

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ADRIANA YURIKO KOGA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
17- β -ESTRADIOL E/OU ÓXIDO DE ZINCO

PONTA GROSSA

2021

ADRIANA YURIKO KOGA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
17- β -ESTRADIOL E/OU ÓXIDO DE ZINCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

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

PONTA GROSSA

2021

K78

Koga, Adriana Yuriko

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante de nanopartículas contendo 17- β -estradiol e/ou óxido de zinco / Adriana Yuriko Koga. Ponta Grossa, 2021.
107 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. Lesão cutânea. 2. Nanotecnologia. 3. Alteração hormonal. 4. Tratamento tópico. I. Farago, Paulo Vitor. II. Lipinski, Leandro Cavalcante. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321



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, 01 de abril 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 05/2021 DA DOUTORANDA **ADRIANA YURIKO KOGA** REALIZADA NO DIA 01 DE ABRIL DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao primeiro dia de abril de dois mil e vinte e um, às 16h30min, 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 Adriana Yuriiko Koga, 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), Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR), Rudiger Daniel Olhoff (PUC/PR) 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 DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO 17- B ESTRADIOL E/OU ÓXIDO DE ZINCO”**.

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.

Observações (se necessário): _____



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

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



Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Leandro Cavalcante Lipinski 1 - (DEMED - UEPG) Presidente

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

Patricia Mathias Doll Boscardin 3 - (DEFAR-UEPG) – Titular

Rudiger Daniel Olhoff 4 – (PUC - PR) – Titular

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

**“Dedico este trabalho à minha família,
meus amigos e professores que
estiveram comigo nesta caminhada.
Sou muito grata por tê-los comigo.”**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades, proteção e pessoas incríveis que colocou no meu caminho.

Aos meus pais, João e Marisa, que são meu porto seguro. Meu maior exemplo de respeito e perseverança. Vocês são a minha inspiração. Minha eterna gratidão por tudo o que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Fernando e Marcelo, vocês são a minha maior motivação. Obrigada por serem meus parceiros de vida e por me mostrarem que os dias sempre podem ser mais animados e divertidos.

Ao meu marido, Eduardo, obrigada por ser essa pessoa incrível, eu sempre irei agradecer por você aceitar compartilhar essa vida comigo. Nada disso seria possível sem você do meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade e ensinamentos. Obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo. Pela paciência e imensa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Logo tudo estará bem e poderei te agradecer pessoalmente.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, pela amizade e pelos ensinamentos que levarei para a vida. Obrigada por compartilhar comigo sua bondade e sabedoria. Serei eternamente grata por me permitir fazer parte da equipe TO e participar de tantos momentos incríveis.

À todos os mestres que contribuíram para o meu crescimento e conhecimento científico.

À Bruna pelo companheirismo, amizade e por tudo o que passamos juntas no laboratório. Foram momentos que ficarão sempre marcados.

À Ester, Lucas e Oscar por todo auxílio e dedicação ao trabalho que realizam. Obrigada pela amizade e por tornarem os dias mais leves e divertidos.

Aos meus amigos do PPGCF que compartilharam comigo as angústias e dificuldades do doutorado. Vocês fizeram essa caminhada mais tranquila e animada. Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Ponta Grossa

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ao C-LABMU e aos profissionais que me auxiliaram na realização dos ensaios físico-químicos

Ao LAPMED e a Traudi pela ajuda no desenvolvimento da validação analítica

Ao TECPAR e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro

À todas as pessoas que encontrei nessa caminhada e que contribuíram para o meu crescimento e conhecimento científico.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar nanocápsulas de 17- β estradiol (E2) e nanoesferas de óxido de zinco (ZnO) para avaliar o efeito cicatrizante em lesões cutâneas de ratas ooforectomizadas. As nanopartículas de E2 foram obtidas utilizando o polímero PCL pelo método de precipitação do polímero pré-formado e as de ZnO pelo método de co-precipitação. A caracterização foi realizada por meio de ensaios morfológicos e espectroscópicos. O método analítico para quantificação do E2 nas nanocápsulas foi validado conforme preconizado pelo *The International Conference on Harmonization*. A estabilidade das nanopartículas de E2 foi avaliada durante 120 dias em 10°C, 25°C e 37°C. O ensaio animal foi realizado em ratas ooforectomizadas com lesões cutâneas dorsais medindo 4 cm² separadas em 15 grupos: CNO (controle não ooforectomizado), CO (controle ooforectomizado), PCLN (nanocápsula sem o fármaco), EC e EN (0,06 e 0,12), ZnOC e ZnON (2,5 e 5,0) e ZnOC + EC e ZnON + EN (0,06 + 2,5 e 0,12 + 5,0). Nos dias 7, 14 e 21 biópsia de pele, útero e amostras sanguíneas foram coletadas. A análise histológica foi realizada utilizando coloração HE e picrosirius. Os resultados mostraram nanopartículas com tamanho, potencial zeta e polidispersão adequados para aplicação tópica em feridas cutâneas. Para quantificação de E2, método simples e eficiente foi desenvolvido utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, mostrando eficiência de encapsulação superior a 99%. A morfologia mostrou formato esférico e homogêneo. Os espectros FTIR sugerem que o fármaco está disperso no núcleo oleoso da nanocápsula. As amostras de E2 apresentaram boa estabilidade nas temperaturas avaliadas com pequena variação de pH e manutenção do tamanho, potencial zeta e polidispersão. Para as nanoesferas de ZnO, a pureza foi realizada utilizando a espectroscopia de raios X com dispersão de energia e apresentou valores de 76,82% de zinco. Os espectros FTIR apresentaram grupos funcionais semelhantes e correspondentes ao ZnO. A avaliação de raios X mostrou picos característicos de cristalinidade nas posições definidas para ZnO. O resultado do ensaio animal mostrou que não houve diferença estatística na retração da lesão de todos os grupos avaliados. A análise hematológica demonstrou alterações na quantificação de linfócitos e neutrófilos que se relacionam com a ação encontrada na análise histológica da pele. Os resultados mostraram que a cirurgia de ooforectomia retarda o processo de cicatrização. O tratamento com ZnO e E2 isolados foram capazes de modular a fase inflamatória principalmente no tratamento com as nanopartículas. A associação de tratamento na forma nanoparticuladas apresentou resultados favoráveis tanto na fase inflamatória como na colagênese. As alterações histológicas no tecido uterino foram maiores no grupo tratado com a forma EC 0,12. Esses resultados demonstram que foi possível obter nanoesferas de ZnO e nanocápsulas de E2 com características físico-químicas adequadas e com potencial efeito benéfico no processo de cicatrização. Essa resposta foi observada tanto nos tratamentos isolados como na associação das nanopartículas. Sendo assim, foi possível desenvolver uma alternativa viável para o tratamento de lesões cutâneas de mulheres na menopausa.

Palavras-chave: Lesão cutânea; nanotecnologia; alteração hormonal; tratamento tópico

ABSTRACT

The aim of this paper was to obtain and characterize 17- β estradiol (E2) nanocapsules and zinc oxide (ZnO) nanospheres to evaluate the effect on cutaneous wound healing. The E2 nanoparticles were obtained using PCL polymer by pre-formed polymer precipitation method and the zinc oxide (ZnO) nanosphere by the co-precipitation method. The characterization was carried out using morphological and spectroscopic analysis. The analytical methods for quantifying E2 in nanocapsules have been validated as recommended by the International Conference on Harmonization. The stability of E2 formulations at 10°C, 25°C and 37°C was evaluated for 120 days. The animal assay was studied on oophorectomized Wistar rats by performing surgical wounds and the animals were divided in 15 groups: CNO (non-oophorectomized control), CO (oophorectomized control), PCLN (nanocapsule without E2), EC and EN (0,06 and 0,12), ZnOC and ZnON (2,5 and 5,0) and ZnOC + EC and ZnON + EN (0,06 + 2,5 and 0,12 + 5,0). On days 7, 14 and 21, skin, uterus fragments and blood sample were collected and a histological analysis was performed using HE and picrosirius staining. The results showed adequate nanoparticles size, zeta potential and polydispersion for topical application on cutaneous wound. For quantification of E2, a simple and efficient method was developed using high performance liquid chromatography showing encapsulation efficiency above 99%. The morphology demonstrated a spherical and homogeneous nanoparticles. The FTIR spectra suggest that the E2 is dispersed in the oil phase of the nanocapsule. The samples showed adequate stability at different temperatures with small pH variation and the maintenance of the size, zeta potential and polydispersion. For ZnO nanoparticles, the purity was performed using X-ray spectroscopy with energy dispersion showing zinc concentration about 76.82%. The FTIR spectra showed similar functional groups corresponding to the expected zinc oxide compound. The X-ray analysis showed smaller peaks at the defined positions, characteristic of zinc oxide crystallinity. The animal assay showed that there was no statistical difference in the wound retraction in all groups. The hematological analysis showed difference on the quantification of lymphocytes and neutrophils that are related to the effect described in the histological analysis of the skin. The oophorectomy surgery can delay the healing process. Treatment with ZnO and E2 may be able to modulate inflammatory phase mainly in treatment with nanoparticles. The association of treatment in the nanoparticulate form has favorable results in both the inflammatory phase and collagenesis. Histological changes in uterine tissue were greater in the group treated with EC 0.12 form. These results demonstrate that it was possible to obtain ZnO nanospheres and E2 nanocapsules with physical-chemical characteristics and with a potential effect on the healing process. This response was observed both in isolated treatments and in the association of nanoparticles. Thus, it was possible to develop an adequate alternative for the treatment of cutaneous wound in menopausal women.

Key words: Cutaneous wound; nanotechnology; hormonal variation; topical treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos estrógenos endógenos.....	21
Figura 2 - Etapas do processo de cicatrização.....	24
Figura 3 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas	27
Figura 4 – Estrutura esquemática do óxido de zinco.....	29
Figura 5 – Desenho experimental	34
Figura 6 – Esquema de obtenção das nanocápsulas de E2	35
Figura 7 – Esquema de obtenção de nanoesferas de óxido de zinco	36
Figura 8 - Gráfico referente ao cálculo do n amostral	41
Figura 9 - Fotomicrografia da pele com quadrante para contagem de células inflamatórias	43
Figura 10 - Fotomicrografia da pele corada por picrosirius red. Microscópio de polarização (200x)	44
Figura 11 - Fotomicrografia do útero com modelo de medidas das camadas uterinas	45
Figura 12 – Cromatogramas das nanopartículas com (A) e sem (B) o fármaco obtido por HPLC	47
Figura 13 – Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do E2 obtida por HPLC.....	47
Figura 14 – Análise de resíduos.....	48
Figura 15 – Eletromicrografias FEG-SEM do fármaco e polímeros convencionais e nanoparticulados.....	54
Figura 16 – Eletromicrografias FEG-SEM do ZnO convencional e nanoparticulado.....	55
Figura 17 – Espectro EDS de óxido de zinco convencional (A) e nanoparticulado (B)	56
Figura 18 – Espectro FTIR E2.....	57

Figura 19 – Espectro FTIR do PCL.....	58
Figura 20 – Espectros FTIR do E2, PCL, MF, PCLN e E2N.....	59
Figura 21– Espectros FTIR do TCM, tween 80, span 80, E2N e PCLN.....	60
Figura 22 – Espectro FTIR do ZnO convencional.....	60
Figura 23 – Espectro FTIR do ZnO convencional e nanoparticulado.....	61
Figura 24 – Difratoograma do ZnO convencional e nanoparticulado.....	62
Figura 25 – Variação do pH nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias.....	63
Figura 26 – Área da retração da lesão por grupo.....	66
Figura 27 – Análise do hematócrito por grupo.....	69
Figura 28 – Quantificação de linfócitos dos grupos controles.....	70
Figura 29 – Quantidade de linfócitos sistêmicos dos grupos tratados com ZnO.....	71
Figura 30 – Quantidade de linfócitos circulantes dos grupos tratados com E2.....	72
Figura 31 – Quantificação de linfócitos sistêmicos dos grupos tratados com ZnO + E2.....	73
Figura 32 – Quantificação de neutrófilos nos grupos controle.....	74
Figura 33 – Quantidade de neutrófilos sistêmicos dos grupos tratados com ZnO.....	75
Figura 34 – Quantidade de neutrófilos sistêmicos dos grupos tratados com E2.....	76
Figura 35 – Quantificação de neutrófilos nos grupos tratados com ZnO + E2.....	76
Figura 36 - Quantificação de células inflamatórias no tecido cutâneo dos grupos controle.....	77
Figura 37 - Quantificação das células inflamatórias nos grupos tratados com ZnO nas formas convencional e nanoparticulada.....	78
Figura 38 - Análise da quantidade de células inflamatórias na lesão dos grupos tratados com estrógeno.....	79
Figura 39 - Quantificação de células inflamatórias nos grupos tratados com a associação ZnO + E2.....	80

Figura 40 - Quantificação de fibras colágeno tipo I e III nos grupos controles.....	81
Figura 41 - Avaliação das fibras colágeno nos grupos tratados com ZnO nas formas convencional e nanoparticulada.....	81
Figura 42 - Avaliação das fibras colágeno tipo I e III dos grupos tratados com E2...	82
Figura 43 - Quantificação das fibras colágeno tipo I e III nos grupos tratados com a associação ZnO+E2.....	83
Figura 44 - Avaliação das alterações histológicas no perimétrio nos grupos tratados com E2.....	84
Figura 45 - Análise das alterações do miométrio nos dias 7, 14 e 21 dos grupos tratados com E2.....	85
Figura 46 - Avaliação das alterações endometriais dos grupos tratados com E2.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros cromatográficos	37
Tabela 2 – Descrição dos grupos submetidos ao teste de cicatrização	41
Tabela 3 – Resultados do teste ANOVA para linearidade do método	48
Tabela 4 – Resumo dos parâmetros da curva analítica do E2	49
Tabela 5 – Dados precisão intermediária e repetibilidade	49
Tabela 6 – Valores obtidos no ensaio de exatidão	50
Tabela 7 – Dados obtidos para robustez	51
Tabela 8 – Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de E2, PCL e ZnO	53
Tabela 9 – Principais bandas encontradas no espectro FTIR do 17- β estradiol	57
Tabela 10 – Principais bandas encontradas no espectro FTIR do PCL	58
Tabela 11 – Principais bandas encontradas no espectro FTIR do ZnO convencional	61
Tabela 12 – Eficiência de encapsulação E2 após 120 de armazenamento em 25°C, 10°C e 37°C	65
Tabela 13 – Valores médios do hematócrito por grupo	68

LISTA DE SIGLAS

AMC	Analytical Methods Committe
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DF	Graus de liberdade
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	X ray difraction
E1	Estrona
E2	17- β estradiol
E3	Estriol
E4	Estretol
EC	Estrógeno convencional
EE	Eficiência de encapsulação
EGF	Fator de crescimento epitelial
EN	Estrógeno nanoparticulado
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ER α	Receptor de estrógeno α
ER β	Receptor de estrógeno β
FDA	Food and drug administration
FEG	Field emission gun
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FSH	Hormônio folículo estimulante
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
HE	Hematoxilina e eosina
HPLC	High performance liquid chromatography

ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use
IGF	Fator de crescimento de insulina
IL	Interleucina
KGF	Fator de crescimento de queratinócito
LD	Limite de detecção
LH	Hormônio luteinizante
LQ	Limite de quantificação
M1	Macrófago tipo M1
M2	Macrófago tipo M2
MEC	Matriz extracelular
MIP	Proteína adesiva de mexilhão
MMP	Matriz metaloproteinase
MS	Média dos quadrados
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PCLN	Nanopartícula de poli(ϵ -caprolactona)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Ponto hidrogeniônico
SEM	Scanning electron microscopy
SS	Soma dos quadrados
TGF – α	Fator de crescimento transformante α
TGF – β	Fator de crescimento transformante β
TNF	Fator de necrose tumoral
TRH	Terapia de reposição hormonal
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VEGF	Fator de crescimento vascular
ZnO	Óxido de zinco
ZnOC	Óxido de zinco convencional
ZnON	Óxido de zinco nanoparticulado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	RESPOSTA CUTÂNEA AO ENVELHECIMENTO	20
3.2	USO DO E2 NO ENVELHECIMENTO	21
3.3	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	23
3.4	NOVAS FORMULAÇÕES TÓPICAS BASEADAS EM NANOTECNOLOGIA.....	26
3.5	NANOPARTÍCULAS DE ZnON	28
3.6	EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE E2 E ZnO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	EQUIPAMENTOS.....	31
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	31
4.2.1	Fármaco	31
4.2.2	Água Purificada	32
4.2.3	Demais Solventes e Reagentes	32
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	33
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.4.1	Obtenção das nanocápsulas de E2.....	35
4.4.2	Obtenção das Nanoesferas de Óxido de Zinco	35
4.4.3	Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por HPLC	36
4.4.3.1	Validação do método analítico para a quantificação do E2	37
4.4.3.2	Determinação do E2 incorporado e avaliação da eficiência de encapsulação (EE).....	38
4.4.4	Caracterização das Nanopartículas.....	38
4.4.4.1	Espalhamento de luz dinâmico e microeletroforese laser Doppler.....	38
4.4.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy – FEG-SEM</i>)	39
4.4.2.3	Espectroscopia de raio x com dispersão de energia (EDS).....	39

4.4.4.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR</i>)	39
4.4.4.5	Difração de Raios X (<i>X Ray Diffraction – DRX</i>)	40
4.4.4.6	Estabilidade das nanocápsulas de E2	40
4.4.5	Ensaio Animal.....	40
4.4.5.1	Ooforectomia e lesão na pele	41
4.4.5.2	Obtenção do gel para aplicação tópica	42
4.4.5.3	Avaliação da retração da lesão	42
4.4.5.4	Análise hematológica	42
4.5.5.5	Análise histológica.....	43
4.5.5.5.1	Coloração Hematoxilina e Eosina – pele.....	43
4.5.5.5.2	Coloração Picrosirius red – pele.....	43
4.5.5.5.3	Coloração Hematoxilina e Eosina – útero.....	44
4.4.5.6	Análise estatística	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE E2 E ZnO.....	46
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA QUANTIFICAÇÃO DE E2 NAS NANOCÁPSULAS	46
5.2.1	Quantificação de E2 Incorporado nas Nanocápsulas Poliméricas	51
5.3	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MICROELETROFORESE LASER DOPPLER	52
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (FEG-SEM)	53
5.5	ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X COM DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)	55
5.6	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA EM Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR</i>)	56
5.7	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	62
5.8	ESTABILIDADE	63
5.9	ENSAIO ANIMAL	65
5.9.1	Retração da Lesão	65
5.9.2	Análise Hematológica.....	67
5.9.2.1	Hematócrito	67
5.9.2.2	Linfócitos	70

5.9.2.3	Neutrófilos.....	73
5.9.3	Análise Histológica – Pele.....	77
5.9.3.1	Infiltrado inflamatório.....	77
5.9.3.2	Fibras colágeno.....	80
5.9.3.3	Análise histológica –útero.....	83
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS.....	101
	ANEXO A –. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	107

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização envolve complexa interação entre células e mediadores inflamatórios, estabelecendo relação coordenada entre as fases: hemostase, inflamação, proliferação e remodelamento (GONZALEZ *et al.*, 2016).

O tempo prolongado do processo cicatricial e o alto custo dos curativos para o tratamento de feridas, tem sido uma das grandes preocupações na área médica. Além disso, a cicatrização pode ser prejudicada em populações como idosos e pacientes portadores de comorbidades avançadas (HAN; CEILLEY, 2017).

À medida que aumenta a expectativa de vida, cresce também o número de mulheres que encontram-se no período da menopausa. Nessa fase, os sinais e sintomas da deficiência de estrógeno relacionam-se com os problemas encontrados devido ao envelhecimento natural. O retardo no processo cicatricial é comumente descrito nessa população (MUKAI *et al.*, 2019; RAJAN; KREATSOULAS, 2019).

Uma das alternativas para melhorar o tratamento desses pacientes é o uso da nanomedicina. A aplicação tópica de compostos em escala nanométrica permite maior absorção de ativos, menor tempo de tratamento, ação local, além do baixo custo de obtenção. No tratamento de feridas, as nanopartículas podem auxiliar em diferentes etapas do processo (KORRAPATI *et al.*, 2016; PATRA *et al.*, 2018).

O 17- β estradiol (E2) é um hormônio esteroide, produzido principalmente pelo folículo ovariano, que possui importante papel na regulação do ciclo reprodutivo, remodelação óssea, sistema cardiovascular, entre outros. Na cicatrização, a aplicação tópica de estrógeno, forma biologicamente ativa, estimula a epitelização, a ação de enzimas proteolíticas e auxilia a modulação da fase inflamatória (BRUFANI *et al.*, 2017; LOBO, 2009).

O efeito sinérgico de ativos com características pró-cicatrizantes pode resultar em um efeito rápido e organizado. O óxido de zinco (ZnO) é um composto que possui características biocompatíveis para uso na biomedicina. Nanopartículas de ZnO têm sido muito utilizadas no tratamento de feridas cutâneas por estimular a epitelização, possuir efeito antimicrobiano e anti-inflamatório (KOLODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014; MISHRA *et al.*, 2017).

Trabalhos restritos têm sido desenvolvidos para avaliar o efeito cicatrizante de nanoestruturas contendo E2 e ZnO, não havendo estudo tópico da associação desses dois fármacos no tratamento de feridas. Assim, a hipótese deste estudo se pauta no uso de nanopartículas que permitam a ampla superfície de contato com a ferida, o aumento do efeito farmacológico, a liberação controlada do(s) ativo(s) e a melhor resposta de cicatrização, sem alterações no tecido uterino.

Frente ao exposto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo E2 e nanoesferas de ZnO, assim como avaliar os efeitos cicatrizantes em feridas cutâneas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo 17- β -estradiol (E2) e óxido de zinco (ZnO) para aplicação em lesões cutâneas de ratas Wistar ooforectemizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanocápsulas poliméricas contendo E2 pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado;
- Produzir nanoesferas de ZnO pelo método de co-precipitação;
- Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) para avaliar a eficiência de encapsulação do E2;
- Caracterizar os sistemas nanoparticulados obtidos por meio de estudos morfológicos e espectroscópios;
- Estudar a estabilidade das nanocápsulas poliméricas contendo E2 em diferentes temperaturas;
- Avaliar *in vivo* o efeito cicatrizante das nanocápsulas contendo E2 e das nanoesferas de ZnO por meio de análise histológica da pele;
- Avaliar a retração da lesão;
- Investigar possíveis variações hematológicas;
- Quantificar fibras colágeno tipo I e III através da coloração *Picrosirius red*;
- Realizar avaliação histológica do útero;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESPOSTA CUTÂNEA AO ENVELHECIMENTO

O perfil demográfico brasileiro vem sofrendo alterações nos últimos anos. O aumento da expectativa de vida atrelado à provável predominância de doenças crônicas exige uma atenção especial no tratamento da população idosa (DAMACENO; CHIRELLI, 2019; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016).

O envelhecimento populacional está diretamente relacionado com alterações estruturais e funcionais de tecidos e órgãos como a pele. Fisiologicamente, o envelhecimento cutâneo é um processo lento, caracterizado pela diminuição na elasticidade, síntese de colágeno e aumento das dermatoses associadas a idade como xerose, rugas e infecções (BLUME-PEYTAVI *et al.*, 2016; TOBIN, 2017).

A integridade cutânea é afetada por alterações hormonais que podem ocorrer em mulheres no período da menopausa. A diminuição na síntese de estrógeno aumenta a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando danos severos na matriz extracelular, estrutura do DNA, proteínas e lipídeos (BOTTAI *et al.*, 2012).

A menopausa caracteriza-se pelo período onde ocorre interrupção permanente da menstruação devido ao não desenvolvimento do folículo ovariano. Esse processo está associado a alterações na síntese de hormônios hipotalâmicos e pituitários que regulam o ciclo menstrual. O folículo ovariano não responde aos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), consequentemente a síntese de estrógeno e progesterona diminui (DALAL; AGARWAL, 2015).

As variações hormonais no período da menopausa podem levar ao aparecimento de sintomas característicos como fadiga, alteração de humor, secura vaginal, insônia, sintomas vasomotores, dor nas articulações e alterações na pele (SANTORO; EPPERSON; MATHEWS, 2015).

Os sintomas começam a aparecer durante a perimenopausa, em média de quatro a seis anos antes da menopausa e podem ser confundidos com outras doenças associadas (BACON, 2017). Além disso, as alterações hormonais, principalmente estrogênicas podem levar a atrofia e ao aparecimento de miomas uterinos (ULIN *et al.*, 2020).

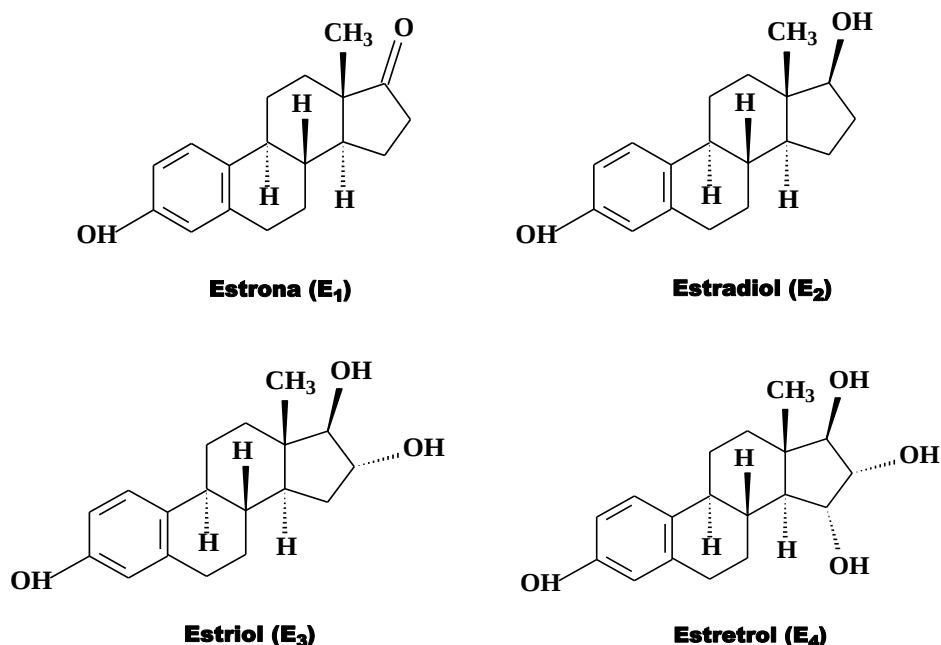
A terapia de reposição hormonal (TRH) é uma alternativa para o tratamento dos sintomas do climatério e consiste na administração oral, intramuscular, subcutânea, intranasal ou transdérmica de hormônios sexuais (estrógeno e progesterona) (FAIT, 2019).

A reposição hormonal pode ter efeitos colaterais indesejáveis como osteoporose e alterações cardiovasculares que devem ser cuidadosamente avaliados. Além disso, para a maioria das mulheres com histórico de câncer de mama esta terapia é inviável (D'ALONZO *et al.*, 2019; ESKANDARI; ALIPOUR, 2019).

3.2 USO DO E2 NO ENVELHECIMENTO

Estrona (E1), 17- β estradiol (E2), estriol (E3) e estretol (E4) (Figura 1) são estrógenos endógenos. O E2, a forma predominante e biologicamente ativa, é secretada principalmente pelas células da granulosa no folículo ovariano. A biossíntese desse hormônio envolve a conversão do colesterol e é catalisada pela aromatase do citocromo P450 (FUENTES; SILVEYRA, 2019; GAO *et al.*, 2015).

Figura 1 - Estrutura química dos estrógenos endógenos



Fonte: O autor

Em mulheres na menopausa os inibidores de aromatase agem na enzima citocromo P450 que converte testosterona em estradiol, reduzindo os níveis

circulantes de estrógeno. O efeito do E2 no tecido alvo envolve um mecanismo complexo que inclui a ligação a receptores citoplasmáticos, alteração conformacional e penetração do complexo no núcleo (MARIANTONIETTA *et al.*, 2014; VARDANYAN; HRUBY, 2006).

O E2 possui dois tipos de receptores nucleares: receptor de estrógeno alfa (ER α) e receptor de estrógeno beta (ER β). Ambos possuem domínios estruturais semelhantes, porém diferem nas suas regiões de ligação ao DNA, o que é importante para suas diversas ações transcricionais (FUENTES; SILVEYRA, 2019; INOUE *et al.*, 2011).

Apesar da afinidade dos receptores estrogênicos pelo E2 ser semelhante, a expressão destes são predominantes em diferentes tecidos. ER α é prevalente no útero, glândulas mamárias, hipófise, músculo esquelético, tecido adiposo e osso. ER β está presente no ovário, próstata, pulmão, sistema nervoso central e pele (RZEPECKI *et al.*, 2019; SELEIT *et al.*, 2016; YASAR *et al.*, 2016).

O E2 é tradicionalmente associado ao ciclo reprodutivo da mulher, no entanto, sabe-se que esse hormônio possui importantes funções no trato reprodutivo masculino, como efeitos cardioprotetores, densidade óssea e regeneração muscular (COOKE *et al.*, 2017; DWORATZEK, 2019; LIAO *et al.*, 2019; MAHMOODZADEH; WEHBE *et al.*, 2020; MONDOCKOVA *et al.*, 2018).

A diminuição da síntese e liberação de E2 na menopausa pode causar efeitos na pele, como atrofia, diminuição na síntese de colágeno, secreção sebácea deficiente e perda de elasticidade. Além da importância fisiológica, possui efeitos na cicatrização de feridas (CALLEJA-AGIUS; BRINCAT, 2012).

Receptores estrogênicos têm sido identificados nos leucócitos, monócitos e macrófagos sugerindo uma modulação de células inflamatórias (THRNTON, 2013). A terapia estrogênica pode reduzir o número de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias no leito da ferida, além de promover mudanças nos subtipos de macrófagos M1 e M2 estimulando a fase proliferativa (VILLA *et al.*, 2015).

O E2 possui efeitos benéficos em diferentes fases do processo cicatricial. Na fase proliferativa auxilia a deposição da matriz extracelular (MEC) (diminuição de proteases), aumento da migração de queratinócitos e fibroblastos e diminui a liberação

de citocinas pró-inflamatórias (WILKINSON; HARDMAN, 2017). No remodelamento estimula a degradação de colágeno, aumentando a expressão de matriz metaloproteinase (MMP) (EMMERSON; HARDMAN, 2012; HORNG *et al.*, 2017).

Estudo realizado com ratas na fase estro (aumento da síntese de estrógeno) e ooforectemizadas (retirada dos ovários) bilateralmente, mostraram que os animais tiveram melhor progressão do processo cicatricial com rápida epitelização e retração da lesão. Esses dados foram comprovados por análises *in vitro* utilizando uma linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) onde foi possível observar uma maior proliferação celular na presença do estrógeno (ZHOU *et al.*, 2016).

Após a interrupção da secreção de estrógeno pelo folículo ovariano, o organismo necessita de outra fonte para suprir as necessidades dos órgãos. Todos os tecidos, com exceção do endométrio possuem a enzima que converte dehidroepiandrosterona (DHEA) em andrógenos e estrógenos, processo denominado intracrinologia (LABRIE, 2015). No entanto, estudos tem demonstrado que essa produção não é suficiente para manter o adequado processo de cicatrização (MUKAI *et al.*, 2016).

3.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

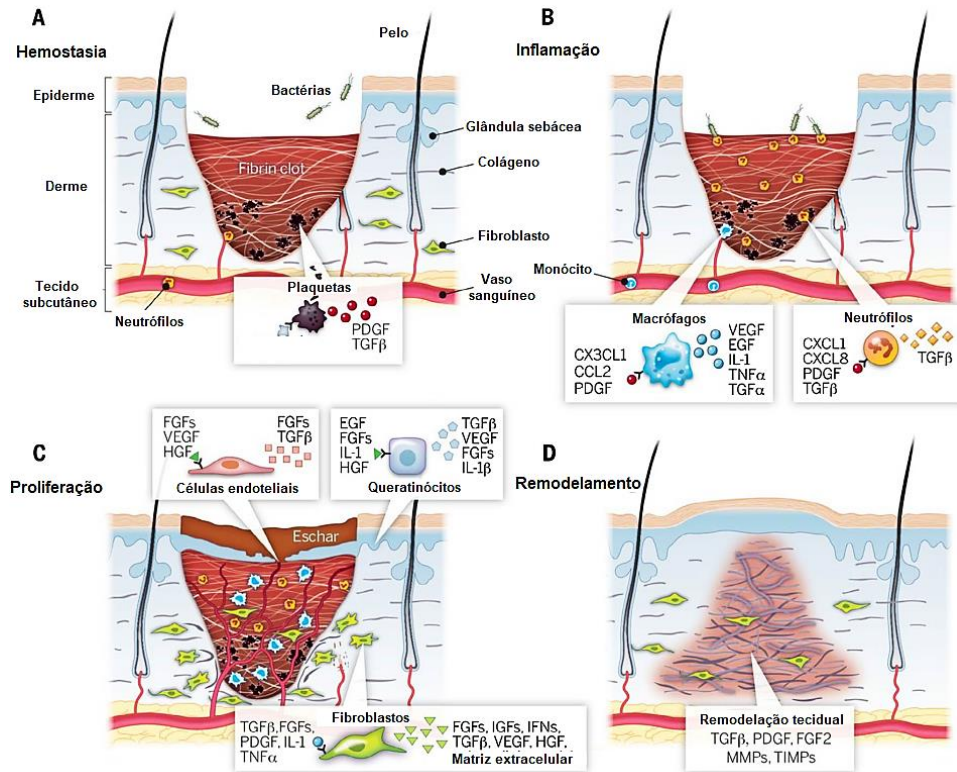
A lesão ocorre quando a integridade da pele é comprometida por cortes, queimaduras ou traumas. O tipo de ferida pode ser classificado de acordo com a espessura, morfologia, complexidade, tempo, profundidade e contaminação. A cicatrização pode ocorrer por primeira, segunda ou terceira intenção, dependendo da perda tecidual e presença de infecção (HASSIBA *et al.*, 2016; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

As feridas agudas cicatrizam completamente dentro de um período de oito a doze semanas. Feridas crônicas não se curam espontaneamente e são mais complexas, devido a contaminação ou presença de outras enfermidades. As lesões cutâneas devem ser tratadas adequadamente para evitar complicações futuras (BOATENG; CATANZANO, 2015; NETHI *et al.*, 2019).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve etapas coordenadas que compreendem a hemostasia, inflamação, proliferação e

remodelamento (Figura 2) que tem como finalidade o restabelecimento da integridade cutânea (MARTIN; NUNAN, 2015).

Figura 2 - Etapas do processo de cicatrização



Fonte: Koehler; Brandl; Goeperich (2018).

Nota: Texto traduzido pelo autor.

As alterações vasculares são os primeiros eventos que ocorrem após a lesão e possuem grande importância no início da resposta inflamatória. Esse processo envolve vasoconstrição, agregação plaquetária (hemostasia primária) e a formação de um tampão rico em fibrina (hemostasia secundária) (RODRIGUES *et al.*, 2019).

As principais células envolvidas no processo inflamatório são neutrófilos e macrófagos. O recrutamento desses leucócitos é rápido e coincide com o aparecimento de alguns sinais inflamatórios como edema e vermelhidão no local da lesão (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Os neutrófilos chegam ao local da inflamação minutos após a lesão. Essas células realizam a fagocitose de partículas estranhas, liberam citocinas pró-inflamatórias e realizam o debridamento do tecido através de enzimas proteolíticas (SHANKAR *et al.*, 2014).

Os macrófagos desempenham importante papel no processo de cicatrização, pois auxiliam na remoção de células apoptóticas, restauração do tecido lesado, angiogênese e proliferação celular. Além de fagocitar restos celulares, os macrófagos iniciam o desenvolvimento do tecido de granulação, estimulando a proliferação de queratinócitos e fibroblastos (CHILDS; MURTHY, 2017). Existem dois importantes tipos de macrófagos, M1 responsável pela fagocitose e remoção de restos celulares e M2 que possui funções de reparo e regeneração (HESKETH *et al.*, 2017; KOTWAL; CHIEN, 2017).

Fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento de insulina (IGF) estimulam a migração e proliferação celular (MASI *et al.*, 2016).

A fase proliferativa envolve várias etapas como: angiogênese, deposição de fibras colágeno e epitelização. A angiogênese é estimulada por fatores mitogênicos. As células endoteliais tem um papel importante no processo de cicatrização uma vez que permitem a migração de leucócitos, o transporte de nutrientes e oxigênio, e a secreção de substâncias como fator de crescimento endotelial, fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), TGF- β e PDGF. O processo de angiogênese envolve a síntese de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos pré-existent (CANEDO-AYALA, 2019; CANEDO-DORANTES).

A síntese de colágeno é mediada por fatores como PDGF, FGF, interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF) e TGF- β . Os fibroblastos substituem a matriz provisória produzida durante a fase inflamatória por um tecido de granulação rico em colágeno. Além disso, essas células produzem proteoglicanos e glicosaminoglicanos, principais componentes da matriz extracelular (CHILDS; MURTHY, 2017).

A epitelização ocorre devido a um aumento na atividade mitótica dos queratinócitos da borda da ferida, estimulada por EGF, fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) e FGF. A epitelização necessita de um ambiente úmido e livre de contaminação microbiana (CARDOSO, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2016; MESTRE; RODRIGUES;).

Na remodelação tecidual, ocorre o restabelecimento da integridade da área lesada, com alteração da matriz extracelular, deposição de proteoglicanos e colágeno. Uma cicatrização adequada ocorre quando a formação do tecido necrótico é mínima (MAYET *et al.*, 2014).

3.4 NANOTECNOLOGIA APLICADA À NOVAS FORMULAÇÕES TÓPICAS

A nanotecnologia é uma área direcionada ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas nanométricos. As nanopartículas podem ser obtidas por diferentes processos e aplicadas em diversas áreas (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017; RADWAN, 2018). A expansão no uso da nanotecnologia deve-se à diversidade e as características físico-químicas ajustáveis dos nanocompostos que oferecem alternativas rápidas e economicamente viáveis de desenvolvimento (JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

As propriedades físicas e químicas das nanopartículas podem diferir das formas convencionais do mesmo material na cor, temperatura de ebulição, condutividade elétrica, magnetismo, propriedades mecânicas e cristalinidade (GOH *et al.*, 2016).

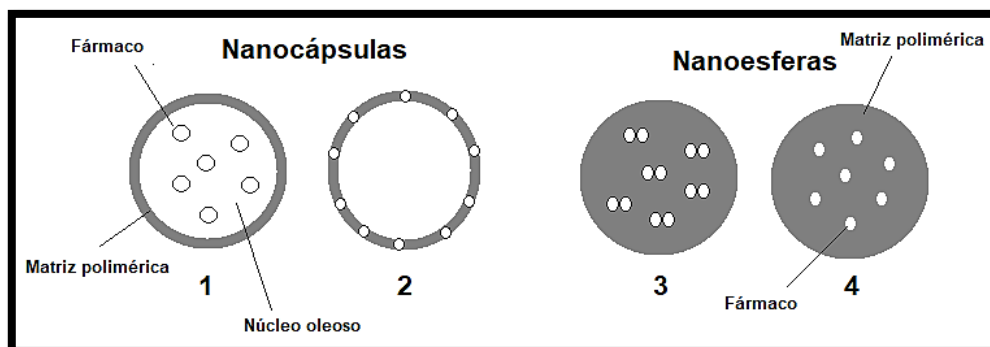
Os benefícios dos materiais nanoparticulados incluem a maior superfície de contato. Nos sistemas biológicos, o menor tamanho pode ser ideal para absorção celular dos ativos (LEON; CHUNG; RINALDI, 2020). O uso de nanomateriais formados por polímeros e metais têm despertado o interesse de muitos pesquisadores devido aos benefícios desses compostos em aplicações biomédicas (BHARDWAJ; KAUSHIK, 2017; RAMOS *et al.*, 2017).

Os nanosistemas podem ser úteis na liberação de fármacos, o que permite melhorar a biodisponibilidade de ativos com baixa solubilidade, diminuir os efeitos colaterais, liberar o medicamento de maneira controlada e ser administrada em menor dose (PATRA *et al.*, 2018).

Nanopartículas poliméricas são amplamente utilizadas para a liberação de fármacos. Essas podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas são sistemas coloidais que apresentam invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso ou aquoso. O fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou aderido à superfície polimérica. As nanoesferas não possuem núcleo e são compostas por

uma matriz, onde o fármaco encontra-se solubilizado ou disperso homogeneamente (Figura 3) (JARAI *et al.*, 2020; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Figura 3 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Schaffazick; Guterres (2003).

Nota: 1- fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; 2- fármaco adsorvido na matriz polimérica; 3- fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera; 4- fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica.

A liberação dos ativos a partir das nanocápsulas é controlada através da difusão pela matriz polimérica, portanto a taxa vai depender da interação do fármaco com o polímero. Nas nanoesferas, esse processo ocorre devido a erosão da matriz onde o ativo está disperso (RIZVI; SALEH, 2018).

A obtenção das nanopartículas poliméricas pode ser realizada utilizando diferentes métodos: polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou precipitação de polímeros pré-formados (JARAI *et al.*, 2020; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). O método de deposição interfacial de polímero pré-formado baseia-se no lento gotejamento da fase orgânica em uma fase aquosa sob agitação vigorosa. Esse processo resulta na formação de uma suspensão coloidal de nanocápsulas devido à rápida difusão do solvente e diminuição da tensão superficial entre as fases. Em seguida o solvente é evaporado e o excesso de água retirado (FESSI *et al.*, 1989).

A síntese de nanoesferas pode ser realizada pelo método de co-precipitação, que baseia-se em reações químicas com diferentes condições de tempo, agitação, velocidade de adição dos componentes, temperatura e concentração das soluções (MAYRINCK *et al.*, 2014).

O uso tópico de nanopartículas poliméricas têm se mostrado uma alternativa viável para o tratamento de feridas cutâneas devido a ação localizada com baixo efeito

sistêmico, fácil aplicação, concentração adequada de ativo no local da ferida e rápida remodelação tecidual. A escolha do polímero é muito importante, pois este interfere no tamanho, forma e hidrofiliabilidade das nanopartículas (BERTHET *et al.*, 2017; PARANI *et al.*, 2016).

A dimensionalidade é uma das principais preocupações em cicatrização de feridas. A nanotecnologia oferece excelentes ferramentas para a produção de biomateriais ou estruturas que imitam a MEC ou o microambiente celular. A modificação da superfície e a estrutura 3D em nanoescala é viável e os nanomateriais podem ser combinados formando estruturas (CASTANO *et al.*, 2018).

As nanopartículas mais usadas para administração tópica ou transdérmica de drogas são nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, nanolipossomas, nanopartículas metálicas e dendrímeros (GOYAL *et al.*, 2016). Na cicatrização, estas podem atuar minimizando a inflamação, simulando a ação de fatores endógenos e de crescimento ou modulando a atividade proteolítica (GOH *et al.*, 2016).

As nanopartículas poliméricas consistem em um sistema de incorporação de fármacos composta principalmente por polímeros biodegradáveis. O tamanho reduzido permite que haja uma maior superfície de contato, com grande quantidade de ativo absorvido. Além disso, essa estrutura mantém a estabilidade de compostos, o tempo de retenção e a penetração intracelular (DUBEY; PRABHU; KAMATH, 2012; KAUL *et al.*, 2018).

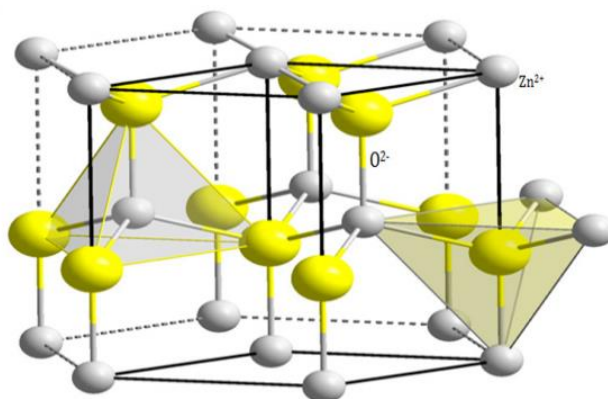
Um exemplo notável na literatura é o uso da Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) na cicatrização de feridas. O uso desse polímero associado a outros fármacos possui efeitos benéficos na regeneração de tecidos lesados devido, por exemplo, a diminuição do infiltrado inflamatório (PINZÓN-GARCIA, 2017). Kim *et al.* (2017) avaliaram o efeito cicatrizante de nanofibras da blenda proteína adesiva de mexilhão (MIP) e PCL em lesão cutânea. Os resultados mostraram que houve uma melhor progressão do processo de cicatrização, o que pode ser atribuído à maior absorção de exsudato e proliferação de queratinócitos.

3.5 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO (ZnON)

ZnO é um composto semicondutor que possui alta estabilidade química e eletrônica. Esse óxido é comumente encontrado na forma chamada “wurtzite” que

possui característica hexagonal (Figura 4). A estrutura do ZnO pode ser descrita como planos alternados compostos pelos átomos de O^{2-} e Zn^{2+} distribuídos ao longo do eixo axial (GUO, 2017; KLINGSHIRN, 2010).

Figura 4 – Estrutura esquemática do óxido de zinco



Fonte: Guo (2017).

A importância do zinco na cicatrização foi descrita por Sandstead *et al.* (1970) que avaliou o processo de reparo de lesões cutâneas em animais que receberam dieta com e sem suplemento de zinco. Os resultados mostraram que houve melhor contração da ferida, sugerindo a relação com a síntese de proteína.

O óxido de zinco pode ser utilizado associado a outros metais, ou incorporado em curativos para uso tópico. A concentração administrada deve ser avaliada, pois altas doses podem ser tóxicas, causando disfunção nos queratinócitos e produção de ERO (MIHAI *et al.*, 2019).

As atividades farmacológicas exercidas pelo ZnO devem-se principalmente a interação das células com o íon Zn^{2+} . O zinco é liberado em função da diminuição do pH do meio (formação de Zn^{2+} e H_2O) e a cicatrização de feridas agudas ocorre primeiramente em meio ácido, resultante de uma resposta fisiológica temporária (JONES; COCHRANE; PERCIVAL, 2014; YANG; XIE, 2006).

O zinco possui ação anti-inflamatória por modular a liberação de citocinas, auxiliar a síntese de proteínas, neutralizar radicais livres e impedir infecções bacterianas. A suplementação exógena de zinco quando realizada em concentrações adequadas pode auxiliar a atividade de linfócitos T e macrófagos (GAMMOH; RINK,

2017). O tratamento de lesões cutâneas com óxido de zinco promove a migração de células endoteliais, diminuição de infiltrado inflamatório e re-epitelização auxiliando o processo de regeneração tecidual (BALAURE *et al.*, 2019; RACCA *et al.*, 2018).

O zinco é um cofator para as metaloproteinases que possui um papel importante na degradação da matriz extracelular. A aplicação tópica de nanopartículas de óxido de zinco auxiliam a cicatrização devido a maior superfície de contato, ao tamanho e concentração das partículas (RAJENDRAN *et al.*, 2018).

3.6 EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE E2 E ZnO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

A aplicação tópica de benzoato de estradiol mostrou-se eficaz no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratas com 80 semanas de vida. Os resultados mostraram uma melhor retração da lesão, modulação da resposta inflamatória, com diminuição no número de macrófagos e neutrófilos, no grupo tratado com estrógeno (MUKAI *et al.*, 2019).

O uso de nanopartículas de ZnO têm demonstrado potencial efeito cicatrizante principalmente devido a sua ação antibacteriana. As ligações eletrostáticas entre o zinco e as membranas celulares permitem a adesão e penetração deste íon, que leva a geração de espécies reativas de oxigênio, causando disfunção da membrana e morte bacteriana (KAUSHIK *et al.*, 2019).

Não existem estudos que relatam o efeito sinérgico no uso de nanopartículas de E2 e ZnO em feridas de ratas ooforectomizadas. O desenvolvimento de alternativas viáveis para o tratamento de lesões cutâneas em mulheres na menopausa se faz necessário devido ao tempo e custo das opções disponíveis hoje no mercado. Diante do exposto, o presente trabalho visa desenvolver nanocompostos com potencial ação cicatrizante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Agitador magnético (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Coluna cromatográfica;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK- HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrômetro de auto correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nano series ZS90, Worcestershire, Reino Unido);
- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR-Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (NOVA ÉTICA, modelo 410/D, Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE; Bedford, MA, Estados Unidos);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão);
- Filtro para seringa PTFE (politetrafluoretileno) (0,45 μm x 25 mm, Cromafil®, Xtra, MACHEREY-NAGEL GNBH & CO. KG, Duren, Alemanha);
- Seringa para HPLC de 100 μL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- 17- β estradiol (JIANGSU GRAND XINYI PHARMACEUTICAL, China). O fármaco foi utilizado como padrão para o desenvolvimento do método analítico por HPLC e como ativos nas formulações;
- Óxido de zinco P. A. (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).

4.2.2 Água Purificada

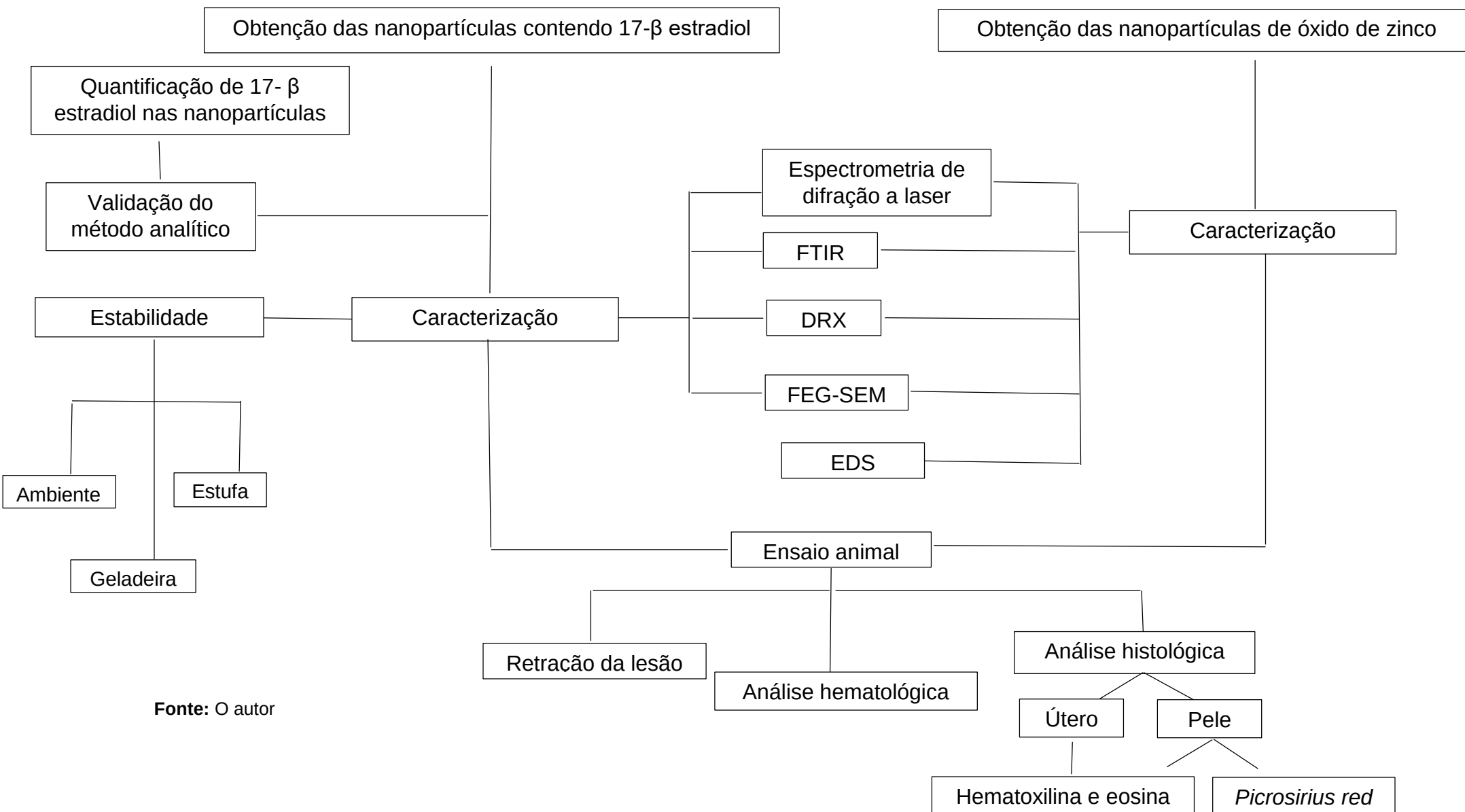
- Para análises no cromatógrafo líquido, determinação do tamanho de partícula e potencial zeta foi utilizada água ultrapura obtida no equipamento (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Para o desenvolvimento dos sistemas microparticulados e demais análises foi utilizada água destilada em equipamento FANEM LTDA (modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil).

4.2.3 Demais Solventes e Reagentes

- Hidróxido de potássio P. A. (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Poli- ϵ -caprolactona (PCL) (Mw 70.000 a 90.000 g/mol, sigma-aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Nitrato de zinco P.A. (ÊXODO CIENTÍFICA, Sumaré, São Paulo, Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween® 80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Acetonitrila (ACN) grau HPLC (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Metanol grau HPLC (APPLYCHEM PANREAC QUÍMICA, Barcelona, Espanha);
- Brometo de potássio (KBr) grau espectroscópico (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Etanol P.A. (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Xilol (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Parafina histológica (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Hematoxilina de Harris (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)
- Eosina (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Picrosirius red (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Ácido acético (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Iniciou-se o experimento com a obtenção das nanopartículas de E2 e de óxido ZnO. Em seguida foi feita a validação analítica com quantificação de ativo presente nas nanocápsulas de E2. Realizou-se a caracterização dos sistemas nanométricos com análises morfológicas e espectroscópicas. A estabilidade das nanocápsulas de E2 foi realizada em 0, 30, 60, 90 e 120 dias com quantificação de ativo no último mês. A avaliação *in vivo* foi realizada utilizando ratas ooforectomizadas. O tratamento foi feito utilizando gel de hidroxietilcelulose (Natrosol®) com concentrações de nanopartículas de E2 e ZnO previamente estabelecidas. Em seguida realizou-se análise da retração da lesão e hematológica. A análise histológica da pele foi realizada utilizando coloração hematoxilina e eosina (HE) e *picrosirius red*. A análise histológica do útero foi realizada utilizando a coloração HE. Por fim foi realizada análise estatística dos dados obtidos (Figura 5).

Figura 5 – Desenho experimental

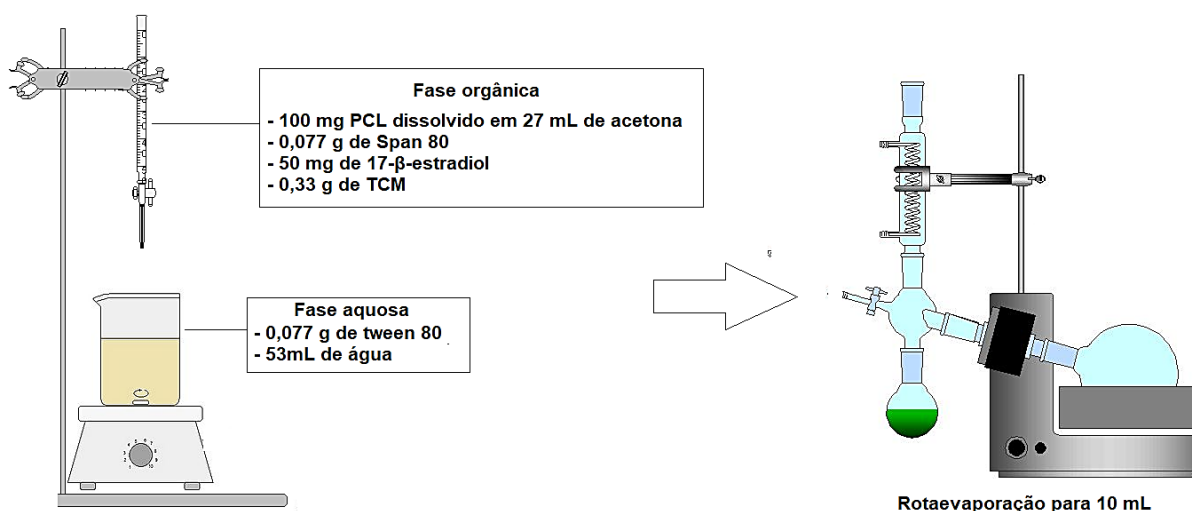
Fonte: O autor

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das Nanocápsulas Poliméricas Contendo E2

Suspensões de nanocápsulas foram obtidas utilizando a PCL (100 mg) dissolvido em acetona (30 mL) na presença de Span® 80 (0,077g), E2 (50 mg) e triglicerídeos de cadeia média (0,33 g). A solução foi mantida sob agitação por 10 minutos. A fase aquosa foi preparada utilizando Tween 80® (0,077 g) e água destilada (53 mL). Em seguida, a fase orgânica foi adicionada lentamente a fase aquosa sob agitação magnética constante a 40°C. A nanoemulsão resultante dessa mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, o solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 40°C, resultando em uma amostra concentrada (10 mL) (Figura 6). Foram obtidas nanopartículas com o fármaco (EN) e sem o fármaco (PCLN).

Figura 6 – Esquema de obtenção das nanocápsulas de E2



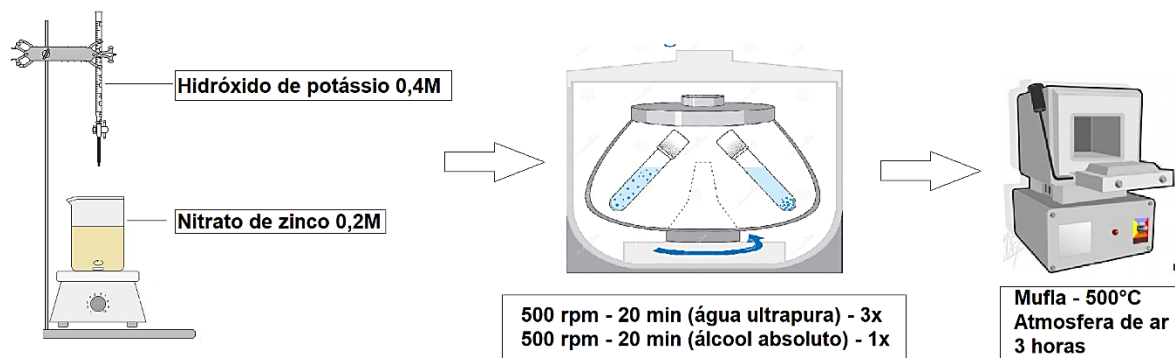
Fonte: O autor

4.4.2 Obtenção das Nanoesferas de ZnO

As nanoesferas foram preparadas adicionando lentamente e sob agitação vigorosa, uma solução aquosa de hidróxido de potássio 0,4 mol/L em solução aquosa de nitrato de zinco 0,2 mol/L. Em seguida, a mistura resultante foi centrifugada a 5000 rpm durante 20 minutos, o procedimento foi repetido três vezes lavando com água e

por último com álcool absoluto. O sedimento foi calcinado em mufla a 500°C em atmosfera de ar durante 3 horas (Figura 7).

Figura 7 – Esquema de obtenção de nanoesferas de ZnO



Fonte: O autor

4.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por HPLC para a Quantificação do E2 nas Nanocápsulas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo MERCK-HITACHI (Lachrom D-7000; Tóquio, Japão), equipado com detector UV L-7400, bomba L-7100, degaseificador e injetor manual Rheodyne (volume de injeção de 20 µL), software Chromquest. As amostras foram injetadas com auxílio de seringa de 100 µL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça).

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a composição da fase móvel em 60 minutos. Em seguida, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução do pico para E2. Uma amostra contendo o polímero foi injetada antes das análises das nanocápsulas, como controle negativo.

A validação do método analítico por HPLC 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 166 de 24 de Julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.4.3.1 Validação do método analítico para a quantificação do E2

As amostras foram injetadas manualmente com o auxílio de uma seringa (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça). Foi utilizada coluna C18 GL Science Inertsil[®] ODS3 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Tóquio, Japão), acoplada a pré-coluna GL Science Inertsil[®] ODS3 (10 mm, 4 mm, 5 µm, Tóquio, Japão). Os parâmetros estabelecidos na quantificação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros cromatográficos

Característica	Descrição
Detecção	UV – 280 nm
Fluxo	1,5 mL/min
Tempo de análise	6 minutos
Volume de injeção	20 µL
Fase móvel	Acetonitrila e água (92:8)

O método foi validado conforme as etapas descritas a seguir.

Para determinar os melhores parâmetros para a corrida cromatográfica, foi realizado um gradiente exploratório, variando as concentrações de acetonitrila de 5 a 95% em 60 minutos. Em seguida, as condições foram otimizadas obtendo-se a melhor resolução para o pico de E2.

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas das nanopartículas sem fármaco comparado com aquelas contendo E2. O objetivo foi confirmar que nenhum dos excipientes interferiu na quantificação do fármaco.

Na linearidade foram feitas três curvas analíticas com seis concentrações (70, 100, 130, 160, 190 e 220 µg/mL) utilizando metanol como solvente. A avaliação de cada ponto foi feita em triplicata. A equação da reta e o coeficiente de variação (r) foram determinados.

Os limites de detecção (LD) (Equação 1) e de quantificação (LQ) (Equação 2) foram calculados utilizando o desvio padrão (DP) e a inclinação da curva analítica, conforme as equações:

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{B} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \quad (2)$$

Na repetibilidade, três concentrações (100, 160 e 220 µg/mL) foram avaliadas em triplicata. A precisão intermediária foi realizada por desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR) das três concentrações analisadas intradia e interdia.

A exatidão foi realizada utilizando análise de recuperação, adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco (5 µg/mL) à solução amostra, resultando em uma concentração de 90, 120 e 180 µg/mL. As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de recuperação.

A análise de robustez, foi realizada com as amostras a 90, 160 e 220 µg/mL por variação no fluxo (1,495 e 1,505 mL/min) e concentração da fase móvel para 93:7 (V/V) e 91:9 (V/V). Para avaliar a influência das variações utilizou-se o teste Tukey de Análise de variância (ANOVA). Os resultados foram analisados utilizando o DPR comparando os valores da condição padrão.

4.4.3.2 Determinação do E2 incorporado e avaliação da eficiência de encapsulação (EE)

A quantificação de E2 encapsulado foi realizada pelo método indireto que determina a concentração de fármaco não encapsulado. Uma alíquota de 500 µg da suspensão de nanocápsula foi submetida à ultrafiltração/centrifugação usando o dispositivo Amicon® 10.000 Mw (Milipore) a 6000 rpm durante 30 minutos. A quantidade de E2 foi determinada (triplicata) no ultrafiltrado utilizando um método previamente validado.

A eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela diferença entre a concentração total e de fármaco livre (Equação 3).

$$EE(\%) = \frac{17-\beta \text{ estradiol inicial} - 17-\beta \text{ estradiol livre}}{17-\beta \text{ estradiol inicial}} * 100 \quad (3)$$

Onde 17-β estradiol inicial corresponde a quantidade adicionada inicialmente à formulação e 17-β estradiol livre aquela não incorporada às nanocápsulas. A quantificação foi expressa pela média ± DP.

4.4.4 Caracterização das Nanopartículas

4.4.4.1 Espalhamento de luz dinâmico e microeletroforese laser Doppler

O tamanho de partícula e potencial zeta das nanopartículas (E2, PCLN e ZnON) foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido), após o preparo das amostras (1:500 V/V) em água ultrapura. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field emission gun scanning electron microscopy* – FEG-SEM)

A avaliação morfológica e de superfície de todas as nanopartículas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). 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*).

4.4.4.2 Espectroscopia de raios X com dispersão de energia (SED)

A composição elementar do óxido de zinco (convencional e nanopartícula) foi determinada pela espectroscopia de raio x com dispersão de energia a uma voltagem de aceleração de 15kV e microsonda analítica de raios-X Oxford X-maxⁿ 50, com metalização das amostras. Foram feitos 3 ciclos de medidas para cada amostra, em seguida a média da porcentagem de cada elemento foi obtida.

4.4.4.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada em Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR)

As amostras dos ativos (E2 e ZnO) nas formas convencionais e nanoparticulados, a mistura física (E2 e PCL), PCL, TCM, Tween[®] 80 e Span[®] 80 foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), 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.

4.4.4.4 Difração de Raios X (*X-ray diffraction* – DRX)

O óxido de zinco na forma convencional e nanoparticulada foi examinada em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, *scan* de 2°/min e 2θ de 5° 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.

4.4.4.5 Estabilidade das nanocápsulas de E2

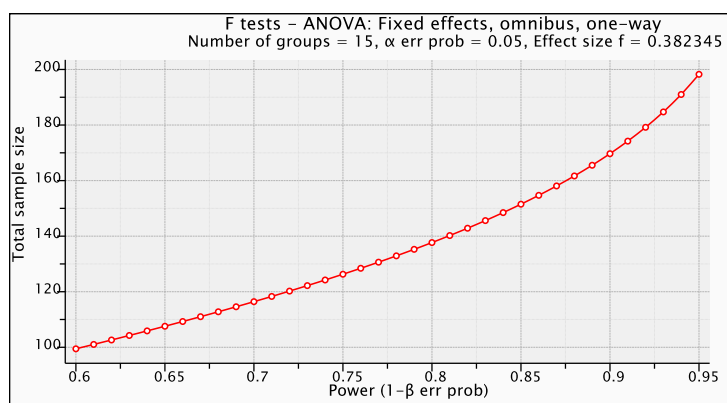
A estabilidade das nanocápsulas de E2 foi realizada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias. Foram realizadas análises de pH, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta. Após 120 dias, foi realizada a quantificação do fármaco utilizando o método cromatográfico previamente validado.

4.4.5 Ensaio Animal

O protocolo experimental foi previamente submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Número de aprovação: 014/2018 (ficha anexo A).

Foram utilizados 225 ratos Wistar fêmeas, pesando aproximadamente 250 g, mantidos em gaiolas de plástico com ração (Nutival®) e água *ad libitum*, temperatura ($22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas controlados automaticamente.

O cálculo do *n* amostral foi realizado com base na média e desvio padrão (Figura 8) de dados encontrados na literatura, estabelecendo um poder de teste de 95%, usando o programa GPower 3.1. Foi acrescido 10% ao valor total para eventuais perdas durante o experimento.

Figura 8 - Gráfico referente ao cálculo do n amostral

Os animais foram divididos em grupos conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos grupos submetidos ao teste de cicatrização

Grupo	Ooforectomia	Tratamento
CNO	Não	Sem tratamento nas feridas
CO	Sim	Sem tratamento nas feridas
PCLN	Sim	Nanopartículas sem o fármaco
EC 0,06	Sim	E2 convencional 0,06%
EC 0,12	Sim	E2 convencional 0,12%
EN 0,06	Sim	E2 nanoparticulado 0,06%
EN 0,12	Sim	E2 nanoparticulado 0,12%
ZnOC 2,5	Sim	ZnO convencional 2,5%
ZnOC 5,0	Sim	ZnO convencional 5,0%
ZnON 2,5	Sim	ZnO nanoparticulado 2,5%
ZnON 5,0	Sim	ZnO nanoparticulado 5,0%
ZnOC 2,5 + EC 0,06	Sim	ZnO convencional 2,5% + E2 convencional 0,06%
ZnOC 5,0 + EC 0,12	Sim	ZnO convencional 5,0% + E2 convencional 0,12%
ZnON 2,5 + EN 0,06	Sim	ZnO nanoparticulado 2,5% + E2 nanoparticulado 0,06%
ZnON 5,0 + EN 0,12	Sim	ZnO nanoparticulado 5,0% + E2 nanoparticulado 0,12%

4.4.5.1 Ooforectomia e lesão na pele

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 (40 mg/kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. A retiradas das gônadas foram feitas 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. As lesões na pele foram feitas 45 dias após as ooforectomia, foi produzida uma lesão na região cervico-lombar, medindo 2 cm², em cada animal.

4.4.5.2 Obtenção do gel para aplicação tópica

As nanocápsulas poliméricas contendo E2 e as nanoesferas de ZnO foram adicionadas ao gel de hidroxietilcelulose (Natrosol®) 1,5% para aplicação nas lesões cutânea dos animais. As concentrações aplicadas foram de 0,06% e 0,12% para nanopartículas de E2 e 2,5% e 5,0% para nanoesferas de ZnO. A administração tópica dos tratamentos foi realizada durante 7 dias aplicando 1mL de gel em cada lesão. A escolha das concentrações testadas foram baseadas em produtos disponíveis no mercado para terapia de reposição hormonal e assaduras.

4.4.5.3 Avaliação da retração da lesão

A análise da retração da lesão foi realizada com os animais anestesiados com isoflurano administrado por via inalatória. A medida da área de cada ferida foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico (tempo 0) e nos dias 7, 14, e 22 por meio de fotografia das lesões. Foi utilizado um suporte padrão com distância adequada para evitar alterações. As imagens demarcadas das feridas foram analisadas utilizando o programa Image J.

4.4.5.4 Análise hematológica

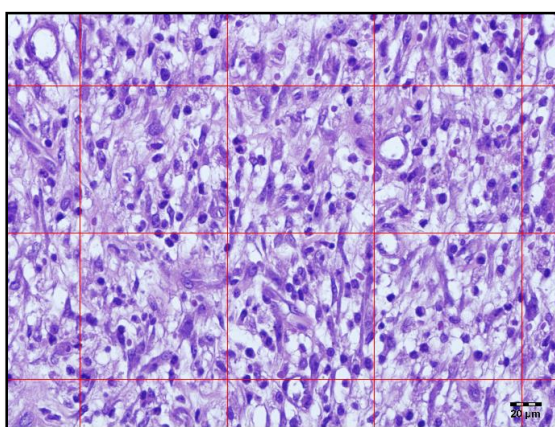
O sangue foi coletado por punção cardíaca, adicionado em tubo contendo EDTA e homogeneizado. O hemograma foi realizado no contador hematológico veterinário MED VET.

4.4.5.5 Análise histológica

4.4.5.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina - pele

Após a eutanásia com superdosagem de quetamina e xilasina, dos locais das feridas, foram retirados fragmentos da borda direita das lesões com auxílio de um “punch” e fixados em formol 10% (v/v). Após a fixação, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, embebido e incluído em parafina, seccionado em micrótomo com espessura de 3 μm e corado com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação da resposta inflamatória quanto à celularidade sob microscopia de luz. Após análise e seleção, as secções histológicas foram fotografadas com microscópio Olympus AX70 (aumento 400x), utilizando o programa T capture. A quantificação das células inflamatórias foi realizada utilizando o software Image J – cell counter com a contagem de 3 quadrantes padronizados por imagem (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografia da pele com quadrante para contagem de células inflamatórias



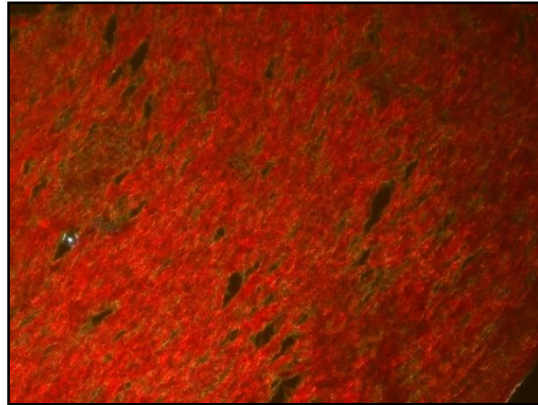
Fonte: O autor

4.4.5.5.2 Coloração Picrosirius Red - pele

A análise histológica das fibras colágeno foi realizada com amostras das lesões dos animais nos dias 14 e 22. 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 Olympus AX70 – com polarizados acoplado e para evitar variações relacionadas ao processo de captura, as configurações da câmera e intensidade de luz foram idênticas para todas as amostras

(Figura 10). As imagens foram analisadas utilizando o programa Image J e os resultados expressos em pixels.

Figura 10 - Fotomicrografia da pele corada por *Picrosirius Red*. Presença de fibras colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde). Fotomicrografia obtida utilizando microscópio de polarização (200x).

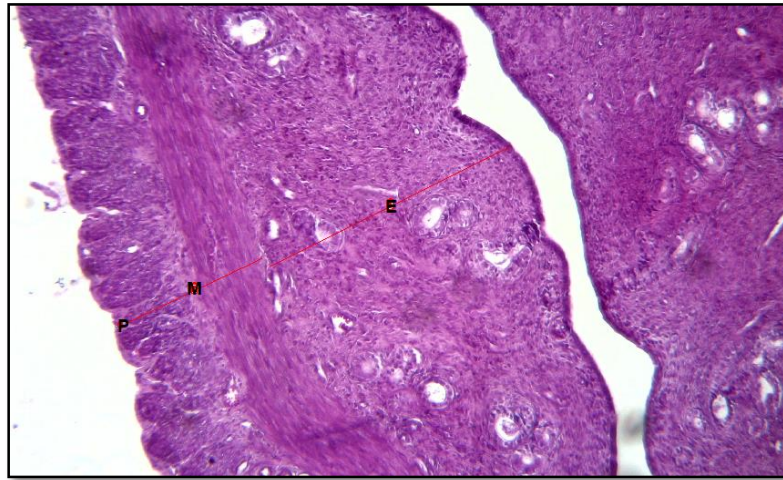


Fonte: O autor

4.4.5.5.3 Coloração Hematoxilina e Eosina – útero

Após a eutanásia o útero dos grupos tratados com estrógeno e do grupo controle ooforectomizado foram coletados e fixados em formol 10%. Em seguida, foi realizado o processamento histológico e a amostra foi seccionada em micrótomo com espessura de 3 μ m e corado com Hematoxilina e Eosina (HE). As secções histológicas foram fotografadas utilizando microscópio Olympus AX70 (aumento 20x), utilizando o programa T capture. A espessura das camadas perimétrio, miométrio e endométrio foram realizadas utilizando o programa Image J após padronização da distância conhecida (Figura 11). A média e desvio padrão foram calculados para posterior análise estatística.

Figura 11 - Fotomicrografia do útero com modelo de medidas das camadas uterinas



Fonte: O autor

Nota: P – perimetrio, M – miométrio e E – endométrio

4.4.5.6 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 6 pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguido do teste de Tukey, com intervalo de confiança em 95% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE E2 E ZnO

A suspensão de nanocápsulas de E2 apresentaram-se como um líquido homogêneo, de aspecto leitoso e opalescente com reflexo azulado característico do movimento browniano de estruturas coloidais. O resultado está de acordo com o descrito por Weber *et al.* (2016) e Marchiori *et al.* (2017) que caracterizaram nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso.

Após o processo de secagem, as nanoesferas de ZnO demonstraram características semelhantes ao descrito por Basha *et al.* (2016) e Pillai *et al.* (2020) como um pó fino, branco, inodoro, semelhante ao material de partida que apresenta aspecto pulverulento.

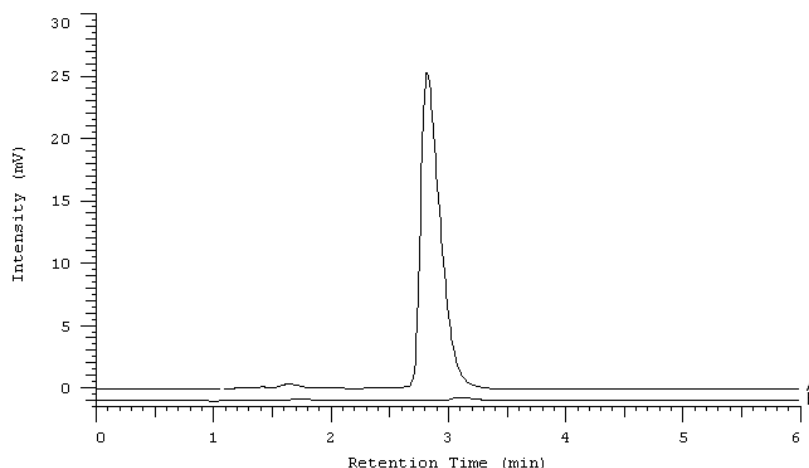
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA QUANTIFICAÇÃO DE E2 NAS NANOCÁPSULAS

Após corrida em gradiente exploratório foi definida a proporção da fase móvel acetonitrila:água (92:8) (V/V) e fluxo de 1,5 mL/min como condições padrão para realização das demais análises. O tempo de corrida foi determinado em 6 minutos sendo rápido e adequado para análises laboratoriais.

A especificidade avalia a capacidade do método em identificar o analito na presença de impurezas (ICH, 2005). Esse teste foi realizado utilizando formulações de nanocápsulas com e sem o fármaco.

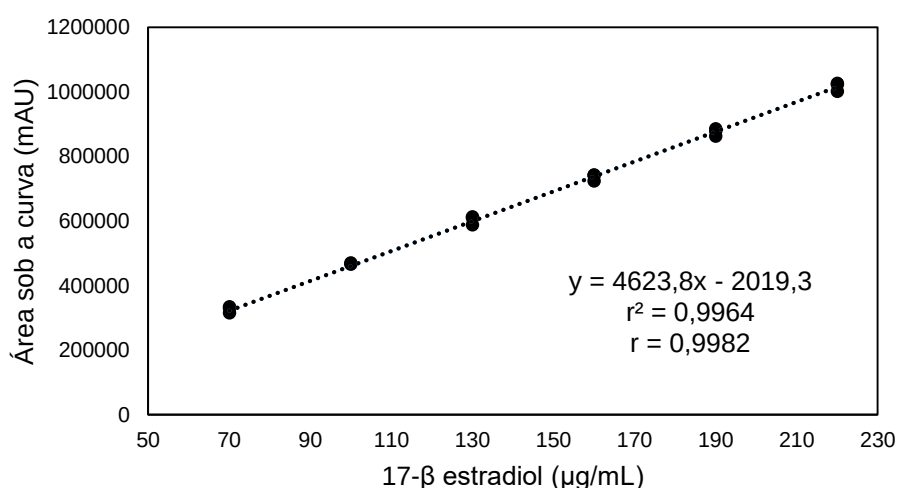
A comparação dos cromatogramas (Figura 12) mostra que não há interferência na determinação do fármaco sendo possível confirmar a especificidade do método.

Figura 12 – Cromatogramas das nanopartículas com (A) e sem (B) o fármaco obtido por HPLC



A linearidade é a capacidade de obter dentro de um intervalo, concentrações proporcionais do analito na amostra (ICH, 2005). Esse parâmetro foi realizado utilizando seis níveis de concentração: 70, 100, 130, 160, 190 e 220 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada uma relação linear entre a área do pico e a concentração de E2 obtendo a equação $y = 4623,8x - 2019,3$ (Figura 13).

Figura 13 – Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do E2 obtida por HPLC



O DPR da inclinação foi de 0,86%, valor menor do que o proposto pelo ICH e pela ANVISA que é de 5%. O valor negativo de b está dentro do intervalo de confiança da curva analítica (95%), pelo teste de ANOVA.

De acordo com o *Analytical Methods Committee* (AMC), deve ser aplicado o teste de ajuste, que avalia a variação dos valores residuais, uma vez que o valor do coeficiente de correlação próximo a 1 não indica resultado de relação linear (RAWSKI *et al.*, 2016). A Tabela 3 mostra os testes ANOVA para linearidade.

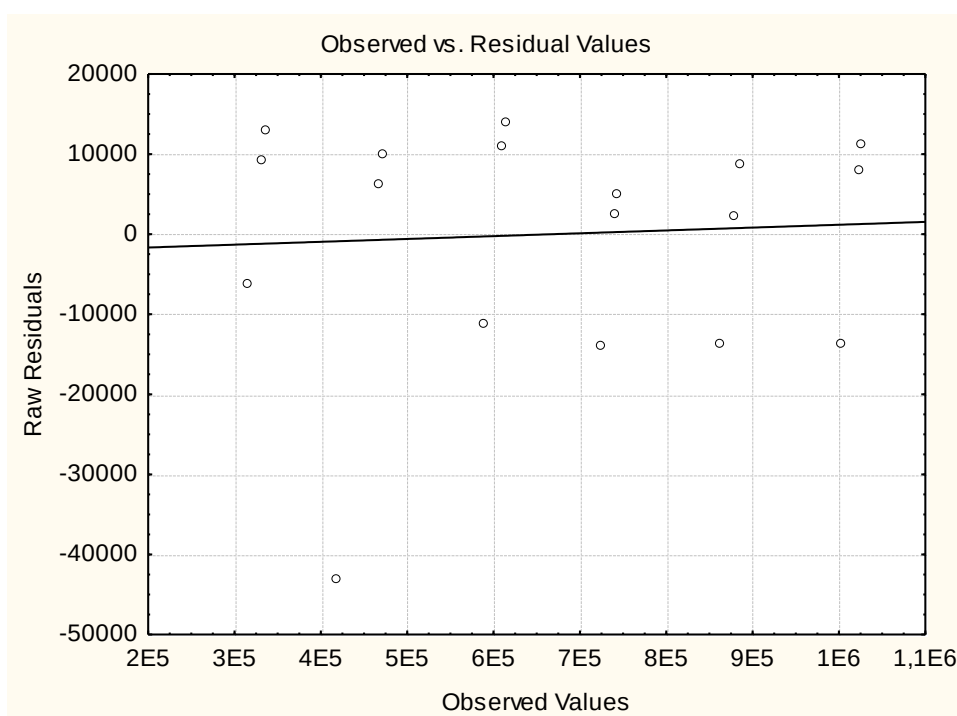
Tabela 3 – Resultados do teste ANOVA para linearidade do método

	SS	DF	MS	F	Ftab
Modelo	8,146896E+06	1	8,146896E+06	0,036	3,048
Resíduo	3,601018E+09	16	225063624	Linear	
Falta de ajuste	416385716	4	104096429	0,3922	2,48
Erro puro	3,184632E+09	12	265386023	No lack of fit	

Nota: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados; F: valor de F do teste; Ftab: valor de F tabelado

O valor de F foi menor que o F tabelado utilizando um nível de significância de 95%, mostrando que a regressão linear não apresentou falta de ajuste. A Figura 14 mostra o gráfico da análise de resíduos apresentando valores dispersos e independentes. A tabela 4 resume os parâmetros da curva analítica.

Figura 14 – Análise de resíduos



Fonte: O autor.

Tabela 4 – Resumo dos parâmetros da curva analítica do E2

Linearidade	
Faixa linear	70 a 220 µg/mL
Limite de detecção	5,78 µg/mL
Limite de quantificação	17,54 µg/mL
Dados da regressão	
N	3
Inclinação (α)	4623,8
Desvio padrão da inclinação	39,82
Desvio padrão relativo da inclinação (%)	0,86
Intercepto (b)	-2019,3
Coeficiente de correlação (r)	0,9982

O limite de detecção e quantificação foram calculados, obtendo-se os valores de 5,78 µg/mL e 17,54 µg/mL respectivamente. Esses resultados mostram que o método cromatográfico é adequado para detectar e quantificar o E2 entre 70 e 220 µg/mL.

A precisão de um método descreve a proximidade dos resultados quando o teste é aplicado repetidamente (ICH, 2005). Foi realizada a repetibilidade que expressa a precisão dos resultados sob as mesmas condições em um curto intervalo de tempo e a precisão intermediária (Tabela 5) que avalia a variação intradia, interdía e diferentes analistas. Os resultados mostram que o método é preciso.

Tabela 5 – Dados precisão intermediária e repetibilidade

Precisão		Concentração teórica (µg/mL)	Concentração prática (µg/mL) – Média ± DP*	DPR (%) **
Repetibilidade		100	100,8 ± 0,70	0,70
		160	155,8 ± 2,83	1,83
		220	217,3 ± 3,92	1,81
Precisão Intermediária	Intradia (n=3)	100	101,96 ± 1,67	1,64
	Interdia (n=3)	100	102,72 ± 0,70	0,69
	Diferentes analistas	100	103,0 ± 0,27	0,27
	Média ± DP*	100	101,98 ± 0,71	0,70

*DP – desvio padrão; **DPR – desvio padrão relativo

A exatidão do método determina a proximidade de concordância entre o resultado obtido no teste com o valor teórico de analito na amostra (ICH, 2005). A determinação da exatidão por ensaio de recuperação foi realizada adicionando uma quantidade exata de E2 a uma solução conhecida do fármaco.

As médias de recuperação (90, 120 e 180 µg/mL), desvio padrão e desvio padrão relativo estão descritas na tabela 6, mostrando que o método proposto é exato para determinação do E2.

Tabela 6 – Valores obtidos no ensaio de exatidão*

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração prática (µg/mL) – Média ± DP**	Recuperação (%)	DPR*** (%)
90	89,79 ± 2,65	99,77	2,95
120	119,59 ± 2,99	99,66	2,52
180	178,40 ± 1,44	99,11	0,81

* Os testes foram realizados em triplicata; **DP – desvio padrão; ***DPR – desvio padrão relativo

A robustez indica a capacidade do método em permanecer inalterado quando submetido a pequenas variações dos parâmetros pré-estabelecidos (ICH, 2005). Para avaliação da robustez foram realizadas alterações no fluxo isocrático (1,495 e 1505 mL/min) e concentração da fase móvel (93:7 e 91:9 V/V). O método mostrou-se robusto para o fármaco analisado, sob as condições estabelecidas. Os valores obtidos estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Dados obtidos para robustez

Parâmetro	Concentração teórica (µg/mL) - Média ± DP*	Concentração prática (µg/mL) - Média ± DP*	DPR** (%)
Fluxo 1,495 mL/min	100	103,55 ± 2,21	2,16
	160	161,03 ± 2,38	1,48
	220	221,92 ± 2,14	0,96
Fluxo 1,505 mL/min	100	103,02 ± 2,51	2,43
	160	161,29 ± 2,30	1,43
	220	220,88 ± 2,35	1,07
Fase móvel 93:7 (V/V)	100	103,93 ± 2,54	2,44
	160	161,87 ± 2,11	1,31
	220	222,98 ± 5,01	2,25
Fase móvel 91:9 (V/V)	100	101,60 ± 0,75	0,73
	160	163,13 ± 3,44	2,11
	220	256,64 ± 41,4	16,16

* DP – desvio padrão; **DPR – desvio padrão relativo

5.2.1 Quantificação de E2 Incorporado nas Nanocápsulas Poliméricas

A determinação da concentração de fármaco incorporado nas nanocápsulas e a eficiência de encapsulação foram realizadas em triplicata utilizando o método previamente validado. As nanocápsulas obtidas pelo método de precipitação do polímero pré-formado apresentaram rendimento superiores a 99%. Não há método validado para quantificação de E2 em nanopartículas poliméricas na literatura.

Yilmaz e Kadioglu (2017), descreveram a validação de um método para quantificação de E2 em amostras de medicamentos para reposição hormonal. O método utilizou como fase móvel metanol:água (70:30) em coluna de fase reversa C18 (Merck, Darmstadt, Germany) com partículas de 5 µm e volume de injeção de 20 µl. Utilizou-se um detector de fluorescência e foi possível quantificar o teor de fármacos nas amostras, demonstrando valor correspondente ao descrito nas embalagens.

Outros autores descrevem a validação de diferentes métodos para quantificação de E2 em águas residuais e rios (MORAES *et al.*, 2015; LIZ *et al.*, 2017).

5.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MICROELETROFORESE LASER DOPPLER

A avaliação do tamanho da nanopartícula de E2 apresentou valor médio de $191,96 \pm 10,37$ nm. O resultado foi próximo ao descrito por Mittal (2009), que obteve nanopartículas com $115 \pm 2,5$ nm de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e estradiol para avaliar o efeito em ratas oofectomizadas e hiperlipidêmicas. As nanopartículas de PCL (PCLN) apresentaram $187,23 \pm 7,19$, o tamanho da mesma partícula descrita por Ajiboyne (2018) variou de 150 a 350 nm.

As nanopartículas de ZnO apresentaram $214,53 \pm 40,61$ nm de diâmetro. O tamanho foi menor que encontrado por Costa *et al.* (2018), que utilizaram o método de reação entre nitrato de zinco e hidróxido de amônio. Os resultados mostraram partículas em forma de bastão e com tamanho de 360 ± 40 nm de comprimento e 75 ± 20 de diâmetro. Já Shamhari *et al.* (2018), obtiveram nanopartículas de 145,1 nm de comprimento e 97,2 nm de diâmetro.

O tamanho reduzido das nanopartículas permite maior superfície de contato, melhorando a eficiência do fármaco e tornando a aplicação tópica alternativa eficaz no tratamento de distúrbios hormonais (MAJUMDAR *et al.*, 2020). O tamanho das nanopartículas e o potencial zeta estão descritos na Tabela 8.

O potencial zeta caracteriza-se como a carga elétrica da superfície das partículas. Esse parâmetro mede a diferença de potencial entre o fluido e a camada estacionária do líquido associado à superfície das nanopartículas (SELVAMANI, 2019).

Resultados entre ± 10 a ± 30 correspondem a instabilidade, entre ± 30 a ± 40 moderadamente estáveis e ± 40 a ± 60 muito estáveis. Esses valores podem se manter inalterados em variações de pH e estão relacionados com a liberação de biomoléculas (AMGOTH *et al.*, 2014).

A grande área formada pelas nanopartículas cria uma energia superficial alta que é termodinamicamente instável. Consequentemente, estas tendem a se aglomerar, sedimentar ou cristalizar. Esse processo pode interferir na homogeneidade da amostra. Sendo assim, essa análise é parâmetro físico-químico importante para avaliar a estabilidade das nanopartículas (KUMAR; DIXIT, 2017).

As nanopartículas de E2 apresentaram potencial zeta igual a $-37,93 \pm 5,95$ mV, indicando alta estabilidade. O valor encontrado para PCLN foi de $-34,23 \pm 5,50$ mV,

valor menor do que o descrito por Tavares *et al.* (2017), que obtiveram resultado entre -9,3 a -15,8 mV.

O potencial zeta das nanopartículas de ZnO foi de $-17,5 \pm 4,60$ mV. O resultado está próximo ao encontrado por Abdelhakim, El-Sayed e Rashidi (2020), e Sirumbayee e Anusuya (2020), que descreveram valores de -23,92 mV e -19 mV, respectivamente.

A determinação do potencial zeta de nanopartículas de óxido metálicos pode variar de acordo com a concentração e pH da amostra. Isso pode ser explicado devido a reação do CO₂ dissolvido, com os grupos funcionais da partícula que neutraliza a carga da superfície. Além disso, em pH baixo a hidroxila pode se tornar protonada e carregada positivamente e em pH alto são carregados negativamente (LOWRY *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013).

Tabela 8 – Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de E2, PCL e ZnO

Nanopartícula	Tamanho (nm) Média ± DP*	Potencial zeta (mV) Média ± DP*
E2N	191,96 ± 10,37	-37,93 ± 5,95
PCLN	187,23 ± 7,19	-34,23 ± 5,50
ZnON	214,53 ± 40,61	- 17,5 ± 4,60

*DP – desvio padrão

O índice de polidispersão indica a heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão. Valores menores que 0,05 indicam monodispersão e maiores que 0,7 representa variação muito ampla de tamanhos (DANAEI *et al.*, 2018). As nanopartículas apresentaram valores de $0,107 \pm 0,03$, $0,078 \pm 0,01$ e $0,184 \pm 0,03$ para nanopartículas de E2, PCL e ZnO, respectivamente. O resultado indica adequada homogeneidade de tamanhos.

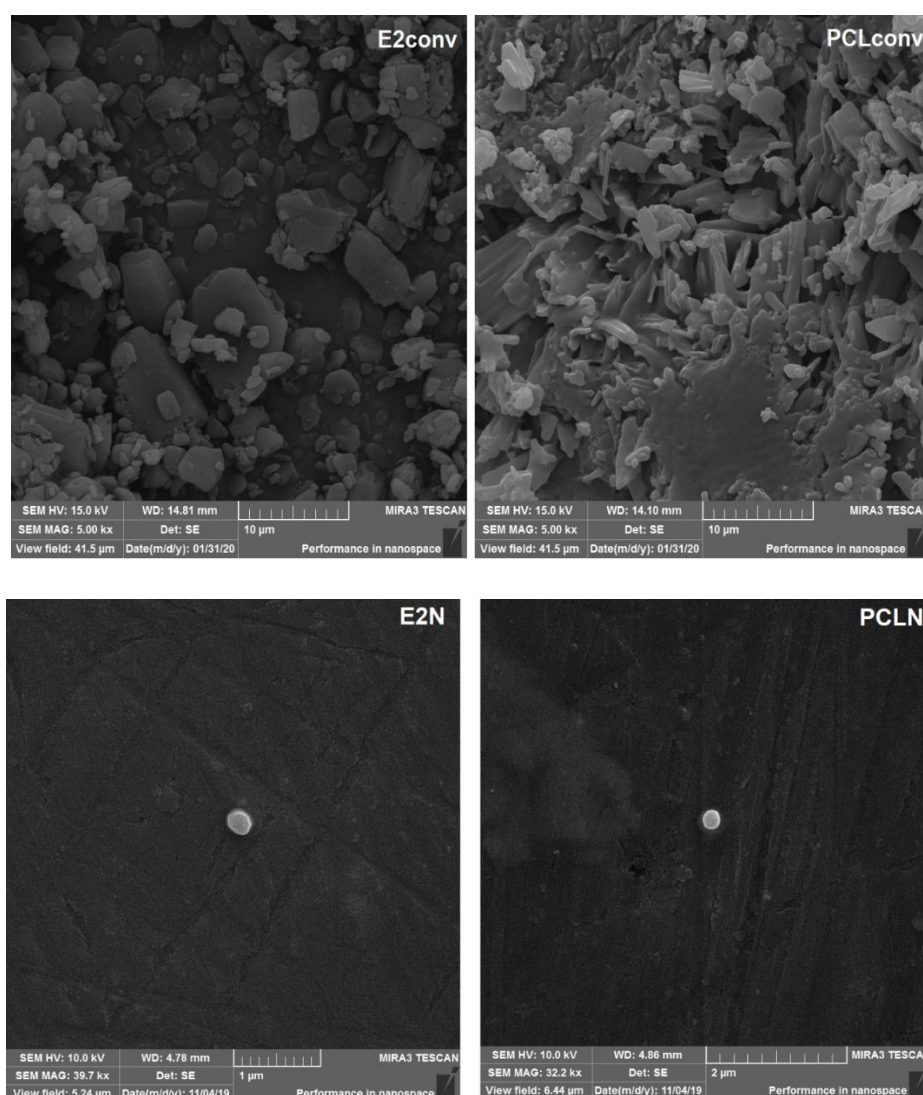
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (FEG-SEM)

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que permite avaliar a influência das condições de síntese sobre a morfologia das nanopartículas (XIE *et al.*, 2011). Os resultados obtidos por MEV da PCL e E2 convencionais apresentaram partes grandes e irregulares. A eletromicrografia das

nanopartículas de estradiol e PCL mostraram formato esférico com superfície homogênea (Figura 15).

Takeuchi *et al.* (2016), obteve nanopartículas de poli(lactídeo-co-glicolídeo) pelo método de emulsão e evaporação do solvente contendo E2 e descreveu partículas esféricas e dispersas. O formato arredondado e homogêneo das nanopartículas de PCL estão de acordo com o descrito por Grossen *et al.* (2016).

Figura 15 – Eletromicrografias FEG-SEM do fármaco e polímeros convencionais e nanoparticulados

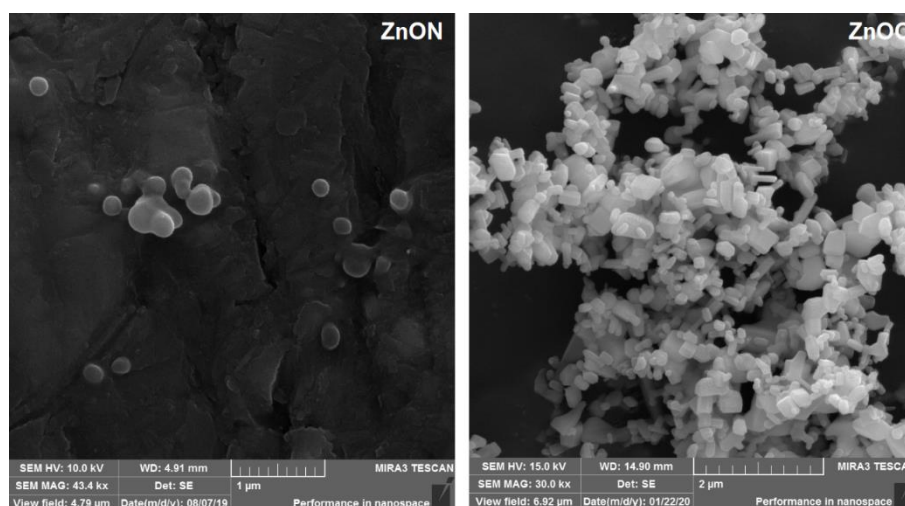


O óxido de zinco possui uma das maiores variedades de estruturas de nanopartículas entre os materiais estudados. Essas podem ser encontradas nas formas uni (1D), bi (2D) e tridimensionais (3D) (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014).

As nanopartículas de ZnO apresentaram formato esférico, uniforme com a presença de pequenos aglomerados (Figura 16). Al-Bedairy e Alshamsi (2018), obtiveram as nanopartículas a partir da solução de acetato de zinco e hidróxido de potássio e descreveu nanoesferas em formato cúbico e esférico.

A temperatura e o tempo de agitação utilizados na obtenção das nanopartículas pode influenciar as características morfológicas. Costa *et al.* (2018), descreveu diferentes tamanhos e formas das nanopartículas após 1 hora e 24 horas de agitação. A fotomicrografia do ZnO convencional mostrou diferentes tamanhos e formas do óxido. Essa variação pode influenciar o tratamento, uma vez que a aplicação poderá não ser homogênea.

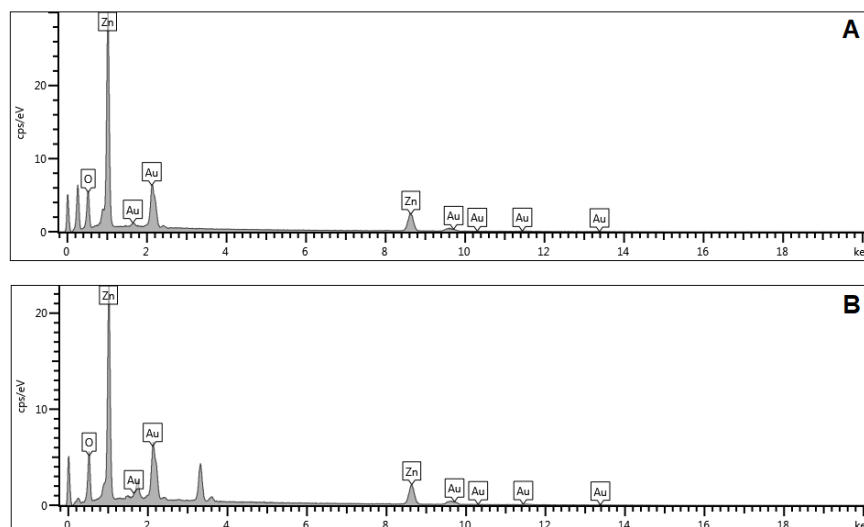
Figura 16 – Eletromicrografias FEG-SEM do ZnO convencional e nanoparticulado



5.5 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X COM DISPERSÃO DE ENERGIA (SED)

A pureza das nanopartículas de óxido de zinco foi realizada utilizando a espectroscopia de raios X com dispersão de energia. O espectro (Figura 17) mostra a composição das amostras. O resultado demonstrou alta pureza das nanopartículas com 76,82% de zinco e 23,18% oxigênio. O zinco convencional apresentou 74,22% de zinco e 25,77% de oxigênio. A presença de Au deve-se ao recobrimento da amostra realizado antes da análise (SHARMA *et al.*, 2020).

Figura 17 – Espectro EDS de ZnO convencional (A) e nanoparticulado (B)



Singh, Hudiara e Rana (2016) descreveram a composição das nanopartículas de ZnO calcinadas a 450°C, 600°C e 750°C por 2 horas e obtiveram 92,01%, 91,69% e 91,51% de íons zinco, respectivamente. Os resultados mostraram alta pureza e pouca interferência da temperatura. Shamhari *et al.* (2018), obteve nanopartículas de óxido de zinco a partir das soluções de acetato de zinco e hidróxido de potássio. O resultado do EDS mostrou a composição de 76,3% de zinco e 23,7% de oxigênio, caracterizando alta pureza.

5.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA EM Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR)

O espectro de absorção no infravermelho do E2 demonstrou bandas características, de acordo com os dados encontrados na literatura. Pode-se observar regiões correspondentes aos anéis presentes na estrutura química do E2 (Figura 18). O espectro em 1628, 1571 e 1500 cm^{-1} está relacionado ao benzeno (anel A), ciclohexano em 2935 e 2871 cm^{-1} (anel B e C) e ciclopentanol em 1284 cm^{-1} (anel D). As principais bandas estão descritas na Tabela 9.

Figura 18 – Espectro FTIR E2

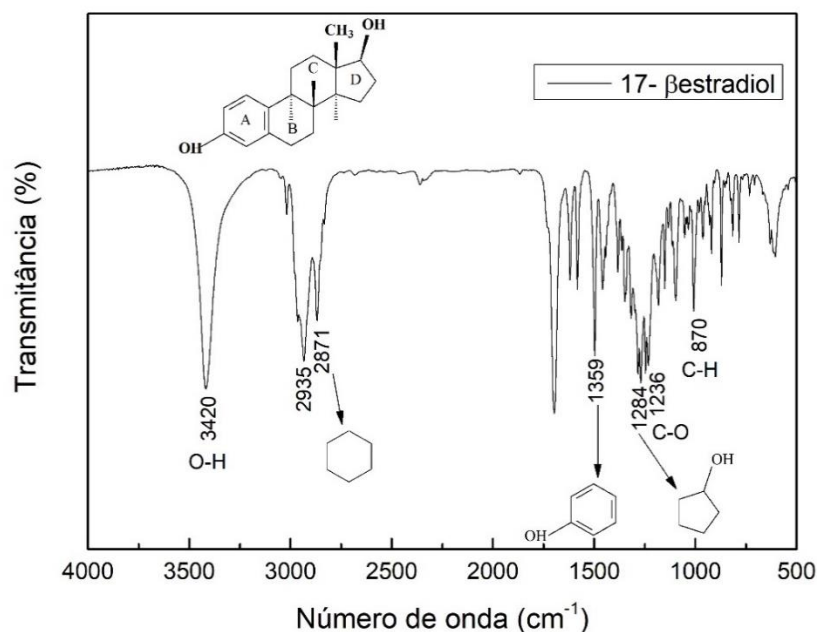


Tabela 9 – Principais bandas encontradas no espectro FTIR do E2

Bandas	Resultado (cm ⁻¹)	Literatura (cm ⁻¹)	Referências
Benzeno	1628, 1571 e 1500	1600 a 1500	GUO <i>et al.</i> , 2016; MINAEV; MINAEVA, 2008
O-H	3420	3438 e 3422	GUO <i>et al.</i> , 2016; UNNITHAN <i>et al.</i> , 2015; KOÇ <i>et al.</i> , 2011
Vibração do estiramento C-H (ciclohexano)	2935 e 2871	2900	GUO <i>et al.</i> , 2016; KOÇ <i>et al.</i> , 2011; MINAEV; MINAEVA, 2008
Fenol	1359	1359	UNNITHAN <i>et al.</i> , 2015
Ciclopentanol	1284	1283	UNNITHAN <i>et al.</i> , 2015
C-O	1236	1230 – 1140	UNNITHAN <i>et al.</i> , 2015
C-H fora do plano	870	870-900	GUO <i>et al.</i> , 2016; MINAEV; MINAEVA, 2008
C-C (anel aromático)	1501 e 1577	1600 – 1500	MINAEV; MINAEVA, 2008

O espectro do polímero PCL (Figura 19) possui bandas em 3421 cm^{-1} referente ao grupamento OH, 1700 cm^{-1} que deve-se a carbonila (C=O) do grupamento éster, 1234 cm^{-1} relacionado ao estiramento simétrico da ligação C-O-C e em 2936 e 2863 cm^{-1} pertencem ao estiramento simétrico e assimétrico de CH_2 , respectivamente. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Figura 19 – Espectro FTIR do PCL

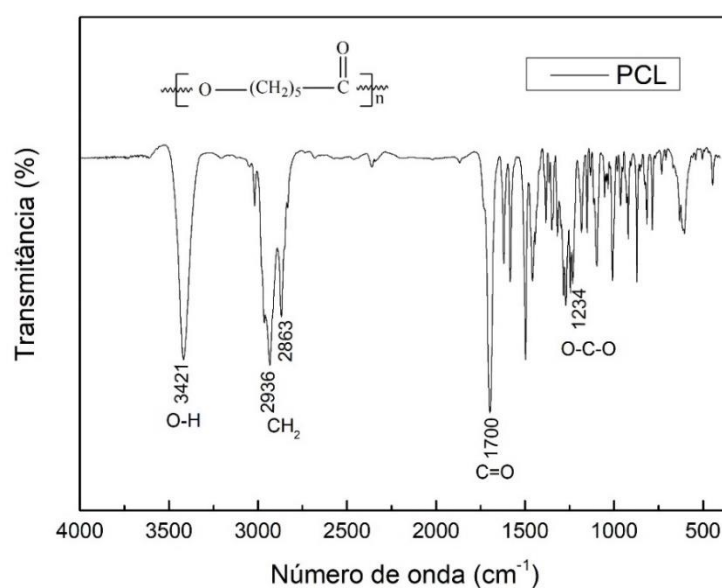
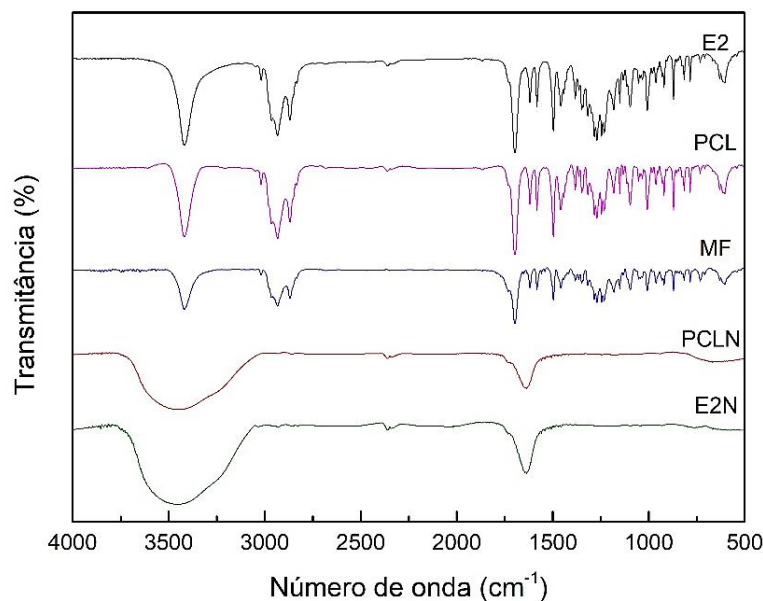


Tabela 10 – Principais bandas encontradas no espectro FTIR do PCL

Bandas	Resultado (cm^{-1})	Literatura (cm^{-1})	Referências
O-H	3421	3500	BENKADDOUR <i>et al.</i> , 2013
Estiramento simétrico CH_2	2936	2944; 2852	BEZERRA <i>et al.</i> , 2017; FRANÇA <i>et al.</i> , 2018; KOZEHKONAN <i>et al.</i> , 2019
Estiramento assimétrico CH_2	2863	2861; 2921; 2863	BEZERRA <i>et al.</i> , 2017; FRANÇA <i>et al.</i> , 2018; KOZEHKONAN <i>et al.</i> , 2019
C=O	1700	1724; 1725	FRANÇA <i>et al.</i> , 2018; KOZEHKONAN <i>et al.</i> , 2019
O-C-O	1234	1238; 1168; 1243	BEZERRA <i>et al.</i> , 2017; FRANÇA <i>et al.</i> , 2018; KOZEHKONAN <i>et al.</i> , 2019

A Figura 20 mostra os comparativos do espectro de absorção do E2, polímero (PCL), mistura física (MF) e das nanopartículas sem (PCLN) e com fármaco (E2N). As bandas presentes nas nanopartículas mostram que não houve ligação química entre o hormônio e o polímero.

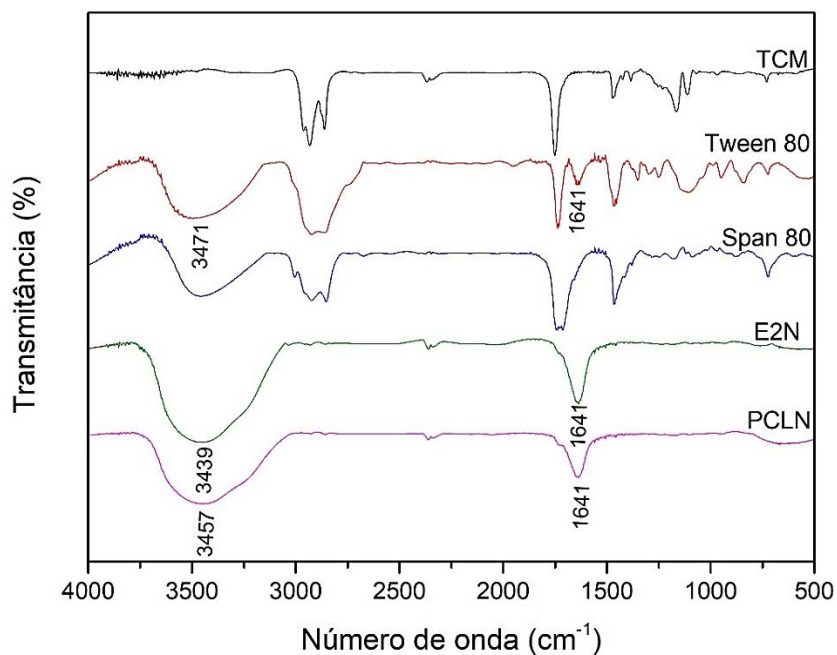
Figura 20 – Espectros FTIR do E2, PCL, MF, PCLN e E2N



A Figura 21 mostra os espectros do triglicerídeo de cadeia média (TCM), tween 80, span 80 e nanopartículas com (E2N) e sem fármaco (PCLN). Os surfactantes são moléculas anfifílicas que permitem a formação de nanopartículas com núcleo hidrofóbico (E2) e superfície hidrofílica, além de impedir a aglomeração (WEI; BAI; FAN, 2019).

Os espectros FTIR das nanopartículas mostraram bandas em 1641 e 3439-3471 cm^{-1} que estão presentes no surfactante Tween 80 adicionado na fase aquosa e correspondem a ligação $-\text{CH}=\text{CH}-$ e $\text{O}-\text{H}$, respectivamente (BRANZOI; BRANZOI, 2017; LIU *et al.*, 2015). Esse resultado sugere que o fármaco esteja disperso no núcleo oleoso da nanopartícula, uma vez que a superfície é composta principalmente pelo tween 80.

Figura 21– Espectros FTIR do TCM, tween 80, span 80, E2N e PCLN



O espectro de absorção no infravermelho do ZnO (Figura 22) mostrou bandas com absorção em 3689 cm^{-1} referente a ligação O-H, estiramento simétrico do dióxido de carbono (CO_2) presente na atmosfera em 2349 cm^{-1} , banda em 1586 cm^{-1} que é atribuída a ligação C=O e o estiramento da ligação ZnO em 430 cm^{-1} . Esses resultados estão de acordo com o encontrado por outros autores conforme descrito na Tabela 11.

Figura 22 – Espectro FTIR do ZnO convencional

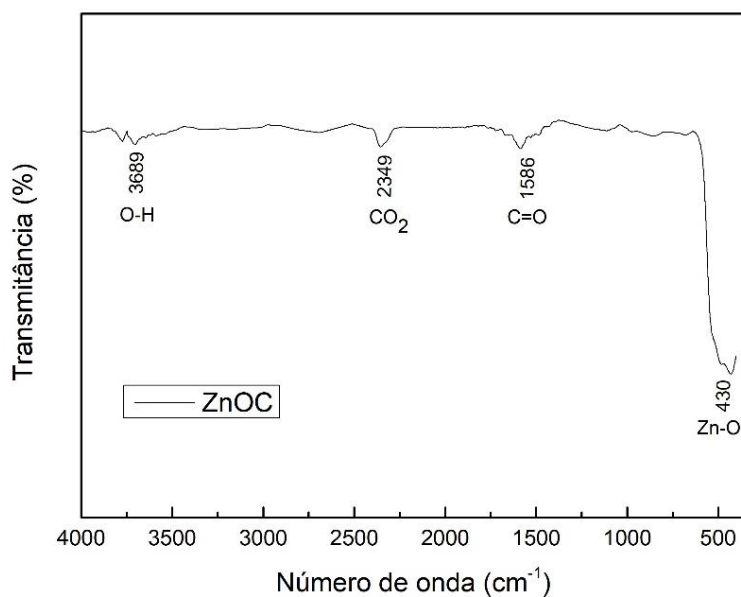
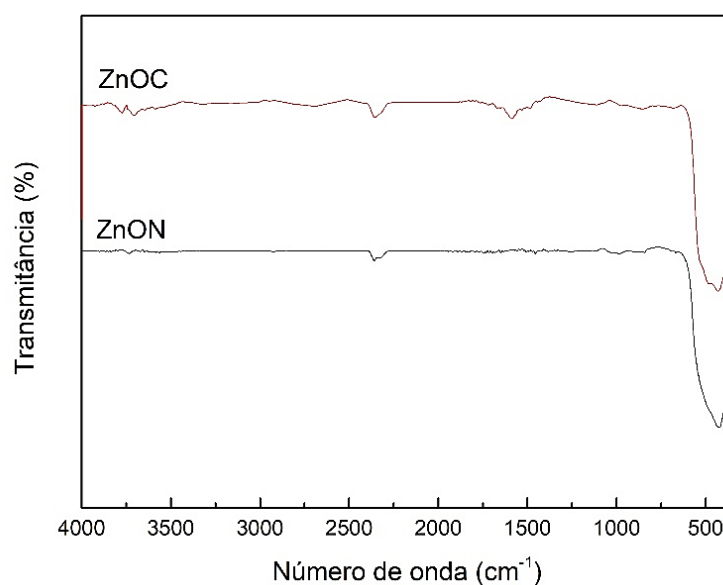


Tabela 11 – Principais bandas encontradas no espectro FTIR do ZnO convencional

Bandas	Resultado (cm ⁻¹)	Literatura (cm ⁻¹)	Referências
OH	3689	3800-3600	SIRUMBAYEE; ANUSUYA, 2020; SILVEIRA; NOBRE; LANFREDI, 2015
CO ₂	2349	2350	SILVEIRA; NOBRE; LANFREDI, 2015; AHMED <i>et al.</i> , 2012
C=O	1586	1400-1600	AHMED <i>et al.</i> , 2012
Zn-O	430	550-400	SILVEIRA; NOBRE; LANFREDI, 2015; AHMED <i>et al.</i> , 2012; ZAK <i>et al.</i> , 2011

A comparação dos espectros do ZnO convencional e nanoparticulado obtido pelo método de co-precipitação apresenta grupos funcionais semelhantes e correspondentes ao composto esperado (Figura 23). O resultado mostra que não houve interações entre outros compostos durante o processo de formação das nanopartículas.

Figura 23 – Espectro FTIR do ZnO convencional e nanoparticulado

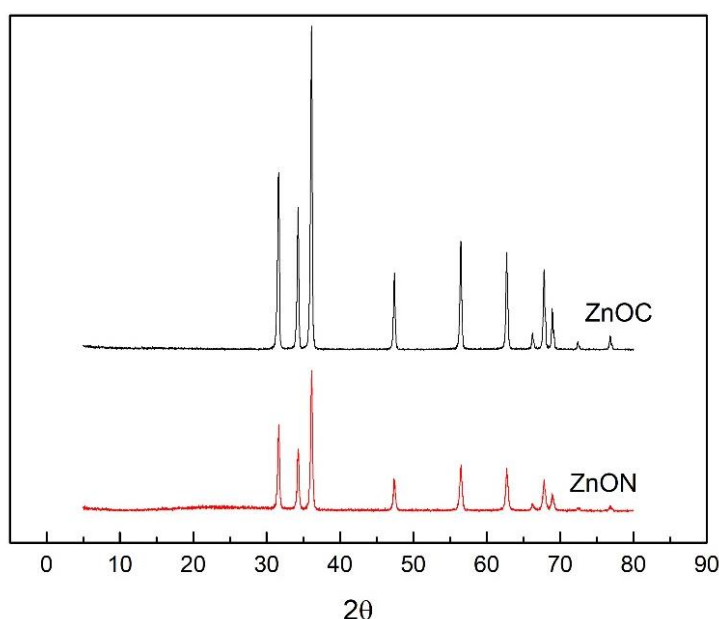


5.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A difração de raios X é uma das principais metodologias utilizadas para avaliar a cristalinidade dos materiais. Quando as substâncias são submetidas a dimensões nanométricas podem sofrer mudanças no estado sólido. Compostos amorfos são mais solúveis e apresentam picos indefinidos no difratograma (SERRANO; GALLAGHER; HEALY, 2015).

O difratograma do ZnO convencional e nanoparticulado está descrito na Figura 24, ambos apresentaram picos em 31,49°; 34,10°; 36,0°; 47,26°; 56,42°; 62,64°; 66,24° e 68,89°. O resultado está de acordo com o descrito na literatura: 32.25°, 34.87°, 36.77°, 47.99°, 57.26°, 63.27°, 66.75° e 68.24° (AKBAS; TAYGUN; KUÇUKBAYRAK, 2018) e 31°; 34°; 36°; 47°; 56°; 63°; 66°; 68° e 69° (SHARMA *et al.*, 2020).

Figura 24 – Difratograma do ZnO convencional e nanoparticulado



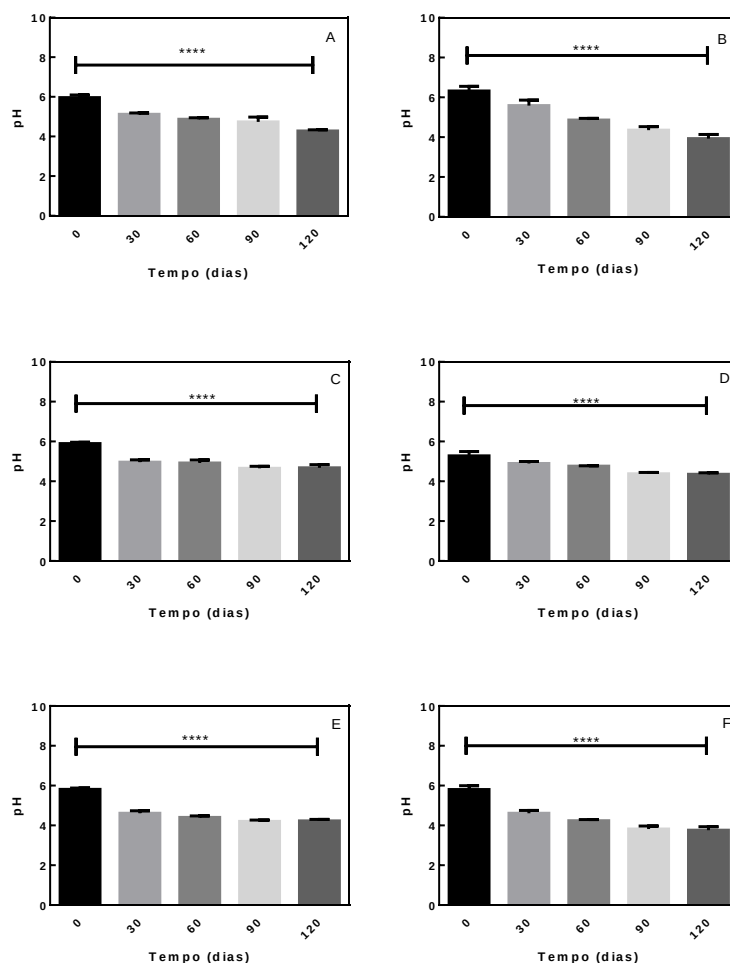
A técnica de DRX pode determinar o arranjo estrutural das partículas. Picos acentuados nas posições definidas explicam a natureza cristalina com estrutura hexagonal “wurtzite” do ZnO, nenhum pico de impureza foi detectado no difratograma. O resultado é semelhante ao descrito por Venkatasubbu *et al.* (2016), Souza *et al.* (2019) e Halbus, Horozov e Paunov (2020).

5.8 ESTABILIDADE DA NANOPARTÍCULA DE E2

Todas as formulações preparadas permaneceram com aspecto leitoso e opaco com reflexo azulado devido ao movimento browniano das nanopartículas. A variação do pH nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias estão descritas na Figura 25. Todos os resultados diferiram estatisticamente quando comparado o dia 0 com 120.

É possível observar uma variação maior nas amostras de nanopartículas sem o fármaco, sugere-se que a diferença ocorra devido ao polímero. Essa observação pode ser explicada pela exposição de um maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais resultantes da hidrólise da ligação éster presente na estrutura da PCL (LOH, 2012).

Figura 25 – Variação do pH nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias



Nota: A= E2 (25°C); B = PCL (25°C); C = E2 (10°C); D = PCL (10°C); E = E2 (37°C) e F = PCL (37°C). * $p \leq 0,05$.

Alguns fatores como pH, concentração iônica, temperatura e tempo de armazenamento podem influenciar a estabilidade das partículas. A alteração no pH da solução pode modificar a carga de superfície, podendo levar a mudança na polidispersão e homogeneidade da amostra (XU *et al.*, 2018).

O tamanho das nanopartículas sofreu baixa variação, não diferindo estatisticamente. Esse resultado sugere alta estabilidade das amostras quando submetidas a diferentes temperaturas. Esse parâmetro é importante uma vez que o tamanho é essencial para ação esperada do fármaco.

O potencial zeta durante os 120 dias analisados variou de -31 a -36 mV e -29 a -37 mV para E2 e PCL em temperatura ambiente, respectivamente. Em 10°C houve uma variação de -28 a -19 mV para E2 e -29 a -23 mV para PCL. Na temperatura de 37°C a variação foi de -33 a -21 para E2 e -36 a -19 para PCL. Não houve diferença significativa na avaliação do potencial zeta confirmando boa estabilidade das nanopartículas.

A alta magnitude do potencial zeta corresponde a maior repulsão eletrostática e conseqüentemente melhor estabilidade. A aglomeração das nanopartículas pode ocorrer devido a fatores como alta concentração de partículas na solução, condições termodinâmicas e variações de pH (SELVAMANI, 2019).

A polidispersão manteve valor abaixo de 0,14 para todas as amostras avaliadas, nas três temperaturas (10°C, 25°C e 37°C). O resultado demonstra que as nanopartículas mantiveram-se homogêneas durante os 120 dias de armazenamento. A variação nos valores da polidispersão em função do tempo pode indicar a agregação ou quebra das partículas, resultando na variação de tamanhos (SOUZA *et al.*, 2012).

O resultado está de acordo com o encontrado por Alex *et al.* (2016), que descreveram a estabilidade das nanopartículas de PCL carregadas com carboplatina. O resultado após três meses de armazenamento em temperatura ambiente mostrou que não houve diferença estatística no potencial zeta, tamanho de partícula e polidispersão.

Melo *et al.* (2018), descreveram a estabilidade de nanopartículas de PCL contendo articaína avaliando pH, tamanho e polidispersão durante 120 dias. Os resultados mostraram que houve diminuição nos valores de pH e aumento na

polidispersão, sugerindo hidrólise do polímero e agregação de partículas. Não houve alteração no tamanho.

A avaliação da eficiência de encapsulação do E2 após 120 dias de armazenamento mostrou valores acima de 99% em todas as temperaturas analisadas. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 12 e confirmam a boa estabilidade das nanopartículas.

Tabela 12 – Eficiência de encapsulação E2 após 120 dias de armazenamento em 25°C, 10°C e 37°C

Temperatura (°C)	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}^*$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}^*$)	Eficiência de encapsulação $\pm \text{SD}$
25	5000	4993,27 $\pm$ 0,27	99,8 $\pm$ 0,01
10	5000	4994,33 $\pm$ 0,51	99,7 $\pm$ 0,04
37	5000	4986,21 $\pm$ 1,96	99,8 $\pm$ 0,01

* DP = Desvio padrão

5.9 ENSAIO ANIMAL

5.9.1 Retração da Lesão

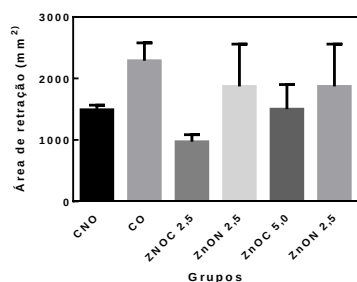
A avaliação macroscópica da lesão não indicou contaminação, nem a presença de corpo estranho no leito das lesões. A Figura 26 mostra a porcentagem da retração nos dias 7, 14 e 21. Não houve diferença estatística nesta análise entre os grupos avaliados. Esse resultado pode ser explicado devido a pequena área da lesão. Em feridas com extensões maiores a alteração pode ser mais evidente.

Figura 26 – Área da retração da lesão por grupo

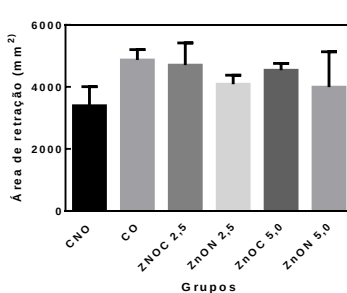
Retração da lesão

ZnO

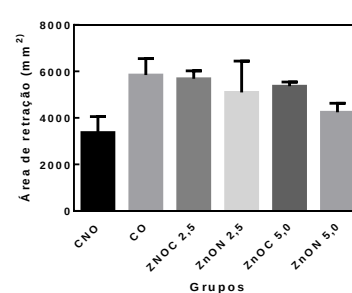
D7



D14

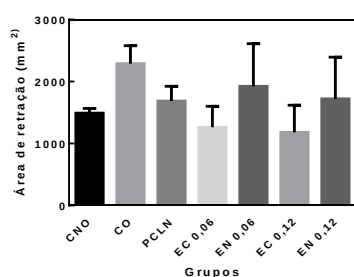


D21

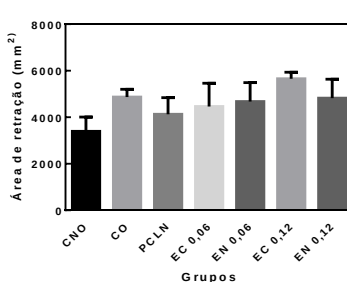


E2

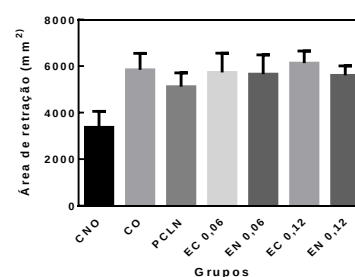
D7



D14

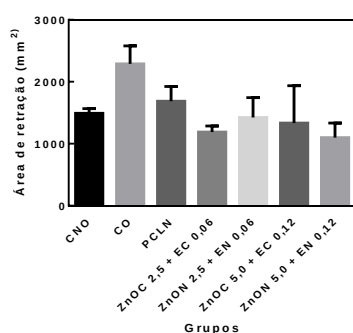


D21

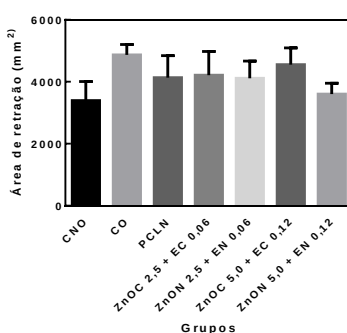


ZnO + E2

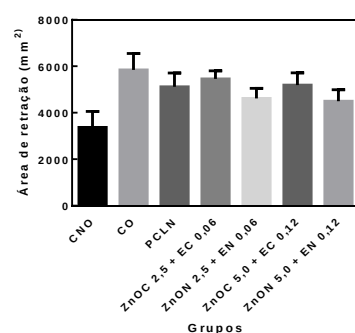
D7



D14



D21



Nota: CNO – controle não ooforectomizado; CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco; ZnOC– óxido de zinco convencional; ZnON – nanopartícula de óxido de zinco; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno; ZnOC + EC - óxido de zinco convencional + estrógeno convencional; ZnON + EN – óxido de zinco nanoparticulado + estrógeno nanoparticulado. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: ZnO (2,5% e 5,0%) e E2 (0,06% e 0,12%).

Os miofibroblastos desempenham um papel importante no processo de contração das feridas. Após a lesão, os fibroblastos presentes na derme são estimulados por fatores de crescimento derivados de plaquetas e pela tensão mecânica transformando-se em proto-miofibroblastos. Em seguida, estes se diferenciam em miofibroblastos que expressam actina no músculo liso. Essa diferenciação ocorre principalmente na fase proliferativa (SORG *et al.*, 2016).

Os miofibroblastos possuem maior concentração de filamentos citoplasmáticos contráteis do que outras células. No entanto, tanto os fibroblastos quanto os miofibroblastos promovem a contração da ferida pelo deslizamento dos filamentos de actina-miosina. As extremidades das fibras se ligam a matriz extracelular produzindo força de tração celular (LI; WANG, 2011).

5.9.2 Análise Hematológica

5.9.2.1 Hematócrito

A análise hematológica permite realizar a avaliação da resposta sistêmica ao ferimento cutâneo. A avaliação de parâmetros como hematócrito e a quantificação de células de defesa como linfócitos e neutrófilos pode sugerir a progressão do processo cicatricial.

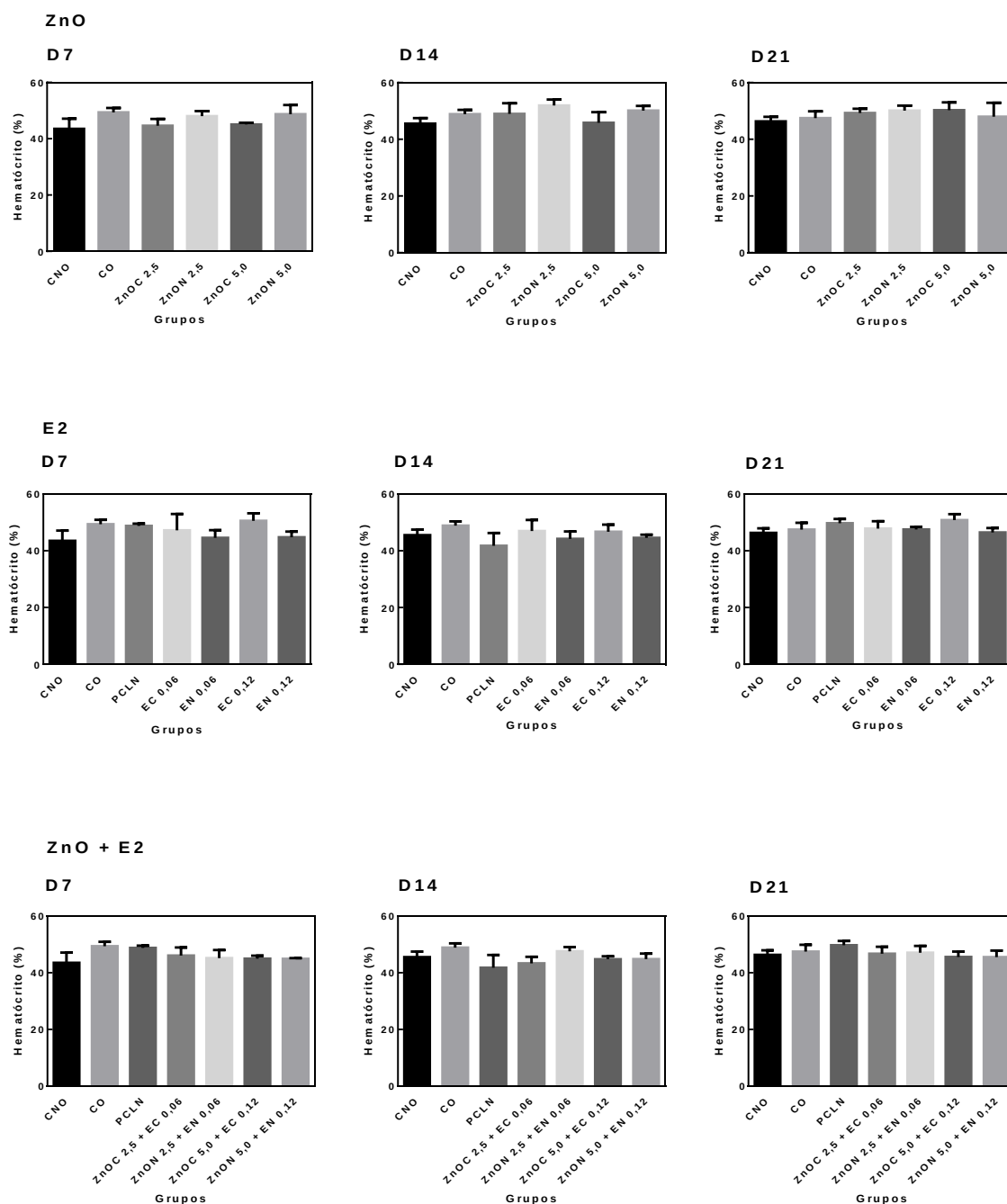
A média dos valores do hematócrito de todos os grupos avaliados apresentaram valores entre: $41,8 \pm 4,47\%$ e $51,9 \pm 2,08\%$, conforme descrito na tabela 13. Não houve diferença estatística na análise do hematócrito em todos os tratamentos quando comparados ao grupo controle ooforectomizado (Figura 27). O hematócrito caracteriza-se pela porcentagem de volume ocupado pelos glóbulos vermelhos quando comparado ao volume de sangue total (BRUNKEN *et al.*, 2016).

Essa avaliação é importante uma vez que valores baixos tem efeitos diretos na cicatrização, pois pode estar relacionado com alterações hematológicas que ocorrem ao longo do processo como hemorragias, anemia, má nutrição proteica ou doença renal (HESS, 2013).

Tabela 13 – Valores médios do hematócrito por grupo

Grupos	Hematócrito (%)		
	Dias (média ± DP*)		
	D7	D14	D21
CNO	43,5 ± 3,64	45,5 ± 1,99	46,3 ± 1,59
CO	49,4 ± 1,53	48,9 ± 1,50	47,5 ± 2,41
ZnOC 2,5	44,6 ± 2,41	49,0 ± 3,75	49,3 ± 1,46
ZnON 2,5	48,0 ± 1,81	51,9 ± 2,08	50,1 ± 1,73
ZnOC 5,0	45,1 ± 0,59	45,8 ± 3,75	50,3 ± 2,77
ZnON 5,0	48,7 ± 3,27	50,1 ± 1,65	48,0 ± 4,92
PCLN	48,8 ± 0,82	41,8 ± 4,47	49,7 ± 1,48
EC 0,06	47,2 ± 5,76	47,0 ± 3,91	47,8 ± 2,60
EN 0,06	44,6 ± 2,71	44,2 ± 2,63	47,5 ± 0,91
EC 0,12	50,6 ± 2,63	46,7 ± 2,53	50,8 ± 2,09
EN 0,12	44,8 ± 2,01	44,6 ± 1,12	46,5 ± 1,56
ZnOC 2,5 + EC 0,06	46,1 ± 2,83	43,3 ± 2,31	46,7 ± 2,47
ZnOC 5,0 + EC 0,12	45,2 ± 2,86	47,6 ± 1,46	47,1 ± 2,36
ZnON 2,5 + EN 0,06	45,0 ± 1,04	44,8 ± 1,08	45,6 ± 1,90
ZnON 5,0 + EN 0,12	44,9 ± 0,26	44,8 ± 1,97	45,5 ± 2,32

* DP - desvio padrão

Figura 27 – Análise do hematócrito por grupo

Nota: CNO – controle não ooforectomizado; CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco; ZnOC– óxido de zinco convencional; ZnON – nanopartícula de óxido de zinco; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno; ZnOC + EC - óxido de zinco convencional + estrógeno convencional; ZnON + EN – óxido de zinco nanoparticulado + estrógeno nanoparticulado. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: ZnO (2,5% e 5,0%) e E2 (0,06% e 0,12%).

5.9.2.2 Linfócitos

O aumento na quantidade de linfócitos sistêmico está relacionado com a migração celular característica das diferentes fases do processo cicatricial. Linfócitos circulantes chegam ao local lesionado aproximadamente após 4 dias e se mantêm por duas semanas (CANEDO-DORANTES; CANEDO-AYALA, 2019).

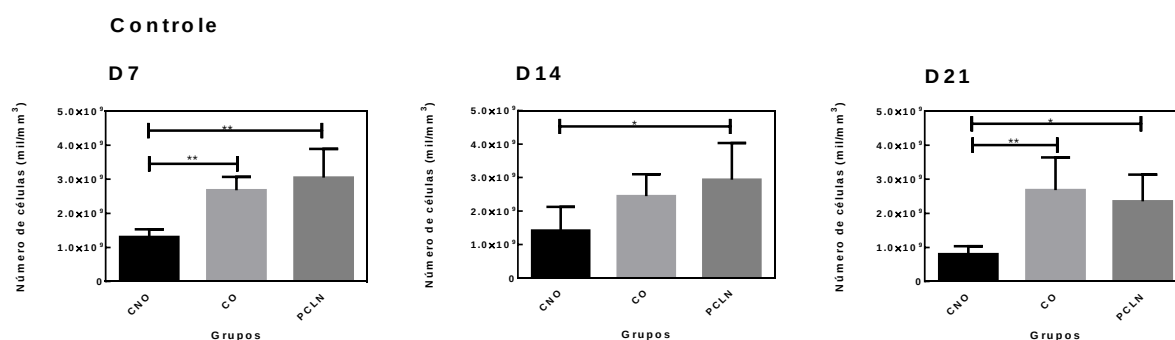
Os linfócitos são atraídos por mediadores inflamatórios como a interleucina-2 (IL-2). Além de fornecer imunidade celular para a produção de anticorpos, essas células são importantes para a fase inflamatória e proliferativa (MEDEIROS; FILHO, 2016).

A análise hematológica apresentou menor concentração de linfócitos circulantes no grupo não ooforectomizado (CNO) quando comparado ao controle ooforectomia (CO) e ao tratado com a nanopartícula sem o fármaco (PCLN) (Figura 28) nos dias 7 e 21. No dia 14, houve diferença apenas entre os grupos CNO e PCLN.

Esse resultado pode estar relacionado com a retirada dos ovários. Os receptores estrogênicos são encontrados nos linfócitos, podendo alterar a função, produção de fatores imunorreguladores e limitar a capacidade de reação com outras células (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

As mulheres na menopausa tem um risco aumentado de desenvolver condições patológicas relacionadas à inflamação excessiva. No entanto, o mecanismo pelo qual o estrógeno modula o reparo, principalmente na pele, ainda não está totalmente elucidado (CAMPBELL *et al.*, 2010).

Figura 28 – Quantificação de linfócitos dos grupos controles



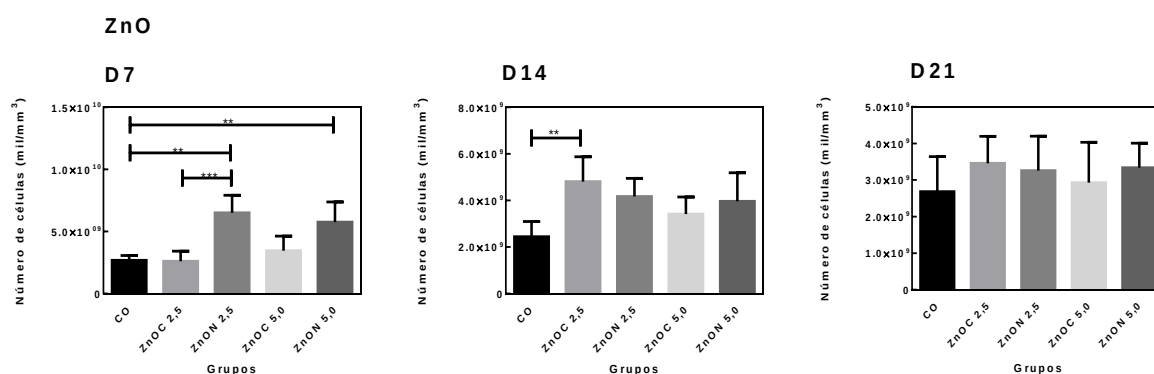
Nota: CNO – controle não ooforectomizado; CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco. * $p \leq 0,05$.

O resultado do tratamento com nanopartículas de óxido de zinco apresentou aumento no número de linfócitos no dia 7, nas concentrações de 2,5% (ZnON 2,5%) e 5,0% (ZnON 5,0%) quando comparado ao CO e aos grupos tratados com a forma convencional. No dia 14 houve maior concentração no grupo tratado com óxido de zinco 2,5% convencional (ZnOC 2,5%) quando comparado ao grupo CO, o que pode estar relacionado com um processo inflamatório tardio (Figura 29).

O zinco pode alterar a resposta imune de várias maneiras, incluindo a sinalização inflamatória para diferenciação linfocitária e produção de anticorpos (LIN *et al.*, 2018). Ilves *et al.* (2014) avaliou o efeito de nanopartículas de óxido de zinco no tratamento tópico de dermatite. Os resultados mostraram efeito anti-inflamatório local e aumento nas concentrações de IgE mediada por célula B, o que sugere um efeito sistêmico relacionado a absorção íon Zn^{2+} . As células respondentes podem variar de acordo com a concentração e provocar diferentes efeitos sistêmicos e locais.

Estudo realizado por Navaei-Nigjeh *et al.* (2018), avaliaram o efeito das nanopartículas de óxido de zinco no stress oxidativo induzido por pesticidas organofosforados em linfócitos humanos. Os resultados demonstraram que houve uma diminuição na liberação de $TNF-\alpha$, modulação da inflamação e aumento na viabilidade celular nos grupos tratados com ZnO.

Figura 29 – Quantidade de linfócitos sistêmicos dos grupos tratados com ZnO

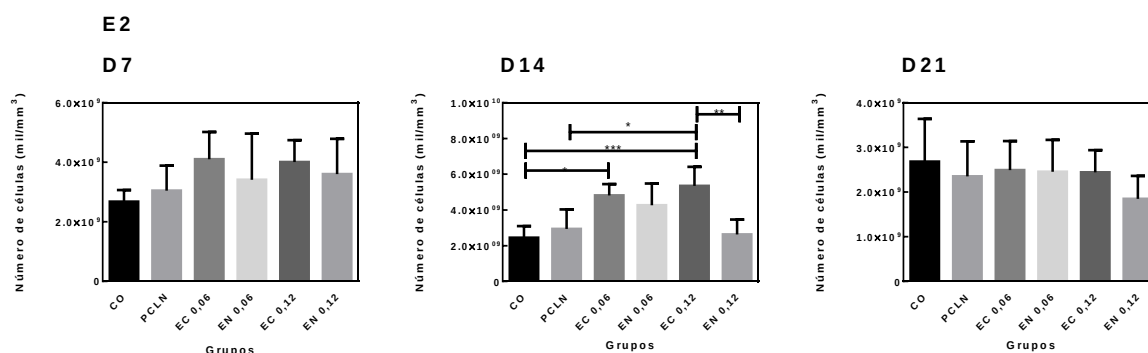


Nota: CO – controle ooforectomizado; ZnOC– óxido de zinco convencional; ZnON – nanopartícula de óxido de zinco. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 2,5% e 5,0%. *p≤0,05.

O grupo E2 convencional (EC 0,06% e EC 0,12%) promoveu o aumento no número de linfócitos no dia 14 quando comparado ao controle ooforectomizado. O tratamento com nanopartículas sem o fármaco (PCLN) e na concentração 0,12% (EN

0,12%) demonstraram um aumento no número de linfócitos quando comparado a forma convencional (EC 0,12%) (Figura 30). Essa alteração sistêmica no número de linfócitos pode estar relacionado com o tipo de receptor estrogênico presente nessa célula.

Figura 30 – Quantidade de linfócitos circulantes dos grupos tratados com E2



Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%. *p<0,05.

Os linfócitos B apresentam alta expressão de receptores tipo β (ER β) quando comparado a qualquer outro tipo celular e α (ER α) em relação aos demais leucócitos (HORNG *et al.*, 2017). O linfócito T atua como modulador do fibroblasto intersticial, contribuindo para a fibrose. As substâncias produzidas por essas células, como TGF- β , atuam na síntese de fibronectina e colágeno, induzindo a contração da ferida (FREIRE *et al.*, 2018).

Estudos sugerem que a expressão dos subtipos de receptores está relacionada com efeitos antagônicos, promovendo ou inibindo a inflamação. O alto nível de receptores ER α está relacionado a progressão de doenças autoimune como o lúpus eritematoso, e o subtipo β parece possuir efeitos anti-inflamatórios (MASELLI *et al.*, 2016).

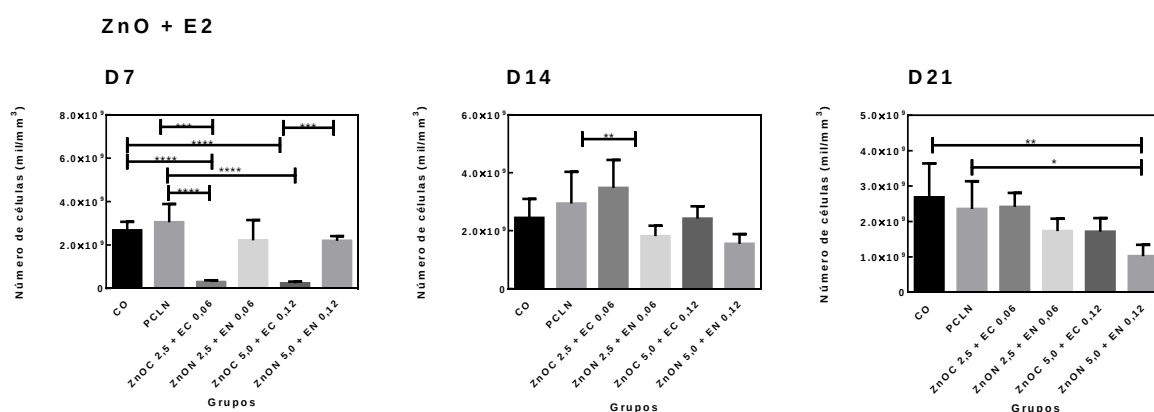
Mohammad *et al.* (2018), observaram que a deleção dos receptores ER α em linfócitos T contribuiu para múltiplos aspectos na função dessas células, incluindo a redução da sua ativação e proliferação. Os resultados sugerem que esse receptor possui importante função pró-inflamatória e contribui para a progressão de doenças autoimunes.

Ahn *et al.* (2020), estudaram o efeito cicatrizante da genisteína (fitoestrogênio extraído da soja) em feridas de camundongos ooforectomizados e na pele humana.

Os resultados mostraram que o efeito benéfico do tratamento foi mediado principalmente pela ligação ao receptor estrogênico β presente no tecido cutâneo.

No dia 7, houve diferença estatística no tratamento conjunto de E2 e ZnO na forma convencional, quando comparado ao grupo controle ooforectomizado, controle tratado com nanopartícula sem o fármaco (PCLN) e aos tratados com as formas nanoparticuladas (Figura 31). A menor concentração nos grupos convencionais pode estar relacionada com uma resposta inflamatória tardia, uma vez que a associação nanoparticulada de maior concentração promoveu uma diminuição no número de linfócitos circulantes no dia 21.

Figura 31 – Quantificação de linfócitos sistêmicos dos grupos tratados com ZnO + E2



Nota: CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco; ZnOC + EC - óxido de zinco convencional + estrógeno convencional; ZnON + EN – óxido de zinco nanoparticulado + estrógeno nanoparticulado. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: ZnO (2,5% e 5,0%) e E2 (0,06% e 0,12%). * $p \leq 0,05$.

5.9.2.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são as células inflamatórias mais abundantes no sistema imunológico. A capacidade desses leucócitos polimorfonucleares de migrar para o local da lesão é essencial para a resposta inflamatória aguda e é influenciada por fatores quimioatraentes produzido pelo hospedeiro (RUNGELRATH; KOBAYASHI; DELEO, 2019).

Essas células são as primeiras a serem recrutadas da circulação para auxiliar no combate a agentes infecciosos. Esse processo ocorre por meio da fagocitose,

produção de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e síntese de armadilhas extracelulares (compostas por proteínas granulares, cromatina e DNA capaz de aprisionar e matar micróbios) (PHILLIPSON; KUBES, 2019).

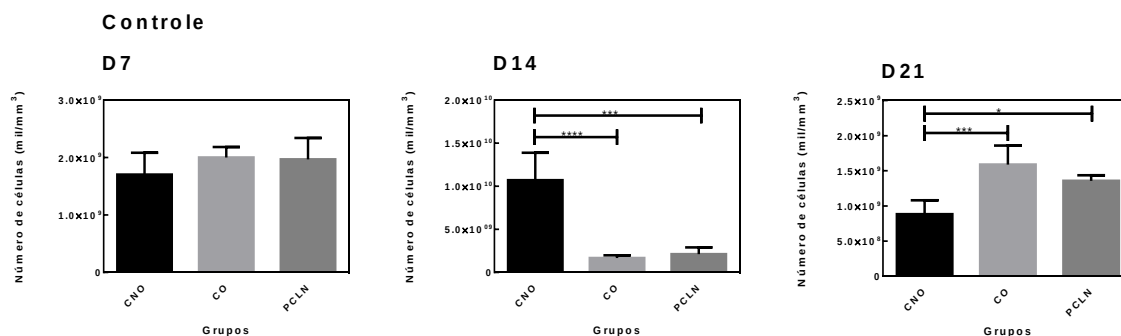
A Figura 32 mostra que a quantificação de neutrófilos do grupo controle não ooforectomizado (CNO) foi maior no dia 14 quando comparado ao grupo controle ooforectomizado (CO) e menor no dia 21 em comparação ao grupo PCLN. O resultado demonstra que ocorreu uma resposta leucocitária sistêmica devido à retirada dos ovários. A alteração no dia 14 do grupo CNO, pode ser explicada por uma exacerbação da resposta inflamatória pela ausência de tratamento.

A neutrofilia que ocorreu no dia 21 nos grupos controles ooforectomizados (CO e PCLN), sugere uma alteração sistêmica relacionada à diminuição estrogênica, característico de inflamação crônica com aumento no número de leucócitos e liberação de IL-6 e TNF- α (ABILDGAARD *et al.*, 2020).

Estudo realizado por Goettems-Fiorin *et al.* (2019) mostrou que a privação estrogênica promoveu uma diminuição na defesa anti-inflamatória, com baixos níveis de IL-10, o que pode ter causado alteração no perfil leucocitário com aumento neutrofílico no grupo ooforectomizado.

Abdelrazek *et al.* (2019), observaram que a cirurgia de retirada dos ovários acelera o stress oxidativo, demonstrado pelo aumento de óxido nítrico. Os resultados mostraram ainda que a suplementação da dieta com isoflavonas de soja (considerado modulador seletivo dos receptores estrogênicos) promoveu ação anti-inflamatória com a diminuição das moléculas de adesão e quimiocinas.

Figura 32 – Quantificação de neutrófilos nos grupos controle



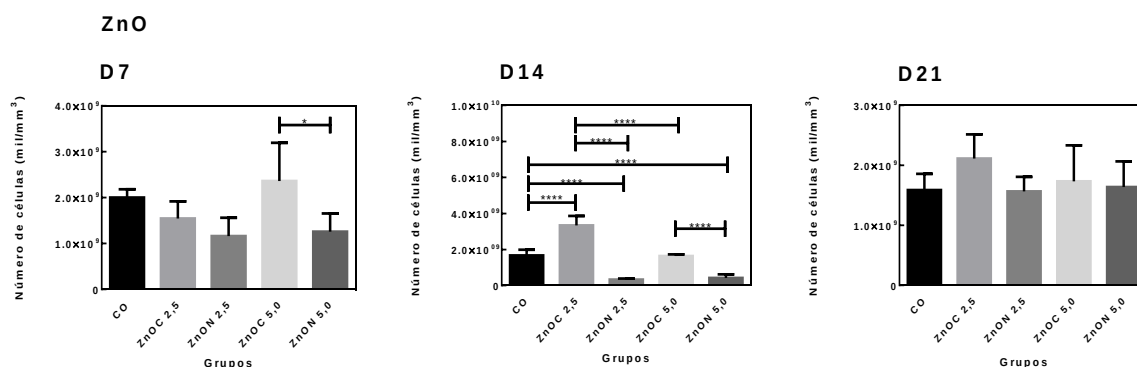
Nota: CNO – controle não ooforectomizado; CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco. * $p \leq 0,05$.

Os resultados da análise hematológica entre os grupos tratados com óxido de zinco mostrou diferença estatística no dia 7 entre os grupos tratados com a forma nanoparticulada e convencional, ambos na concentração de 5,0% (Figura 33).

No dia 14 houve diferença estatística com diminuição dos neutrófilos nos grupos ZnON 2,5% e ZnON 5,0% quando comparado ao controle ooforectomizado. Além disso, os grupos que receberam as formas nanoparticuladas apresentaram valores menores em comparação as suas respectivas formas convencionais.

Esse resultado demonstra um possível efeito benéfico no tratamento com as nanopartículas de óxido de zinco. O efeito desse tratamento na quantificação de neutrófilos pode estar relacionado a diminuição na expressão de mieloperoxidase e inibição de citocinas pró-inflamatórias (AGARWAL; SHANMUGAM, 2020).

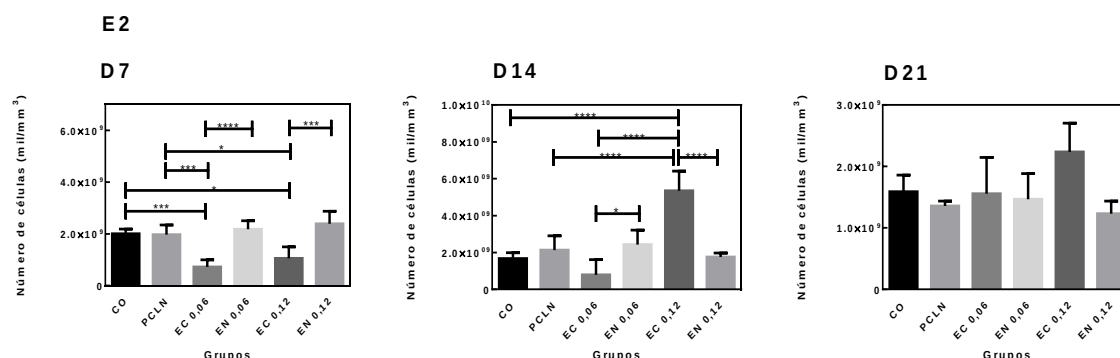
Figura 33 – Quantidade de neutrófilos sistêmicos dos grupos tratados com ZnO



Nota: CO – controle ooforectomizado; ZnOC– óxido de zinco convencional; ZnON – nanopartícula de óxido de zinco. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 2,5% e 5,0%. *p≤0,05.

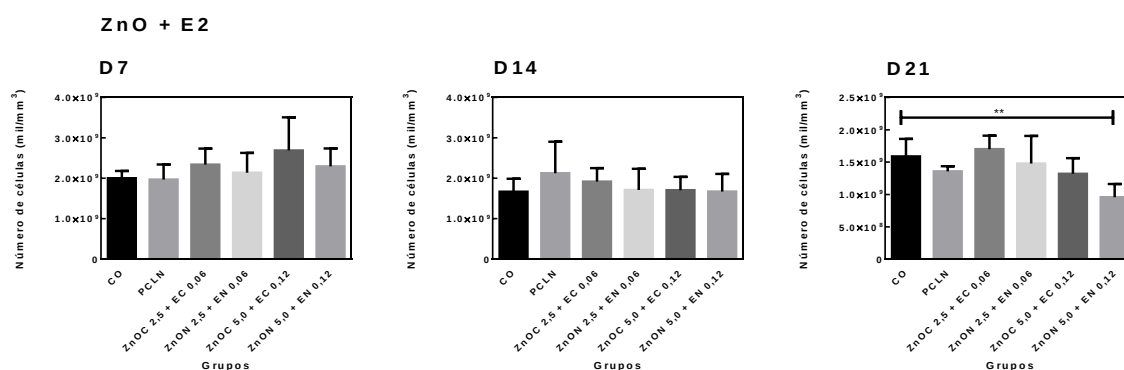
A Figura 34 demonstra que nos tratamentos com EC 0,06% e EC 0,12% houve uma redução significativa no dia 7 quando comparado aos outros grupos ooforectomizados. O efeito do estrógeno pode ser atribuído à redução das moléculas de adesão aos neutrófilos L-selectina, levando a diminuição destas células no local de inflamação (WILKINSON; HARDMAN, 2017).

No dia 14, o grupo EC 0,12% apresentou neutrofilia quando comparado aos demais. O grupo EC 0,06% demonstrou menor quantidade de neutrófilos do que o EN 0,06%. As respostas estimuladoras e supressoras do estrógeno sobre as funções imunológicas podem ser dose-dependente e o tratamento com nanopartículas pode influenciar o efeito do ativo (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

Figura 34 – Quantidade de neutrófilos sistêmicos dos grupos tratados com E2

Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%. * $p \leq 0,05$.

O tratamento sinérgico com nanopartículas de ZnO 5,0% + E2 0,12% (Figura 35) mostrou diminuição no dia 21 quando comparado ao grupo controle ooforectomizado. Este resultado sugere melhor progressão do processo cicatricial com diminuição de células inflamatórias e início da proliferação e remodelamento.

Figura 35 – Quantificação de neutrófilos nos grupos tratados com ZnO + E2

Nota: CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco; ZnOC + EC - óxido de zinco convencional + estrógeno convencional; ZnON + EN – óxido de zinco nanoparticulado + estrógeno nanoparticulado. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: ZnO (2,5% e 5,0%) e E2 (0,06% e 0,12%). * $p \leq 0,05$.

5.9.3 Análise Histológica - Pele

5.9.3.1 Infiltrado inflamatório

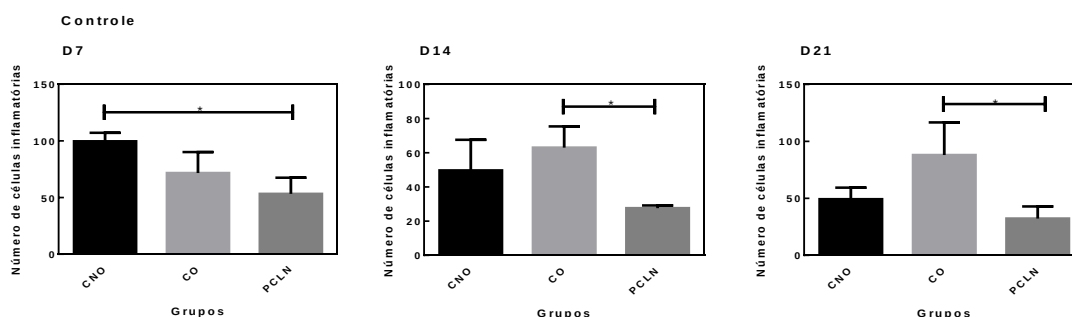
O processo inflamatório é uma das etapas mais importantes da cicatrização. Essa fase envolve a migração de células imunes ao local da lesão estimuladas por citocinas, fatores de crescimento, restos celulares e patógenos (KIRBY *et al.*, 2015).

Os neutrófilos migram ao local lesionado estimulados principalmente por PDGF e TGF – β . Além de realizar fagocitose e secretar proteínas antimicrobianas essas células são capazes de formar armadilhas extracelulares (NETs) para o sequestro de patógenos (AYADI; JAY; PRASAI, 2020).

Entre as células imunes, os macrófagos desempenham um papel importante tanto na fase inflamatória como na transição para a fase proliferativa. Os macrófagos M1 são ativados por fatores pró-inflamatórios como degradação celular, aumento de ROS, IL-6 e TNF- α . A progressão da fase inflamatória estimula a ativação de macrófagos M2 que, por sua vez, possuem características anti-inflamatórias e auxiliam o início da fase proliferativa (KIM, 2019).

A análise quantitativa do infiltrado inflamatório nos grupos controle mostrou diferença no dia 7 entre CNO e PCLN e nos dias 14 e 21 entre os grupos CO e PCLN, com aumento no grupo ooforectomizado (Figura 36). Esse resultado evidencia que a deficiência estrogênica causada pela ooforectomia pode prolongar a resposta inflamatória, retardando o processo cicatricial (ASHCROFT *et al.*, 1999; HORNG *et al.*, 2017; MUKAI, 2016).

Figura 36 - Quantificação de células inflamatórias no tecido cutâneo dos grupos controle



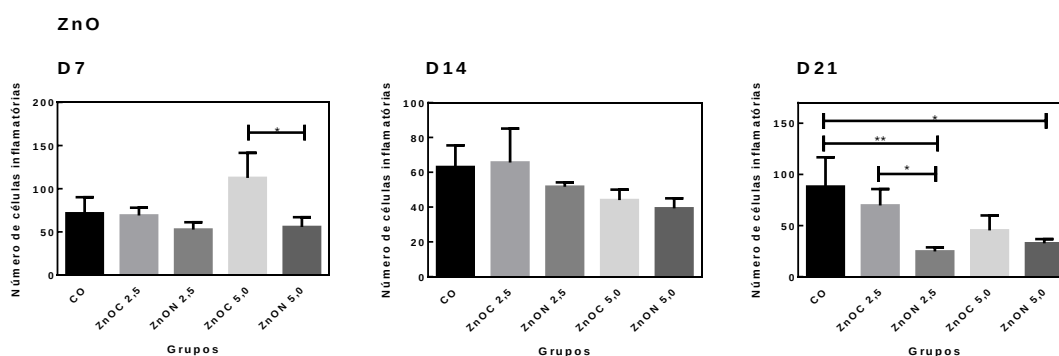
Nota: CNO – controle não ooforectomizado; CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco. * $p \leq 0,05$.

A análise do infiltrado inflamatório dos grupos tratados com óxido de zinco (Figura 37) nas formas convencionais e nanoparticuladas demonstrou diferença estatística no dia 7 entre os grupos ZnOC 5,0 e ZnON 5,0 e no dia 21 entre os grupos ZnON 2,5 e ZnON 5,0 quando comparado ao grupo controle ooforectomizado e entre os grupos ZnOC 2,5 e ZnON 2,5.

Esse resultado demonstra que a aplicação tópica de nanopartículas de óxido de zinco apresentou melhor modulação da fase inflamatória nas duas concentrações testadas. O zinco é descrito como cofator para metaloproteínases e desempenha um importante papel na degradação da matriz extracelular. O efeito do ZnO na cicatrização relaciona-se com o tamanho e a concentração das partículas. A atividade antibacteriana pode ser aumentada pela maior superfície de contato das nanopartículas (RAJENDRAN *et al.*, 2018).

Batool *et al.* (2021), estudaram o efeito de curativos de nanopartículas de óxido de zinco em hidrogel de sílica durante 11 dias e observaram um aumento na apoptose, angiogênese e melhor re-epitelização do tecido lesado dos grupos tratados.

Figura 37 - Quantificação das células inflamatórias nos grupos tratados com ZnO nas formas convencional e nanoparticulada



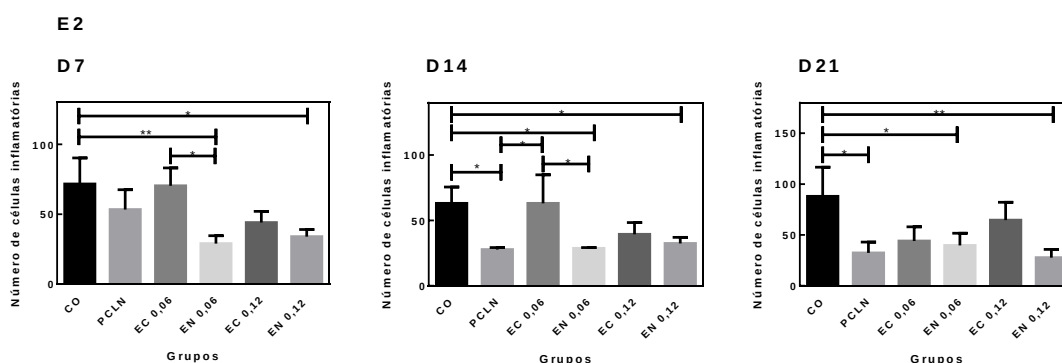
Nota: CO – controle ooforectomizado; ZnOC– óxido de zinco convencional; ZnON – nanopartícula de óxido de zinco. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 2,5% e 5,0%. * $p \leq 0,05$.

Os resultados da quantificação do infiltrado inflamatório dos grupos tratados com E2 estão apresentados na Figura 38. Houve diferença em todos os dias entre os grupos CO, EN 0,06 e EN 0,12 demonstrando diminuição das células inflamatórias nos grupos tratados com a nanopartícula. No dia 7 e 14 houve diferença entre os grupos EC 0,06 e EN 0,06.

O efeito benéfico do estrógeno na fase inflamatória pode estar associada a diminuição da infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, devido à redução na expressão de moléculas de adesão celular. Associado a esse mecanismo, o efeito anti-inflamatório do E2 é predominantemente mediado pela inibição de citocinas inflamatórias e presença do fator de inibição da migração de macrófagos (ASHCROF *et al.*, 1999; MOHTADI *et al.*, 2021).

Além disso, a utilização do estrógeno na forma nanoparticulada pode permitir o controle na taxa de liberação do ativo, prolongando o efeito farmacológico no local da lesão (SALIMI; MOHAMMADIPANAH, 2021; URIE *et al.*, 2018).

Figura 38 - Análise da quantidade de células inflamatórias na lesão dos grupos tratados com estrógeno

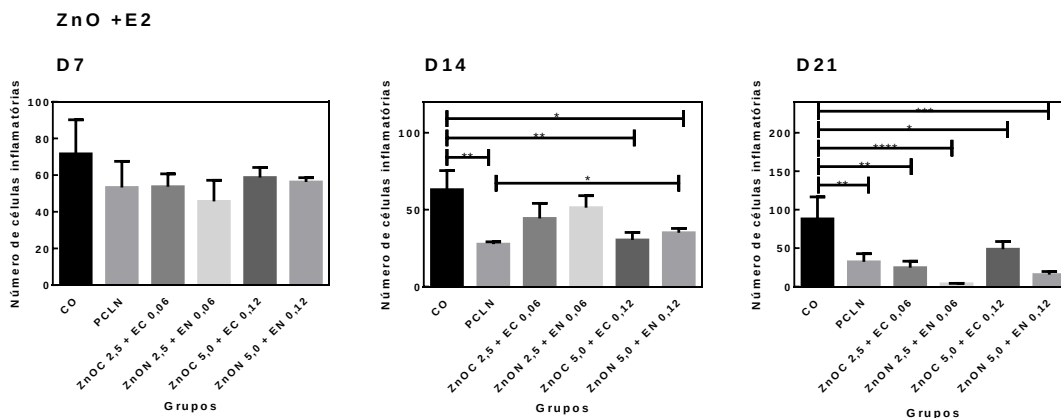


Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%. * $p \leq 0,05$.

Os resultados da análise quantitativa do infiltrado inflamatório dos grupos tratados com a associação de ZnO e E2 mostraram diferença estatística no dia 14, apresentando uma menor quantidade de células nos grupos ZnO 5,0 + E 0,12 nas formas convencionais e nanoparticuladas, quando comparados ao grupo CO. No dia 21 todos os grupos apresentaram menor quantidade de células inflamatórias com relação ao grupo controle ooforectomizado (Figura 39).

Esse resultado sugere que a associação dos ativos, principalmente na forma nanoparticulada foi capaz de modular a fase inflamatória. O efeito sinérgico do óxido de zinco e do E2 demonstrou que o tratamento é eficaz e melhora de forma significativa a progressão do processo cicatricial em ambas as doses testadas.

Figura 39 - Quantificação de células inflamatórias nos grupos tratados com a associação ZnO + E2



Nota: CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco; ZnOC + EC - óxido de zinco convencional + estrógeno convencional; ZnON + EN – óxido de zinco nanoparticulado + estrógeno nanoparticulado. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: ZnO (2,5% e 5,0%) e E2 (0,06% e 0,12%). * $p \leq 0,05$.

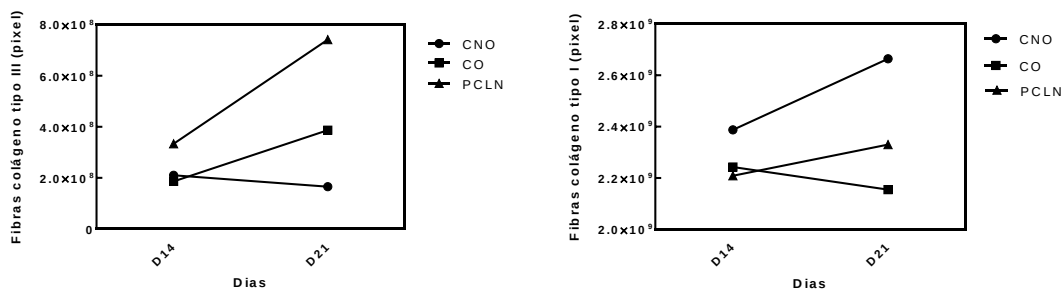
5.9.3.2 Fibras colágeno

A fase proliferativa da cicatrização caracteriza-se pela migração e ligação de células à matriz extracelular que estimulam a síntese de colágeno, angiogênese e queratinização do tecido lesado (YEUNG; KELLY, 2021).

A derme é composta por aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 10 -15% de tipo III. As fibras tipo I apresentam características mais espessas e proporcionam resistência à tensão. O colágeno tipo III, possui uma estrutura mais fina e é o principal constituinte da matriz temporária presente durante a remodelação tecidual (EL SHERIF *et al.*, 2006; TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016; MAKUSZEWSKA *et al.*, 2020).

A análise quantitativa das fibras colágeno tipo I e III dos grupos controle CNO, CO e PCL não apresentaram diferença nos dias 14 e 21. No entanto, foi possível observar uma menor quantidade de fibras tipo I no grupo CO no dia 21, sugerindo que a diminuição estrogênica causada pela retirada dos ovários pode interferir na síntese de colágeno (Figura 40).

Figura 40 - Quantificação de fibras colágeno tipo I e III nos grupos controles



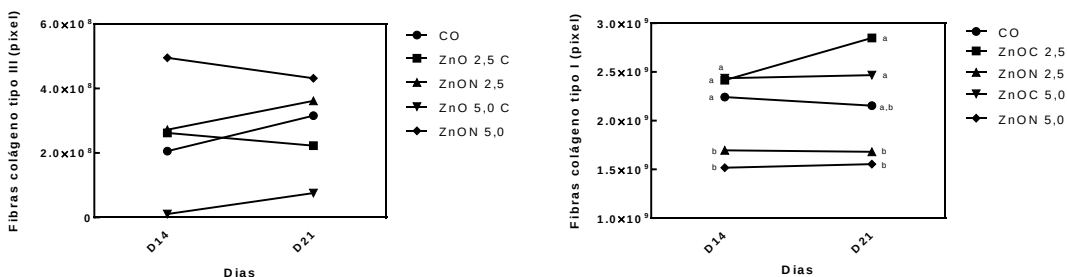
Nota: CNO – controle não ooforectomizado; CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco. *p≤0,05.

Os resultados dos grupos tratados com ZnO, demonstraram diferença nas fibras tipo I nos dias 14 e 21 entre os grupos ZnON 2,5 e ZnON 5,0 quando comparados aos demais (Figura 41).

Esse resultado demonstra que as nanopartículas de óxido de zinco possuem ação principalmente no controle de infecções, devido a sua ação antibacteriana, e consequentemente o seu efeito principal ocorre na fase inflamatória do processo de cicatrização (DIEZ-PASCUAL; DIEZ-VICENTE, 2015).

Sendo assim, o uso sinérgico das nanopartículas de ZnO com outros ativos que possam estimular a síntese de colágeno tipo I e III pode ser uma alternativa adequada para acelerar o processo de remodelamento do tecido lesado.

Figura 41 - Avaliação das fibras colágeno nos grupos tratados com ZnO nas formas convencional e nanoparticulada



Nota: CO – controle ooforectomizado; ZnOC– óxido de zinco convencional; ZnON – nanopartícula de óxido de zinco. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 2,5% e 5,0%. *p≤0,05.

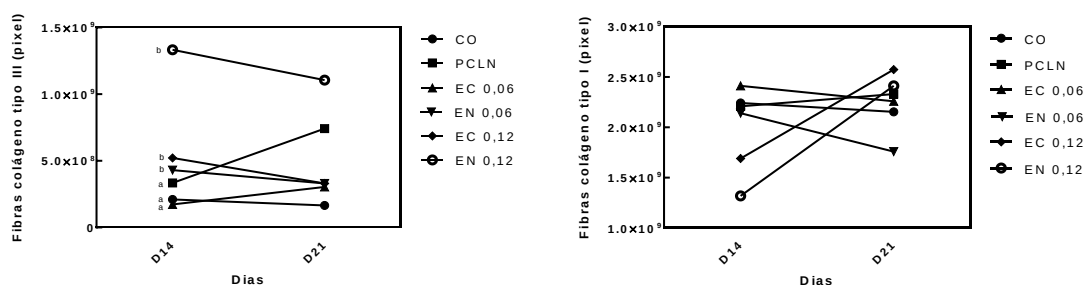
A análise quantitativas das fibras colágeno dos grupos tratados com E2 apresentou diferença das fibras colágeno tipo III no dia 14. O resultado mostrou que

houve um aumento nas fibras dos grupos EN 0,12, EC 0,12 e EN 0,06 quando comparados aos demais conforme Figura 42.

Não houve diferença estatística na quantificação de fibras tipo I, no entanto a quantidade obtida nos grupos EC 0,12 e EN 0,12 mostrou valores maiores quando comparado ao grupo CO. Embora não tenha diferença, esse resultado sugere que o tratamento com E2 pode estimular o remodelamento tecidual.

Zhuge *et al.* (2018) avaliou o efeito tópico do estrógeno no tratamento de feridas cutâneas em ratos diabéticos. Os resultados mostraram que houve um aumento na densidade de vasos sanguíneos e na deposição de colágeno dos grupos tratados.

Figura 42 - Avaliação das fibras colágeno tipo I e III dos grupos tratados com E2

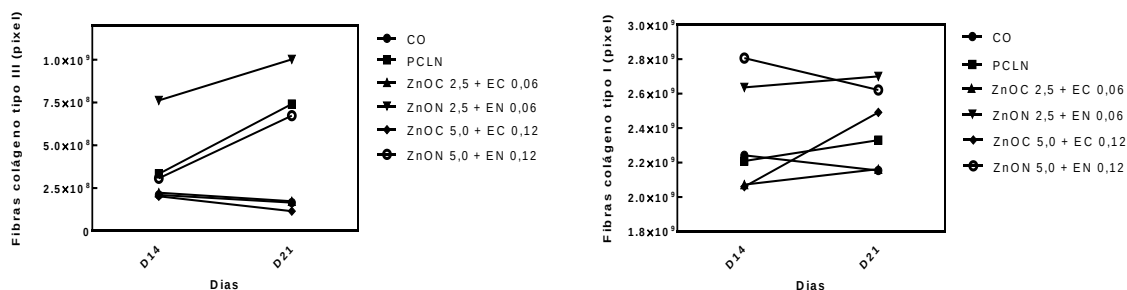


Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%. *p<0,05.

Os resultados da análise quantitativa de fibras colágeno tipo I e III nos grupos tratados com a associação ZnO + E2 não apresentaram diferença nos dias 14 e 21 (Figura 43).

No entanto, foi possível observar uma maior quantidade de fibras tipo I e III nos grupos tratados com a associação ZnO + E2 na forma nanoparticulada em ambas as concentrações quando comparado ao grupo CO. Esse resultado sugere que houve um estímulo maior de fibroblastos, e possivelmente aumento na síntese de colágeno, na fase proliferativa do processo de cicatrização

Figura 43 - Quantificação das fibras colágeno tipo I e III nos grupos tratados com a associação ZnO + E2



Nota: CO – controle ooforectomizado; PCLN – nanopartículas sem o fármaco; ZnOC + EC - óxido de zinco convencional + estrógeno convencional; ZnON + EN – óxido de zinco nanoparticulado + estrógeno nanoparticulado. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: ZnO (2,5% e 5,0%) e E2 (0,06% e 0,12%). * $p \leq 0,05$.

5.9.3.3 Análise histológica - útero

O câncer endometrial é uma importante enfermidade ginecológica que acomete principalmente mulheres no período pós-menopausa. O adenocarcinoma pode ocorrer devido a hiperplasia endometrial causada pelo estímulo estrogênico excessivo ou por deficiência de progesterona (BRINTON; FELIX, 2014; WANG, 2020).

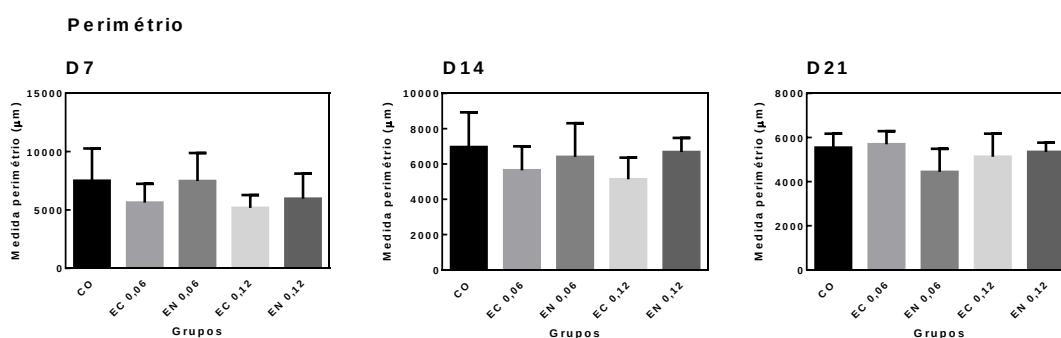
A cirurgia de ooforectomia é muito utilizada em modelos animais para avaliação de alterações causadas pelo período da menopausa nas mulheres. Estudos mostram que a retirada do ovário causa atrofia uterina devido a diminuição dos níveis de hormônios circulantes (ABBASI *et al.*, 2017). O tratamento tópico de lesões cutâneas com E2 poderia causar modificações endometriais prejudiciais, sendo assim a avaliação das alterações histológicas do útero consideradas importantes.

O útero é formado por três camadas principais: a camada externa, o perimétrio é composto por uma túnica serosa. O miométrio, constituído por musculatura lisa forma a maior parte da parede uterina. O endométrio caracteriza-se pela porção mucosa e se modifica com o ciclo menstrual e gravidez (APLIN, 2018; CHUFFA *et al.*, 2011).

A ação estrogênica no útero ocorre principalmente pela ligação aos receptores nucleares ER α e ER β . A isoforma predominante no endométrio é o ER α e a ligação ao estrógeno estimula a proliferação nas células do estroma durante a fase proliferativa (APLIN, 2018).

Não houve diferença na análise das medidas do perimétrio nos dias 7, 14 e 21 (Figura 44). Esse resultado era esperado, uma vez que essa camada geralmente não é susceptível à alterações causadas por substâncias endógenas sintéticas ou naturais.

Figura 44 - Avaliação das alterações histológicas no perimétrio nos grupos tratados com E2



Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%

Houve diferença no dia 7 com aumento da espessura do miométrio nos grupos EC 0,06; EN 0,06 e EN 0,12 quando comparados ao grupo CO. Foi possível observar também diferença entre os grupos EC 0,12 e EN 0,12 (Figura 45).

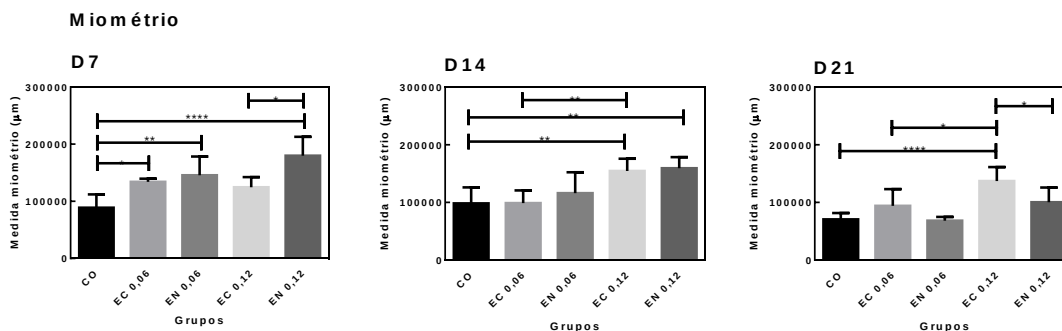
No dia 14 observou-se diferença entre os grupos EC e EN 0,12 quando comparados ao CO. Os grupos EC 0,06 e EC 0,12 também mostraram-se diferentes, com aumento na espessura do miométrio do grupo tratado com maior concentração de E2. No dia 21, o grupo EC 0,12 apresentou diferença quando comparado aos demais (Figura 45).

Esse resultado sugere que o tratamento com E2 na forma convencional de maior concentração (EC 0,12) apresentou maior efeito no tecido uterino. Foi possível observar que o tratamento tópico com estrógeno aumenta a espessura do miométrio, no entanto no dia 21 os grupos tratados com a forma nanoparticulada não mostraram diferença quando comparado ao CO.

Os hormônios esteroides, em particular o estrógeno, promovem a proliferação e diferenciação das células do miométrio durante a gravidez. Ocorre um aumento significativo tanto no tamanho como no número de células musculares. O estrógeno,

por meio dos receptores ER α , podem regular positivamente as proteínas contráteis durante o parto (CONDON *et al.*, 2020).

Figura 45 - Análise das alterações do miométrio nos dias 7, 14 e 21 dos grupos tratados com E2



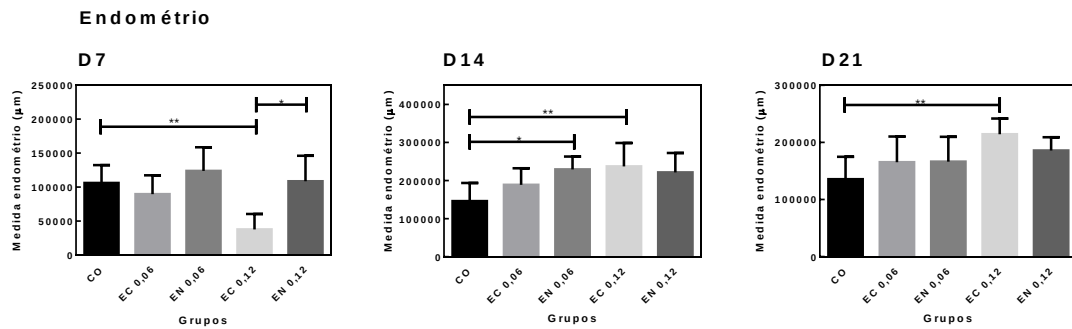
Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%. * $p \leq 0,05$.

A avaliação endometrial mostrou diferença no dia 7 entre o grupo EC 0,12 comparado aos grupos CO e EN 0,12. No dia 14 observou-se diferença com aumento na espessura do endométrio nos grupos EC 0,12 e EN 0,06 em relação ao grupo CO. No dia 21 o grupo EC 0,12 ainda apresentou diferença quando comparado ao CO (Figura 46).

Franco *et al.* (2020), avaliaram o efeito do extrato de isoflavonas na endocérnix de ratas ooforectomizadas. Os resultados mostraram que houve efeito proliferativo quando comparado ao grupo controle.

Os resultados demonstram que não houve estímulo endometrial nos grupos tratados com as formas nanoparticuladas no dia 21. Sendo assim, o tratamento com as nanopartículas de E2 pode ser uma alternativa viável para feridas cutâneas em mulheres na menopausa, uma vez que não houve estímulo excessivo nas células uterinas. Além disso, a dose e o tempo de tratamento podem ser ajustados conforme a necessidade de cada paciente.

Figura 46 - Avaliação das alterações endometriais dos grupos tratados com E2



Nota: CO – controle ooforectomizado; EC – estrógeno convencional; EN – nanopartícula de estrógeno. Os grupos variam conforme as concentrações testadas: 0,06% e 0,12%. * $p \leq 0,05$.

6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de E2 e ZnO apresentaram características como tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão adequados para aplicação em feridas. A avaliação por FTIR do E2 apresentou bandas características indicando que o fármaco está disperso no núcleo oleoso. A nanocápsula de E2 mostrou-se estável em diferentes temperaturas, e o método validado foi apropriado para quantificação do E2. Para as nanoesferas de ZnO, a análise por raios-X mostrou picos característicos da amostra e o EDS alta pureza das nanopartículas. O espectro de FTIR apresentou picos característicos e semelhantes para a forma convencional e nanoparticulada. Os resultados do ensaio *in vivo* mostraram que houve melhor progressão da inflamação nos grupos tratados com a forma nanoparticulada de E2 e ZnO. Não houve atraso na retração da lesão e na colagênese. Houve maior quantidade de fibras colágeno tipo I e III no grupo ZnON +EN. A nanopartícula de E2 não alterou significativamente o tecido uterino. Os resultados deste trabalho demonstraram que foi possível desenvolver nanocápsulas de E2 e nanoesferas de ZnO com características físico-químicas adequadas e com potencial efeito cicatrizante de lesões cutâneas em ratas ooforectomizadas.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.; BAMBAEICHI, E.; NEMATBAKHS, M. Co-administration of vitamin C or estradiol with aerobic exercise on liver oxidative stress and enzymes in ovariectomized rat. **Sport Sci Health**, v. 13, p. 521-526, 2017.
- ABDELHAKIM, H. K.; EL-SAYED, E. R.; RASHIDI, F. B. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with Antimicrobial, Anticancer, Antioxidant and Photocatalytic Activities by the Endophytic *Alternaria tenuissima*. **J App Microbiol**, p. 1-27, 2020.
- ABDELRAZEK, H. M. A. Soy Isoflavones Ameliorate Metabolic and Immunological Alterations of Ovariectomy in Female Wistar Rats: Antioxidant and Estrogen Sparing Potential. **Oxid Med Cell Longev**, p. 1-13, 2019.
- ABILDGAARD, J. *et al.* Increased systemic inflammation and altered distribution of T-cell subsets in postmenopausal women. **Plos One**, v. 5, n. 6, p. 1-14, 2020.
- AGARWAL, H.; SHANMUGAM, V. A review on anti-inflammatory activity of green synthesized zinc oxide nanoparticle: Mechanism-based approach. **Bioorg Chem**, v. 94, p. 1-10, 2020.
- AHMED, F. *et al.* Doping effects of Co²⁺ ions on structural and magnetic properties of ZnO nanoparticles. **Microelectron Eng**, v. 89, p. 129-132, 2012.
- AHN, S. *et al.* Biomimetic and estrogenic fibers promote tissue repair in mice and human skin via estrogen receptor β . **Biomaterials**, v. 255, p. 1-12, 2020.
- AJIBOYE, A. L.; TRIVEDI, V.; MITCHELL, J. C. Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions. **Drug Deliv and Transl Res**, v. 8, p. 1790-1796, 2018.
- AKBAS, A.; TAYGUN, M. E.; KUÇUKBAYRAK, S. Fabrication and characterization of PCL/ZnO-NP nanocomposite for wound dressing applications. **Eurasian J Bio Chem. Sci**, v. 1, n. 2, p. 54-58, 2018.
- AL-BEDAIRY, M. A.; ALSHAMSI, H. A. H. Environmentally Friendly Preparation of Zinc Oxide, Study Catalytic Performance of Photodegradation by Sunlight for Rhodamine B Dye. **Eurasian J Analyt Chem**, v. 13, n. 6, p. 1-9, 2018.
- ALEX, A. T. *et al.* Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. **Drug Deliv**, v. 23, n. 7, p. 2144-2153, 2016.
- AMGOTH, C. *et al.* Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery Applications. Nanotechnology for Animal Health and Production. **Nanotechnology for Animal Health and Production**, p. 99-123, 2014.
- APLIN, J. D. Uterus—Endometrium. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 2, 2018.

ASHCROF, G. S. *et al.* Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response. **Am J Pathol**, v. 155, n. 4, 1999

AYADI, A. E.; JAY, J. W.; PRASAI, A. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, p. 1-28, 2020.

BATOOL, M. *et al.* Adsorption, antimicrobial and wound healing activities of biosynthesised zinc oxide nanoparticles. **Chem. Paper**, v. 75, p. 893-907, 2021.

BACON, J. L. The Menopausal Transition. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 44, p. 285-296, 2017.

BALAURE, P. C. *et al.* In vitro and in vivo studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds. **Int J Pharm**, v. 557, p. 199-207, 2019.

BASHA, S. K.; LAKSHMI, K. V.; KUMARI, V. S. Ammonia sensor and antibacterial activities of green zinc oxide nanoparticles. **Sens Bio-Sens Res**, v. 10, p. 34-40, 2016.

BENKADDOUR, A. *et al.* Grafting of Polycaprolactone on Oxidized Nanocelluloses by Click Chemistry. **Nanomater**, v. 3, p. 141-157, 2013.

BERTHET, M. *et al.* Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?. **Trend Biotechnol**, v. 35, n. 8, p. 770-784, 2017.

BEZERRA, E. B. *et al.* Rheological behaviour of Bio-PE and PCL upon addition of PEGAA and PEGM. **Matéria**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2017.

BHARDWAJ, V.; KAUSHIK, A. Biomedical Applications of Nanotechnology and Nanomaterials. **Micromachines**, v. 8, n. 298, p. 1-3, 2017.

BLUME-PEYTAVI, U. *et al.* Age-Associated Skin Conditions and Diseases: Current Perspectives and Future Options. **Gerontologist**, v. 56, n. 2, p. 230-242, 2016.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. **J Pharmaceutical Sci**, v. 104, p. 3653-3680, 2015.

BOTTAI, G. *et al.* 17 β -estradiol protects human skin fibroblasts and keratinocytes against oxidative damage. **J Europe Acad Dermatol and Venereol**, p. 1-8, 2012.

BRANZOI, F.; BRANZOI, V. Investigation of Some Nonionic Surfactants as Corrosion Inhibitors for Carbon Steel in Sulfuric Acid Medium. **Int J Electrochem Sci**, v. 12, p. 7638-7658, 2017.

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

BRINTON, L. A.; FELIX, A. S. Menopausal hormone therapy and risk of endometrial câncer. **J Steroid BiochemMol Biol**, v. 142, p. 83-89, 2014.

BRUFANI, M. *et al.* Novel Locally Active Estrogens Accelerate Cutaneous Wound Healing-Part 2. **Sci Reports**, v. 7, p. 1-36, 2017.

BRUNKEN, G. S. *et al.* Agreement assessment between hemoglobin and hematocrit to detect anemia prevalence in children less than 5 years old. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 1, p. 118-123, 2016.

CALLEJA-AGIUS, J. BRINCAT, M. The effect of menopause on the skin and other connective tissues. **Gynecol Endocrinol**, v. 28, n. 4, p. 273-277, 2012.

CAMPBELL, L. *et al.* Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor β independent of its antiinflammatory activities. **J Experiment Med**. v. 207, n. 9, p. 1825-1833, 2010.

CANEDO-DORANTES, L.; CANEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. **Int J Inflamm**, p. 1-15, 2019.

CASTANO, O. *et al.* Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 129, p. 95-117, 2018.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgic Clinic North Am**, v. 97, p. 189-207, 2017.

CHUFFA, L. G. A. *et al.* Nandrolone Decanoate and Physical Effort: Histological and Morphometrical Assessment in Adult Rat Uterus. **The anatomical record**, v. 294, p. 335-341, 2011.

COOKE, P. S. *et al.* Estrogens in male physiology. **Physiol Rev**, v. 97, p. 995-1043, 2017.

CONDON, J. C. *et al.* Estrogen/estrogen receptor action and the pregnant myometrium. **Current Op in Physiol**, v. 13, p. 135-140, 2020.

COSTA, B. C. *et al.* ZnO Nanoparticles with Different Sizes and Morphologies for Medical Implant Coatings: Synthesis and Cytotoxicity. **BioNanoScience**, v. 8, p. 587-595, 2018.

DALAL, P. K.; AGARWAL, M. Postmenopausal syndrome. **Indian J Psychiatry**, v. 57, n. 2, p. 222-232, 2015.

DAMACENO, M. J. C. F.; CHIRELLI, M. Q. The Implementation of Senior Health Care in the Family Health Strategy: The View of Professionals and Managers. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 5, p. 1637-1646, 2019.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1-17, 2018.

DIEZ-PASCUAL, A. M.; DIEZ-VICENTE, A. L. Wound Healing Bionanocomposites Based on Castor Oil Polymeric Films Reinforced with Chitosan-Modified ZnO Nanoparticles. **Macromol**, v. 16, p. 2631-2644, 2015

DUBEY, A.; PRABHU, P.; KAMATH, J. V. Nano Structured lipid carriers :A Novel Topical drug delivery system. **Int J PharmTech Res**, v. 4, n. 2, p. 705-714, 2012.

D'ALONZO, M. *et al.* Current Evidence of the Oncological Benefit-Risk Profile of Hormone Replacement Therapy. **Medicina**, v. 55, n. 573, p. 1-7, 2019.

EALIAS, A. M.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **Mat Sci Eng**, v. 263, p. 1-16, 2017.

EL SHERIF, A. *et al.* Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect. **Hernia**, v. 10, n.6, p. 511-520, 2006.

EMMERSON, E.; HARDMAN, M. J. The role of estrogen deficiency in skin ageing and wound healing. **Biogerontol**, v. 13, n. 1, p. 3-20, 2012.

ESKANDARI, A.; ALIPOUR, S. Hormone Replacement Therapy and Breast Diseases: A Matter of Concern for the Gynecologist. **Archives of Breast Cancer**, v. 6, n. 3, p. 113-119, 2019.

FAIT, T. Menopause hormone therapy: latest developments and clinical practice. **Drugs in Context**, v. 8, p. 1-9, 2019.

FESSI, H.P.F.D. *et al.* Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. **Int J Pharm**, v. 55, n.1, p.1-4, 1989.

FRANCO, P. C. *et al.* The influence of phytoestrogens or estrogens on the proliferation of the rat endocervical mucosa. **Rev assoc méd bras**, v. 66, n. 2, p. 174-179, 2020

FRANÇA, D. C. *et al.* Photodegradation Mechanisms on Poly(ϵ -caprolactone) (PCL). **Mat Res**, v. 21, n. 5, p. 1-8, 2018.

FREIRE, L. C. *et al.* A relação dos linfócitos t reguladores na cicatrização: revisão da literatura. **Rev Cient do Hospital Santa Rosa**, v. 8, 2018.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 116, p. 135-169, 2019.

GAMMOH, N. Z.; RINK, L. Zinc in Infection and Inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 624, p. 1-25, 2017.

GAO, W. L. *et al.* Measurement of serum estrogen and estrogen metabolites in pre- and postmenopausal women with osteoarthritis using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Brazil J Med Biol Res**, v. 48, n. 2, p. 146-153, 2015.

- GOETTEMES-FIORIN, P. B. *et al.* Ovariectomy predisposes female rats to fine particulate matter exposure ' s effects by altering metabolic, oxidative, pro-inflammatory, and heat-shock protein levels. **Environ Sci Pol Res**, v. 26, p. 20581-20594, 2019.
- GOH, E. T. *et al.* Accelerated Wound Healing Using Nanoparticles. **Nanosci Dermatol**, p. 187-306, 2016.
- GONZALEZ, A. C. O. *et al.* Wound healing - A literature review. **An Brasil Dermatol**, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.
- GOYAL, R. *et al.* Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **J Control Release**, v. 240, p. 77-92, 2016.
- GROSSEN, P. *et al.* Functionalized Solid-Sphere PEG- b -PCL Nanoparticles to Target Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro. **J Nanomat**, p. 1-13, 2016.
- GUO, K. W. Property of zinc oxide (Zno) nanostructures potential for biomedical system and its common growth mechanism. **J App Biotechnol Bioeng**, v. 2, n. 5, p. 197-202, 2017.
- GUO, P. *et al.* Development of molecularly imprinted column-on line-two dimensional liquid chromatography for rapidly and selectively monitoring estradiol in cosmetics. **Talanta**, v. 161, p. 830-837, 2016.
- HALBUS, A. F.; HOROZOV, T. S.; PAUNOV, V. N. Surface-Modified Zinc Oxide Nanoparticles for Antifungal and Antiyeast Applications. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 1, p. 44-451, 2020.
- HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Adv Therapy**, v. 34, p. 599-610, 2017.
- HASSIBA, A. J. *et al.* Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. **Nanomed**, v. 11, n. 6, p. 1-35, 2016.
- HESKETH, M. *et al.* Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. **Int J Mol Sci**, v. 18, p. 1-10, 2017.
- HESS, C. T. Skin and wound care. **Clin Guide to Skin & Wound Care**. Lippincott Williams & Wilkins. 7 ed. 2013.
- HORNG, H. *et al.* Estrogen Effects on Wound Healing. **Int J Mol Sci**, v. 18, p. 1-14, 2017.
- ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology, v.1, 2005.
- ILVES, M. *et al.* Topically applied ZnO nanoparticles suppress allergen induced skin inflammation but induce vigorous IgE production in the atopic dermatitis mouse model. **Particle and Fibre Toxicol**, v. 11, n. 38, 2014.

INOUE, T. *et al.* The role of estrogen-metabolizing enzymes and estrogen receptors in human epidermis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 344, p. 35-40, 2011.

JARAI, B. M. Polymeric Nanoparticles. **Nanopart Biom App**, p. 308-324, 2020.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein J Nanotechnol**, v. 9, p. 1050-1074, 2018.

JONES, E.M.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. **Adv wound care**, v. 0, p. 1-9, 2014.

KAUL, S. *et al.* Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. **J Pharm**, p. 1-19, 2018.

KAUSHIK, M. *et al.* Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles. **App Surf Sci**, v. 479, p. 1169-1177, 2019.

KIM, B. J. *et al.* Accelerated skin wound healing using electrospun nanofibrous mats blended with mussel adhesive protein and polycaprolactone. **J Biom Mat Res Part A**, v. 105, p. 218-225, 2017.

KIM, H. *et al.* Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. **Adv Sci News**, v. 6, p. 1-13, 2019

KIRBY, G. T. S. *et al.* Stem Cells for Cutaneous Wound Healing. **BioMed Res Int**, p. 2-12, 2015.

KLINGSHIRN, C. F. *et al.* Zinc oxide: from fundamental properties towards novel application. **Spring Ser Mat Sci**, 10. Ed. 2010.

KOÇ, I. *et al.* Selective removal of 17-estradiol with molecularly imprinted article-embedded cryogel systems. **J Hazardous Mat**, v. 192, p. 1819-1826, 2011.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. **Europ Polym J**, v. 100, p. 1-11, 2018.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, J. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, p. 2833-2881, 2014.

KORRAPATI, P. S. *et al.* Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. **Mat Sci Engin**, v. 67, p. 747-765, 2016.

KOTWAL, G. J.; CHIEN, S. Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. **Macrophages**, p. 353-364, 2017.

KOZEHKONAN, G. S. *et al.* Preparation and characterization of PCL polymeric scaffolds coated with chitosan/ bioactive glass/gelatin nanoparticles using the tips methodology for bone tissue engineering. **Nanomed J**, v. 6, n. 4, p. 311-320, 2019.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. **Adv Nanomed Deliv Therap Nucleic Acids**, p. 43-58, 2017.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Coll Surf B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LABRIE, F. All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 145, p. 133-138, 2015.

LEON, L.; CHUNG, E. J.; RINALDI, C. A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. **Nanopart Biomed App**, p. 1-4, 2020.

LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **J Tissue Viab**, v. 20, p. 108-120, 2011.

LIAO, Z. H. *et al.* Estrogen signaling effects on muscle-specific immune responses through controlling the recruitment and function of macrophages and T cells. **Skeletal Muscle**, v. 9, n. 20, p. 1-16, 2019.

LIN, P. *et al.* Zinc in Wound Healing Modulation. **Nutrients**, v. 10, n. 16, p. 1-20, 2018.

LIU, Y. *et al.* LiFePO₄ nanoparticles growth with preferential (010) face modulated by Tween-80. **RSC Advances**, v. 5, p. 9745-9751, 2015.

LIZ, M. V. *et al.* Sensitive Estrogens Determination in Wastewater Samples by HPLC and Fluorescence Detection. **J Braz Chem Society**, v. 28, n. 8, p. 1453-1460, 2017.

LOBO, R. A. Menopause and Aging. **Yen & Jaffe's Reproduc Endocrinol**, p. 325-355, 2009.

LOH, X. J. The Effect of pH on the Hydrolytic Degradation of Poly(ϵ -caprolactone)-Block-Poly(ethylene glycol) Copolymers. **J App Polym Sci**, v. 127, n. 3, p. 1-11, 2012.

LOWRY, G. V. *et al.* Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Envir Sci: Nano – Royal Society of Chem**, v. 3, p. 953-965, 2016.

MAHMOODZADEH, S.; DWORATZEK, E. The Role of 17 β -Estradiol and Estrogen Receptors in Regulation of Ca²⁺ Channels and Mitochondrial Function in Cardiomyocytes. **Frontiers Endocrinol**, v. 10, p. 1-15, 2019.

MAJUMDAR, M. *et al.* Nanotechnology for enhanced bioactivity of bioactive compounds. **Biotechnol Produc Bioactive Comp**, p. 433-466, 2020.

MAKUSZEWSKA, M. *et al.* Expression of collagen type III in healing tympanic membrane. **Int J Pediatric Otorhinolaryngol**, v. 136, 2020.

MARCHIORI, M. C. L. *et al.* Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. **Am Assoc Pharm Sci**, 2017.

MARIANTONIETTA, C. *et al.* Aromatase Inhibitors: A New Reality for the Adjuvant Endocrine Treatment of Early-Stage Breast Cancer in Postmenopausal Women. **Rec Adv Med Chem**, v. 1, p. 99-130, 2014.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British J Dermatol**, v. 173, p. 370-378, 2015.

MASI, E. C. D. J. *et al.* The influence of growth factors on skin wound healing in rats. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 82, n. 5, p. 512-521, 2016.

MASSELLI, A. *et al.* Low expression of estrogen receptor β in T lymphocytes and high serum levels of anti-estrogen receptor α antibodies impact disease activity in female patients with systemic lupus erythematosus. **Biol Sex Differ**, v. 7, n. 3, p. 1-10, 2016.

MAYET, N. *et al.* A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. **J Pharm Sci**, v. 103, n. 8, p. 2211-2230, 2014.

MAYRINCK, C. *et al.* Síntese, Propriedades e Aplicações de Óxido de Zinco Nanoestruturado. **Rev Virt Quim**, v. 6, n. 5, p. 1185-1204, 2014.

MEDEIROS, A. C.; FILHO, A. M. D. Healing of surgical wounds. **J Sur Clin Res**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MEDEIROS, S. F.; MAITELLI, A.; NINCE, A. P. B. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n. 11, p. 593-601, 2007.

MELO, N. F. S. *et al.* Characterization of Articaine-Loaded Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules and Solid Lipid Nanoparticles in Hydrogels for Topical Formulations. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 18, p. 4428-4438, 2018.

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO, J. Cicatrização de feridas crônicas – algumas opções terapêuticas. **Rev SPDV**, v. 70, n. 4, p. 423-433, 2012.

MIHAI, M. M. *et al.* Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. **Materials**, v. 12, p. 1-16, 2019.

MINAEVA, V. A.; MINAEV, B. F.; HOVORUN, D. M. Vibrational spectra of the steroid hormones, estradiol and estriol, calculated by density functional theory. the role of low-frequency vibrations. **Biopol Cell**, v. 80, n. 4, p. 82-95, 2008.

- MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. C. G.; SILVA, A. L. A. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Rev Bras Geriatr Gerontol**, v. 19, n. 3, p. 507-519, 2016.
- MISHRA, P. K. *et al.* Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug Disc Today**, v. 22, n. 12, p. 1825-1834, 2017.
- MITTAL, G. *et al.* Pharmacodynamic Evaluation of Oral Estradiol Nanoparticles in Estrogen Deficient (Ovariectomized) High-Fat Diet Induced Hyperlipidemic Rat Model. **Pharm Res**, v. 26, n. 1, p. 218-223, 2009.
- MOHAMMAD, I. *et al.* Estrogen receptor α contributes to T cell-mediated autoimmune inflammation by promoting T cell activation and proliferation. **Sci Signaling**, v. 11, p. 1-12, 2018.
- MOHTADI, M. E. *et al.* Estrogen deficiency – a central paradigm in age-related impaired healing?. **EXCLI Journal**, v. 20, p. 99-116, 2021.
- MONDOCKOVA, V. The estrogen receptor 1 gene affects bone mineral density and osteoporosis treatment efficiency in Slovak postmenopausal women. **BMC Medic Genetic**, v. 19, n. 174, p. 1-13, 2018.
- MORAES, F. C. *et al.* Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. **Analyt Chim**, v. 881, p. 37-43, 2015.
- MUKAI, K. *et al.* Evaluation of Effects of Topical Estradiol Benzoate Application on Cutaneous Wound Healing in Ovariectomized Female Mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1-15, 2016.
- MUKAI, K. *et al.* Topical estrogen application to wounds promotes delayed cutaneous wound healing in 80-week-old female mice. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1-14, 2019.
- NAVAEI-NIGJEH, M. *et al.* Molecular and Biochemical Evidences for Beneficial Effects of Zinc Oxide Nanoparticles in Modulation of Chlorpyrifos Toxicity in Human Lymphocytes. **Iranian J Pharm Res**, v. 17, n. 3, p. 927-939, 2018.
- NETHI, S. K. *et al.* Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. **Biomaterial Sci**, v. 7, p. 2652-2674, 2019.
- PARANI, M. *et al.* Engineered Nanomaterials for Infection Control and Healing Acute and Chronic Wounds. **ACS App Mat Interf**, v. 8, p. 10049-10069, 2016.
- PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnol**, v. 16, n. 71, p. 1-33, 2018.
- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The Healing Power of Neutrophils. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 7, p. 635-647, 2019.
- PILLAI, A. M. *et al.* Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with antibacterial and antifungal activity. **J Mol Struct**, v. 1211, p. 1-8, 2020.

- PINZON-GARCIA, A. D. *et al.* Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice. **J Biom Mat Res Part B**, v. 105, p. 1938-1949, 2017.
- RACCA, L. *et al.* Zinc Oxide Nanostructures in Biomedicine. **Smart Nano Biomedic**, p. 171-187, 2018.
- RADWAN, F. A. A. Nanotechnology and medicine. **Mat Sci Nanotechnol**, v. 2, n.2, p. 10-11, 2018.
- RAJAN, S.; KREATSOULAS, C. A review of menopausal hormone therapy: recalibrating the balance of benefit and risk. **Polish Arch Int Med**, v. 129, n. 4, p. 276-280, 2019.
- RAJENDRAN, N. K. *et al.* A review on nanoparticle based treatment for wound healing. **J Drug Del Sci Technol**, p. 1-38, 2018.
- RAMOS, A. P. *et al.* Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysic Ver**, v. 9, p. 79-89, 2017.
- RAWSKI, R. I. *et al.* Regression Analysis in Analytical Chemistry. Determination and Validation of Linear and Quadratic Regression Dependencies. **South African J Chem**, v. 69, 166–173, 2016
- RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharm J**, v. 26, p. 64-70, 2018.
- RODRIGUES, M. *et al.* Wound healing: a cellular perspective. **Physiologic Ver**, v. 99, p. 665-706, 2019.
- RUNGELRATH, V.; KOBAYASHI, S. D.; DeLEO, F. R. Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. **Syst Biol Med**, v. 12, p. 1-30, 2019.
- RZEPECKI, A. K. *et al.* Estrogen-deficient skin: The role of topical therapy. **Int J Women's Dermatol**, v. 5, p. 85-90, 2019.
- SALIMI, F.; MOHAMMADIPANAH, F. Nanomaterials Versus The Microbial Compounds With Wound Healing Property. **Front Nanotechnol**, v. 2, p. 1-17, 2021
- SANDSTEAD, H. H. *et al.* Effects of Zinc Deficiency and Zinc Supplementation. **Am J Clin Nut**, v. 23, n. 5, p. 514-519, 1970.
- SANTORO, N.; EPPERSON, C. N. E.; MATHEWS, S. B. Menopausal Symptoms and Their Management. **Endocrinol Metabol Clinic North Am**, v. 44, n. 3, p. 497-515, 2015.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SELEIT, I. *et al.* Intrinsic versus Extrinsic Aging: A Histopathological, Morphometric and Immunohistochemical Study of Estrogen Receptor β and Androgen Receptor. **Skin Pharm Physiol**, v. 29, p. 178-189, 2016.

SELVAMANI, V. Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. **Charact Biol Nanomat Drug Del**, 2019.

SERRANO, D. R.; GALLAGHER, K. H.; HEALY, A. M. Emerging Nanonisation Technologies: Tailoring Crystalline Versus Amorphous Nanomaterials. **Current Topics Med Chem**, v. 15, p. 2327-2340, 2015.

SHAMHARI, N. M. *et al.* Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles with Small Particle Size Distribution. **Acta Chim Slovenica**, v. 65, p. 578-585, 2018.

SHANKAR, M. *et al.* Wound healing and it's importance- a review. **Der Pharm Sinica**, v. 1, n. 1, p. 24-30, 2014.

SHARMA, S. *et al.* The effect of shape and size of ZnO nanoparticles on their antimicrobial and photocatalytic activities: a green approach. **Bulletin Mat Sci**, v. 43, n. 20, p. 1-10, 2020.

SILVEIRA, G. S.; NOBRE, M. A. L.; LANFREDI, S. Síntese e caracterização estrutural de nanopartículas do tipo core/shell ZnO@ni. **Conf Paper**, p. 1-13, 2015.

SINGH, R. P. P.; HUDIARA, I. S.; RANA, S. B. Effect of calcination temperature on the structural, optical and magnetic properties of pure and Fe-doped ZnO nanoparticles. **Mat Sci-Poland**, v. 34, n. 2, p. 451-459, 2016.

SIRUMBAYEE, E.; ANUSUYA, S. Preparation of Zinc Oxide Nanoparticles using Azima tetracantha Lam. Leaf Extract and Its Potential for the Removal of Contaminants from Water. **J Nanosc Technol**, v. 6, n. 1, p. 862-865, 2020.

SORG, H. *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surg Res**, v. 58, p. 81-94, 2016.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SOUZA, P. M. S. *et al.* Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-e-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quim Nova**, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SOUZA, R. C. *et al.* Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by solochemical process. **Braz J Chem Eng**, v. 36, n. 2, p. 885-893, 2019.

TAKEUCHI, I. *et al.* Transdermal delivery of estradiol-loaded PLGA nanoparticles using iontophoresis for treatment of osteoporosis. **Bio-Med Mat Eng**, v. 27, p. 475-483, 2016.

TAVARES, M. R. *et al.* Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. **Polym Testing**, v. 60, p. 39-48, 2017.

TAZIMA, M. F. G. S.; ANDRADE, Y. A. M. V. Biologia da ferida e cicatriz. **Medicina**, v. 3, p. 259-264, 2008.

THORNTON, M. J. Estrogens and aging skin. **Dermato-Endocrinol**, v. 5, n. 2, p. 264-270, 2013.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **J Tissue Viab**, v. 26, p. 37-46, 2017.

TRACY, L.E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Adv wound care**, v. 5, n.3, p. 119-136, 2016.

ULIN, M. *et al.* Uterine fibroids in menopause and perimenopause. **J North Am Menopause Society**, v. 27, n. 2, p. 1-5, 2020.

UNNITHAN, A. R. *et al.* Electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats loaded with Estradiol for post-menopausal wound dressing. **Int J Biol Macromol**, v. 77, p. 1-8, 2015.

URIE, R. *et al.* Inorganic nanomaterials for soft tissue repair and regeneration. **Annual Rev Biomed Eng**, 20, 353–374, 2018.

VARDANYAN, R. S.; HRUBY, V. J. Female Sex Hormones. **Synth Essential Drugs**, p. 365–379, 2006.

VENKATASUBBU, G. D. Toxicity mechanism of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against food pathogens. **Coll Surf B:Biointerfaces**, v. 148, p. 600-606, 2016.

VILLA, A. *et al.* Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. **Nature**, v. 5, p. 1-14, 2015.

WANG, C. *et al.* Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Receptor Markers in Endometrial Cancer. **J Cancer**, v. 11, p. 1693-1701, 2020

WANG, N. *et al.* Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. **J Coll Interf Sci**, v. 407, p. 22-28, 2013.

WEBER, J. *et al.* Association of Borage Oil and Betamethasone Dipropionate in Lipid-Core Nanocapsules: Characterization, Photostability and In Vitro Irritation Test. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 16, n. 2, p. 1354-1362.

WEHBE, Z. *et al.* Estrogen and Bisphenol A in Hypertension. **Current Hypert Rep**, v. 22, p. 1-10, 2020.

WEI, W.; BAI, F.; FAN, H. Surfactant-Assisted Cooperative Self-Assembly of Nanoparticles into Active Nanostructures. **iScience**, v. 11, p. 272-293, 2019.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. The Role of Estrogen in Cutaneous Ageing and Repair. **Maturitas**, v. 103, p. 60-64, 2017.

XIE, J. *et al.* Simple fabrication and photocatalytic activity of ZnO particles with different morphologies. **Powder Technol**, v. 207, p. 140-144, 2011.

XU, L. *et al.* Stability and Reactivity: Positive and Negative Aspects for Nanoparticle Processing. **Chem Ver**, v. 118, p. 3209-3250, 2018.

YANG, Z.; XIE, C. Zn ²⁺ release from zinc and zinc oxide particles in simulated uterine solution. **Coll Surf B: Biointerfaces**, v. 47, p. 140-145, 2006.

YASAR, P. *et al.* Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. **Rep Med Biol**, v. 16, p. 4-20, 2016.

YEUNG, D. A.; KELLY, N. H. The Role of Collagen-Based Biomaterials in Chronic Wound Healing and Sports Medicine Applications. **Bioengineering**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2021.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. Determination of 17 b-estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. **Arabian J Chem**, v. 10, p. 1422-1428, 2017.

ZAK, A. K. *et al.* Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles prepared in gelatin media. **Mat Letters**, v. 65, p. 70-73, 2011.

ZHUGE, Y. *et al.* The effect of estrogen on diabetic wound healing is mediated through increasing the function of various bone marrow-derived progenitor cells. **J Vasc Surgery**, v. 68, n. 6, p. 127-135, 2018.

ZHOU, T. *et al.* Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting Proliferation of Epidermal Keratinocytes via Erk/Akt Signaling Pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, p. 959-968, 2016.

APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS



ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

ORIGINAL ARTICLE
Experimental Surgery

Evaluation of wound healing effect of alginate film containing *Aloe vera* gel and cross-linked with zinc chloride¹

Adriana Yuri Koga^I , Julio César Felix^{II} , Rodrigo Gomes Marques Silvestre^{III} , Leandro Cavalcante Lipinski^{IV} , Bruna Carletto^V , Fernanda Alexia Kawahara^{VI} , Ailton Vicente Pereira^{VII} 

^I Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Brazil. Technical procedures, analysis and interpretation of data, manuscript writing.

^{II} Professor, Director in Technology Institute of Paraná, Curitiba-PR, Brazil. Scientific, conception and design of the study.

^{III} Master, Industrial Director in Technology Institute of Paraná, Curitiba-PR, Brazil. Scientific, conception and design of the study.

^{IV} PhD, Associate Professor, Department of Medicine, UEPG, Ponta Grossa-PR, Brazil. Design of the study, technical procedures, statistical analysis, interpretation of data, critical revision, final approval.

^V Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, UEPG, Ponta Grossa-PR, Brazil. Technical procedures, manuscript writing.

^{VI} Master, Postgraduate Program in Biomedical Science, UEPG, Ponta Grossa-PR, Brazil. Design of the study, technical procedures.

^{VII} PhD, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Science, UEPG, Ponta Grossa-PR, Brazil. Design of the study, technical procedures, interpretation of data, manuscript writing, critical revision, final approval.

Abstract

Purpose: To develop a new wound dressing composed of alginate and Aloe vera gel and cross-linked with zinc ions.

Methods: The aloe-alginate film was characterized using scanning electron microscopy (SEM), swelling profile, mechanical properties, polysaccharide content and X-ray diffraction (XRD). Thirty Wistar rats were divided in two groups a) treated with aloe-alginate film and b) control (treated with sterile gauze). Wound contraction measurements and histological analysis were performed on 7th, 14th and 21st days after wound surgery.

Results: The aloe-alginate film presented adequate mechanical resistance and malleability for application as wound dressing. There was no statistical difference in wound contraction between two groups. Histological assay demonstrated that aloe-alginate film presented anti-inflammatory activity, stimulated angiogenesis on proliferative phase and a more significant increase in collagen type I fibers and decreased type III fibers which promoted a mature scar formation when compared to control.

Conclusions: The aloe-alginate film showed adequate physicochemical characteristics for wound dressing applications. The *in vivo* assay demonstrated that aloe-alginate film enhanced the healing process of incisional skin wounds.

Key words: Wound Healing. Aloe. Zinc. Rats.



Insulin nanocapsules orally administered in hyperglycemia rats alter the metabolic profile and intestinal histomorphology

Alteração do perfil metabólico e histomorfometria intestinal em ratos hiperglicêmicos tratados com nanocápsulas de insulina via oral

DOI:10.34117/bjdv7n1-705

Recebimento dos originais: 20/12/2020

Aceitação para publicação: 27/01/2021

Adriana Yuriko Koga

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: adri_yuriko@hotmail.com

Priscilla Vanessa Alves Santos

Mestranda em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: priscis21@gmail.com

Bruna Carletto

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: brunacarletto@hotmail.com

Marcos Noris Bernardes de Souza

Graduando em Medicina pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: marcos.noris.souza@gmail.com

Nicole Guimarães

Graduanda em Medicina pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: ni.guimaraes@yahoo.com.br

Dionízia Xavier Scomparin

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá. Docente do departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: scomparindio@hotmail.com

Marcos Ricardo da Silva Rodrigues

Pós-Doutor pela Yale University (EUA). Docente do departamento de Medicina da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: marcosrsr75@gmail.com



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 10, Issue, 08, pp. 39677-39683, August, 2020

<https://doi.org/10.37118/ijdr.19683.08.2020>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE TO BARBED POLYDIOXANONE AND POLYGLACTING 910 IN VAGINAL APEX AND ABDOMINAL APONEUROSIS SUTURE IN PIGS SUBMITTED TO HYSTERECTOMY

Gilmar Alves do Nascimento¹, Adriana Yuriko Koga², Alceu de Oliveira Toledo Junior³, Bruna Carletto⁴, Leandro Cavalcante Lipinski⁵, Mário Rodrigues Montemor Netto⁶, Laryssa De Col Dalazoana Baier^{7,*} and Ricardo Zanetti Gomes⁸

¹Master's Degree, Medicine Department, State University of Ponta Grossa, Brazil. Conception and design, data acquisition, technical procedures, manuscript writing, critical review

²Master's Degree, Pharmaceutical Sciences Post-Graduation Program, State University of Ponta Grossa, Brazil. Technical procedures, preparation of manuscripts

³Master's Degree, Clinical Analysis Department, State University of Ponta Grossa, Brazil. Data analysis and interpretation, biochemical parameters

⁴Master's Degree, Pharmaceutical Sciences Post-Graduation Program, State University of Ponta Grossa, Brazil. Technical Procedures, preparation of manuscripts

⁵PhD, Medicine Department, State University of Ponta Grossa, Brazil. Conception and Design, data analysis and interpretation, technical procedures, statistical analysis, critical review

⁶Master's Degree, Medicine Department, State University of Ponta Grossa, Brazil. Data analysis and interpretation, histopathological exams

⁷Master's Degree, Nursing Department, State University of Ponta Grossa, Brazil. Technical procedures, preparation of manuscripts

⁸PhD, Medicine Department, State University of Ponta Grossa, Conception and Design, relevant scientific and intellectual contributions to the study, critical review and final approval

ARTICLE INFO

Article History:

Received 11th May 2020

Received in revised form

19th June 2020Accepted 14th July 2020Published online 30th August 2020

Key Words:

Healing, Suture,
Inflammation,
Hysterectomy Dehiscence.

*Corresponding author:

Laryssa De Col Dalazoana Baier

ABSTRACT

The number of women submitted to hysterectomy grows every year. Such procedure can be carried out using different techniques regarding access, type of suture and the surgical thread used. Surgical threads play a relevant role in surgical practice and there is a great variety of materials with which they are produced. Therefore, they enable the use of different suture techniques, minimizing the tissue reaction and reducing the time needed for this procedure. This study aimed to demonstrate that both threads have similar characteristics and, therefore, we can suggest the use of Stratafix® for procedures that minimize surgical time is relevant (laparoscopic video surgeries, for example). This study carried out 16 abdominal hysterectomies in pigs, divided into two groups, eight using polydioxanone thread (Stratafix®) and the other eight using polyglactin 910 thread (Vicryl®). Blood samples were collected before the surgery, (D1) and in the collection of aponeurosis and vaginal Apex samples (D9). The blood samples, (D1 and D9) were submitted to the following examinations: Complete blood count and fibrinogen and C reactive protein measurement, to evaluate systemic inflammatory reaction. When the aponeurosis and vaginal apex samples (D9) were collected, the presence or absence of local adhesions or abscesses was observed, and then the material was sent to histological analysis, for the evaluation of fibrosis and fat encapsulation. Classification and attribution of indices to the histological findings and later characterization of the inflammatory process phase. In this study, we did not observe significant changes in the data analyzed in relation to both types of thread investigated.

Copyright © 2020, Gilmar Alves do Nascimento et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Gilmar Alves do Nascimento, Adriana Yuriko Koga, Alceu de Oliveira Toledo Junior, Bruna Carletto et al. "Biochemical and histological evaluation of the inflammatory response to barbed polydioxanone and polyglactin 910 in vaginal apex and abdominal aponeurosis suture in pigs submitted to hysterectomy", *International Journal of Development Research*, 10, (08), 39677-39683.

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

BRUNA CARLETTO¹, 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-ol) (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 $C_{30}H_{48}O_3$ [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

These results suggest that the stability of the emulsion is important for both safety and efficacy. Without stability, the cotton-tipped applicator can absorb more concentrated emulsion zones, which can lead to complications such as scars. Improved stability may provide more predictable, uniform effects and reduces the need for constant agitation, as previously required with the SEP formulation. Despite its widespread historical use, SEP can be replaced with an emulsifier that creates more stable phenol–croton oil formulas. With greater predictability of injury depth, NOV offers the possibility of improved efficacy and patient safety.

Aline da Silva Justo, PharmD, MSc,^a Bruna Mikulis Lemes, PharmD, MSc,^a Bruna Nunes, PharmD,^a Kevin Alves Antunes, PharmD,^a Bruna Carletto, PharmD, MSc,^a Adriana Yuriko Koga, PharmD, MSc,^a Leandro Cavalcante Lipinski, DVM, PhD,^b Mario Rodrigues Montemor Netto, MD, PhD,^b Eduardo Baumli Campagnoli, DMD, PhD,^c Flávio Luís Beltrame, PharmD, PhD,^a and Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD^d

From the Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Brazil^a; Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, Brazil^b; Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Brazil^c; and Department of Dermatology, Alpert School of Medicine of Brown University, Providence, Rhode Island.^d

Funding sources: None.

Disclosure: Dr Wambier is an advisor to Young Pharmaceuticals, Inc, and has a patent application regarding the emulsification of phenol–croton oil formulas. Drs Justo, Lemes, Nunes, Antunes, Carletto, Koga, Lipinski, Montemor Netto, Campagnoli, and Beltrame have no conflicts of interest to declare.

IRB approval status: Approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Ponta Grossa (CEUA/UEPG), approval no. 034/2017.

Reprint requests: Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD, Rhode Island Hospital, 593 Eddy St, APC, 10th Floor, Providence RI 02903

E-mail: carlos_wambier@brown.edu

REFERENCES

1. Wambier CG, Lee KC, Soon SL, et al. Advanced chemical peels: phenol–croton oil peel. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(2):327–336.

2. US Food & Drug Administration. FDA issues final rule on safety and effectiveness of consumer hand sanitizers. Available: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-issues-final-rule-safety-and-effectiveness-consumer-hand-sanitizers>; 2019. Accessed October 17, 2019.
3. Baker TJ. Chemical face peeling and rhytidectomy. A combined approach for facial rejuvenation. *Plast Reconstr Surg Transpl Bull*. 1962;29:199–207.
4. Lee KC, Sterling JB, Wambier CG, et al. Segmental phenol–croton oil chemical peels for treatment of periorbital or perioral rhytides. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(6):e165–e166.
5. Zhang XL, Khan AA, Wang L, Yu K, Li F, Wang MK. Four new phorbol diesters from *Croton tiglium* and their cytotoxic activities. *Phytochem Lett*. 2016;16:82–86.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.02.064>

A prospective comparison of cutaneous sarcoidosis disease response to immunomodulatory and immunosuppressive therapies



To the Editor: Sarcoidosis is a multisystem disease of unknown etiology characterized by granulomatous infiltrates resulting in organ dysfunction. Skin involvement occurs in 25% to 35% of patients and significantly decreases quality of life, resulting in the need to identify effective treatments for cutaneous sarcoidosis (CS).¹

Data on optimal treatment regimens for systemic therapies are limited.² Our primary objective was to investigate CS response to hydroxychloroquine; tetracycline antibiotics doxycycline and minocycline; methotrexate; and tumor necrosis factor- α inhibitors (TNFi) infliximab and adalimumab. Secondarily, we assessed disease response in patients with lupus pernio, an important CS morphologic subtype associated with chronic, recalcitrant disease.¹

Patients were recruited from the University of Pennsylvania CS clinic from December 15, 2013, through February 15, 2019. All patients had biopsy-proven CS and were offered enrollment prospectively during standard-of-care clinic visits. A characteristic facial lesion (infiltrative plaques; dermal papules; or nodules on the nose, cheeks, or central face, with or without scaling) with biopsy-proven sarcoidosis signified lupus pernio. Data were prospectively collected and managed using Research Electronic Data Capture (REDCap) software.³ The University of Pennsylvania Healthcare System institutional review board approved this study, and all participants provided consent.

A total of 61 patients undergoing initial trials of hydroxychloroquine, tetracyclines, methotrexate, and/or TNFi for CS were identified. Of these,



Evaluation of cutaneous wound healing effect of associated zinc oxide (ZnO) and estrogen (E2) nanoparticles

Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas tratadas com a associação de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e estrógeno (E2)

DOI:10.34117/bjdv7n3-790

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

Adriana Yuriko Koga

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: adri_yuriko@hotmail.com

Bruna Carletto

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: brunacarletto@hotmail.com

Paulo Vitor Farago

Doutor em Química pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Docente do departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: pvfarago@gmail.com

Leandro Cavalcante Lipinski

Doutor em Clínica Veterinária pela Universidade de São Paulo (USP). Docente do departamento de Medicina da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84.030-900 - Ponta Grossa – PR

E-mail: leandrolipinski@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de nanopartículas de estrógeno (EN) e óxido de zinco (ZnON) em feridas cutâneas de ratas ooforectomizadas. O ensaio animal foi realizado com 90 ratas Wistar divididas igualmente em 6 grupos: controle ooforectomizado (CO), grupo tratado com nanopartículas sem o fármaco (PCLN), grupos tratados com ZnOC 2.5 + EC 0.06; ZnON 2.5 + EN 0.06; ZnOC 5.0 + EC 0.12 and ZnON 5.0 + EN 0.12. Foi realizada análise da retração da lesão, parâmetros hematológicos, quantificação de infiltrado inflamatório e fibras colágeno tipo I e III. Não foi possível observar diferença estatística na taxa de retração da lesão, no entanto a análise hematológica de linfócitos e neutrófilos apresentou baixo efeito sistêmico nos grupos tratados com as nanopartículas associadas. A quantificação de células inflamatórias mostrou que houve uma melhor modulação da inflamação no grupo tratado com ZnON 5.0 + EN 0.12. Esses resultados mostraram que o tratamento tópico com a associação de nanopartículas de estrógeno e

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 014/2018
Protocolo UEPG – 7311/2018

Título – Projeto de pesquisa “Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante de sistema de liberação nanoparticulados contendo 17-Beta estradiol e óxido de zinco e solicitação de uso de animais”

Interessado, Prof. Dr. Leandro Lipinski (DEMED, leandrolipinski@yahoo.com.br)

Data de Entrada – 04/05/2018

Prezado Professor Leandro

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da utilização de 225 (duzentos e vinte e cinco) ratos wistar fêmeas com peso aproximado de 250 g

Ponta Grossa, 22 de junho de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA – Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. *Monika Kover Scarpazzin*
Coordenadora

Prof. Carlos Cavalcanti, n. 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264