e precisão intermediária, para a concentração definida como 100% (60 µg.mL⁻¹), em sextuplicata e para as concentrações de 20,0; 50,0 e 90,0 µg.mL⁻¹, em triplicata.

A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas por desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), analisadas intradia, interdía e com diferentes analistas.

A exatidão foi determinada por análises de recuperação, adicionando-se a quantidade de 60 µg às soluções de 20,0; 50,0 e 90,0 µg.mL⁻¹. A exatidão (%) do método foi calculada, em triplicata, conforme equação 6.

$$\% \text{ Exatidão} = \frac{(CAF - CA) \times 100}{CTA} \quad (6)$$

Onde, CAF: concentração experimental da amostra fortificada; CA: concentração experimental da amostra não fortificada; CTA: concentração teórica adicionada.

A robustez foi avaliada no padrão a 60,0 µg.mL⁻¹, por variações na taxa de fluxo para 0,75 e 0,85 mL.min⁻¹, e a concentração da fase móvel acetonitrila:água para 91:9 (V/V) e 93:7 (V/V). Teste *Tukey* de Análise de variância (ANOVA) foi realizado para avaliar se as variações alteram o resultado das análises cromatográficas. Os resultados foram analisados utilizando o DPR comparando com os valores obtidos para a condição padrão (taxa de fluxo de 0,80 mL.min⁻¹ e fase móvel acetonitrila:água 92:8 (V/V)).

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

As nanocápsulas foram submetidas à ultrafiltração usando o dispositivo Amicon® 10.000 Mw (MILLIPORE, Billerica, MA, EUA) a 2200 x g por 30 minutos. O ácido ursólico livre foi determinado no ultrafiltrado. A EE (%) foi calculada indiretamente pela diferença entre a concentração total e a concentração de fármaco livre, empregando o método analítico por UHPLC/DAD desenvolvido e validado.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

4.7.1 Espectrometria de difração a laser

O tamanho de partícula foi determinado por espalhamento de luz dinâmico e o potencial zeta por mobilidade eletroforética, após o preparo de uma suspensão das nanocápsulas (1:500, V/V) em água ultrapura. As medidas, em triplicata, foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido).

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* – FEG-SEM)

A avaliação morfológica e de superfície foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). Para a preparação da amostra a nanosuspensão foi diluída em água na proporção 1:500 (v/v) e então uma gota foi depositada sob o Stub e seca a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.7.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR)

Os sistemas poliméricos foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho, para essa análise foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 200 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m) e uma gota da nanosuspensão, e foram analisadas no equipamento IR Prestige 21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min⁻¹. Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, da formulação branco referente e da mistura física da formulação e das nanopartículas.

4.7.4 Difração de raios X (*X Ray Diffraction* – DRX)

As nanocápsulas foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, *scan* de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 4° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade. Para a realização da análise as amostras de nanosuspensão foram gotejadas sob uma lamínula e secas a temperatura ambiente formando uma camada espessa de amostra.

4.8 ESTABILIDADE

Para verificar a estabilidade das nanocápsulas nas suas diferentes formulações, suspensões das mesmas foram armazenadas durante 180 dias sob três diferentes condições de temperatura: em temperatura ambiente, -2°C e à -20°C . Após cada mês, as nanocápsulas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio e potencial zeta. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9 ENSAIO ENZIMÁTICO

4.9.1 Verificação da inibição da atividade da enzima Colagenase

Para a dosagem da ação inibidora da colagenase do ácido ursólico foi utilizado o kit *Collagenase Activity Colorimetric Assay*, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diluições do AU foram feitas em etanol para obtenção das seguintes concentrações: 1000 $\mu\text{g/mL}$; 500 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi obtida adicionando-se 10 μL da solução estoque de AU diretamente no poço. Em placa de 96 poços foram colocados 10 μL de AU diluído (concentrações finais nos poços: 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (10 μL da solução estoque). Em seguida, foram adicionados 80 μL de tampão fornecido no kit e 10 μL da enzima colagenase derivada da bactéria *Clostridium histolyticum* (0.35 U/mL). Posteriormente, 60 μL do substrato sintético FALGPA (*N*-[3-(2-furil) acrilil]-Leu-Gli-Pro-Ala) (1,6 mM) também preparado com 40 μL tampão, foram adicionados. A mistura reacional final (volume total de 200 μL) continha tampão, FALGPA, colagenase e diferentes concentrações de AU livre. Para o controle positivo foi adicionado 2 μL do inibidor (1,10-fenantrolina). A

absorbância foi medida imediatamente após a adição do substrato e sequencialmente até 80 minutos no comprimento de onda de 345 nm à temperatura de 37° C usando leitor de microplacas. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo a equação 7. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

$$\% \text{ inibição da collagenase} = 100 - \frac{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra})}{\text{Abs. Amostra}} \times 100 \quad (7)$$

4.10 ESTUDOS *IN VIVO*

Todos os experimentos foram realizados após aprovação da Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob número 010/2018 (Anexos).

Para testagem da hipótese do ácido ursólico estimular a síntese de colágeno, foi inicialmente realizado um estudo da atividade do fármaco em modelo de lesão de pele de ratos.

Foram utilizados 135 ratos wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas de 3 meses divididos em 9 grupos (n=15), conforme descrito na tabela 2:

Tabela 2- Divisão de grupos experimentais

Grupo	Ooforectomia	Tratamento	Sigla
G1	Não	Veículo (5% etanol; 20%propilenoglicol; água q.s.p)	CTRL
G2	Sim	Veículo	CTRL OVX
G3	Sim	Ácido ursólico livre	AU Livre
G4	Sim	Nanocápsulas Núcleo lipídico (NNL); PLA	NPLA-0
G5	Sim	NNL; PLA - ácido siálico	NPLA-AS-0
G6	Sim	NNL; PLA – PEG	NPLA-PEG-0
G7	Sim	NNL; PLA com ácido ursólico	NPLA-AU
G8	Sim	NNL; PLA - ácido siálico com ácido ursólico	NPLA-AS-AU
G9	Sim	NNL; PLA – PEG com ácido ursólico	NPLA-PEG-AU

Fonte: O autor.

O veículo foi composto de 5% de etanol, 20% de propilenoglicol e água qsp.

4.10.1 Técnica de ooforectomia

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a jejum hídrico por 2 horas e alimentar de 4 horas. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal. A retirada das gônadas foi feita por incisões de 0,5 cm em cada flanco. O ovário foi pinçado com pinça hemostática e foi feita a ligadura da artéria ovariana com fio absorvível 4-0.

Para analgesia no pós-operatório imediato, os animais receberam citrato de fentanila (2 mg/kg) logo após o procedimento e retorno anestésico.

4.10.2 Produção das lesões

As lesões na pele foram feitas 4 meses após a ooforectomia. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal e, em seguida, foi produzida uma lesão na pele na região cervico-lombar, medindo aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, em cada animal.

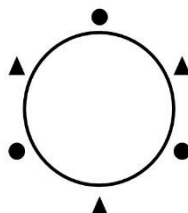
Após encerrada a anestesia, os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Todos permaneceram no Núcleo Avançado de Estudo da Vida (NAEVI) da Universidade Estadual de Ponta Grossa em gaiolas individuais, com temperatura, luminosidade e umidade controlada.

4.10.3 Tratamento das lesões

As lesões foram tratadas diariamente com injeções intradérmicas até o 5º dia após a produção da lesão, conforme cada grupo descrito na tabela 1. Para a realização do tratamento os animais foram anestesiados através da inalação de isoflurano. Os animais receberam 150 µL (10 mg/kg/dia) das amostras em seis pontos da região perilesional por via intradérmica intercalando três pontos em cada dia (Figura 7) sendo que os pontos representados por triângulos foram realizados nos dias pares e os círculos nos dias ímpares. Não foi feita nenhuma aproximação dos bordos da ferida, sendo feito então a avaliação da cicatrização por segunda intenção.

A escolha em realizar o tratamento pela via intradérmica se deu em virtude dos biomateriais comumente utilizados na clínica com a finalidade de bioestimulação do colágeno serem realizados por essa via de administração.

Figura 7- Esquema de aplicação do tratamento nas lesões



Fonte: O autor.

4.10.4 Avaliação da retração da lesão

A análise da retração da lesão se deu com os animais anestesiados através da inalação de isoflurano. A área de cada lesão foi aferida imediatamente após o procedimento cirúrgico (tempo 0), bem como nos dias 7, 14 e 21, mediante fotografia das lesões. As áreas das imagens demarcadas das feridas foram analisadas utilizando o software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

Para o cálculo da retração macroscópica, primeiro foi realizada a diferença entre a área da ferida no tempo 0 e a área no dia da eutanásia (dia 7, 14 e 21). A razão entre essa diferença e a área da ferida no tempo 0 gerou a porcentagem de retração. Esse mesmo cálculo foi feito para os subgrupos dos dias 7, 14 e 21.

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.11.1 Hematoxilina eosina

Nos dias 7, 14 e 21, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados conforme as recomendações da resolução 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012). Dos locais das feridas, foram retirados fragmentos da borda com auxílio de um “*punch*” e fixados em formol 10% (v/v). Após a fixação, o material foi processado utilizando técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, seccionado em micrótomo com espessura de 3 μ m e corado com Hematoxilina e

Eosina (HE) a fim de avaliar a espessura da derme e da epiderme, resposta inflamatória, segundo os critérios de celularidade e angiogênese, sob microscopia de luz. Após análise e seleção adequada, as secções histológicas foram fotografadas com microscópio Olympus DP72 com aumento de 400X, utilizando o *software CellSens Standard*.

4.11.2 *Picrosirius red*

A análise histológica das fibras colágenas (tipo I e III) foi realizada com amostras das lesões dos animais dos grupos controle e tratamentos dos dias 14 e 21. Os tecidos das lesões foram desparafinizados, hidratados e corados utilizando *picrosirius red* em solução aquosa saturada de ácido pícrico. As imagens foram obtidas com microscópio de polarização Olympus BX51P e para evitar variações relacionadas ao processo de captura, as configurações da câmera e intensidade de luz foram idênticas para todas as amostras. As imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ que reconhece as regiões coradas em vermelho (colágeno tipo I) e verde (colágeno tipo III) calculando a concentração destes subtipos de colágeno. Foram analisados 4 campos por lâmina e os resultados expressos em pixel.

4.12 ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

Nas avaliações bioquímicas foram dosadas as atividades de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e os níveis de creatinina no soro, as amostras foram avaliadas utilizando um kit comercial (Bioclin, Quibasa - Química Básica Ltda, Minas Gerais, Brasil). As atividades enzimáticas foram expressas em U/L. Os níveis de creatinina foram expressos em mg/dL.

A análise hematológica foi realizada em contador de células automatizado (Med Max cell conter), sendo que os parâmetros avaliados foram contagem total de células brancas, linfócitos e neutrófilos.

A dosagem do fibrinogênio foi realizada pela técnica de precipitação plasmática a 56° C, utilizando refratômetro (SCHALM; JAIN; CARROLL, 1975). Para todas as análises foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste ANOVA de 1 via, com análise posterior pelo teste de *Tukey*. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os testes foram realizados utilizando o programa *Graph Pad - Prism Stat*, versão 6.0 (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

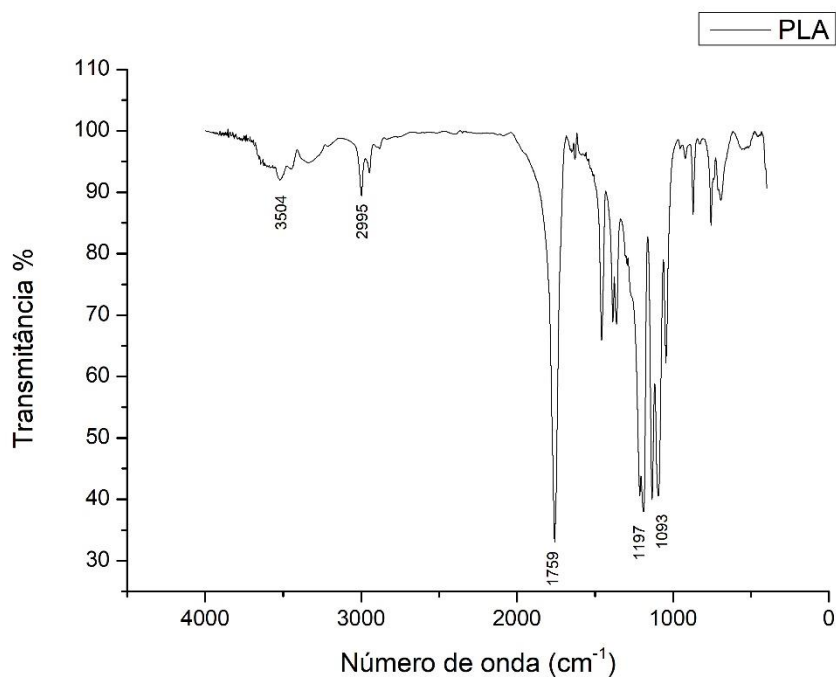
5.1 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁCTICO) – PLA

O PLA foi obtido com sucesso pelo método de policondensação, apresentando-se como um pó branco de aspecto granulado fino. A síntese por policondensação tem como principal vantagem ser um processo simples, além de não necessitar de solventes o que é fundamental para polímeros que serão utilizados com finalidade biomédica (GHALIA; DAHMAN, 2017).

5.1.1 Caracterização do Poli(ácido láctico) – PLA

A técnica de espectroscopia do infravermelho proporciona informações sobre os grupos funcionais das moléculas. Com estes dados é possível analisar se os produtos da síntese estão em conformidade com os relatos da literatura, o espectro do PLA está representado na figura 8.

Figura 8 – Espectro na região do infravermelho do poli(ácido láctico) –PLA



Fonte: O autor.

O polímero apresentou bandas características condizentes com os dados encontrados na literatura (MOAZZEN *et al.*, 2019), indicando a presença de uma banda larga típica em 3504 cm^{-1} referente à deformação axial dos grupamentos hidroxila, em 2995 cm^{-1} referente às vibrações das ligações C-H, em 1759 cm^{-1} decorrente de deformação axial do grupamento C=O do éster e/ou do ácido carboxílico, em 1197 cm^{-1} resultante do estiramento assimétrico do O-C=O que também é característico da ligação éster do PLA, e em 1093 cm^{-1} correspondendo ao estiramento simétrico C-O-C, comprovando assim as características estruturais do polímero.

Em relação à massa molar o valor obtido foi de 1070 g.mol^{-1} , que está condizente com a literatura, já que os polímeros sintetizados pela metodologia de policondesação apresentam baixa massa molar (GHALIA; DAHMAN, 2017), esse valor está relacionado à policondensação, pois a água obtida durante a esterificação provoca a hidrólise do poliéster, o que leva a cadeias poliméricas mais curtas. O valor obtido para a massa molar do polímero está adequado com o objetivo do trabalho, onde necessita que a partícula libere o fármaco de maneira mais rápida para que possa exercer a sua ação na derme, por esse motivo essa é uma característica essencial pois seu processo de degradação e liberação é mais acelerado.

5.2 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

As nanocápsulas foram obtidas com sucesso pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. A escolha do método de preparação das nanocápsulas a partir dessa metodologia foi determinada pela sua capacidade de encapsulamento de moléculas lipofílicas, por possibilitar um maior rendimento, ser de fácil produção e possibilitar maior reprodutibilidade (BADRI *et al.*, 2016). Após o preparo as partículas apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, leitoso, com coloração branca opalescente e sem odor.

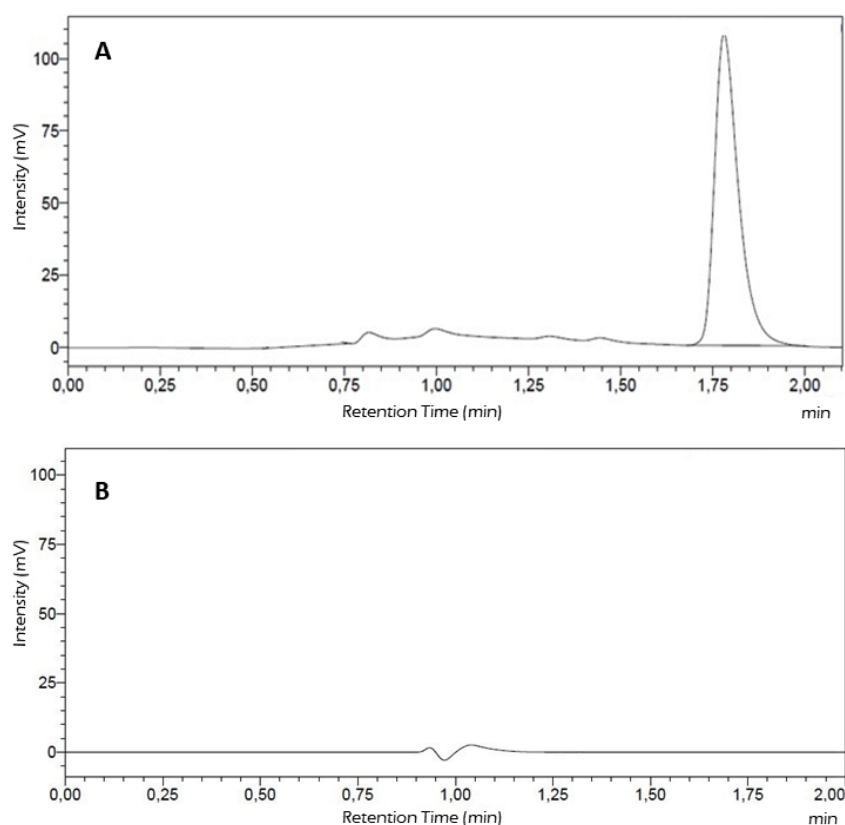
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR UHPLC PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO URSÓLICO EM NANOPARTÍCULAS

Os testes iniciais para a definição das condições cromatográficas foram baseados em um método já descrito na literatura para o AU (ANTONIO *et al.*, 2016).

Porém, descrevem a metodologia utilizando cromatógrafo de alta eficiência. Desse modo se justifica a validação de um método analítico capaz de quantificar o ácido ursólico em UHPLC.

Após a realização da corrida em gradiente exploratório, a fase móvel foi estabelecida utilizando acetonitrila:água (92:8, V/V), com fluxo de $0,80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo estas condições definidas como padrão para o restante das análises (tabela 3). Quanto ao tempo de corrida e ao tempo de retenção os valores obtidos foram de 2,1 e 1,78 minutos respectivamente, sendo estes valores adequados para o método.

Figura 9- Cromatogramas da nanocapsula preparada sem o fármaco: NPLA-0 (B); em comparação com o ácido ursólico para seletividade



Fonte: O autor.

Tabela 3- Condições cromatográficas utilizadas para validação do método analítico por UHPLC

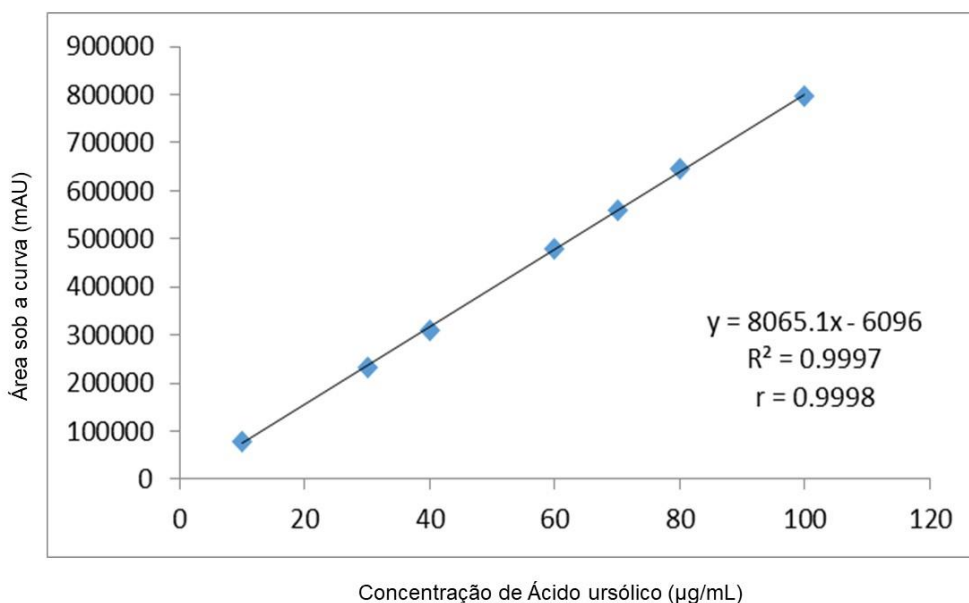
Parâmetro	Descrição
Coluna	Shim-pack XR-ODS III, 200 mm x 2 mm, 2,2 μ m, acoplada à pré-coluna C18
Fase móvel	Acetonitrila:água (92:8, V/V)
Fluxo	0,80 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 μ L
Detector PDA UV-Vis	λ 203 nm
Temperatura do amostrador	8 °C
Temperatura da coluna	50 °C
Tempo de corrida	2,1 min
Tempo de retenção	1,78 min

Fonte: O autor.

5.3.1 Linearidade

A determinação da linearidade do método foi realizada através da análise da área sob a curva de sete soluções padrão de ácido ursólico no intervalo de 10 a 100 μ g.mL⁻¹, a partir dos resultados obtidos pela curva analítica foi gerado um coeficiente de correlação de 0,9998, o que comprova a linearidade do método no intervalo de concentração empregado. A equação linear obtida para o método foi $y = 8065,1x - 6096$ ($n = 3$, $r = 0,9998$) (Figura 10).

Figura 10 – Curva analítica do ácido ursólico. Fase móvel acetoneitrila:água (92:08, v/v) em 203 nm ($n=3$). Equação da reta: $y = 8065,1x - 6096$



Fonte: O autor.

A análise de variância ANOVA para a linearidade do método está apresentada na tabela 4. Além do valor do coeficiente de regressão, foi realizado o teste para a falta de ajuste, que avalia a variação dos valores residuais. O valor de F obtido para a falta de ajuste foi menor que o valor de F tabelado, para intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), portanto a regressão linear não apresentou falta de ajuste.

Tabela 4- Resultados de ANOVA para linearidade do método

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	1.126210E+12	1	1.126210E+12	24314,34	2,990
Resíduo	8.800568E+08	19	4.631878E+07	Linear	
Falta de Ajuste	380576702	5	76115340	2,133448	2,307
Erro puro	499480095	14	35677150	Não há falta de ajuste	

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado

Fonte: O autor.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros de três curvas analíticas. A menor concentração de ácido ursólico que pode ser detectado (LD) e quantificado (LQ) com aceitável precisão e exatidão foi 1,35 e 4,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, estes valores evidenciam a sensibilidade do método e a confiabilidade para análises de concentrações baixas do analito. A tabela 5 resume os parâmetros da curva.

Tabela 5- Parâmetros da curva analítica do ácido ursólico

Linearidade	
Faixa linear	10,0 – 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de Detecção	1,35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de Quantificação	4,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Dados de regressão	
N	3
Inclinação (α)	27762,33
Desvio Padrão da Inclinação	62,36
Desvio Padrão Relativo da Inclinação (%)	0,77
Intercepto (b)	-6096,13
Coeficiente de correlação (r)	0,9998

* $y = ax + b$, onde x é a concentração do composto e y é a área sob a curva

Fonte: O autor.

5.3.2 Precisão

A precisão de um método analítico representa a contiguidade dos resultados obtidos através de repetidas medições de uma mesma amostra e pode ser expressa como variância, desvio padrão ou coeficiente de variação (ICH, 2005), foi avaliada a precisão intradia, interdia e com diferentes analistas. Os resultados expressos como desvio padrão relativo (DPR) obtidos para repetitividade e precisão intermediária estão descritos na tabela 6.

Segundo o Guia internacional de validação analítica (ICH) valores de DPR não devem ultrapassar 5% (ICH, 2005), desse modo, os resultados obtidos confirmam a precisão, uma vez que o maior valor observado foi de 1,99% estando em conformidade com o que é preconizado para esse parâmetro de análise.

Tabela 6- Dados da repetitividade e precisão intermediária para amostras de ácido ursólico

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetitividade			
n = 6	60	60,39 $\pm$ 0,25	0,42
n = 3	20	19,95 $\pm$ 0,40	1,99
n = 3	50	49,48 $\pm$ 0,67	1,35
n = 3	90	91,20 $\pm$ 0,89	0,98
Precisão intermediária			
Intradia			
n = 6	60	60,35 $\pm$ 0,30	0,49
n = 3	20	19,80 $\pm$ 0,32	1,60
n = 3	50	49,73 $\pm$ 0,84	1,68
n = 3	90	91,30 $\pm$ 0,92	1,00
Interdia			
n = 6	60	60,49 $\pm$ 0,24	0,40
n = 3	20	20,05 $\pm$ 0,28	1,41
n = 3	50	49,97 $\pm$ 0,89	1,78
n = 3	90	91,66 $\pm$ 0,78	0,85
Diferentes analistas			
n = 6	60	60,60 $\pm$ 0,28	0,46
n = 3	20	19,93 $\pm$ 0,28	1,41
n = 3	50	49,57 $\pm$ 0,74	1,50
n = 3	90	91,17 $\pm$ 0,94	1,03

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

Fonte: O autor.

5.3.3 Exatidão

A exatidão foi confirmada através da análise da proximidade dos valores obtidos em amostras de ácido ursólico em comparação aos valores de concentrações teóricas.

Foram analisadas três soluções padrão de ácido ursólico nas concentrações de 20, 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a porcentagem de recuperação variou de 100,30 a 96,16 %, demonstrando que os valores estão próximos do valor real, o que indica que o método é exato para a faixa de concentração empregada. A porcentagem de recuperação está detalhada na tabela 7.

Tabela 7- Dados obtidos na análise de exatidão pelo método de recuperação para o ácido ursólico.

Concentração teórica final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (% $\pm$ DP*)	DPR** (%)
20	100,30 $\pm$ 2,48	2,47
50	98,60 $\pm$ 2,80	2,84
70	96,16 $\pm$ 1,24	1,29

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

Fonte: O autor.

5.3.4 Robustez

Com o intuito de analisar a robustez, pequenas alterações foram aplicadas em alguns parâmetros analíticos, pois de acordo com o ICH para ser classificado como robusto os valores obtidos devem manter-se inalterados a pequenas variações que eventualmente ocorram durante o processo de análise (ICH, 2005). Os parâmetros alterados foram fluxo, proporção de fase móvel e temperatura da coluna. Os resultados estão expressos na tabela 8.

Tabela 8- Variações do método para avaliação da robustez para o ácido ursólico

Parâmetros iniciais	Alteração	DPR* (%)
Fluxo	0,75	1,29
0,80 (mL.min ⁻¹)	0,85	1,85
Proporção da fase móvel	91:9	1,08
92:8 (V/V)	93:7	1,15
Temperatura	48	0,54
50 °C	52	2,00

Fonte: O autor.

O teste de Tukey a um nível de significância de 5% mostrou que não houve diferença significativa na área do pico e no tempo de retenção do ácido ursólico em decorrência das alterações realizadas, sendo assim o método provou ser robusto para o fármaco analisado, sob as condições avaliadas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

5.4.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão

O tamanho e o índice de polidispersão das nanocápsulas estão entre os parâmetros indispensáveis no processo de caracterização dos nanocarreadores, pois influenciam diretamente como o sistema carreador vai interagir com o organismo. O diâmetro ideal das partículas vai depender do seu propósito de aplicação, para nanopartículas com a finalidade de administração cutânea o ideal são partículas com diâmetro inferior a 300 nm (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Com base nos resultados indicados (tabela 9) pode-se observar que as formulações desenvolvidas sem a presença do fármaco apresentaram tamanho inferior a 300 nm, já as formulações contendo ácido ursólico revelaram a presença de partículas com diâmetro médio de 364,9 nm (NPLA-AU), 355,9 nm (NPLA-PEG-AU) e 352,30 nm (NPLA-AS-AU) ficando próximo do valor considerado adequado. No entanto, é sabido que a presença e a concentração do fármaco podem influenciar as características de tamanho das nanopartículas (POLETTTO *et al.*, 2015). Assim como a concentração de polímero, método de injeção da fase orgânica, relações de volume entre fase orgânica e fase aquosa, viscosidade da fase orgânica e concentração crítica de agregação de matérias-primas na fase orgânica, sendo a presença do

fármaco capaz de alterar esta viscosidade causando saturação e levando à formação de partículas de tamanhos maiores (JORNADA *et al.*, 2012).

Tabela 9- Diâmetro médio e índice de polidispersão* nas nanocápsulas de PLA nas suas diversas formulações

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão (PDL)
NPLA-0	253,90 ± 18,79	0,26 ± 0,009
NPLA-AU	364,90 ± 19,80	0,22 ± 0,016
NPLA-PEG-0	290, 97 ± 20,05	0,35 ± 0,055
NPLA-PEG-AU	355,90 ± 36,34	0,28 ± 0,012
NPLA-AS-0	293,87 ± 41,43	0,25 ± 0,023
NPLA-AS-AU	352,30 ± 34,55	0,33 ± 0,018

*Média (n = 3) ± desvio padrão

Fonte: O autor.

Em seu estudo Nakama *et al.* (2020) desenvolveram nanopartículas de núcleo lipídico e obtiveram valores médios de tamanho de partícula que variaram de 296 nm para as partículas controle, 288 nm quando carregadas com curcumina e 315 nm quando carregadas com meloxicam, confirmando que valores semelhantes foram obtidos quando utilizada a mesma metodologia de produção.

As nanocápsulas contendo PEG e ácido siálico apresentaram um pequeno aumento do seu diâmetro em relação às partículas controle (NPLA-0), o que se deve ao fato dessas substâncias formarem uma camada hidrofílica ao redor da partícula aumentando seu raio hidrodinâmico e consequentemente alterando o valor obtido (RABANEL; HILDGEN; BANQUY, 2014).

Os resultados estão condizentes com o objetivo do trabalho, pois como o tratamento é realizado através de aplicações intradérmicas e sendo a derme extremamente vascularizada, valores muito reduzidos de tamanho de partícula favoreceriam a passagem das mesmas pelo endotélio vascular, o que não contribuiria para a sua ação local na derme.

A escolha em produzir nanocápsulas de núcleo lipídico, também, foi em decorrência de favorecer a sua permanência na derme, pelo fato da presença do monoestearato de sorbitano e dos triglicerídeos de cadeia média no núcleo formarem um organogel que diminui a flexibilidade da partícula, fazendo com que as

nanocápsulas de núcleo lipídico apresentem maior retenção na pele quando comparado a nanocápsulas convencionais (BRUM *et al.*, 2015)

O índice de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade da amostra, de modo que os resultados para essa análise devem sempre variar entre 0 e 1. Valores maiores ou próximos a 0,5 indicam que a formulação apresenta dispersão heterogênea (AVADI *et al.*, 2010).

As suspensões apresentaram valores de índice de polidispersão (tabela 8) variando entre 0,22 (NPLA-AU) e 0,35 (NPLA-PEG-0), demonstrando assim, que não ocorreu uma grande variação de tamanho entre as partículas, mas que existe uma certa variação de tamanho entre elas.

5.4.2 Potencial zeta

O potencial zeta é um importante preditor da estabilidade física das nanosuspensões. Esta técnica é capaz de identificar as cargas elétricas presentes na superfície das partículas, pode-se dizer que quanto maior for o seu valor de carga em módulo, maior será a estabilidade do sistema, devido à repulsão entre as partículas (BHATTACHARJEE, 2016). É indicado então que quanto mais próximo ou maior que $|30|$ mV estiver a suspensão, mais estáveis serão consideradas as partículas (NEVES *et al.*, 2013).

Na tabela 10 é possível verificar os resultados de potencial zeta obtidos para as nanocápsulas de PLA. Pode-se observar que todas as formulações apresentaram valores de potencial zeta negativos. Estes resultados são provavelmente resultantes dos grupamentos carboxílicos terminais presentes na cadeia polimérica de PLA, sendo ele um polímero aniônico (NEVES *et al.*, 2013).

Tabela 10- Valores de Potencial Zeta* das nanocápsulas de PLA e suas diversas formulações

Formulação	Potencial Zeta (ζ)
NPLA-0	$-37,23 \pm 4,83$
NPLA-AU	$-31,24 \pm 2,92$
NPLA-PEG-0	$-39,13 \pm 4,35$
NPLA-PEG-AU	$-31,85 \pm 0,64$
NPLA-AS-0	$-26,75 \pm 8,73$
NPLA-AS-AU	$-22,23 \pm 2,29$

*Média ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão

Fonte: O autor.

Nas formulações contendo o fármaco foi observado uma redução de cerca de 16% do valor da carga em relação às nanocápsulas vazias, esta redução se deve provavelmente a uma quantidade do ácido ursólico estar adsorvido na membrana polimérica.

Também, foi observada uma redução de 28% do valor da carga das formulações contendo ácido siálico (NPLA-AS-0 e NPLA-AS-AU) em comparação com as formulações contendo somente o polímero PLA e o fármaco (NPLA-0 e NPLA-AU), esses resultados sugerem que ele está interagindo na superfície das nanocápsulas, provavelmente por meio de interações de hidrogênio, e que a incorporação do ácido siálico na superfície da partícula aconteceu de maneira eficiente. Pois se sabe que esta metodologia tem a capacidade de medir a diferença de potencial entre a camada de íons na superfície da partícula e a solução (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003).

Nas demais formulações, não foram observadas alterações significativas, desse modo os valores de potencial zeta encontrados foram considerados satisfatórios, por se encontrarem próximos a -30 mV o que garante que estas formulações não possuem tendência a agregação.

5.4.3 Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco

A determinação da eficiência de encapsulação foi determinada indiretamente a partir de um método de UHPLC previamente desenvolvido e validado. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 11.

Tabela 11- Eficiência de encapsulação* do ácido ursólico nas nanocápsulas de núcleo lipídico

Formulação	Eficiência de Encapsulação (EE%)
NPLA-AU	99,89 ± 0,005
NPLA-AS-AU	99,91 ± 0,002
NPLA-PEG-AU	99,90 ± 0,004

*Média (n = 3) ± desvio padrão

Fonte: O autor.

Os resultados indicam que a média da eficiência de encapsulação das nanocápsulas de núcleo lipídico foi bastante satisfatória, apresentando resultados superiores a 99% em todas as formulações estudadas, esses resultados comprovam

que praticamente a totalidade da quantidade do fármaco encontra-se associada a nanopartícula.

Estes valores podem ser justificados, principalmente, pela polaridade do ácido ursólico, além da sua afinidade pelo polímero, a característica lipofílica do fármaco favorece a encapsulação o que também é justificado pela presença de óleo na cavidade central da partícula, aumentando a afinidade do fármaco pelo núcleo, estas características favorecem um aumento da concentração de fármaco no interior das nanocápsulas (VENTURINI *et al.*, 2011).

O resultado obtido apresentou valores superiores a trabalhos que também utilizam o ácido ursólico como fármaco de estudo para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, como Abriata e colaboradores (2017) que desenvolveram nanopartículas de PCL contendo ácido ursólico pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e obtiveram em sua melhor formulação eficiência de encapsulação de 94,1%. Valores de 78% foram obtidos no estudo de Antônio e colaboradores (2016) em que produziram nanopartículas de PLA contendo ácido ursólico pelo método de emulsão simples seguida de evaporação do solvente. Utilizando a técnica de evaporação do solvente e emulsão múltipla Baishya e colaboradores (2016) obtiveram eficiência de encapsulação de 70% em sua formulação contendo ácido ursólico e PLGA.

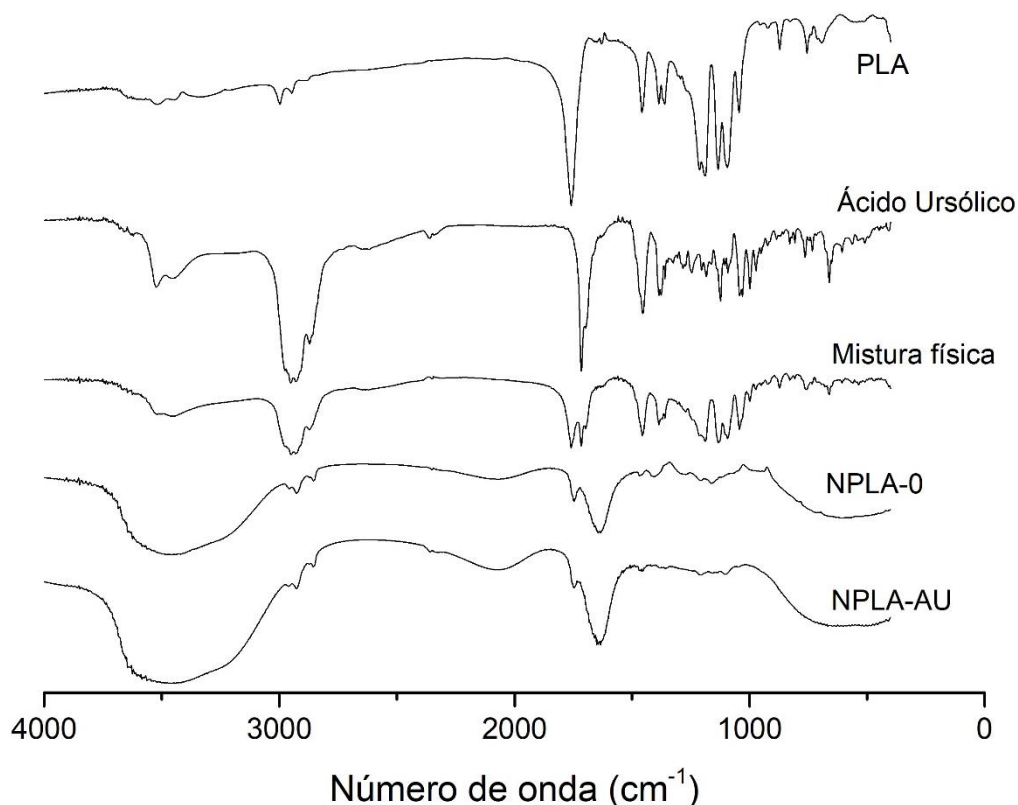
Portanto, pode-se afirmar que tanto o método escolhido para a produção como o polímero e os solventes contribuíram significativamente para a excelente porcentagem de incorporação do fármaco nas nanocápsulas.

5.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho foi empregada para investigar a natureza das interações entre a droga e os sistemas de transporte. O espectro obtido para o ácido ursólico (Figura 11) indicou uma banda larga em 3504 cm^{-1} referente às vibrações do grupamento OH, característica dos ácidos carboxílicos; em 2954 cm^{-1} uma banda referente as ligações C-H; uma banda intensa em 1718 cm^{-1} , sendo que esta banda é referente à ligação C=O do ácido carboxílico; em 1449 cm^{-1} foi observado uma banda correspondente à vibração de deformação angular da ligação C-H de alquenos. E as bandas específicas dos triterpenos ursanos foram observadas em

1383, 1363, 1324, 1285 e 1256 cm^{-1} (ELOY; MARCHETTI, 2014, RODRIGUES *et al.*, 2018).

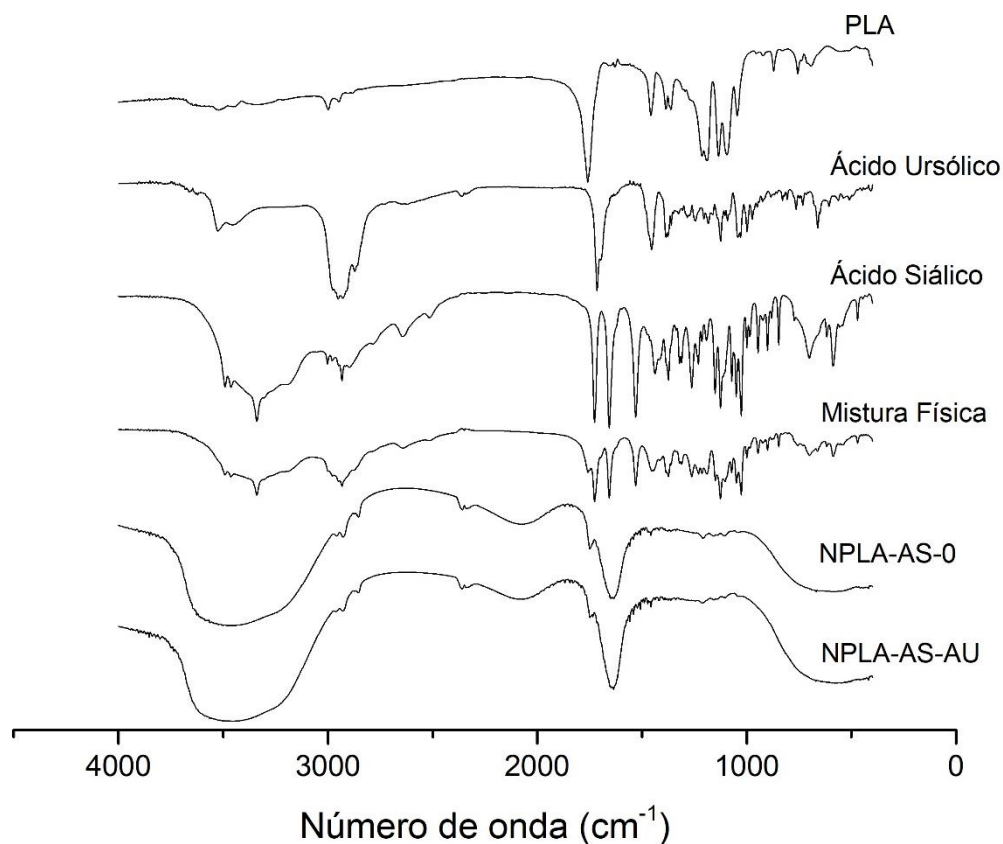
Figura 11 – Espectro na região do infravermelho do PLA, ácido ursólico, mistura física (PLA:ácido ursólico), nanocápsulas de PLA controle e nanocápsulas de PLA contendo ácido ursólico



Fonte: O Autor.

O espectro infravermelho do ácido siálico (Figura 12) mostrou uma banda de alongamento referente ao grupamento amida N-H e à ligação OH do grupo carbonila no intervalo entre 3343 e 3490 cm^{-1} , em 2931 cm^{-1} uma banda referente as ligações C-H; a ligação carbonila do ácido carboxílico foi observada em 1727 cm^{-1} e a banda referente a ligação do grupamento carbonila do grupo amida foi observada em 1654 cm^{-1} (SINGH *et al.*, 2017).

Figura 12 - Espectro na região do infravermelho do PLA, ácido ursólico, ácido siálico, mistura física (PLA:ácido ursólico:ácido siálico), nanocápsulas de PLA – ácido siálico controle e nanocápsulas de PLA – ácido siálico contendo ácido ursólico



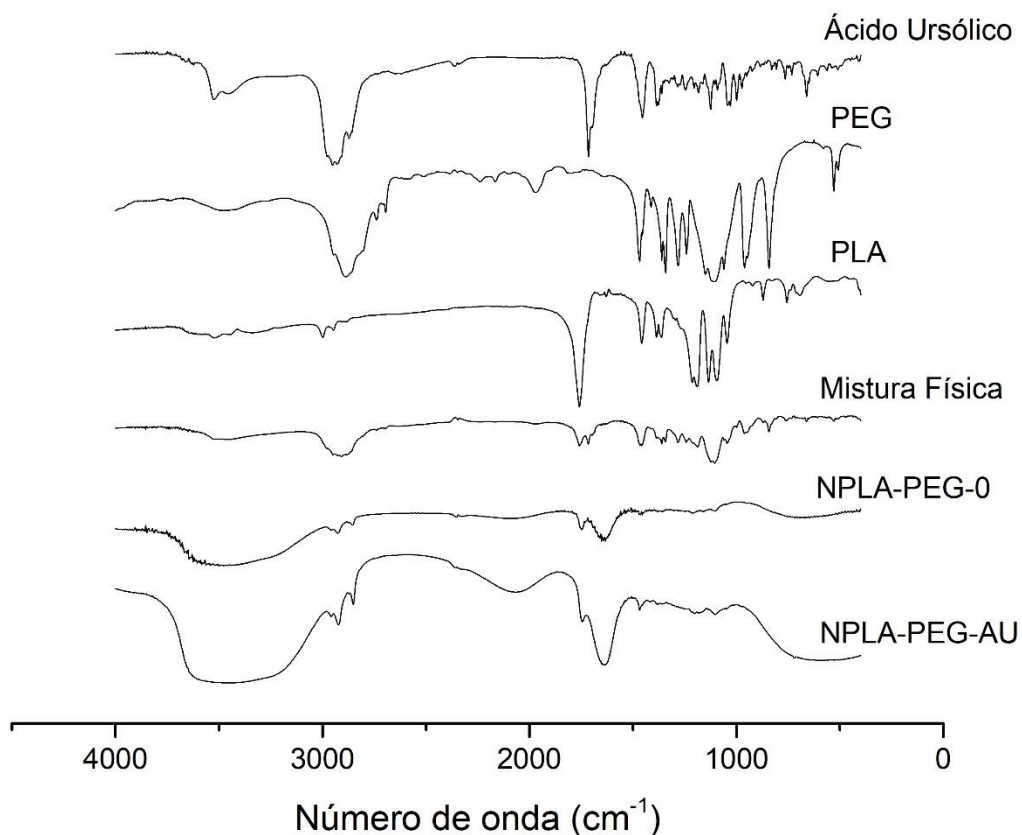
Fonte: O Autor.

O polietilenoglicol (PEG) (Figura 13) apresentou bandas características, sendo uma em 3421 cm^{-1} referente a vibração do grupamento OH terminal, em 2884 cm^{-1} referente a vibração de alongamento da ligação C-H e em 1113 cm^{-1} foi observada uma banda referente a vibração de estiramento da ligação C-O de ésteres (ELOY; MARCHETTI, 2014).

O espectro das misturas físicas, como esperado, revelou a sobreposição das bandas características para o ácido ursólico e o polímero PLA (Figura 11), assim como para ácido ursólico, PLA e PEG (Figura 13) e ácido ursólico, PLA e ácido siálico (Figura 12).

Os resultados obtidos para as nanocápsulas revelaram a sobreposição das bandas características dos polímeros e do fármaco, sendo então demonstrado que não ocorreram alterações químicas durante o processo de nanoencapsulação.

Figura 13 - Espectro na região do infravermelho do PLA, ácido ursólico, polietilenoglicol, mistura física (PLA:ácido ursólico: polietilenoglicol), nanocápsulas de PLA – polietilenoglicol controle e nanocápsulas de PLA – polietilenoglicol contendo ácido ursólico



Fonte: O autor.

5.4.5 Difração de raios X (DRX)

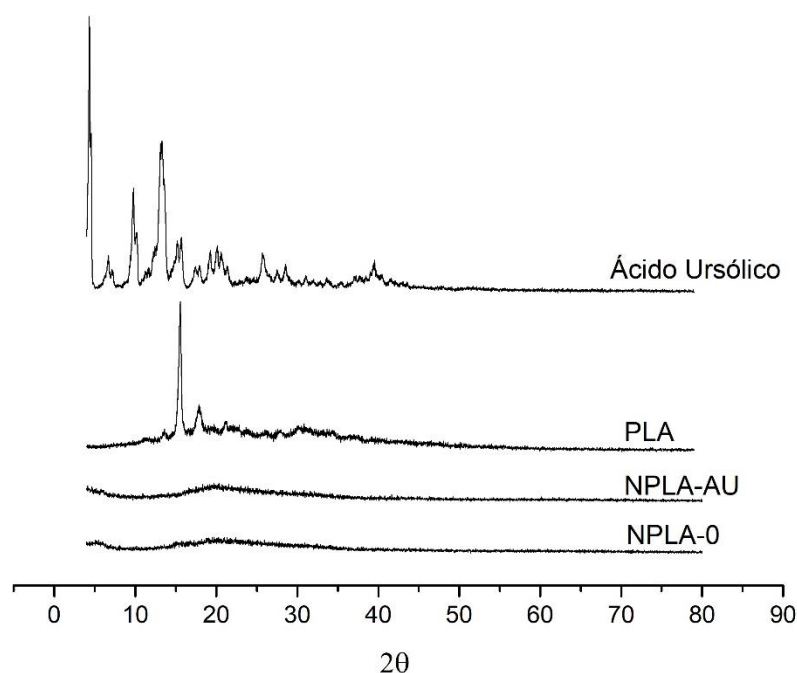
A difração de raios X é utilizada para avaliação da cristalinidade dos materiais, pois substâncias sólidas podem se apresentar como sólidos cristalinos ou sólidos amorfos, e a sua utilização durante a caracterização de nanocarreadores é de extrema importância visto que a sua conformação estrutural está diretamente relacionada à sua solubilidade (RIEKES *et al.*, 2011), sendo que esse é um dos principais problemas do ácido ursólico.

A forma cristalina das substâncias apresenta vantagens como pureza e estabilidade física ou química, no entanto, de uma maneira geral, materiais sólidos no estado cristalino apresentam uma menor solubilidade quando comparado as formas amorfas, isso se deve à energia envolvida no processo de dissolução. Substâncias amorfas possuem uma estrutura desorganizada necessitando de uma menor energia para que ocorra a sua solubilização (BAGHEL; CATHCART; OREILLY, 2016).

Os resultados obtidos para o PLA, ácido ursólico e as nanocápsulas NPLA-0 e NPLA-AU estão apresentados na Figura 14. O PLA apresentou dois picos em 2θ : $16,44^\circ$ e $18,94^\circ$ confirmando a sua forma semicristalina, o PLA pode variar a sua conformação dependendo da proporção dos seus enantiômeros, com quantidades menores que 6% da sua configuração D, o polímero é semicristalino, acima dessa quantidade é amorfo (ESMAEILZADEH *et al.*, 2017).

No caso do AU foram observados diversos picos intensos relacionados à sua estrutura cristalina nos ângulos de difração em 2θ : $5,28^\circ$; $7,64^\circ$; $10,74^\circ$; $14,19^\circ$; $16,32^\circ$; $21,20^\circ$ e $26,92^\circ$ o que confirma a sua estrutura cristalina, estes dados foram condizentes com os observados na literatura (ELOY; MARCHETTI, 2014).

Figura 14 - Difratomogramas do ácido ursólico puro, do PLA e das nanocápsulas NPLA-AU e NPLA-0



Fonte: O autor.

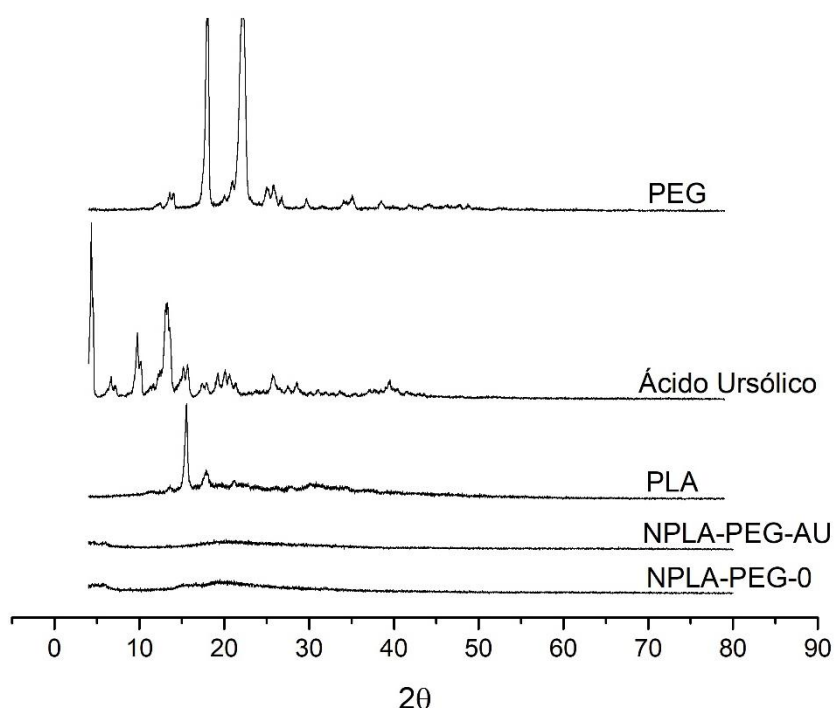
Os difratogramas obtidos para as nanopartículas NPLA-0 e NPLA-AU apresentaram redução significativa dos picos de cristalinidade tanto do polímero como do fármaco, indicando que estas formulações apresentam característica amorfa.

Os resultados obtidos para o PEG e para as formulações NPLA-PEG-0 e NPLA-PEG-AU estão representados na Figura 15, os difratogramas revelaram dois picos intensos nos ângulos de difração para o PEG em 2θ : $18,94^\circ$ e $23,05^\circ$, estes

valores são concordantes com os encontrados na literatura, e indicam que há a presença de regiões cristalinas incluídas no material polimérico amorfo (ELOY; MARCHETTI, 2014).

As formulações NPLA-PEG-0 e NPLA-PEG-AU não apresentaram a presença de picos de cristalinidade em seus difratogramas indicando que houve uma amorfização destas formulações.

Figura 15 - Difratogramas do ácido ursólico puro, do PLA, PEG e das nanocápsulas NPLA-PEG-AU e NPLA-PEG-0.



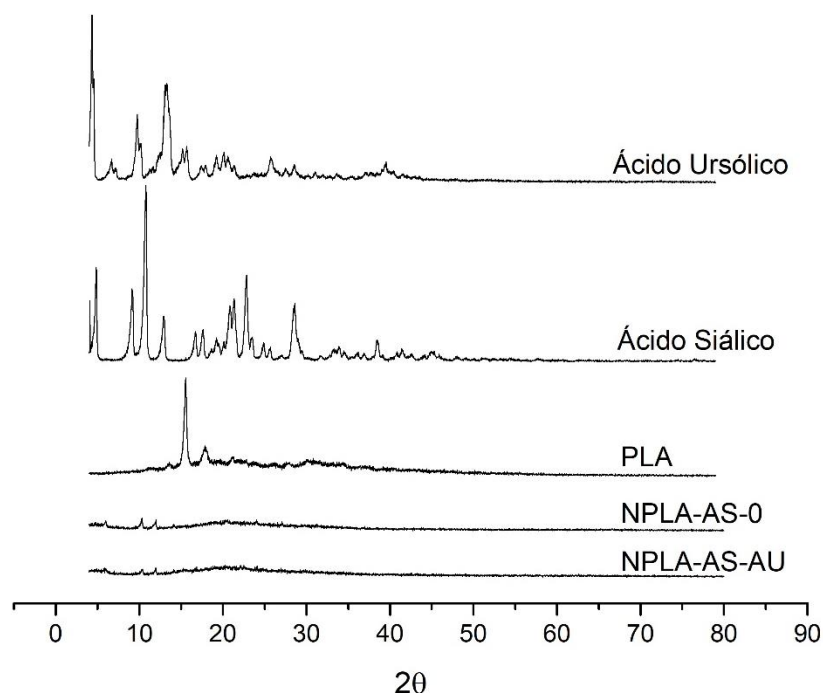
Fonte: O autor.

A Figura 16 ilustra os difratogramas obtidos para o ácido siálico e as suas formulações NPLA-AS-0 e NPLA-AS-AU. No difratograma referente ao ácido siálico percebe-se picos cristalinos em 2θ de: $5,82^\circ$; $10,10^\circ$; $11,65^\circ$; $13,98^\circ$; $22,33^\circ$; $23,90^\circ$ e $29,52^\circ$ que são picos característicos desta substância (SINGH *et al.*, 2017), estes dados comprovam que o ácido siálico possui estrutura cristalina.

As formulações de nanocápsulas com a presença do ácido siálico também apresentaram uma grande redução dos picos de cristalinidade tanto do polímero como do fármaco, mas ainda é possível observar um pico com muito baixa intensidade condizente ao grau em 2θ de $10,10^\circ$ do ácido siálico, o que também indica que uma

pequena quantidade de fármaco cristalino se encontra na superfície da partícula e não disperso no sistema polimérico.

Figura 16 - Difratomogramas do Ácido Ursólico puro, do PLA, do Ácido Siálico e das nanocápsulas NPLA-AS-AU e NPLA-AS-0



Fonte: O autor.

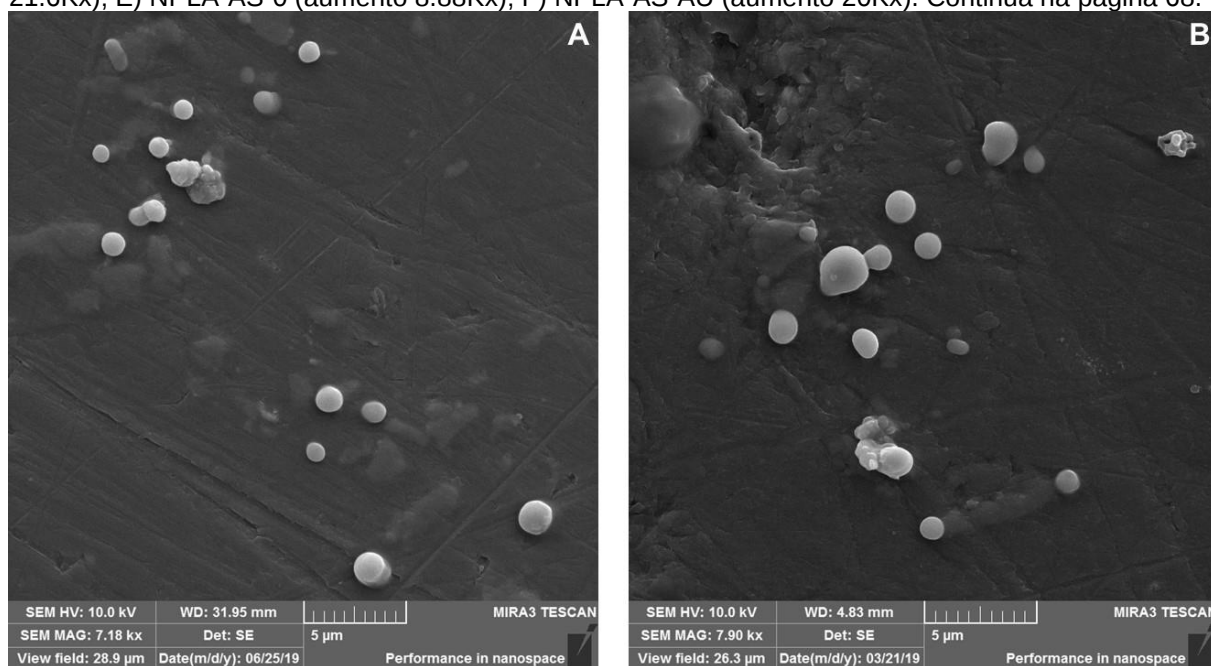
Os resultados de difração de raios X obtidos evidenciam que o processo de nanoencapsulação levou a uma diminuição importante dos picos de difração cristalina em todas as formulações estudadas, o que caracteriza as formulações obtidas como amorfas. Estes dados podem indicar que o fármaco está molecularmente disperso no complexo polimérico e no interior da partícula.

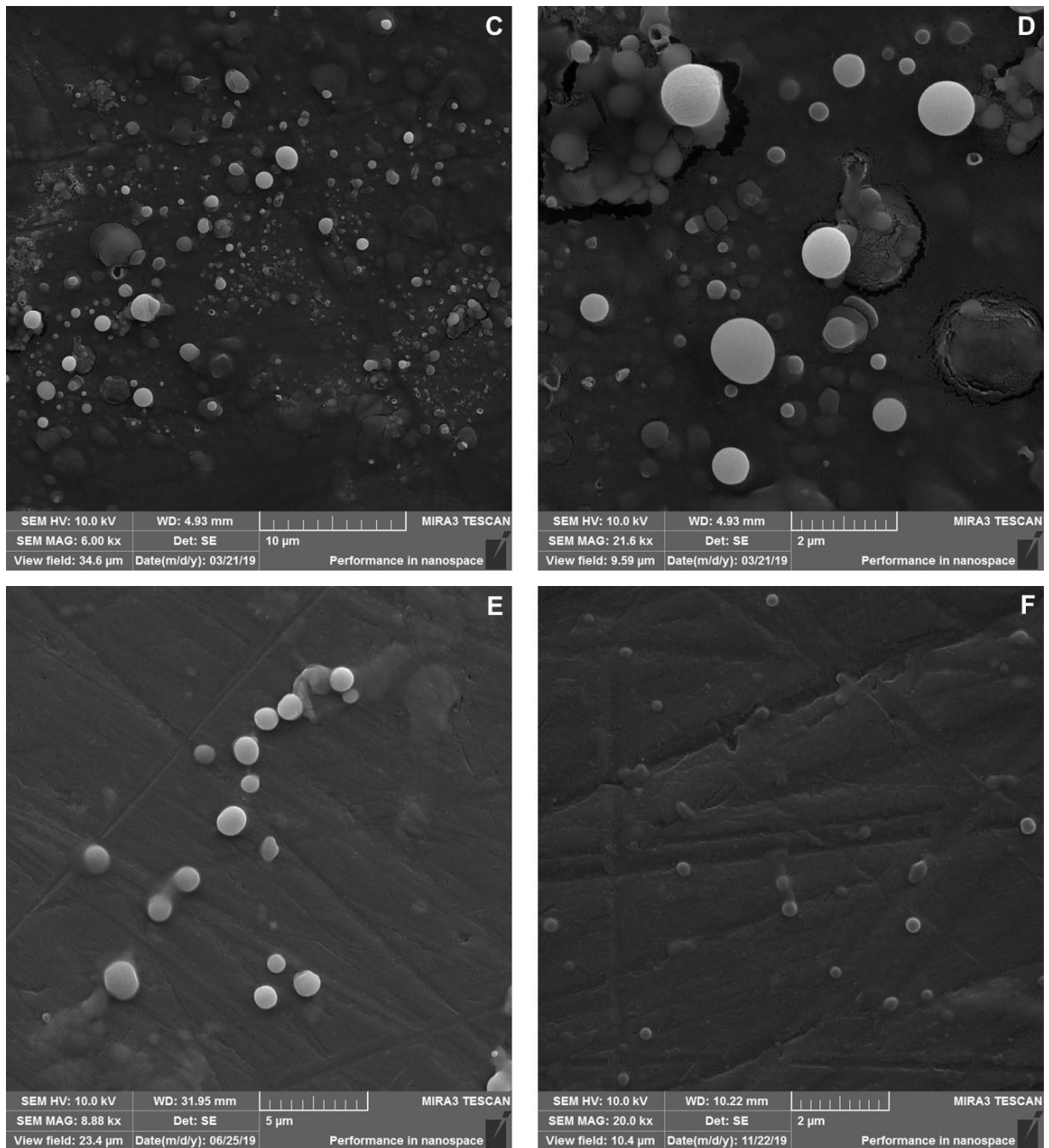
A obtenção de nanocarreadores com característica amorfa, pode contribuir com o processo de dissolução do ácido ursólico, que na sua forma cristalina como utilizada no material de partida tem baixa solubilidade em meio aquoso, por essa razão a amorfização do sistema contribui com o processo de dissolução visto que as moléculas estão dispostas de forma desorganizada necessitando de pouca energia para solubilizar, o que leva a uma dissolução mais acelerada (BAGHEL; CATHCART; OREILLY, 2016).

5.4.6 Análise Morfológica de Superfície

A análise morfológica das partículas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (FEG), as fotomicrografias obtidas para as nanopartículas estão apresentadas na Figura 17. As imagens confirmaram a formação de nanopartículas através da metodologia de nanoprecipitação bem como as dimensões nanométricas das formulações em estudo. Todas as formulações apresentaram partículas com formato esférico bem definido, com superfície lisa e sem a presença de poros. Não foi verificada a presença de cristais do fármaco nem de outros componentes da formulação na superfície da partícula, no entanto foi possível observar houve uma variação de tamanho entre as partículas confirmando os resultados obtidos pela espectrometria de difração a laser.

Figura 17 – Fotomicrografias das nanocápsulas obtidas por FEG: A) NPLA-0 (aumento de 7.18Kx); B) NPLA-AU (aumento de 7.90Kx); C) NPLA-PEG-0 (aumento 6Kx); D) NPLA-PEG-AU (aumento 21.6Kx); E) NPLA-AS-0 (aumento 8.88Kx); F) NPLA-AS-AU (aumento 20Kx). Continua na página 68.





Fonte: O autor.

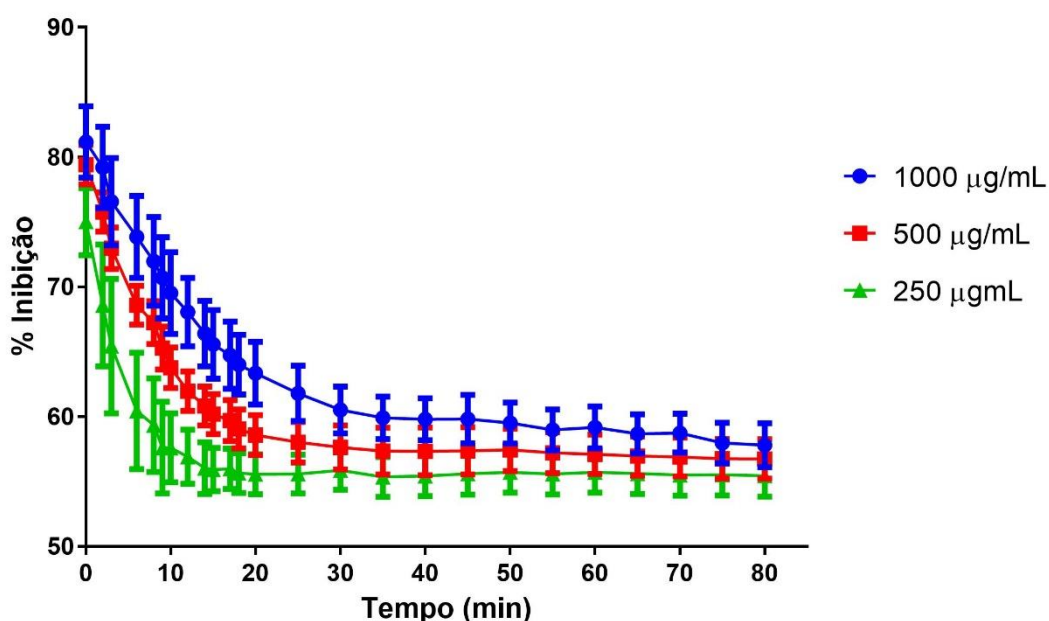
5.4.7 Verificação da inibição da atividade da enzima collagenase

Dentre os constituintes predominantes da matriz extracelular (MEC) tem-se os colágenos fibrilares, a elastina e os glicosaminoglicanos, juntos eles constituem o suporte dos tecidos conjuntivos e contribuem para a manutenção estrutural e mecânica da pele (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

A redução da quantidade da MEC está ligada especialmente à diminuição do colágeno na derme, que é mencionado como sendo um dos mecanismos predominantes que levam à atrofia dérmica (SHIN *et al.*, 2019). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases que atuam nos processos de remodelação e renovação da MEC, além disso, possuem a capacidade de degradar os seus constituintes, na pele as MMP-1, -8 e -13 são conhecidas como collagenases e possuem como função degradar colágeno (KAHARI; SAARIALHO-KERE, 1997).

No entanto, alguns processos como inflamação cutânea, radiação UV e o processo de envelhecimento levam a um desequilíbrio na produção destas metaloproteinases, aumentando muito sua quantidade na MEC, o que acarreta em uma degradação intensa das fibras de colágeno (HUH *et al.*, 2015). Para avaliar o potencial de inibição da collagenase pelo ácido ursólico foi utilizado um teste colorimétrico que avalia a absorbância do substrato após reagir com a collagenase, e seus resultados estão expostos na Figura 18. Os valores obtidos demonstram que o ácido ursólico possui a capacidade de inibir a ação da collagenase.

Figura 18 – Porcentagem de inibição da collagenase pelo ácido ursólico (AU) nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$



Fonte: O autor.

A menor concentração de ácido ursólico testada (250 $\mu\text{g/mL}$) apresentou uma queda da porcentagem que se estabilizou em 17 minutos a uma porcentagem de 55%

de inibição; já na concentração de 500 µg/mL essa redução foi mais lenta onde a degradação mais acentuada aconteceu até os 25 minutos chegando a porcentagem de 57% e esse valor teve pouca redução até o final do experimento em 80 minutos (56%), e a maior concentração testada (1000 µg/mL) mostrou ainda mais duração da inibição da collagenase em maiores porcentagens chegando em 35 minutos com 59% de inibição, terminando aos 80 minutos com 57,7% de inibição.

Embora tenha sido observado que as maiores concentrações têm uma redução mais lenta dessa inibição, todas as concentrações de ácido ursólico testadas apresentaram uma estabilização na faixa entre 50 e 60% de inibição, demonstrando o potencial do ácido ursólico em inibir o processo de degradação do colágeno decorrente do envelhecimento.

Załuski, Mendyk e Smolarz (2015) obtiveram em seu estudo utilizando 100 µg/mL de ácido ursólico o valor de 90,9% de inibição da MMP-1 que é uma das collagenases, o que também confirma a ação do ácido ursólico para essa metaloproteinase de matriz em específico.

Son e Lee (2020) estudaram a atividade da MMP-1 em células HaCaT de um composto oxidado do ácido ursólico, e observaram uma notável redução da secreção de MMP-1, verificaram que essa diminuição está relacionada à regulação negativa das vias de sinalização ERK e c-Fos nos queratinócitos HaCaT.

Também, foi relatado que diversas MMPs necessitam do fator AP-1 para que possam realizar a sua transcrição, e já é sabido que o ácido ursólico atua inibindo esse fator, o que contribui para a redução da quantidade dessas metaloproteinases na pele, isso demonstra que o ácido ursólico consegue atuar de maneira a antagonizar a manifestação destas MMPs (CHECKER *et al.*, 2012; MIX; SPORN; BRINCKERHOFF, 2004).

5.4.8 Avaliação da estabilidade das nanocápsulas contendo ácido ursólico

A análise da estabilidade global das nanopartículas se dá por meio da avaliação da estabilidade química e física destas partículas, levando em conta as alterações decorrentes da degradação dos componentes presentes na formulação durante um certo período de tempo.

As nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho foram armazenadas à temperatura ambiente, sob refrigeração (4° C) e em congelador (-20° C), os

parâmetros avaliados foram tamanho de partícula e potencial zeta nos tempos de 30, 60, 90 e 180 dias.

Em relação às alterações macroscópicas, todas as nanosuspensões mantiveram sua característica líquida de aparência leitosa, as formulações mantidas em congelador já no primeiro intervalo de análise (30 dias) apresentaram pequenos grânulos, indicando que ocorreu aglomeração, as demais formulações não apresentaram alterações macroscópicas no intervalo de tempo examinado.

Os resultados da análise de tamanho de partícula estão descritos na tabela 12 e revelam um aumento do diâmetro médio para todas as formulações estudadas, sendo que o período de análise de 60 dias foi o que apresentou a maior intensidade de alterações e no tempo 180 as nanocápsulas apresentaram diminuição dos valores de diâmetro médio.

Pode-se observar que as amostras acondicionadas em congelador apresentaram maior aumento de tamanho de partícula. É possível que isso se deva à aglomeração das mesmas, visto que já no primeiro tempo de análise foi observada a presença de pequenos grânulos na amostra.

A condição de armazenamento em geladeira demonstrou melhor manter a estabilidade das formulações estudadas em relação ao diâmetro médio, pois sabe-se que a degradação do PLA que é o polímero responsável pela formação da membrana polimérica da nanopartícula é altamente dependente do pH e da temperatura (XU; CRAWFORD; GORMAN, 2011).

Em seu estudo Xu, Crawford e Gorman (2011) observaram que o aumento da temperatura leva a uma degradação mais acelerada do PLA, eles demonstraram que na temperatura de 25° C a degradação integral do polímero ocorreu após 400h, e essa taxa de degradação quadruplicou em 37°C. O que confirma que a redução da temperatura diminui a taxa de degradação do polímero, favorecendo a estabilidade da partícula.

O aumento do tamanho de partícula no tempo 60, pode se dever ao processo de degradação do polímero, esse processo é normal para que ocorra a liberação do composto presente no interior do nanocarreador no seu local de ação.

Tabela 12- Valores de tamanho de partícula das nanosuspensões submetidas a diferentes condições de temperatura como: Temperatura ambiente (TA), geladeira (G) e congelador (C), nos tempos de 30, 60, 90 e 180

Tempo	Cond.	NPLA-0	NPLA-AU	NPLA-PEG-0	NPLA-PEG-AU	NPLA-AS-0	NPLA-AS-AU
0	TA	253,9 ± 18,8	364,9 ± 19,8	290, 9 ± 20,0	355,9 ± 36,3	293,9 ± 41,4	352,3 ± 34,5
30	TA	321,8 ± 11,7	446,8 ± 97,1	384,1 ± 7,8	434,8 ± 86,6	423,3 ± 48,4	547,3 ± 39,8
	G	288,15 ± 4,2	365,6 ± 53,4	415,8 ± 80,0	351,8 ± 11,2	316,75 ± 28,6	337,05 ± 2,5
	C	645,2 ± 104,4	538,7 ± 15,9	964,0 ± 155,6	604,8 ± 33,6	936,6 ± 52,5	519,4 ± 33,3
60	TA	442,4 ± 28,0	472,6 ± 44,9	496,2 ± 166,5	640,2 ± 73,8	383,7 ± 65,5	524,9 ± 127,6
	G	405,4 ± 25,4	471,8 ± 5,4	431,65 ± 98,8	405,6 ± 66,0	408,2 ± 4,1	457,75 ± 15,6
	C	1144,5 ± 3,5	722,8 ± 141,3	1236,5 ± 229,8	608,0 ± 177,3	679,7 ± 59,2	519,1 ± 78,1
90	TA	568,7 ± 45,7	614,6 ± 14,9	524,2 ± 45,0	446,0 ± 26,6	451,4 ± 42,8	526,7 ± 51,3
	G	345,1 ± 5,8	479,1 ± 29,5	371,25 ± 9,3	412,2 ± 1,4	415,25 ± 19,3	577,8 ± 22,8
	C	395,8 ± 58,9	417,0 ± 91,8	526,9 ± 140,0	494,7 ± 75,0	450,9 ± 131,2	583,6 ± 178,7
180	TA	401,8 ± 14,3	493,4 ± 15,4	382,7 ± 3,7	519,7 ± 10,9	339,65 ± 1,2	415,95 ± 15,8
	G	285,6 ± 6,6	341,5 ± 1,1	316,7 ± 10,8	353,6 ± 10,7	324,9 ± 3,2	425,8 ± 9,8
	C	451,3 ± 93,6	458,4 ± 26,4	622,6 ± 296,8	393,55 ± 5,3	434,35 ± 19,0	393,05 ± 26,6

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Fonte: O autor.

As avaliações para o potencial zeta (Tabela 13) revelaram, de uma maneira geral, que ocorreu uma diminuição em módulo dos valores de carga em todas as condições de temperatura nas formulações NPLA-0, NPLA-AU, NPLA-PEG-0 e NPLA-PEG-AU, sendo que a maior redução ocorreu no tempo de 60 dias o que coincide com os resultados encontrados no tamanho de partícula, em que esse tempo foi o que apresentou maior aumento das partículas, mesmo assim todas as formulações apresentaram valores próximos a -30 mV, indicando que estas nanocápsulas possuem estabilidade em suspensão, esses dados sugerem que o aumento do valor de diâmetro médio pode estar relacionado ao processo de degradação polimérica e não a agregação das mesmas.

Já as nanosuspensões de PLA-AS-0 e PLA-AS-AU apresentaram em média um aumento do valor em módulo da sua carga de superfície, que pode se dever ao fato dos grupos carboxílicos presentes na membrana polimérica estarem sendo ionizados (KÜLKAMP *et. al.*, 2009), mas ainda assim exibem resultados bem próximos a -30 mV, indicando também a estabilidade destas formulações.

Tabela 13- Valores de potencial zeta das nanosuspensões submetidas a diferentes condições de temperatura como: temperatura ambiente (TA), geladeira (G) e congelador (C), nos tempos de 30, 60, 90 e 180

Tempo	Cond.	NPLA-0	NPLA-AU	NPLA-PEG-0	NPLA-PEG-AU	NPLA-AS-0	NPLA-AS- AU
0	TA	-37,2 ± 4,8	-31,2 ± 2,9	-39,1 ± 4,3	-31,8 ± 0,6	-26,7 ± 8,7	-22,2 ± 2,3
	TA	-34,2 ± 2,0	-27,6 ± 2,3	-36,5 ± 8,3	-28,9 ± 1,6	-32,3 ± 2,3	-28,5 ± 2,6
30	G	-27,3 ± 4,9	-22,1 ± 4,9	-26,8 ± 14,5	-22,0 ± 6,7	-32,1 ± 7,7	-21,4 ± 3,8
	C	-40,5 ± 5,1	-36,0 ± 5,7	-41,6 ± 0,7	-31,5 ± 2,0	-45,3 ± 4,5	-28,5 ± 4,0
60	TA	-27,9 ± 3,2	-27,5 ± 1,0	-33,1 ± 0,2	-25,2 ± 2,0	-27,2 ± 2,5	-27,6 ± 2,0
	G	-28,7 ± 0,4	-22,4 ± 1,8	-39,6 ± 5,4	-25,4 ± 1,5	-29,0 ± 7,6	-24,5 ± 3,7
	C	-37,8 ± 1,5	-32,1 ± 1,7	-43,3 ± 1,8	-30,8 ± 4,3	-37,2 ± 3,6	-30,4 ± 1,4
90	TA	-32,8 ± 4,6	-24,2 ± 5,3	-35,4 ± 4,2	-24,8 ± 4,7	-31,9 ± 4,0	-26,8 ± 3,5
	G	-37,6 ± 2,5	-26,9 ± 2,1	-39,9 ± 0,8	-26,6 ± 1,4	-27,1 ± 0,9	-25,9 ± 3,8
	C	-40,7 ± 2,7	-35,2 ± 0,6	-41,0 ± 1,8	-35,3 ± 4,1	-35,9 ± 2,6	-25,7 ± 6,9
180	TA	-34,7 ± 1,0	-26,9 ± 4,3	-34,2 ± 0,3	-26,1 ± 2,6	-33,2 ± 1,2	-28,3 ± 1,0
	G	-30,4 ± 2,4	-29,9 ± 1,9	-37,4 ± 0,2	-28,0 ± 2,3	-29,6 ± 2,7	-28,1 ± 0,6
	C	-32,6 ± 3,1	-35,5 ± 4,6	-37,0 ± 7,3	-30,6 ± 0,9	-32,2 ± 5,3	-33,3 ± 2,1

Os resultados foram expressos como média e ± desvio padrão.

Fonte: O autor.

5.5 ESTUDO *IN VIVO*

5.5.1 Análise de retração da lesão

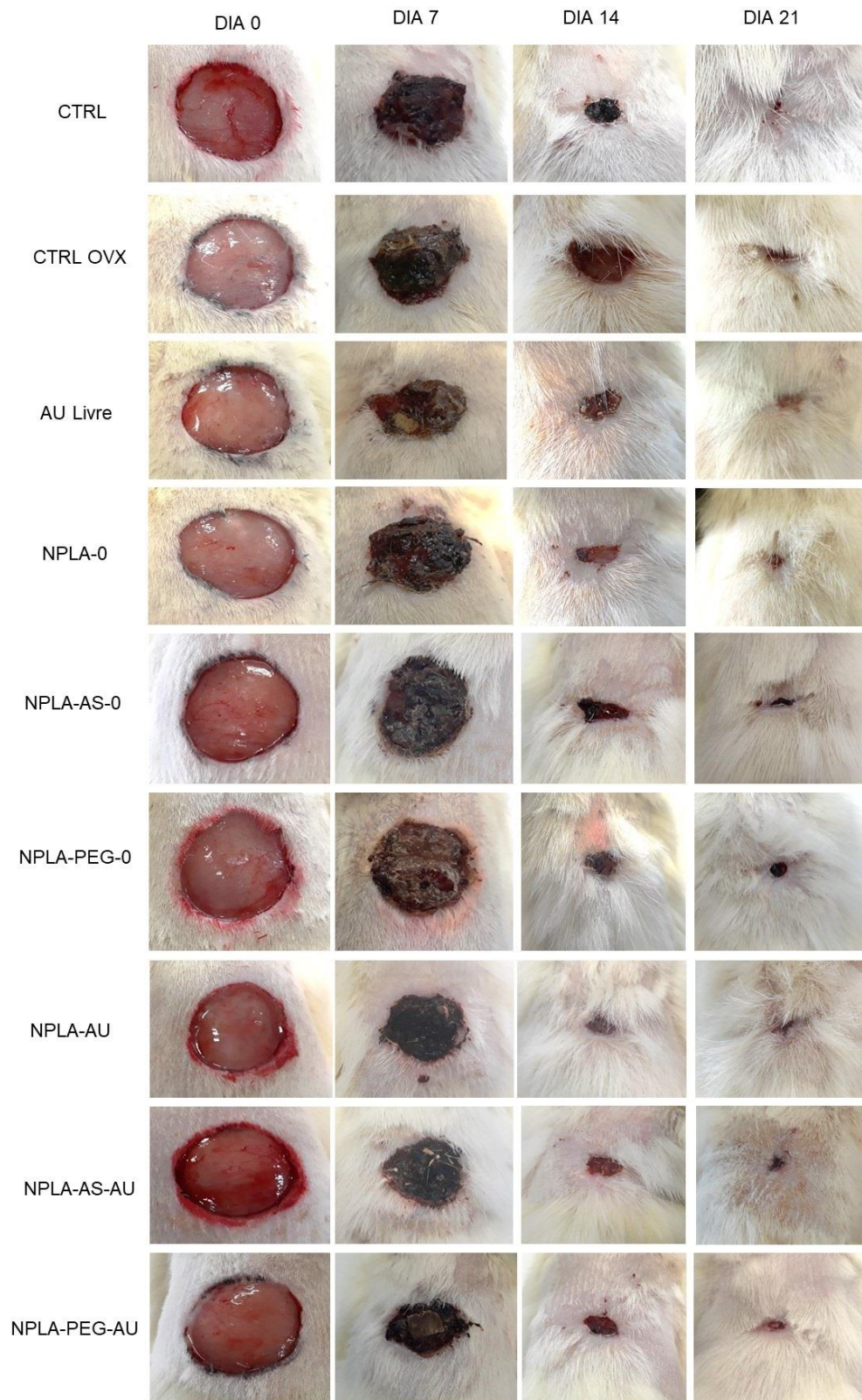
O modelo de cicatrização em ratas ooforectomizadas foi escolhido pelo fato de simular os efeitos do envelhecimento cutâneo, em decorrência da ausência do hormônio estrogênio, reproduzindo um padrão de menopausa. Em seu estudo Nanashima *et al.*, (2018) observaram que após três meses da ooforectomia os ratos apresentam redução dos níveis de colágeno, elastina e ácido hialurônico, confirmando este modelo como ideal, para avaliação da síntese de colágeno.

As análises macroscópicas das feridas durante os dias de experimento, estão expostas na Figura 19. Com estas imagens foi possível verificar que todos os grupos apresentaram uma redução progressiva da área da lesão no decorrer do experimento, e que as lesões não apresentaram sinais de edema, infecção ou resposta inflamatória exacerbada.

Os dados obtidos por meio da análise estatística (Figura 20) revelaram no sétimo dia que o grupo CTRL (37,5%) teve uma retração significativamente mais acelerada ($p < 0,01$) em comparação aos animais CTRL OVX (12,9%), assim como no décimo quarto dia com resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$) de 93,6% do grupo CTRL e 79,5% nos animais CTRL OVX, comprovando que a redução de estrogênio através do processo de ooforectomia contribui para dificultar o processo de reparo e leva a uma retração mais lenta da ferida.

O grupo tratado com as nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com ácido ursólico (NPLA-AU) (34,1%) e as nanocápsulas com a presença de ácido siálico também carregadas com ácido ursólico (NPLA-AS-AU) (31,4%) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CTRL OVX (12,9%) no sétimo dia. A retração mais acelerada observada no grupo NPLA-AS-AU pode ter ocorrido em decorrência do ácido siálico facilitar a comunicação da partícula com a célula, favorecendo a entrada do fármaco por meio de endocitose mediada por receptor, essa habilidade possibilita uma maior ação do ácido ursólico no tecido, além de reduzir uma das suas limitações que é a baixa permeabilidade (ZHANG *et al.*, 2014).

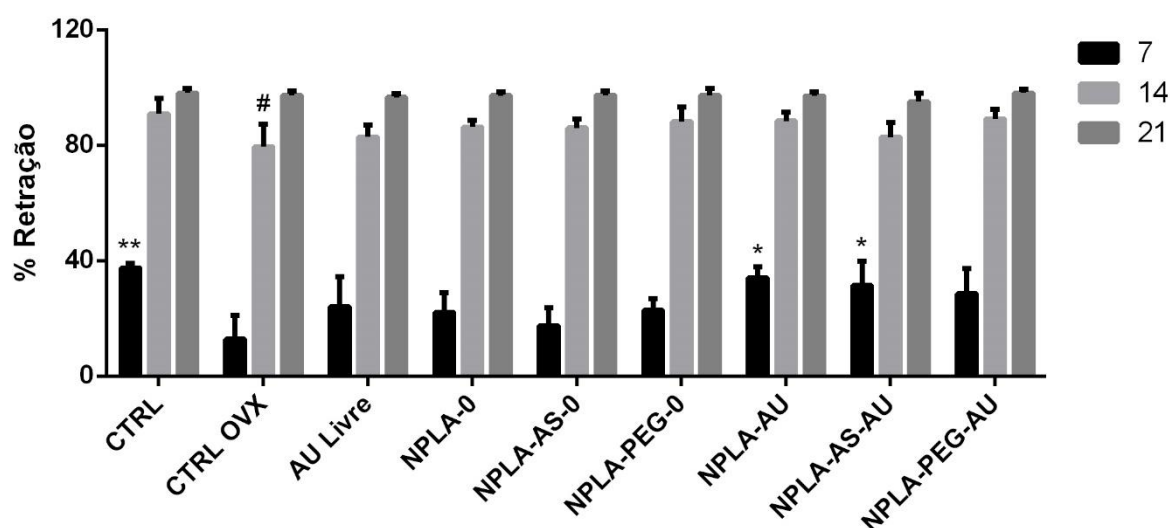
Figura 19- Imagens das lesões nos dias de biópsia dos grupos veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) nos dias 0, 7, 14 e 21.



Fonte: O autor.

Os resultados obtidos no estudo evidenciaram que o tratamento com as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico foi uma abordagem mais efetiva na contração da área da lesão, quando comparada à exposição direta ao fármaco livre (24,2%, dia 7). Esses resultados superiores foram particularmente perceptíveis nos primeiros 7 dias de reparo da lesão, visto que nos demais tempos não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos, embora as nanocápsulas com ácido ursólico tenham apresentado resultado levemente superior.

Figura 20- Porcentagem de retração das lesões nos dias 7, 14 e 21, para os grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$), símbolos indicam diferença significativa * indica diferença em relação ao grupo controle ooforectomia * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ no dia 7, # indica diferença em relação ao grupo controle $p < 0,05$ no dia 14. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way" seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

Nos demais tempos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Alterações que justifiquem estes achados poderão ser observadas na análise histológica.

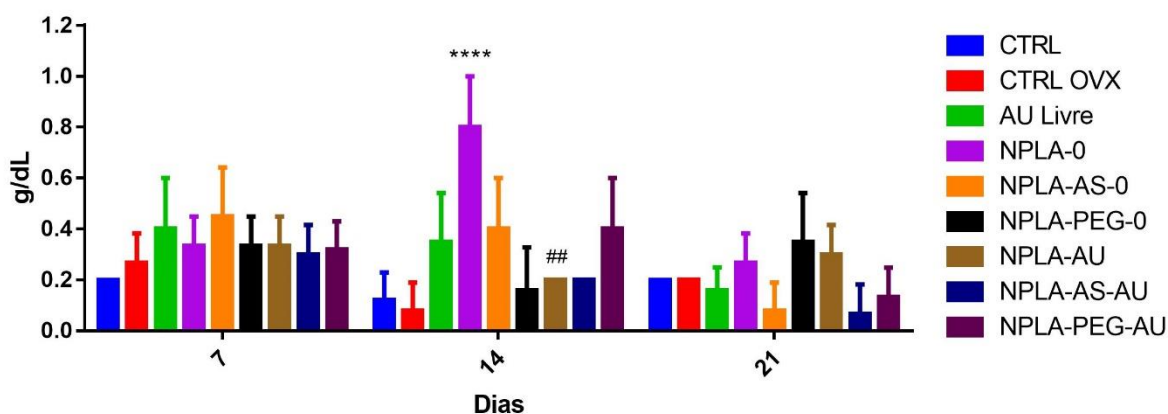
5.5.2 Dosagem de fibrinogênio

O fibrinogênio é uma conhecida proteína de coagulação que também é intitulada proteína de fase aguda, em virtude das suas concentrações plasmáticas aumentarem rapidamente na presença de processos inflamatórios (SONG, 2006).

Essa resposta de fase aguda é dividida em duas fases a fim de auxiliar na reparação da lesão tecidual, na primeira o fibrinogênio atua interrompendo a perda de sangue e prevenindo a infecção microbiana sendo dominada pela clivagem da trombina de fibrinogênio e por uma resposta inflamatória aguda, já na segunda fase ocorre a dissolução da plasmina, fibrina e outras proteínas da matriz onde estão presentes células inflamatórias (LUYENDYK; SCHOENECKER; FLICK, 2018).

Por essa razão e pelo fibrinogênio ser um preditor da resposta inflamatória, a sua avaliação é de grande importância para a análise do processo de cicatrização. Os resultados obtidos para este parâmetro estão apresentados na Figura 21.

Figura 21- Dosagem de fibrinogênio nos dias 7, 14 e 21 nos grupos de animais tratados com veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$) os símbolos indicam diferença significativa **** $p < 0,0001$ em comparação aos grupos controle (CTRL e CTRL OVX) ## indica diferença em relação ao grupo NPLA-0 $p < 0,01$. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way" seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

Fibrinogênio em taxas moderadas foi observado para todos os grupos nos dias 7, 14 e 21, exceto a alta concentração alcançada para NPLA-0 no dia 14. Essas concentrações moderadas são esperadas devido ao processo de cicatrização.

O valor estatisticamente alto obtido para NPLA-0 no dia 14, provavelmente se deve à ação inflamatória desencadeada pelo polímero, além da sua capacidade de estimular a ativação inflamatória dos macrófagos (HSIEH *et al.*, 2017), visto que nos locais onde o PLA é injetado ocorre uma reação de corpo estranho, o que gera um microambiente pró inflamatório em torno do polímero (STEIN *et al.*, 2015). O valor mais baixo para as nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU), pode ter ocorrido em decorrência da atividade anti-inflamatória do ácido ursólico, pois sabe-se

que ele possui a capacidade de suprimir os fatores de transcrição NF- κ B, levando a uma inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias através das células T e células B (CHECKER *et al.*, 2012). Os outros grupos não apresentaram diferença significativa nos tempos estudados.

5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

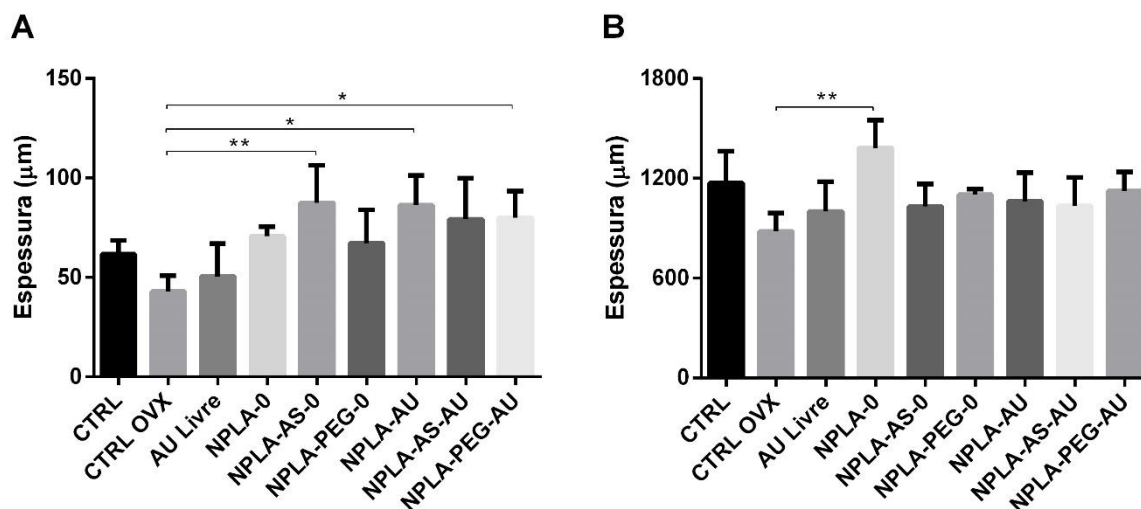
Na avaliação da espessura da pele, foi possível observar, tanto em relação à epiderme como à derme (Figura 22) que os animais que não foram submetidos a ooforectomia (CTRL, 61,64 μ m epiderme; 1172,62 μ m derme), apresentaram maior espessura das duas estruturas avaliadas em relação aos animais ooforectomizados (CTRL OVX, 42,99 μ m epiderme; 881,1 μ m derme) no vigésimo primeiro dia de avaliação, confirmando a influência hormonal no processo de cicatrização, bem como na estruturação da pele pós lesão.

O grupo tratado com as nanocápsulas com ácido siálico sem a presença do fármaco (NPLA-AS-0, 87,58 μ m) apresentou um aumento significativo da espessura da epiderme (Figura 22, A) em relação ao grupo CTRL OVX. O ácido siálico possui ação fundamental no processo de diferenciação e proliferação celular, fato este que pode justificar a maior espessura da epiderme (VARKI E VARKI, 2007), pois sua presença na membrana polimérica das nanocápsulas pode ter favorecido a comunicação celular levando a uma maior replicação.

O aumento da espessura da epiderme, também foi observado de maneira significativa nos animais tratados com as nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, 86,28 μ m e NPLA-PEG-AU, 80,03 μ m), muito provavelmente devido à capacidade do ácido ursólico em aumentar a expressão das proteínas essenciais para a diferenciação dos queratinócitos e na síntese dérmica de colágeno (BOTH *et al.*, 2002).

Em relação à espessura da derme (Figura 22, B), o único grupo que apresentou valores significativamente maiores que os animais controle ooforectomia (CTRL OVX) foram os animais tratados com as nanocápsulas vazias (NPLA-0, 1384,5 μ m), esse aumento pode ser resultante do processo de degradação do polímero, que ocorre lentamente, o que gera uma resposta inflamatória mais prolongada, levando a uma maior síntese de colágeno e consequentemente aumentando a espessura da derme (HERRMANN *et al.*, 2018).

Figura 22- Medida da espessura da epiderme (A) e da derme (B) no dia 21, para os grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$ em 3 locais diferentes por lâmina), símbolos indicam diferença significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

Embora não tenham apresentado diferença significativa, os demais grupos demonstraram valores superiores aos animais controle ooforectomizados, indicando que as formulações de nanocápsulas conseguem amenizar a redução da espessura da pele em decorrência da deficiência de estrogênio. No entanto, é necessária uma avaliação histológica detalhada, pois a qualidade da cicatrização e da reestruturação da pele vai depender da qualidade e da quantidade das fibras colágenas.

Em seu estudo Özyazgan e colaboradores (2002) observaram que mesmo os animais avaliados não tendo apresentado diferença significativa em relação à espessura da derme e epiderme, os animais ooforectomizados possuíam uma estruturação das fibras colágenas mais dispersa e com menor intensidade de coloração na avaliação histológica em relação ao grupo controle, comprovando a necessidade de uma avaliação mais específica.

5.6.1 Resposta inflamatória

A evolução do processo de cicatrização de feridas cutâneas ocorre de maneira dinâmica e compreende quatro fases distintas que se sobrepõe, sendo elas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (REINKE; SORG, 2012). A

fase inflamatória é a segunda fase deste processo e é reconhecida pela migração de neutrófilos para o local da ferida, sendo eles os responsáveis por conduzir a primeira resposta de defesa do organismo contra infecções ou danos nos tecidos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o controle ooforectomizado (CTRL OVX) apresentou um aumento da contagem de neutrófilos em comparação ao grupo controle não ooforectomizado (CTRL), nos três tempos estudados, sendo esse aumento significativo no décimo quarto dia (Figura 23, B), estes resultados demonstram que a deficiência de estrogênio altera o perfil inflamatório, com recrutamento alterado das células inflamatórias, levando-as a um aumento excessivo e com a função celular prejudicada. Além disso, também, é relatado o aumento das citocinas pró-inflamatórias e MMPs (GOSAIN; DIPIETRO, 2004; WILKINSON; HARDMAN, 2017), o que contribui para a intensificação da resposta inflamatória.

No sétimo dia (Figura 23, A) o grupo tratado com o ácido ursólico livre (AU Livre) apresentou valores significativamente mais elevados quando comparado ao CTRL OVX, com um aumento da contagem de neutrófilos no leito da ferida, esse valor foi reduzido com diferença significativa quando o ácido ursólico estava nanoencapsulado. Este resultado indica que o tratamento com as nanocápsulas reduziu a resposta inflamatória exacerbada no início do processo cicatricial, em decorrência do processo de nanoencapsulação proporcionar uma maior biocompatibilidade inicial, promover uma liberação controlada do composto na lesão, além de proporcionar um incremento da solubilidade o que favorece a permeabilidade do ácido ursólico na célula (PERRIE, 2016), possibilitando-o de exercer tanto a sua ação anti-inflamatória como antioxidante.

No décimo quarto dia, também foi possível observar uma redução significativa dos neutrófilos nos animais tratados com as nanocápsulas vazias que continham ácido siálico, PEG e as nanocápsulas contendo PEG carregadas com ácido ursólico, essa redução pode ter ocorrido em função da atividade furtiva tanto do ácido siálico como do PEG, fazendo com que a resposta inflamatória inespecífica gerada pela imunidade inata, em decorrência do tratamento com as nanocápsulas, fosse menos intensa (LIU *et al.*, 2017).

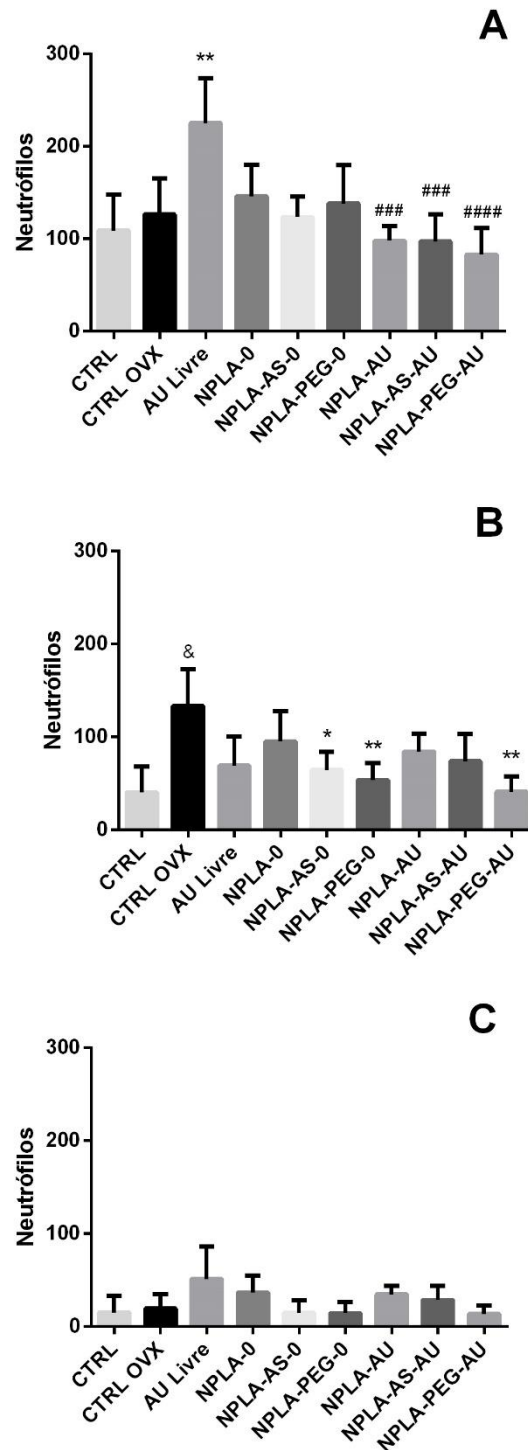
O processo de modificação de superfície das nanocápsulas possui a capacidade de alterar a resposta imunológica no organismo de diversas formas, uma dessas alternativas que é bastante descrita é em relação a hidrofiliabilidade da partícula

(LIU *et al.*, 2017), propriedade característica das partículas revestidas com PEG, que além de auxiliar na redução do reconhecimento, o seu incremento também auxilia na redução do nível de expressão de citocinas pro-inflamatórias observadas em animais tratados com partículas hidrofóbicas (MOYANO *et al.*, 2012).

O ácido síalico, além de possuir e fornecer às nanocápsulas essa propriedade hidrofílica, possui também a capacidade de interagir com as células imunológicas através dos Siglecs, e essa ligação pode levar a uma redução do processo inflamatório por reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (SPENCE *et al.*, 2015). É possível observar que todas as formulações de nanocápsulas apresentaram redução da quantidade de neutrófilos, essa ação comprova que as mesmas conseguem reduzir o processo inflamatório acentuado decorrente do procedimento de ooforectomia.

Uma notável redução na contagem de neutrófilos foi observada com 21 dias (Figura 23, C) para todos os grupos, indicando que a lesão se encaminhou para a resolução do processo inflamatório, o que é positivo pois um prolongamento da inflamação é capaz de provocar grandes prejuízos para o tecido e pode desencadear um estímulo desregulado dos queratinócitos com consequente falha na sua diferenciação e proliferação o que pode levar a formação de um processo crônico (LANDÉN, LI, STÅHLE, 2016; SINGH, YOUNG, MCNAUGHT, 2017).

Figura 23- Contagem de neutrófilos nos dias 7 (A), 14 (B) e 21 (C), nos grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 5) e média da análise de 5 campos por lâmina em aumento de 400x, símbolos sinalizam diferença significativa, & indica diferença em relação ao grupo CTRL & p<0,01, * indica diferença em relação ao grupo CTRL OVX * p<0,05, ** p< 0,01, # indicam diferença em relação ao grupo AU Livre # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 e ##### p<0,0001. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

Para auxiliar no processo de resolução da fase inflamatória ocorre o influxo de macrófagos para os locais da ferida, eles atuam nas três fases subsequentes do processo de cicatrização, resumidamente, na fase inflamatória auxiliam na limpeza da lesão eliminando bactérias, desbridando o tecido e induzindo a apoptose dos neutrófilos; na fase proliferativa vão estimular a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos através da secreção do fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1); e na fase de remodelamento, auxiliando a reorganização da matriz extracelular e dos vasos, contribuindo para o desenvolvimento do tecido cicatricial (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; FADOK *et al.*, 1998).

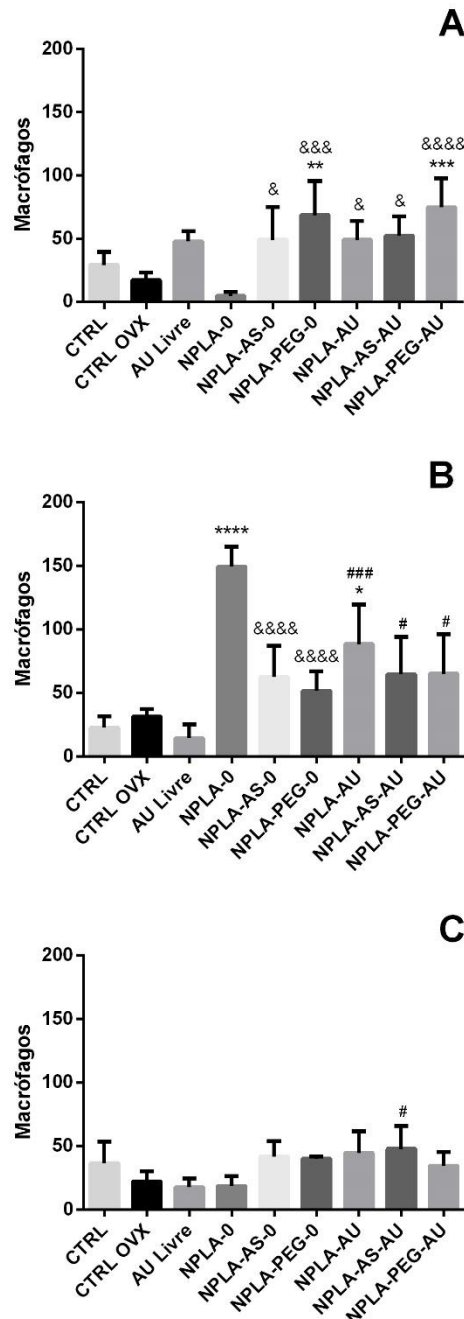
Os valores encontrados revelaram um aumento da contagem de macrófagos (Figura 24) nos animais tratados com as nanocápsulas de núcleo lipídico, principalmente nas análises do dia 7 e 14; esses achados podem ter ocorrido em decorrência do processo gerado pelo polímero no tecido, pois é conhecido que o PLA gera uma resposta inflamatória e ocasiona um maior recrutamento de macrófagos e uma reação de corpo estranho na tentativa de fagocitar o biomaterial (STEIN *et al.*, 2015), e vale lembrar que além da resposta desencadeada pelas nanocápsulas existe o processo fisiológico da cicatrização da lesão.

No sétimo dia (Figura 24, A), os animais tratados com as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo PEG, NPLA-PEG-0 (68,5) e NPLA-PEG-AU (74,8) apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo CTRL OVX (17). Já as nanocápsulas contendo ácido siálico, NPLA-AS-0 (49) e NPLA-AS-AU (52,25) e as nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, 49) apresentaram um menor aumento dos macrófagos, com diferença significativa quando comparados ao grupo que recebeu as nanocápsulas vazias (NPLA-0, 4,75). Esses resultados indicam que a modificação de superfície não inibiu o recrutamento de macrófagos para a lesão no início do tratamento.

A superfície hidrofílica e também a característica aniônica das nanocápsulas estimulam quantidades mais elevadas de macrófagos e linfócitos próximos as células gigantes de corpo estranho, com maior adesão e ativação (CHANG *et al.*, 2009), assim como, a presença dos grupos de superfície $-OH$ e $-NH_2$ levam a um maior recrutamento de células inflamatórias para o local do implante do biomaterial (KAMATH *et al.*, 2008), e tanto as partículas com PEG, como as com ácido siálico possuem na sua estrutura o grupamento $-OH$, característica esta que pode justificar

o aumento da contagem de macrófagos no início do processo cicatricial e mais próximo ao tratamento.

Figura 24- Contagem de macrófagos nos dias 7 (A), 14 (B) e 21 (C), nos grupos controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$) média da análise de 5 campos por lâmina em aumento de 400x, símbolos sinalizam diferença significativa, * indica diferença em relação ao grupo CTRL OVX $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$, # indica diferença em relação ao grupo AU Livre $\#p < 0,05$ e $###p < 0,001$ e & indica diferença em relação ao grupo NPLA-0 $\&p < 0,05$, $\&\&\&p < 0,001$ e $\&\&\&\&p < 0,0001$. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey. Fonte: O autor.

No décimo quarto dia (Figura 24, B) o grupo tratado com as nanocápsulas vazias (NPLA-0, 149,33) teve um aumento bastante intenso com valores significativamente maiores que o CTRL OVX (34,1), bem como as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico (NPLA-AU, 88,33). O comportamento observado nos animais tratados com as nanocápsulas vazias pode ser justificado pela ação do polímero, pois diversos estudos relatam que após a sua administração ocorre um influxo maciço de macrófagos, que gera uma reação de corpo estranho (HERRMANN *et al.*, 2018; RAY; TA, 2020).

Como comentado na seção 5.5.2, o fibrinogênio está presente nas respostas inflamatórias agudas, e a literatura relata que ele possa ser também um elemento responsável pela ação pró-inflamatória destes biomateriais, estimulando o recrutamento de fagócitos (TANG; EATON, 1993; CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019), isso pode ser confirmado já que os níveis de fibrinogênio estavam significativamente aumentados no dia 14 de avaliação nos animais tratados com NPLA-0, coincidindo com o resultado obtido para a contagem de macrófagos nesse mesmo tempo, estes resultados indicam que o biomaterial polimérico estimula a inflamação e leva a um maior recrutamento de macrófagos no dia 14.

No entanto, quando comparado, o grupo NPLA-0 com as nanocápsulas controle com ácido siálico (NPLA-AS-0, 62,4) e com PEG (NPLA-PEG-0, 51,6) foi possível observar uma redução significativa da contagem de macrófagos nos grupos que receberam as partículas com a modificação de superfície, o que pode indicar que a modificação pode influenciar o recrutamento celular de macrófagos em uma etapa mais avançada do processo cicatricial. Tanto o ácido siálico como o PEG conseguem reduzir a expressão de proteínas relacionadas a estimulação imunológica e detecção de patógenos como CD14 e CD86, sendo que estas proteínas são marcadores para macrófagos ativados (KIM *et al.*, 2017), essa atividade pode reduzir o recrutamento de células para o local da lesão.

As nanocápsulas carregadas com ácido ursólico NPLA-AU (88,33), NPLA-AS-AU (64,5) e NPLA-PEG-AU (65) também apresentaram aumento dos macrófagos quando comparado com o fármaco livre (AU Livre,14,4), porém, esse aumento está relacionado ao biomaterial polimérico da membrana das nanocápsulas de núcleo lipídico, visto que as nanocápsulas sem a presença do fármaco apresentaram comportamento semelhante. Ainda assim, foi possível observar que os animais tratados com as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico apresentaram uma

redução dos macrófagos em relação aos tratados com as nanocápsulas controle, isso pode se dever à atividade anti-inflamatória do ácido ursólico, Checker *et al.* (2012) em seu estudo avaliaram a ação anti-inflamatória do ácido ursólico e observaram que ele é capaz de inibir completamente a secreção de citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α em macrófagos esplênicos. A redução das citocinas pela ação anti-inflamatória do fármaco pode levar a uma menor sinalização de dano na lesão, fazendo com que haja um menor recrutamento de células.

No vigésimo primeiro dia (Figura 24, C), todos os grupos apresentaram redução, chegando a valores próximos ao controle (CTRL, 36,6), ainda assim os animais que receberam as nanocápsulas com ácido siálico carregadas com ácido ursólico (NPLA-AS-AU, 47,75) exibiram valores significativamente maiores em comparação ao grupo tratado com o ácido ursólico livre.

Atualmente, tem se buscado biomateriais que consigam interagir de forma a estimular respostas imunológicas no tecido de implantação, promovendo respostas positivas, essa maior capacidade de interação proporciona uma maior adaptação e um reparo tecidual mais eficiente, em comparação com biomateriais que não interagem ou que reduzem essa resposta (MARIANI *et al.*, 2019).

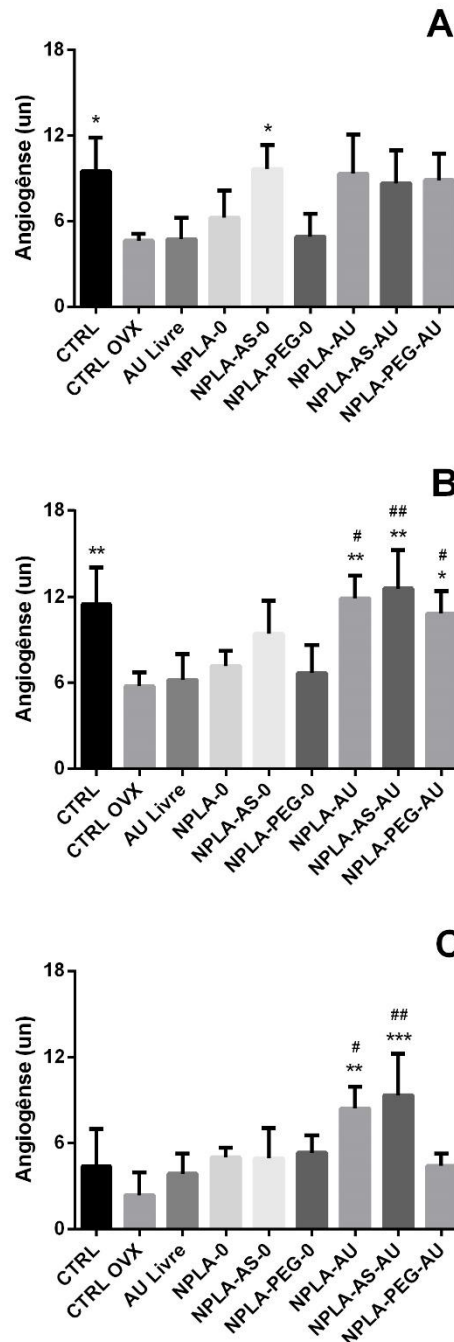
O aumento da síntese de colágeno dérmico está sendo atribuído aos efeitos parácrinos das células de corpo estranho e os macrófagos desempenham ação central neste tipo de reação (VLEGGAAR; FITZGERALD; LORENC, 2014; STEIN *et al.*, 2015), o que demonstra que sua presença é fundamental para o reparo tecidual e estimulação da síntese de colágeno dérmico. Os valores aumentados são considerados positivos, ainda mais por saber que em camundongos idosos a atividade fagocítica dos macrófagos na ferida é diminuída, reduzindo a secreção de VEGF, o que leva a um retardo da angiogênese, formação de tecido de granulação e consequente reepitelização (ASHCROFT; MILLS; ASHWORTH, 2002).

Na fase proliferativa a neovascularização desempenha um papel crucial para o sucesso da resolução do processo de cicatrização com significativa importância para a formação do tecido de granulação, os novos vasos auxiliam fornecendo oxigênio, nutrientes, células, além de facilitar o descarte de resíduos metabólicos (KORNTNER *et al.*, 2019).

Na avaliação da angiogênese (Figura 25) valores reduzidos foram observados em todos os tempos nos animais controle ooforectomia (CTRL OVX), sendo que essa redução foi significativamente diferente ao controle (CTRL) na análise do sétimo

(Figura 25, A) e do décimo quarto dia (Figura 25, B) demonstrando que a carência hormonal do estrógeno leva a uma redução do surgimento de novos vasos.

Figura 25- Número de novos vasos nos dias 7 (A), 14 (B) e 21 (C), nos animais controle veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$) média da análise de 3 campos por lâmina em aumento de 400x, símbolos sinalizam diferença significativa, * indica diferença em relação ao grupo CTRL OVX $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ e # indica diferença em relação ao grupo AU Livre $\#p < 0,05$ e $##p < 0,01$. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way" seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

Essa redução pode estar relacionada à diminuição dos níveis de VEGF no leito da ferida que é um dos fatores pró-angiogênicos mais potentes (KORNTNER *et al.*, 2019), e também há indícios de que essa redução seja decorrente de uma resposta diminuída à hipóxia que é um fator expressivo de estímulo da angiogênese através do fator-1 derivado do estroma dependente de HIF-1 α (Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa) que está reduzido em animais idosos (LOH *et al.*, 2009). A hipóxia também reduz a resposta ao TGF- β 1, sendo que sua expressão já é diminuída em função da idade, e além de estimular a angiogênese o TGF- β 1 promove a migração dos queratinócitos e induz a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (FADOK *et al.*, 1998; MOGFORD *et al.*, 2002), portanto a sua deficiência é bastante danosa no processo de reparo.

Os animais tratados com as nanocápsulas com ácido siálico (NPLA-AS-0, 9,7) apresentaram um aumento significativo no número de novos vasos em relação aos animais CTRL OVX (4,6) no sétimo dia (Figura 25, A), os animais tratados com as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico, NPLA-AU (9,3), NPLA-AS-AU (8,7) e NPLA-PEG-AU (8,9) embora não tenham exibido valores significativamente diferentes, demonstraram um estímulo da proliferação de vasos.

O ácido siálico é o principal ânion presente na superfície das células endoteliais e sua expressão é controlada durante o processo de neovascularização, podendo influenciar o início da formação e desenvolvimento dos vasos sanguíneos, também é relatado que diversos receptores pró-angiogênicos são sialilados (CHIODELLI *et al.*, 2018), estas características podem ter estimulado o surgimento de um maior número de vasos nos animais tratados com as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido siálico.

Já no décimo quarto dia (Figura 25, B) esses mesmos grupos NPLA-AU (11,9), NPLA-AS-AU (12,6) e NPLA-PEG-AU (10,8) expressaram valores significativamente diferentes tanto em comparação com o controle ooforectomia (CTRL OVX, 5,75) como com o ácido ursólico livre (AU Livre, 6,2), os resultados continuaram mantendo valores elevados e com diferença estatística nos animais tratados com NPLA-AU (8,4) e com NPLA-AS-AU (9,3) quando comparados ao grupo CTRL OVX (2,4) e também ao grupo tratado com o ácido ursólico livre (3,9) no vigésimo primeiro dia (Figura 25, C).

Esses resultados revelam que o tratamento com as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico estimulou a angiogênese mesmo em animais com deficiência de estrogênio, e trouxe esses valores para a normalidade e até estimulou essa

proliferação no vigésimo primeiro dia. A atividade angiogênica do ácido ursólico se deve à sua capacidade de regular positivamente a produção de fatores de crescimento angiogênicos como a prostaglandina e o VEGF (CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2004; KIRAN *et al.*, 2008).

Além dos compostos veiculados um dos fatores que podem contribuir com uma atividade angiogênica mais pronunciada no tecido é o colágeno tipo I, e devido ao fato de apresentar características estimuladoras para angiogênese pode ser considerado um importante componente intermediário da matriz para este processo fisiológico (TWARDOWSKI *et al.*, 2007).

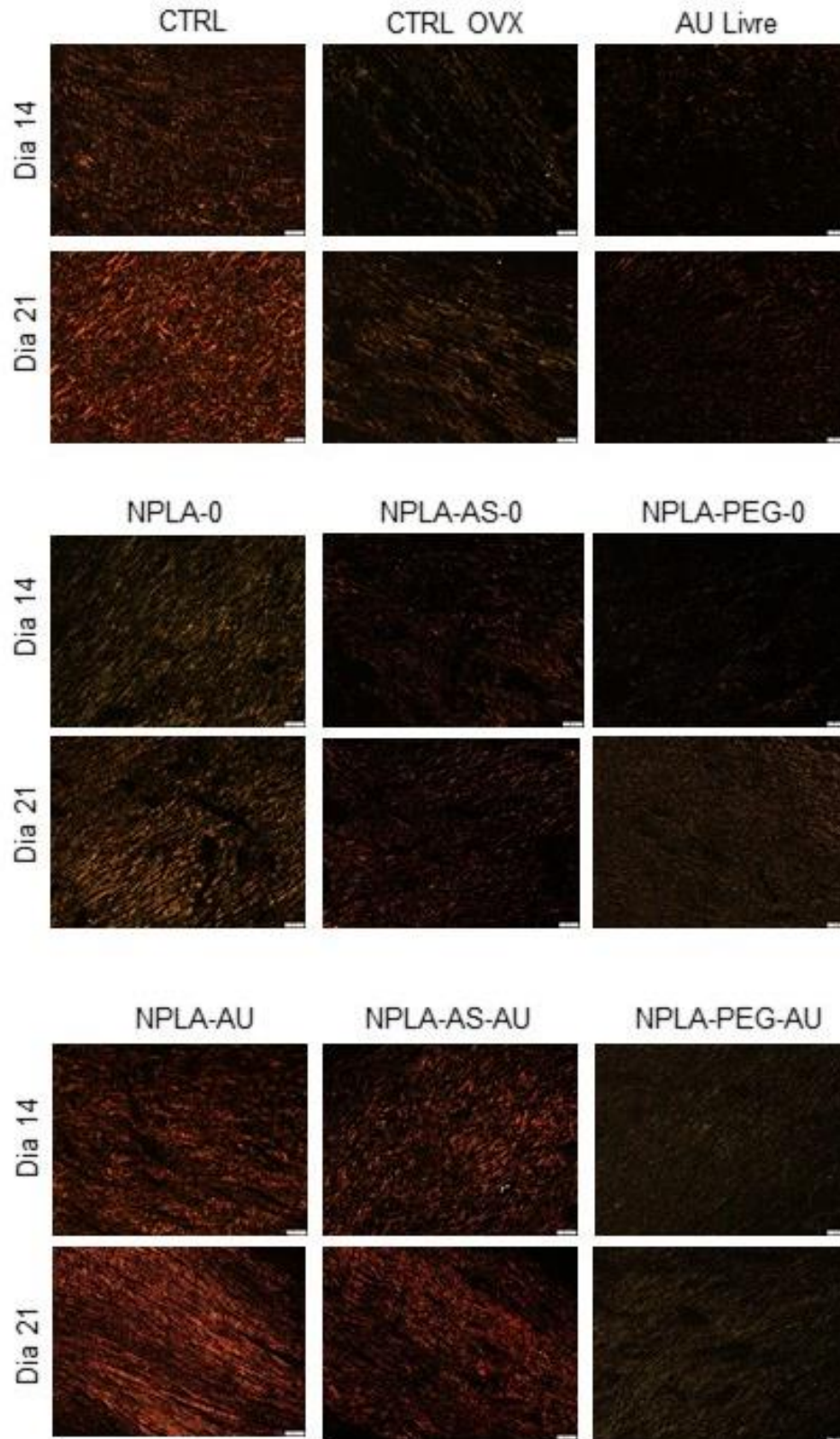
5.6.2 Picrosirius red

A fase de remodelação inicia no final do desenvolvimento do tecido de granulação, em que ocorre a sua troca por fibras colágenas e elásticas (DAVISON-KOTLER; MARSHALL; GARCÍA-GARETA, 2019), a MEC formada possui como principal componente as fibras colágenas e sua síntese correta é fundamental para garantir a densidade e a resistência adequada da pele ao longo do processo de cicatrização (WESS, 2005).

O colágeno tipo III já começa a ser sintetizado pelos fibroblastos no tecido de granulação (GAO *et al.*, 2021), e possui ação fundamental no desenvolvimento das fibrilas de colágeno, regulando o seu diâmetro (LIU *et al.*, 1997), com o início da fase de remodelamento o colágeno tipo III é lentamente substituído pelo colágeno tipo I (GAO *et al.*, 2021), que confere à pele uma maior resistência à tração levando também, a uma melhora da sua estrutura durante a fase de maturação do processo de cicatrização (XUE; JACKSON, 2015).

As imagens das fibras colágenas coradas com picrosirius red estão apresentadas na Figura 26. Os resultados revelaram uma redução significativa ($p < 0,0001$) das fibras colágenas tipo III e tipo I nos animais controle ooforectomizados (CTRL OVX), em relação ao controle (CTRL), tanto no dia 14 (Figura 27 e 28, A) como no dia 21 (Figura 27 e 28, B), esses resultados estão concordantes com os relatos de que o processo de ooforectomia leva a uma redução dos níveis de colágeno (CHANDRAMOGAN *et al.*, 2020; NANASHIMA *et al.*, 2018; PIRILA *et al.*, 2001).

Figura 26- Imagens das fibras de colágeno I (vermelho) e III (verde) dos grupos veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) nos dias 14 e 21. Coloração Picosirius Red, aumento 200X

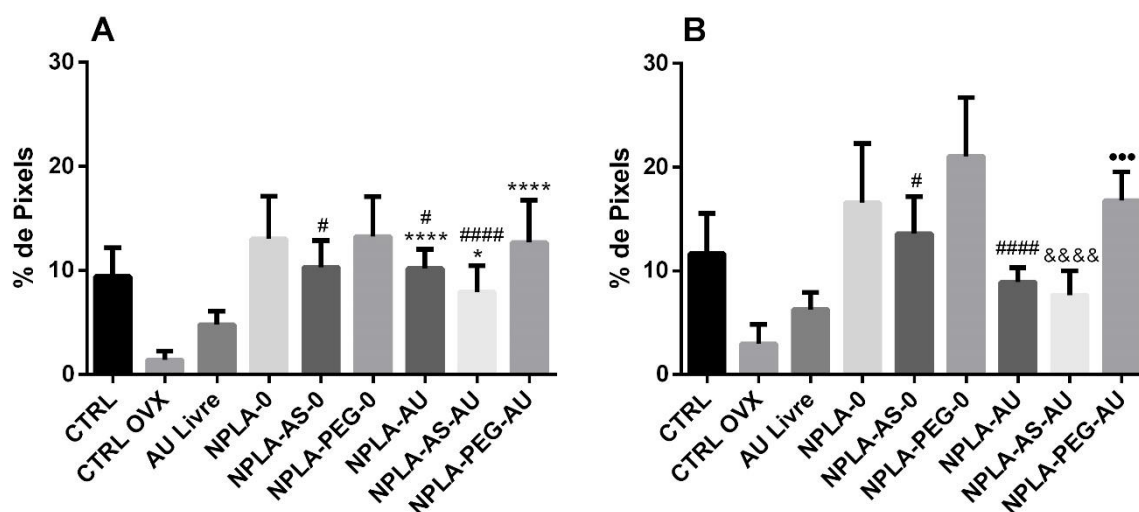


Fonte: O autor.

A redução dos níveis de estrogênio no organismo intensifica a produção de radicais livres, esse acúmulo das espécies reativas de oxigênio estimula mecanismos moleculares e celulares que desencadeiam o processo de envelhecimento, com o aumento das MMPs decorrente do estímulo de fatores de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1) (LEPHART, 2016; SAIMIN; HENDARTO; SOETJIPTO, 2019), reduzindo a deposição da MEC pela proteólise excessiva, fazendo com que as fibras apresentem morfologia fragmentada com distribuição esparsa e grosseira (YASUI *et al.*, 2012).

No décimo quarto dia (Figura 27, A), foi possível observar que os animais que foram tratados com NPLA-0, NPLA-PEG-0 e NPLA-PEG-AU apresentaram um aumento das fibras colágenas tipo III em relação aos demais tratamentos, esse comportamento permaneceu na avaliação do vigésimo primeiro dia (Figura 27, B).

Figura 27- Porcentagem em pixels de colágeno tipo III nos dias 14 (A) e 21 (B) dos grupos controles (CTRL e CTRL OVX), tratados com ácido ursólico livre (AU Livre) e nanocápsulas vazias (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas com a presença do ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU).



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$) média da análise de 5 campos por lâmina em aumento de 200x, símbolos sinalizam diferença significativa, * indica diferença em relação ao grupo AU livre $*p < 0,05$ e $****p < 0,0001$ e # indica diferença em relação ao grupo NPLA-0 #### $p < 0,0001$; & indica diferença entre o grupo NPLA-AS-0 &&&& $p < 0,0001$ e • indica diferença em relação ao grupo NPLA-PEG-0 •• $p < 0,001$. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

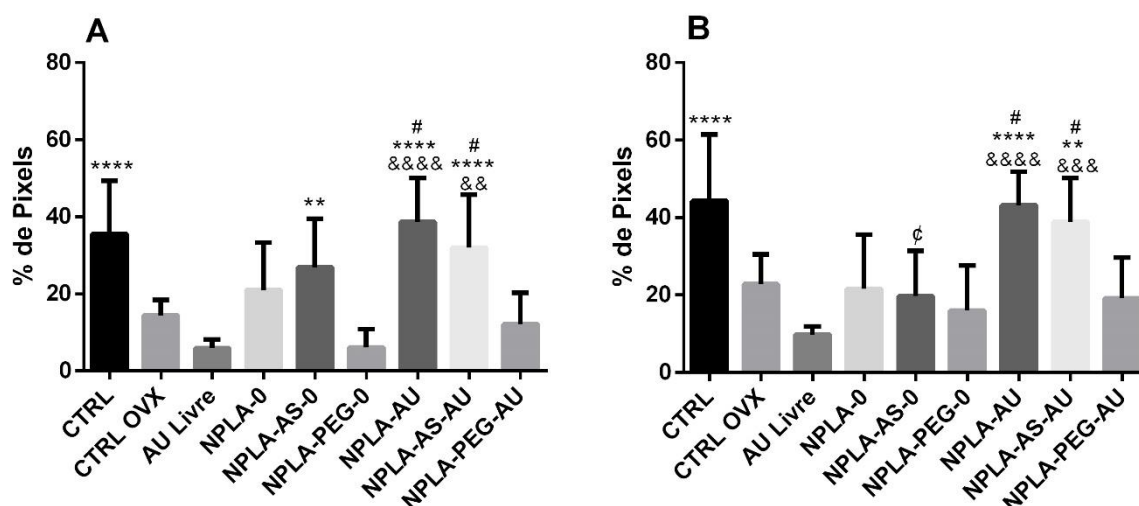
O PLA pode ter estimulado uma reação de corpo estranho na tentativa dos macrófagos fagocitarem a partícula, essa ação faz com que ocorra a secreção de citocinas, dentre elas o TGF- β 1, que possui a capacidade de estimular a proliferação

dos fibroblastos aumentando o estímulo da secreção da MEC e da síntese de colágeno (RAY; TA, 2020). No entanto, uma maior concentração de fibras colágenas do tipo III é principalmente observada em cicatrizes hipertróficas ou cicatrizes com quelóide (BUTZELAAR *et al.*, 2016), o que é bastante negativo podendo trazer consequências estéticas e físicas.

Já os animais tratados com as nanocápsulas recobertas com ácido siálico com e sem a presença de ácido ursólico (NPLA-AS-0 e NPLA-AS-AU) e as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico (NPLA-AU) indicaram uma redução dessa porcentagem nos dois períodos de análise, esses resultados podem ter ocorrido devido ao processo natural de substituição do colágeno tipo III para o colágeno tipo I à medida que a cicatriz amadurece (SIDGWICK; BAYAT, 2011).

Quando realizada avaliação da síntese do colágeno tipo I (Figura 28) os resultados do grupo tratado com NPLA-AU e NPLA-AS-AU evidenciaram um aumento significativo ($p < 0,0001$) da porcentagem de colágeno com valores análogos ao controle (CTRL) nos dois tempos avaliados, esse resultado demonstra que o processo de nanoencapsulação do ácido ursólico, contribuiu para que sua atividade fosse aprimorada, apresentando um maior potencial de ação.

Figura 28- Porcentagem em pixels de colágeno tipo I nos dias 14 (A) e 21 (B) dos grupos controles (CTRL e CTRL OVX), tratados com ácido ursólico livre (AU Livre) e nanocápsulas vazias (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas com a presença do ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$) média da análise de 5 campos por lâmina em aumento de 200x, símbolos sinalizam diferença significativa, * indica diferença em relação ao grupo CTRL OVX $**p < 0,01$ e $****p < 0,0001$; # indica diferença em relação ao grupo AU livre $p < 0,0001$; & indica diferença em relação ao grupo NPLA-0 && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ e &&&& $p < 0,0001$. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way" seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

O ácido ursólico suprime a expressão dos genes c-Fos e c-Jun que são necessários para formar o complexo AP-1, sendo este um fator essencial para o estímulo das MMPs (MIX; SPORN; BRINCKERHOFF, 2004). Checker *et al.*, (2012) observaram em seu estudo que o ácido ursólico além de inibir AP-1, também foi capaz de reduzir a expressão das MAPKs (proteína ativada por mitógenos quinases) que também participa do processo para regulação das MMPs auxiliando no remodelamento da matriz extracelular.

Tan, Sonam e Shimizu (2017) quando avaliaram a ação dos triterpenos na produção de colágeno em células NHDF obtiveram um aumento do conteúdo de colágeno em 3,8 vezes em relação ao controle, quando estas células foram tratadas com ácido ursólico.

A presença do ácido siálico na superfície da partícula pode ter acelerado a liberação do fármaco devido a sua acidez, o que contribui para que o polímero fosse degradado mais rapidamente pelo processo de hidrólise ácida (SCHAUER; KAMERLING, 2018), além da sua capacidade de favorecer a ação do ácido ursólico, um aumento do seu potencial de ação pode ter ocorrido em decorrência da endocitose mediada por receptor (ZHANG *et al.*, 2014). Hu *et al.* (2017) verificaram que micelas mediadas por ácido siálico são internalizadas por células endoteliais por intermédio da ligação entre o receptor de ácido siálico e E-selectina.

No entanto esse desempenho não foi percebido nos animais que receberam as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo PEG (NPLA-PEG-0 e NPLA-PEG-AU), que pode ter ocorrido em decorrência da sua característica altamente hidrofílica, que reduz a interação celular, reduzindo a sua internalização e consequentemente diminuindo a liberação do fármaco na célula (CONTE *et al.*, 2019). Ou estes animais se encontram em um processo mais lento de cicatrização, já que os resultados para o colágeno tipo III estão elevados.

O resultado encontrado para a quantificação do colágeno vai ao encontro dos resultados obtidos para retração da lesão, assim como, da angiogênese em que os tratamentos com NPLA-AU e NPLA-AS-AU apresentaram uma retração significativamente mais acelerada na avaliação do sétimo dia, e uma maior angiogênese nos dias 14 e 21, além de também uma maior porcentagem de colágeno tipo I, o que indica uma maturação cicatricial, esses resultados demonstram a superioridade destes tratamentos quando comparado aos demais grupos.

5.7 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Nos estudos *in vivo* com a utilização de nanotecnologias, é de fundamental importância a análise das alterações hematológicas, para avaliar a presença ou ausência de indícios de toxicidade relacionados ao tratamento utilizado. Pois, em razão do seu tamanho reduzido, as nanopartículas possuem uma maior área de superfície e consequentemente uma grande quantidade de elétrons reativos no seu exterior, o que pode aumentar a sua toxicidade (BULCÃO *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos para avaliação hematológica estão apresentados na tabela 14. Pode-se observar que ocorreu aumento do número global de células brancas (WBC) a partir do dia 14 em relação ao controle (CTRL), embora não tenha apresentado diferença significativa é possível observar um aumento dos leucócitos nos animais controle ooforectomizados, isso indica que estes animais apresentam uma resposta inflamatória mais acentuada, sendo que é observado nos animais com deficiência de estrógeno uma inflamação basal com aumento da contagem de leucócitos no timo, baço e medula óssea, esses fatos podem justificar a maior contagem de células brancas nesses grupos (SOUNG *et al.*, 2004).

No entanto estes valores ainda se encontram dentro da faixa normal para ratos wistar fêmeas de 17 semanas ou mais ($0,96-7,88 \times 10^9/L$) (GIKNIS; CLIFFORD, 2008) o que indica que tanto a reação inflamatória desencadeada pelo processo de cicatrização como o tratamento através das nanocápsulas em suas diferentes formulações, não alterou de modo significativo e exacerbado a liberação de células brancas na corrente sanguínea.

Tabela 14- Contagem de células brancas (WBC), neutrófilos (NEUT) e linfócitos (LYN) nos animais tratados com veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) nos dias 7, 14 e 21

Parâmetro	Dia	CTRL	CTRL OVX	AU Livre	NPLA-0	NPLA-AS-0	NPLA-PEG-0	NPLA-AU	NPLA-AS-AU	NPLA-PEG-AU
WBC (10 ⁹ L)	7	5,17±2,48	5,00±0,57	5,47±1,48	4,95±0,52	4,08±0,83	5,60±0,62	5,32±1,36	6,20±0,65	4,08±1,00
	14	2,52±1,02	4,38±0,51	5,30±1,75	4,13±0,92	3,98±0,66	4,98±2,27	5,30±1,04	5,36±1,82	4,30±1,31
	21	2,52±1,15	4,60±1,04	4,66±1,54	4,97±1,14	4,40±1,56	5,15±1,68	3,62±1,03	5,75±2,38	2,66±1,27
NEUT (%)	7	33,62±6,65	40,15±2,85	44,18±6,15	40,37±2,99	43,0±3,55	35,9±12,27	39,36±3,85	41,9±3,48	44,0±3,40
	14	37,56±4,37	38,68±9,40	36,3±2,72	31,53±7,11	27,96±6,17	37,64±4,72	37,92±3,71	37,83±2,95	32,66±3,04
	21	46,92±3,70	41,93±7,04	41,12±7,79	44,1±8,33	35,37±3,55	42,03±1,90	37,12±1,91	39,06±4,97	35,8±4,85
LYN (%)	7	58,17±10,06	53,42±2,43	49,76±6,20	50,50±4,44	49,24±2,19	50,35±14,33	51,30±1,71	49,27±6,31	46,28±6,76
	14	55,50±5,17	55,22±9,59	59,58±3,71	62,10±7,25	64,20±4,95	55,28±5,87	54,42±4,38	52,42±6,69	60,74±2,80
	21	44,40±3,82	57,02±10,17	50,90±9,77	48,47±9,21	56,52±3,68	49,25±4,92	56,15±2,40	51,65±6,92	54,16±6,33

Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 5). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey.

Fonte: O autor.

Quando analisada a porcentagem de neutrófilos (NEUT) pode-se verificar que embora não tenham sido encontrados valores estatisticamente diferentes é possível notar uma leve redução dessa porcentagem nos animais tratados com as nanocápsulas contendo ácido siálico e PEG no décimo quarto dia, esses resultados dão indícios da ação furtiva destes compostos o que confirma que elas reduzem a ativação do sistema imunológico inato do animal, e leva a uma menor ativação sistêmica de células para capturar e eliminar estas partículas do organismo (OWENSIII; PEPPAS, 2006), essa leve redução também foi observada nos animais tratados com as nanocápsulas contendo ácido ursólico no vigésimo primeiro dia, sinalizando a ação anti-inflamatória do fármaco. Em relação a porcentagem de linfócitos (LYN), também não foram encontrados achados significativos entre os grupos de tratamento estudados.

Em seu estudo Bulcão *et al.* (2013) não observaram reações de toxicidade na administração intradérmica de nanopartículas de núcleo lipídico, estes resultados coincidem com os resultados obtidos neste trabalho que indicam que não houve alterações importantes que apontem toxicidade nos hemogramas em decorrência dos tratamentos com o ácido ursólico, com as nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e com as nanocápsulas carregadas com ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) o que comprova que os mesmos não apresentaram sinais de toxicidade, nem o desencadeamento de resposta inflamatória sistêmica pronunciada.

5.8 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Além da toxicidade sistêmica, é importante avaliar se o tratamento dos animais com as nanocápsulas de núcleo lipídico nas diversas formulações promovem toxicidade em algum órgão específico. Para isso foram avaliados o perfil bioquímico hepático e renal, pois as nanopartículas são principalmente metabolizadas e eliminadas através do fígado e do rim (WEI *et al.*, 2018), sendo estes o foco central da nanotoxicologia, e os valores obtidos neste estudo estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Efeito dos tratamentos com veículo (CTRL e CTRL OVX), ácido ursólico livre (AU Livre), nanocápsulas controle (NPLA-0, NPLA-AS-0 e NPLA-PEG-0) e nanocápsulas contendo ácido ursólico (NPLA-AU, NPLA-AS-AU e NPLA-PEG-AU) na atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CREAT) nos dias 7, 14 e 21

Parâmetro	Dia	CTRL	CTRL OVX	AU Livre	NPLA-0	NPLA-AS-0	NPLA-PEG-0	NPLA-AU	NPLA-AS-AU	NPLA-PEG-AU
AST (U/L)	7	150,39±30,99	136,77±52,45	154,52±60,04	120,62±9,89	107,09±10,10	147,83±46,62	136,77±6,71	130,51±11,75	105,92±9,17
	14	129,09±13,80	132,99±15,28	146,89±44,32	185,51±44,75*	101,15±5,11	156,79±60,76	138,66±28,40	118,15±20,59	108,40±6,27
	21	133,16±44,31	150,88±60,93	134,73±47,63	146,28±61,52	169,36±53,93	131,39±36,75	123,67±10,33	112,18±13,63	166,65±89,53
ALT (U/L)	7	61,98±3,02	67,05±12,38	57,97±23,27	55,87±7,41	69,49±4,52	52,82±22,29	69,84±9,98	65,04±15,18	75,08±12,53
	14	76,48±16,44	72,63±8,24	70,54±10,23	73,77±12,05	77,26±14,35	81,36±25,79	83,80±9,77	67,66±9,17	70,54±11,22
	21	75,08±17,82	88±14,05	96,22±15,87	86±16,10	73,33±9,24	76,39±27,47	80,75±11,35	79,46±32,54	77,70±17,89
CREAT (mg/dL)	7	0,36±0,06	0,40±0,02	0,42±0,03	0,4±0,06	0,39±0,04	0,41±0,07	0,39±0,04	0,45±0,02	0,39±0,05
	14	0,38±0,02	0,41±0,02	0,40±0,02	0,37±0,08	0,48±0,06	0,38±0,02	0,39±0,08	0,42±0,04	0,45±0,06
	21	0,40±0,02	0,45±0,03	0,40±0,02	0,41±0,04*	0,50±0,05	0,42±0,04*	0,45±0,02	0,44±0,06	0,43±0,02

Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 5). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey. * indicam diferença significativa em relação ao grupo NPLA-AS-0 * p<0,05.

Fonte: O autor.

Os valores obtidos de AST indicam que não ocorreu uma elevação significativa deste parâmetro nos animais tratados com as nanocápsulas em relação aos controles nos três tempos estudados, no décimo quarto dia foi observada uma redução significativa no grupo NPLA-AS-0 em relação ao grupo NPLA-0, essa redução pode ter ocorrido em decorrência do recobrimento com o ácido siálico, levando a redução da captação das partículas pelo fígado, mesmo assim todos os tratamentos apresentaram valores dentro da normalidade para ratos wistar (GIKNIS; CLIFFORD, 2008).

Resultados dentro da normalidade e sem a presença de valores significativamente diferentes entre os grupos, também, foram observados para os valores de ALT, o que indica que o tratamento com as nanocápsulas de núcleo lipídico em diferentes formulações não desencadeou toxicidade hepática.

Para avaliar o perfil renal foi realizada a avaliação enzimática de creatinina, mesmo todos os resultados tendo apresentado valores dentro dos limites normais para este parâmetro (GIKNIS; CLIFFORD, 2008), valores significativamente diferentes foram observados nos animais tratados com as nanocápsulas de núcleo lipídico recobertas com ácido siálico sem a presença do ácido ursólico (NPLA-AS-0) em relação as nanocápsulas controle NPLA-0 e NPLA-PEG-0 no vigésimo primeiro dia, essa elevação pode ter ocorrido em virtude da modificação de superfície proporcionar o escape do SFM, fazendo com que aumente o tempo de circulação destas partículas o que pode levar a um maior acúmulo no rim em comparação aos outros tratamentos (NAUMENKO *et al.*, 2019), nos demais tempos analisados não foram observadas diferenças significativas.

Esses resultados revelam que não ocorreu toxicidade renal nos animais tratados com as nanocápsulas. Gomes *et al.* (2020) em seu estudo avaliaram a toxicidade de nanopartículas vazias com diferentes revestimentos, dentre eles, polisorbato 80 e PEG, e observaram que as partículas revestidas com PEG aumentaram a atividade tanto da AST como ALT e também aumentaram os níveis de creatinina, contudo ainda assim indicam baixa toxicidade decorrente da presença do PEG. No entanto, esse comportamento não foi observado neste trabalho indicando que a composição utilizada na produção das nanocápsulas de núcleo lipídico e o fármaco podem ter favorecido esses resultados.

Avaliando nanocápsulas de núcleo lipídico Bulcão e colaboradores (2013) demonstraram que tanto o tratamento a curto prazo como a longo prazo com as

partículas não alterou os marcadores bioquímicos, indicando que não ocorreram sinais de toxicidade.

Tendo em vista os resultados evidenciados, o tratamento com as nanocápsulas de núcleo lipídico vazias e contendo ácido ursólico, nas diferentes configurações de superfície contendo PEG ou ácido siálico não apresentaram alterações que extrapolassem os limites normais dos marcadores bioquímicos analisados, podendo caracterizar as nanocápsulas como não tóxicas e seguras.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o polímero foi sintetizado com sucesso pela metodologia de policondensação, com características adequadas para a sua utilização como polímero de membrana.

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram produzidas de forma eficiente pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados e as modificações de superfície ocorreram de maneira efetiva. A caracterização comprovou a formação de nanocápsulas esféricas, com tamanho nanométrico, potencial zeta negativo indicando estabilidade, e que o processo de nanoencapsulação levou à amorfização do sistema. A avaliação da estabilidade revelou que as partículas mantêm melhor suas características quando armazenadas em geladeira.

Melhores parâmetros de cicatrização foram observados para as ratas OVX quando tratadas com as formulações NPLA-AU e NPLA-AS-AU, podendo até ser comparados aos verificados para as não ooforectomizadas. Também demonstramos que os tratamentos não desencadeiam reações de toxicidade, comprovando a segurança da formulação.

Assim, a modificação de superfície com ácido siálico se mostrou uma alternativa mais eficiente que o PEG e as nanocápsulas de núcleo lipídico podem ser consideradas um portador promissor para o AU, a fim de melhorar a qualidade do processo de cicatrização de feridas e evitar as alterações do envelhecimento da pele associadas à diminuição dos níveis de estrogênio.

REFERÊNCIAS

- ABRIATA, J.P. *et al.* Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. **Materials Science And Engineering: C**, [S.l.], v. 77, p. 1196-1203, 2017.
- AFORNALI, A.; LORENCINI, M. Nanoemulsions to Prevent Photoaging. **Nanoscience In Dermatology**, [S.l.], p.237-246, 2016.
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related Alpha-keto Acids: an Evolutionary Perspective. **Chemical Reviews**, [S.l.], v.102, n.2, p.439-469, 2002.
- ANTONIO, E *et al.* A Validated HPLC-PDA Method for the Analysis of Ursolic Acid Content in Poly(lactic acid) Nanoparticles. **Current Chromatography**, [S.l.], v. 3, n. 2, p.117-122, 2016.
- ANTONIO, E *et al.* Chitosan modified poly (lactic acid) nanoparticles increased the ursolic acid oral bioavailability. **International Journal Of Biological Macromolecules**. [S.l.], v. 172, p. 133-142, 2021.
- ARCHER, D F. Postmenopausal skin and estrogen. **Gynecological Endocrinology**, [S.l.], v. 28, n. 2, p.2-6, 2012.
- ASAI, T. Nanoparticle-Mediated Delivery of Anticancer Agents to Tumor Angiogenic Vessels. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v. 35, n. 11, p. 1855-1861, 2012.
- ASHCROFT, G.S.; MILLS, S.J.; ASHWORTH, J.J. Ageing and wound healing. **Biogerontology**, [S.l.], v. 3, n. 6, p. 337-345, 2002.
- AVADI, M. R. *et al.*, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**, [S.l.], v.6, p. 58-63, 2010.
- BADER, A. R; WARDWELL, R. P. Polysialic acid: overcoming the hurdles of drug delivery. **Therapeutic Delivery**, [S.l.], v.5, n.3, p.235-237, 2014.
- BADRI, W *et al.* Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 515, n. 1-2, p.757-773, 2016
- BAGHEL, S; CATHCART, H; O'REILLY, N J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 105, n. 9, p.2527-2544, 2016.
- BAILON, P; BERTHOLD, W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, [S.l.], v. 1, n. 8, p.352-356, 1998.

BAISHYA, R., *et al.* Ursolic Acid Loaded PLGA Nanoparticles: in vitro and in vivo Evaluation to Explore Tumor Targeting Ability on B16F10 Melanoma Cell Lines. **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 33, n. 11, p.2691-2703, 2016.

BAKHTIARI, N *et al.* Short-term ursolic acid promotes skeletal muscle rejuvenation through enhancing of SIRT1 expression and satellite cells proliferation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 78, p.185-196, 2016.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 43, p 167-179, 2007.

BERTONCELLO, A. C. de A. *et al.* Determinação da atividade antioxidante e despigmentante in vitro do ácido ursólico. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 8, n. 1, 2016.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 235, p.337-351, 2016.

BONDIOLI, L., *et al.* PLGA nanoparticles surface-decorated with the sialic acid, N-acetylneuraminic acid. **Biomaterials**, [S.L.], v.31, n.12, p. 3395-3403, 2010.

BONNANS, C; CHOU, J; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.l.], v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

BORNHÖFFT K.F. *et al.* Nanoparticles Equipped with α 2,8-Linked Sialic Acid Chains Inhibit the Release of Neutrophil Extracellular Traps. **Nanomaterials**, [S.l.], v. 9, n. 4, p. 610, 2019.

BOTH, D M. *et al.* Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. **Archives Of Dermatological Research**, [S.l.], v. 293, n. 11, p.569-575, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Resolução RDC 166 de 24 de julho de 2017. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. n. 1, p. 87, 2017.

BRUM, T L. de *et al.* Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, [S.l.], v. 15, n. 1, p.773-780, 2015.

BULCÃO, R P. *et al.* In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.l.], v. 86, n. 2, p.167-177, 2013.

BÜLL, C *et al.* Sialic Acid Mimetics to Target the Sialic Acid–Siglec Axis. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.l.], v. 41, n. 6, p.519-531, 2016.

BÜLL, C *et al.* Steering Siglec-Sialic Acid Interactions on Living Cells using Bioorthogonal Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.I.], v. 56, n. 12, p.3309-3313, 2017.

BUTZELAAR, L. *et al.* Currently known risk factors for hypertrophic skin scarring: a review. **Journal Of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, [S.I.], v. 69, n. 2, p. 163-169, 2016.

CALICETI, P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.I.], v. 55, n. 10, p.1261-1277, 2003

CAÑEDO-DORANTES, L; CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: a comprehensive review. **International Journal Of Inflammation**. [S.I.], v. 2019, p. 1-15, 2019.

CÁRDENAS, C; QUESADA, A.R; MEDINA, M.Á. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.I.], v. 320, n. 2, p. 402-408, 2004.

CÉ, R *et al.* Chitosan-coated dapson-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.I.], v. 511, p.153-161, 2016.

CHANDRAMOGAN, E; *et al.* Red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in preventing collagen decrease in menopause induced rats skin. **Neurologico Spinale Medico Chirurgico**, [S.I.], v. 3, n. 1, p. 5-8, 2020.

CHANG, D.T. *et al.* Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [S.I.], v. 91, n. 4, p. 1210-1220, 2009.

CHAUDHARI, K R *et al.* Opsonization, Biodistribution, Cellular Uptake and Apoptosis Study of PEGylated PBCA Nanoparticle as Potential Drug Delivery Carrier. **Pharmaceutical Research**, [S.I.], v. 29, n. 1, p.53-68, 2012.

CHECKER, R *et al.* Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **Plos One**, [S.I.], v. 7, n. 2, p.31318-1, 2012.

CHEN, G. *et al.* Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of lactic acid in bulk state. **European Polymer Journal**, [S.I.], v.42, p.468-472, 2006

CHEN, Q. *et al.*, Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.I.], v. 399, n. 8, p. 2877-84, 2011.

CHIODELLI, P. *et al.* Sialic acid as a target for the development of novel antiangiogenic strategies. **Future Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 10, n. 24, p. 2835-2854, 2018.

CHU, D., Development and structure of skin. In: WOLF, K. *et al.* **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. New York: McGraw-Hill, p. 57-73. 2008.

CIFUENTES, S. C. *et al.* In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 32, p.348-357, 2016.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução Nº 1000, de 11 de Maio de 2012**: Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. 2012

CONTE, C. *et al.* Surface Exposure of PEG and Amines on Biodegradable Nanoparticles as a Strategy to Tune Their Interaction with Protein-Rich Biological Media. **Nanomaterials**, [S.l.], v. 9, n. 10, p. 1354-1, 2019.

CRESPO, H.J.; LAU, J.T.Y.; VIDEIRA, P.A.. Dendritic Cells: a spot on sialic acid. **Frontiers In Immunology**, [S.l.], v. 4, 2013.

DAVISON-KOTLER, E; MARSHALL, W.S.; GARCÍA-GARETA, E. Sources of Collagen for Biomaterials in Skin Wound Healing. **Bioengineering**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 56-1, 2019.

DING, J. *et al.* Micro- and nanoparticles-based immunoregulation of macrophages for tissue repair and regeneration. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 192, p. 111075, 2020.

DOBROVOLSKAIA, M A.; MCNEIL, S E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, [S.l.], v. 2, n. 8, p.469-478, 2007.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, [S.l.], v. 68, p.1432-1441, 2006.

EKLOUH-MOLINIER, C; *et al.* In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.l.], v.22, p. 8363-72. 2015.

ELOY, J O; MARCHETTI, J M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, [S.l.], v. 253, p.98-106, 2014.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **Methods in Molecular Biology**, [S.l.], v. 528, p. 16675–691, 2017

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, [S.l.], v. 6, n. 265, p. 265rs6-265rs6, 2014.

ESMAEILZADEH, J *et al.* Microstructure and mechanical properties of biodegradable poly (D/L) lactic acid/polycaprolactone blends processed from the solvent-evaporation technique. **Materials Science And Engineering: C**, [S.l.], v. 71, p.807-819, 2017.

FADEEL, B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. **Swiss Medical Weekly**, [S.l.], p.1-10, 2012.

FADOK, A; *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 101, n. 4, p. 890-898, 1998.

FARWICK, M. *et al.* Pentacyclic Triterpenes from Terminalia arjuna Show Multiple Benefits on Aged and Dry Skin. **Skin Pharmacology And Physiology**, [S.l.], v. 27, n. 2, p.71-81, 2014.

FERNANDES, A.I; GREGORIADIS, G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 217, n. 1-2, p. 215-224, 2001.

FIGUEIRAS, A. R. R; COIMBRA, A. B; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na Saúde: Aplicação e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 14-26, 2014.

FITZGERALD, Rebecca *et al.* Physiochemical Characteristics of Poly-L-Lactic Acid (PLLA). **Aesthetic Surgery Journal**, [S.l.], v. 38, n. 1, p.13-17, 2018.

FONSECA-SANTOS, B.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M. S. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v.51, n.1, p.17-26, 2015.

FORTENBACH, C.R.; MODJTAHEDI, B.S.; MAIBACH, H.I.. Role of Physical Chemical Properties in Drug Relay into Skin Compartments. **Skin Pharmacology And Physiology**, [S.l.], v. 21, n. 6, p.294-299, 2008.

FRANK, L A. *et al.* Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [S.l.], v. 7, n. 5, p.623-639, 2015.

GAO, Q *et al.* Superiority of poly(l-lactic acid) microspheres as dermal fillers. **Chinese Chemical Letters**. [S.l.], v. 32, n. 1, p. 577-582, 2021.

GHALIA, M A; DAHMAN, Y. Biodegradable poly(lactic acid)-based scaffolds: synthesis and biomedical applications. **Journal Of Polymer Research**, [S.l.], v. 24, n. 5, p.1-22, 2017.

GHOSH, S. Nanotechnology and sialic acid biology. **Sialic Acids And Sialoglycoconjugates In The Biology Of Life, Health And Disease**, [S.l.], p. 297-325, 2020.

GIANETI, M. D.; MERCURIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatologic Therapy**, [S.l.], v.26, n.3, p.267-271, 2013.

GIKNIS, M.L.A.; CLIFFORD, C.B. **Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han)**. Charles River, 2008.

GILABERTE, Y. *et al.* Anatomy and Function of the Skin. **Nanoscience In Dermatology**, [S.l.], p.1-14, 2016.

GOMES, M.G. *et al.* Assessment of unloaded polymeric nanocapsules with different coatings in female rats: influence on toxicological and behavioral parameters. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 121, p. 109575-1, 2020.

GOSAIN A, DIPIETRO L.A. Aging and Wound Healing. **World Journal Of Surgery**. [S.l.], v. 28, p. 321, 2004.

GRENIER, P *et al.* Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 287, p.121-131, 2018.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug target insights**, [S.l.], v.2, p. 147-157, 2007.

HABTEMARIAM, S. Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: addressing brain injury, cerebral ischemia, cognition deficit, anxiety, and depression. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**. [S.l.], v. 2019, p. 1-18, 2019.

HERRMANN, J.L. *et al.* Biochemistry, Physiology, and Tissue Interactions of Contemporary Biodegradable Injectable Dermal Fillers. **Dermatologic Surgery**, [S.l.], v. 44, p. 19-31, 2018.

HORIUCHI, K. *et al.* Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 1147-9, 2007.

HORNYAK, G.I.; RAO, A.K.. Fundamentals of Nanoscience (and Nanotechnology). **Nanoscience In Dermatology**, [S.l.], p.15-29, 2016.

HSIEH, J.Y. *et al.* Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 47, p. 14-24, 2017.

HU, J-B. *et al.* Sialic acid-modified solid lipid nanoparticles as vascular endothelium-targeting carriers for ischemia-reperfusion-induced acute renal injury. **Drug Delivery**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 1856-1867, 2017.

HUH, W.B. *et al.* Brown Pine Leaf Extract and Its Active Component Trans-Communic Acid Inhibit UVB-Induced MMP-1 Expression by Targeting PI3K. **Plos One**, [S.l.], v. 10, n. 6, p. e0128365, 2015.

HYON, S.; JAMSHIDI, K.; IKADA, Y. Synthesis of polilactides with different molecular weight. **Biomaterials**, [S.l.], v.18, p.1503-1508, 1997

ICH. International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline, **Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1)**, [S.l.], v. 1, 2005.

JORNADA, D.S. *et al.* Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**. [S.l.], v.8, p.6646, 2012.

KAHARI, V-M; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, [S.l.], v. 6, n. 5, p. 199-213, 1997.

KAMALY, N. *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v.41, p. 2971–3010, 2012.

KAMATH, S. *et al.* Surface chemistry influences implant-mediated host tissue responses. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [S.l.], v. 86, n. 3, p. 617-626, 2008.

KAUR, I P *et al.* Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 127, n. 2, p.97-109, 2008.

KIM, J M *et al.* Tyrosinase inhibitory constituents from the stems of *Maackia fauriei*. **Phytotherapy Research**, [S.l.], v. 24, n. 1, p.70-75, 2010.

KIM, Y *et al.* Development of Sialic Acid-coated Nanoparticles for Targeting Cancer and Efficient Evasion of the Immune System. **Theranostics**, [S.l.], v. 7, n. 4, p.962-973, 2017.

KINGSLEY, J. D. *et al.* Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [S.l.], v. 1, p. 340-350, 2006.

KIRAN, M.S. *et al.* Modulation of angiogenic factors by ursolic acid. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 371, n. 3, p. 556-560, 2008.

KO, R K *et al.* Compounds with Tyrosinase Inhibition, Elastase Inhibition and DPPH Radical Scavenging Activities from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. **Phytotherapy Research**, [S.l.], v. 25, n. 10, p.1451-1456, 2011.

KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KORNTNER, S; *et al.* Limiting angiogenesis to modulate scar formation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 146, p. 170-189, 2019.

KREUTER, J. *et al.* Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 49, p. 81–87, 1997.

KÜLKAMP, I., *et al.* Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, [S.l.], v. 32, n. 8, 2009.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v.75, p.1–18, 2010.

KUNKEL, S. D. *et al.* mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass. **Cell Metabolism**, [S.l.], v. 6, n. 13, p.627-638, 2011.

LABRIE, F. All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.l.], v. 145, p.133-138, 2015.

LAI-CHEONG, MCGRATH J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, [S.l.], v. 41, n. 6, p. 317-320, 2013.

LANDÉN, N.X; LI, D; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.l.], v. 73, n. 20, p. 3861-3885, 2016.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILANDER, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, [S.l.], v. 48, p. 493-515, 2010.

LASPRILLA, A J.R. *et al.* Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 30, n. 1, p.321-328, 2012.

LEE, B K; YUN, Y; PARK, K. PLA micro- and nano-particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 107, p.176-191, 2016.

LEPHART, E D. A review of the role of estrogen in dermal aging and facial attractiveness in women. **Journal Of Cosmetic Dermatology**, [S.l.], v. 17, n. 3, p.282-288, 2018.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 49, n. 2, p. 57-68, 1995.

LIU, Y. *et al.* Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. **Seminars In Immunology**, [S.l.], v. 34, p. 25-32, 2017.

LOH, S.A.; *et al.* SDF-1 α Expression during Wound Healing in the Aged Is HIF Dependent. **Plastic And Reconstructive Surgery**, [S.l.], v. 123, p. 65-75, 2009.

LÓPEZ-HORTAS, L *et al.* Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. **Food Research International**, [S.l.], v. 103, p.130-149, 2018.

LOSQUADRO, W.D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics Of North America**, [S.I.], v. 25, n. 3, p.283-289, 2017.

LU, J. *et al.* Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF-kappa B pathway activation. **Cerebral Cortex**, [S.I.], v. 20, n. 11, p. 2540-8, 2010.

LUYENDYK, J P.; SCHOENECKER, J G.; FLICK, M J. The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. **Blood**, [S.I.], v. 133, n. 6, p.511-520, 2018.

MARIANI, E. *et al.* Biomaterials: foreign bodies or tuners for the immune response? **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 20, n. 3, p. 636, 2019.

MARWAH, H. *et al.* Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug Delivery**, [S.I.], v. 23, n. 2, p.564-578, 2014.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current Status and Future Prospects of Nanotechnology in Cosmetics, **Progress in Materials Science**, [S.I.], v.57, p.875–910, 2012.

MIKESH, L.M; *et al.* Proteomic anatomy of human skin. **Journal of Proteomics**, [S.I.], v.12, n.84, p. 190- 200, 2013.

MINE, S. *et al.* Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. **PloS One**. [S.I.], v.12, n.3, p. 1-13, 2008.

MIX, K.S; SPORN, M.B; BRINCKERHOFF, C.E. Novel Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Gene Expression as Potential Therapies for Arthritis. **Clinical Orthopaedics And Related Research**, [S.I.], v. 427, p. 129-137, 2004.

MLALA, S. *et al.* Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. **Molecules**, [S.I.], v. 24, n. 15, p. 2751, 2019.

MOAZZEN, N *et al.* Optimization and infrared spectrometric evaluation of the mechanical properties of PLA-based biocomposites. **Journal Of Macromolecular Science, Part A**, [S.I.], v. 56, n. 1, p.17-25, 2019.

MOGFORD, J.E.; *et al.* Effect of age and hypoxia on TGF β 1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.I.], v. 190, n. 2, p. 259-265, 2002.

MONTELEONE, P *et al.* Symptoms of menopause — global prevalence, physiology and implications. **Nature Reviews Endocrinology**, [S.I.], v. 14, n. 4, p.199-215, 2018.

MORDORSKI, B.; LANDRISCINA, A.; FRIEDMAN, A. An Overview of Nanomaterials in Dermatology. **Nanoscience In Dermatology**, [S.I.], p.31-46, 2016.

MOYANO, D.F. *et al.* Nanoparticle Hydrophobicity Dictates Immune Response. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.l.], v. 134, n. 9, p. 3965-3967, 2012.

NAKAMA, K A *et al.* Establishment of analytical method for quantification of anti-inflammatory agents co-nanoencapsulated and its application to physicochemical development and characterization of lipid-core nanocapsules. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 2456-2469, 2020.

NANASHIMA, N *et al.* Blackcurrant Anthocyanins Increase the Levels of Collagen, Elastin, and Hyaluronic Acid in Human Skin Fibroblasts and Ovariectomized Rats. **Nutrients**, [S.l.], v. 10, n. 4, p.495-0, 2018.

NAUMENKO, V. *et al.* Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 307, p. 368-378, 2019.

NEVES, A. R., *et al.* Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 8, p. 177-187, 2013.

NGO, S.N.; WILLIAMS, D. B.; HEAD, R. J. Rosemary and câncer prevention: preclinical perspectives. **Critical reviews in food Science and nutrition**, [S.l.], v. 51, n.10, p.946-54, 2011.

OWENSIII, D; PEPPAS, N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

ÖZYAZGAN, İ *et al.* The effects of ovariectomy on the mechanical properties of skin in rats. **Maturitas**, [S.l.], v. 43, n. 1, p. 65-74, 2002.

PAPAKOSTAS, Dimitrios *et al.* Nanoparticles in dermatology. **Archives Of Dermatological Research**, [S.l.], v. 303, n. 8, p.533-550, 2011.

PEREIRA, M.P. *et al.* Cationic and anionic unloaded polymeric nanocapsules: toxicological evaluation in rats shows low toxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 116, p. 109014-1, 2019.

PEREIRA, R.F.; *et al.* Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, [S.l.], v.8, n.4, p.603–621, 2013.

PERRIE, Y. Nanotecnologia farmacêutica e nanomedicamentos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. cap. 45. p. 1513-1545.

PIRILA, E; *et al.* Wound Healing in Ovariectomized Rats Effects of Chemically Modified Tetracycline (CMT-8) and Estrogen on Matrix Metalloproteinases -8, -13 and Type I Collagen Expression. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 281-294, 2001.

POLETTTO, F S. *et al.* How Sorbitan Monostearate Can Increase Drug-Loading Capacity of Lipid-Core Polymeric Nanocapsules. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, [S.l.], v. 15, n. 1, p.827-837, 2015.

RABANEL, J; HILDGEN, P; BANQUY, X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 185, p.71-87, 2014.

RAMACHANDRAN, S. *et al.* Modulation of UVB-induced Oxidative Stress by Ursolic Acid in Human Blood Lymphocytes. **Asian Journal Of Biochemistry**, [S.l.], v. 3, n. 1, p.11-18, 2008.

RAMOS, A A.; PEREIRA-WILSON, C; COLLINS, A R.. Protective effects of Ursolic acid and Luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.l.], v. 692, n. 1-2, p.6-11, 2010.

RANCAN, F. Biodegradable, Biocompatible, and Bioconjugate Materials as Delivery Agents in Dermatology. **Nanoscience In Dermatology**, [S.l.], p.73-87, 2016.

RAY, S; TA, H.T. Investigating the Effect of Biomaterials Such as Poly-(l-Lactic Acid) Particles on Collagen Synthesis In Vitro: method is matter. **Journal Of Functional Biomaterials**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 51, 2020.

REINKE, J.M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, [S.l.], v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RIEKES, M. K. P. *et al.* Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 31, n. 5, p.962- 968, 2011.

RODRIGUES, V H. *et al.* Extraction of Eucalyptus leaves using solvents of distinct polarity. Cluster analysis and extracts characterization. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.l.], v. 135, p.263-274,2018.

SAIMIN, J; HENDARTO, H; SOETJIPTO, S. The effect of tomato juice on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and type-1 collagen on the vaginal wall of the menopausal rats. **Bali Medical Journal**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 707, 2019.

SCHAFFAZICK, S.R; GUTERRES, S.S. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Química Nova**, [S.l.], v. 26, n 5, p. 726-737, 2003.

SCHALM O.W, JAIN N.C, CARROLL W.J, **Veterinary hematology. 3rd ed.** Philadelphia, Lea & Febiger. 807p., 1975.

SCHAUER, R; KAMERLING, J.P. Exploration of the Sialic Acid World. **Advances In Carbohydrate Chemistry And Biochemistry**, [S.l.], v. 75, p. 1-213, 2018.

SEMPLE, S. C. Immunogenicity and Rapid Blood Clearance of Liposomes Containing Polyethylene Glycol-Lipid Conjugates and Nucleic Acid. **Journal Of**

Pharmacology And Experimental Therapeutics, [S.l.], v. 312, n. 3, p.1020-1026, 2004

SHIN, J-W. *et al.* Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 20, n. 9, p. 2126, 2019.

SIDGWICK, G.P.; BAYAT, A.. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. **Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 141-152, 2011.

SIGMA-ALDRICH. **Poli(D, L-lactídeo)**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=PLA&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt@ion=BR&focus=product>. Acesso em: 02 dez. 2020.

SILVA, D *et al.* Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. **Chemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 340, p.9-14, 2018.

SILVA, F.S.; OLIVEIRA, P.J.; DUARTE, M.F. Oleanolic, ursolic, and betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion?. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.l.], v.64, p.2991-3008. 2016.

SINGH, P *et al.* Fabrication of β -cyclodextrin and sialic acid copolymer by single pot reaction to site specific drug delivery. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.l.], p.1-12, 2017.

SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Cosmeceuticals and silibinin. **Clinics in Dermatology**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 479-84, 2009.

SINGH, R.; LILLARD JR, J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, [S.l.], v. 86, p. 215-223, 2009.

SINGH, S; YOUNG, A; MCNAUGHT, CE. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, [S.l.], v. 35, n. 9, p. 473-477, 2017.

SON, J; LEE, S.Y. Ursonic acid exerts inhibitory effects on matrix metalloproteinases via ERK signaling pathway. **Chemico-Biological Interactions**, [S.l.], v. 315, p. 108910, 2020.

SONG, S *et al.* Preoperative Serum Fibrinogen Level Predicts Postoperative Pulmonary Complications After Lung Cancer Resection. **The Annals Of Thoracic Surgery**, [S.l.], v. 81, n. 6, p.1974-1981, 2006.

SOUNG, D.Y. *et al.* Soy isoflavones prevent the ovarian hormone deficiency-associated rise in leukocytes in rats. **Phytomedicine**, [S.l.], v.11, n. 4, p. 303-308, 2004.

SPENCE, S. *et al.* Targeting Siglecs with a sialic acid–decorated nanoparticle abrogates inflammation. **Science Translational Medicine**, [S.l.], v. 7, n. 303, p. 303ra140, 2015.

STEIN, P *et al.* The biological basis for poly-L-lactic acid-induced augmentation. **Journal Of Dermatological Science**, [S.l.], v. 78, n. 1, p.26-33, 2015.

SU, H. *et al.* Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. **Journal Of Applied Toxicology**, [S.l.], v. 38, n. 1, p.3-24, 2017.

SUK, J S *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 99, p.28-51, 2016.

SUZMAN, R.; *et al.* Health in an ageing world—what do we know? **The Lancet**, [S.l.], v. 385, n. 9967, p. 484–486, 2015.

SWART, H. *et al.* Synthesis and transdermal penetration of NSAID glycoside esters. **International Journal of Pharmaceutics**. [S.l.], v. 301, p. 71-79, 2005.

SZAKIEL, A.; *et al.* Cuticular fruit waxes as a source of biologically active triterpenoids. **Phytochemistry Reviews**, [S.l.], v.11, p.263-284. 2012.

TAN, T; SONAM, T; SHIMIZU, K. The Potential of Triterpenoids from Loquat Leaves (*Eriobotrya japonica*) for Prevention and Treatment of Skin Disorder. **International Journal Of Molecular Sciences**. [S.l.], v.18, p.1030, 2017

TANG, L; EATON, J.W. Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. **The Journal Of Experimental Medicine**, [S.l.], v. 178, n. 6, p. 2147-2156, 1993.

THORNTON, M. J. Estrogens and aging skin. **Dermato-endocrinology**, [S.l.], v. 5, n. 2, p.264-270, abr. 2013.

THRING, T. S; HILI, P; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.l.], v. 9, n. 1, p.1-11, 2009.

TONČIĆ, R. J. *et al.* Skin barrier and dry skin in the mature patient. **Clinics In Dermatology**, [S.l.], v. 36, n. 2, p.109-115, 2018.

TÖZ, E *et al.* Potential adverse effects of prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy on skin aging in premenopausal women undergoing hysterectomy for benign conditions. **Menopause**, [S.l.], v. 23, n. 2, p.138-142, 2016.

TWARDOWSKI, T. *et al.* Type I Collagen and Collagen Mimetics as Angiogenesis Promoting Superpolymers. **Current Pharmaceutical Design**, [S.l.], v. 13, n. 35, p. 3608-3621, 2007.

TYLER, B. *et al.* Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 107, p.163-175, 2016.

United Nations. **World Population Ageing 2020**. Disponível em: <<https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/database/index.asp>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

VARKI, N.M.; VARKI, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. **Laboratory Investigation**, [S.l.], v.87, p.851-857, 2007.

VENTURINI, C G. *et al.* Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.l.], v. 375, n. 1-3, p.200-208, 2011.

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VLEGGAR D, FITZGERALD R, LORENC ZP. Composition and mechanism of action of poly-L-lactic acid in soft tissue augmentation. **J Drugs Dermatol**, [S.l.], v. 13, n.4, p.s29-31, 2014

WANG, Y. *et al.* Particle size tailoring of ursolic acid nanosuspensions for improved anticancer activity by controlled antisolvent precipitation. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 494, n. 1, p. 479-489, 2015.

WEI, Y. *et al.* Factors relating to the biodistribution & clearance of nanoparticles & their effects on in vivo application. **Nanomedicine**, [S.l.], v. 13, n. 12, p. 1495-1512, 2018.

WESS, T.J. Collagen Fibril Form and Function. **Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers**, [S.l.], p. 341-374, 2005

WILKINSON, H.N.; HARDMAN, M.J. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. **Maturitas**, [S.l.], v. 103, p. 60-64, 2017.

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology, **Journal of Interferon & Cytokine Research**, [S.l.], v. 30, p. 617 – 628, 2010.

WOŃNIAK, Ł.; SKAŁPSKA, S.; MARSZAŁEK, K. Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Molecules**, [S.l.], v. 20, n. 11, p. 20614-20641, 2015.

WU, J. *et al.* Preparation and characterization of a novel polysialic acid–hyaluronan graft copolymer potential as dermal filler. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 99, p.692-698, 2017.

XIANG, L.; *et al.* A pentacyclic triterpene natural product, ursolic acid and its prodrug US597 inhibit targets within cell adhesion pathway and prevent cancer metastasis. **Oncotarget**, [S.l.], v. 6, p.9295–9312, 2015.

XU, L; CRAWFORD, K; GORMAN, C B. Effects of Temperature and pH on the Degradation of Poly(lactic acid) Brushes. **Macromolecules**, [S.l.], v. 44, n. 12, p.4777-4782, 2011.

XUE, M; JACKSON, C.J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances In Wound Care**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 119-136, 2015.

YANG, M *et al.* Ursolic Acid Regulates Cell Cycle and Proliferation in Colon Adenocarcinoma by Suppressing Cyclin B1. **Frontiers In Pharmacology**. [S.l.], v. 11, p. 622212, 2021.

YASUI, T. *et al.* In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr: forsterite laser. **Journal Of Biomedical Optics**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 031108-1, 2012.

YU, H. *et al.* One-pot three-enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non-natural functionalities. **Nature Protocols**, [S.l.], v.1, n.5, p. 2485-2492, 2006.

ZAJUSKI, D; MENDYK, E; SMOLARZ, H.D. Identification of MMP-1 and MMP-9 inhibitors from the roots of *Eleutherococcus divaricatus*, and the PAMPA test. **Natural Product Research**, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 595-599, 2015.

ZHANG, C *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Triterpenoid Ursolic Acid in Regulating the Antioxidant, Anti-inflammatory, and Epigenetic Gene Responses in Rat Leukocytes. **Molecular Pharmaceutics**, [S.l.], v. 14, n. 11, p.3709-3717, 2017.

ZHANG, S; DUAN, E. Fighting against Skin Aging. **Cell Transplantation**, [S.l.], v. 27, n. 5, p.729-738, 2018.

ZHANG, T *et al.* Application of sialic acid/polysialic acid in the drug delivery systems. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 9, n. 2, p.75-81, 2014.

ZOMER, H D.; TRENTIN, A G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **Journal Of Dermatological Science**, [S.l.], v. 90, n. 1, p.3-12, 2018.

ZOUBOULIS, C. C.; MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in Dermatology**. [S.l.], v. 29, p. 3-14. 2011.

**ANEXO A - CARTAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE
ANIMAIS**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 010/2018

Protocolo UEPG – 7312/2018

Título – Projeto de pesquisa "Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro/in vivo* de nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico"

Resultado: Aprovado

Considerações

Prezado Professor Paulo Victor Farago (pvfarago@gmail.com - DEFAR)

Em relação a utilização de animais no projeto de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela **aprovação do uso de 150 (centro e cinquenta) ratos wistar, de três meses de idade.**

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Coordenadora

Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 007/2019

Protocolo UEPG – 571/2019 Apensado ao 7312/2018

Título – *Solicita o acréscimo de 50 animais para o projeto de doutorado “Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro/in vivo de nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico”*

Interessados: Paulo Victor Farago e Bruna Carletto

Data de Entrada – 04/02/2019

Resultado: Aprovado

Considerações

Prof. Dr. Paulo Victor Farago (pvfarago@gmail.com)

Doutoranda Bruna Carletto (brunacarletto@hotmail.com)

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, do uso de utilização de 50 ratos Wistar.

Ponta Grossa, 05 de abril de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CEUA - Comissão de Ética e Pesquisa em Animais
Dra. Dioneia Xavier Scamporrin
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264

ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES À TESE

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A FAST AND SENSITIVE UHPLC-PDA METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF URSOLIC ACID IN POLY(L-LACTIC ACID) NANOCAPSULES

BRUNA CARLETTTO¹, AMANDA MARTINEZ LYRA¹, ADRIANA YURIKO KOGA¹, ANDRESSA NOVATSKI²,
 RUBIANA MARA MAINARDES³, LEANDRO CAVALCANTE LIPINSKI², PAULO VITOR FARAGO^{1*}

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil. ²Department of Medicine, Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil. ³Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Midwestern Parana, Guarapuava, Brazil. Email: pvfarago@gmail.com

Received: 09 July 2020, Revised and Accepted: 19 August 2020

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study is to develop and validation of a ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) method to determine the ursolic acid content and its encapsulation efficiency (EE) in lipid-core nanocapsules prepared from poly (L-lactic acid).

Methods: A simple UHPLC-PDA method was developed and validated for the quantitative determination of ursolic acid in poly(L-lactic acid) nanocapsules. The chromatographic conditions used were: RP-C18 column, isocratic mobile phase containing acetonitrile:water (92:8, v/v), flow rate of 0.8 ml/min, column temperature of 50°C, and detection at 203 nm. The following parameters were evaluated: Specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy, and robustness.

Results: The method was specific to the ursolic acid and linear ($r=0.9998$) in the range of 10–100 µg/ml. The limits of detection and quantification were 1.35 and 4.10 µg/ml, respectively. The precision was demonstrated by a relative standard deviation less than 2%. Adequate accuracy (98.35 ± 0.82) was obtained. Changes in flow rate, mobile phase, and column temperature did not significantly alter the peak area and the retention time of the ursolic acid. The mean EE was 99.89%.

Conclusion: The method proved to be fast, sensitive, and simple for quantifying ursolic acid in nanocapsules and was successfully used for determining the EE.

Keywords: Analytical development, Drug quantification, Lipid-core nanocapsules, Pentacyclic triterpenoid, Quality assurance, Quality control.

© 2020 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i9.38993>

INTRODUCTION

Pentacyclic triterpenoids are phytochemicals widely distributed in nature and ursolic acid (3β-hydroxy-urs-12-en-28-oic) (UA) is one of their main representatives [1]. It is a white crystalline solid and shows a melting point between 285 and 288°C with a molecular weight of 456.68 g/mol and molecular formula $C_{30}H_{48}O_5$ [2]. UA is usually found in human diet [3] and has a wide range of biological activities, such as the antioxidant effect [4], the anti-obesity and muscle synthesis properties [5], the hepatoprotective potential [6], the blood sugar-lowering effect [7], the neuroprotective potential [8], the anti-inflammatory activity [9], and the antitumor properties [10,11].

In spite of this pharmacotherapeutic potential, some limitations can be related to the UA use due to its low aqueous solubility and its reduced permeability through biological membranes, which decrease its absolute bioavailability to about 8% [12] and lead to a classification as a class IV drug by the biopharmaceutical classification system. For this reason, strategies to overcome these limitations have been widely studied mainly based on nanotechnology [13,14]. In brief, the aim of these approaches was to develop formulations with efficacy and safety that might guarantee at the same time improved solubility, higher bioavailability, and a controlled release pattern for this drug [15]. However, nanoparticles require extensive characterization, including the mandatory determination of the drug content and the encapsulation efficiency (EE) to achieve the expected clinical effect while assuring suitable pharmacokinetic and pharmacodynamic properties when administered *in vivo* [16,17]. Thus, a validated method that is able of quantifying the drug loading in nanoformulation is essential during the research and development process.

In this scenario, some analytical methods were previously described for the UA quantification, mainly in botanicals [18,19] and biological samples as plasma [20,21]. Concerning to the methods developed for drug delivery systems, these strategies were typically based on high-performance liquid chromatography [22-24]. Therefore, to the best of our knowledge, no previous paper was devoted to validate an analytical method for the UA determination in lipid-core nanocapsules using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC). UHPLC has currently attracted great interest from the pharmaceutical industry due to its ability to achieve maximum use of chromatographic principles, to have superior features in terms of resolution, sensitivity, and efficiency, and to decrease the consumption of solvents and other reagents [25].

In this context, the present paper describes the development and the validation of a UHPLC-PDA method for determining the UA content and its EE in lipid-core nanocapsules prepared from poly(L-lactic acid) (PLA).

METHODS

Reagents and chemicals

Ursolic acid (UA) 98% pure was purchased of Natural Field Bio-Technique (Xi'an, China). Methanol HPLC grade (Research Hexis, Phillipsburg, NJ, USA), acetone P.A. (Synth, Diadema, Brazil), acetonitrile HPLC grade (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), L-lactic acid 90% pure (Vetec, Duque de Caxias, Brazil), and chloroform P.A. (Vetec, Duque de Caxias, Brazil) were used as received. The water was purified using a Milli-Q Plus system (Millipore, Burlington, MA, USA).

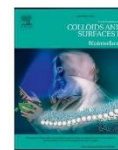
Equipment

A Shimadzu UHPLC system (Nexera X2, Kyoto, Japan) equipped with a SPD-M20A PDA detector, a DGU-20A5RA degasser, a



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Ursolic acid-loaded lipid-core nanocapsules reduce damage caused by estrogen deficiency in wound healing

Bruna Carletto^{a,*}, Adriana Yuriko Koga^a, Addressa Novatski^b, Rubiana Mara Mainardes^c, Leandro Cavalcante Lipinski^d, Paulo Vitor Farago^e

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^b Department of Physics, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^c Department of Pharmacy, Midwestern State University, Brazil

^d Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^e Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Biostimulator
 Collagen
 Menopause
 Nanoparticles
 Neocollagenesis
 Triterpene

ABSTRACT

The skin aging process in women is accelerated due to decreases in serum estrogen levels triggered by the menopause process. Hence, poly(L-lactic acid) lipid-core nanocapsules containing ursolic acid (NPLA-UA) were developed using the interfacial deposition of the preformed polymer methodology as a strategy to reduce damages to the healing process caused by hormonal deficiency in ovariectomized rats. The colloidal suspensions of nanocapsules presented adequate size and morphology (254 and 375 nm), negative zeta potential (-31 and -37 mV), high encapsulation efficiency (99.89 %), and amorphous character.

The analyses performed in an in vivo healing trial showed that the treatment with NPLA-UA resulted in faster wound retraction with less inflammatory response. In addition, the angiogenic process was stimulated increased synthesis of dermal collagen occurred. Ursolic acid-loaded, lipid-core nanocapsules are suitable for treating skin changes triggered by decreased estrogen in menopause.

1. Introduction

The skin is the largest organ of the human body and it performs several functions, including protection against pathogens, the prevention of water loss, the regulation of body temperature, participation in immune responses, and the synthesis of hormones [1]. The skin is affected over time by the combination of the deleterious effects of both extrinsic and intrinsic aging [2]. In addition to chronological aging, women are also affected by the effects of climacteric aging, which is related to a reduction in the secretion of estrogen [3].

Estrogen naturally modulates matrix metalloproteinases (MMPs) by inhibiting such enzymes which promote collagen degradation, increased moisture, and skin turgor by stimulating the proliferation of keratinocytes and increasing the viability of fibroblasts [4]. These provide a better quality of wound healing and act as natural antioxidants by reducing oxidative stress and inflammation [4–6].

Thus, lower estrogen levels have a great impact on the health and quality of skin, whether due to chronological aging or surgically-induced menopause [7]. Estrogen deficiency intensifies skin changes

related to aging. These changes include a reduction in sensory perception and pain, cellular senescence, oxidative stress, delayed healing, decreased immune function, and atrophy, which affects the dermal vascular network and leads to decreased transport of nutrients and hormones [4,8,9].

The healing process of skin wounds comprises four distinct, overlapping phases [10]. In the hemostasis phase, a clot is formed that acts as a barrier for the entry of pathogens, providing a temporary matrix for cell migration during the repair process [11]. The inflammatory phase is marked by the migration of neutrophils to the wound site, which are responsible for conducting the first defense response of the organism against infections or tissue damage [12]. The proliferative phase is characterized by the development of granulation tissue, the beginning of collagen deposition, angiogenesis, reepithelization, and the differentiation of myofibroblasts [13]. Finally, the remodeling phase begins at the end of the development of the granulation tissue, in which it is exchanged for collagen and elastic fibers [14]. The MEC that is formed contains collagen fibers as its main component, and its correct synthesis is essential to ensure the density and adequate resistance of the skin

* Corresponding author at: State University of Ponta Grossa, 4748, General Carlos Cavalcanti Av. Ponta Grossa, 84.030-900, PR, Brazil.

E-mail address: brunacarletto@hotmail.com (B. Carletto).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111720>

Received 14 December 2020; Received in revised form 8 March 2021; Accepted 22 March 2021

Available online 24 March 2021

0927-7765/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.