



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de
hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras**

DEBORA CRISTINE CHRISOSTOMO DIAS

Rio Grande, 2025



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de
hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras**

DEBORA CRISTINE CHRISOSTOMO DIAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande, como
requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiana Lima Dora

Rio Grande, 2025

DEBORA CRISTINE CHRISOSTOMO DIAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade Federal do Rio
Grande, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde

**Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento
de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras**

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Daniela Ramos – FURG

Prof. Dr. Helder Teixeira – Externo

Prof. Dr. Martín Desimone (Suplente) – FURG

Prof(a). Dr(a). Cristiana Lima Dora – FURG

Rio Grande, 2025

Ficha Catalográfica

D541n Dias, Debora Cristine Chrisostomo.

Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras / Debora Cristine Chrisostomo Dias. – 2025.

73 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2025.

Orientadora: Dra. Cristiana Lima Dora.

1. Queimaduras 2. Hiperpigmentação pós-inflamatória
3. Nanoemulsão 4. Curcumina 5. Polihexametileno biguanida
I. Dora, Cristiana Lima II. Título.

CDU 616.5-001.17

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

AGRADECIMENTOS

Com certeza, a primeira pessoa a quem agradeço por toda a jornada que vivi até aqui é ao meu pai, Antônio Sérgio dos Santos Dias. O primeiro a abrir as portas do mundo pra mim e reforçar a importância dos estudos na nossa construção como indivíduos. Ele nunca mediu esforços para que eu e minhas irmãs tivéssemos tudo o possível para sempre seguir em frente. A ele, minha eterna admiração.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Cristiana Lima Dora, que não me conhecia e mesmo assim me acolheu, me ouviu e me consolou, sempre com muito carinho durante essa jornada do mestrado. Você ampliou meu horizonte, abriu portas, oportunidades e, acima de tudo, acreditou na minha capacidade e desempenho. Obrigada.

Ao Labnano e todos os colegas de laboratório. Que me apoiaram, me ensinaram, me guiaram, me escutaram e me orientaram em todo esse mundo, até então, novo pra mim. Tenho muito a agradecer a todos e prefiro não citar nomes por receio de não fazer jus à importância de cada um. Vocês foram essenciais.

À Profa. Dra. Elizandra Braganhol, pela alegria, entusiasmo, recepção e expertise demonstrados e conhecidos no momento de mobilidade discente que realizei em seu laboratório na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA. E, claro, meu agradecimento à sua equipe, que me ensinou muito. Sem esse aprendizado, não teria conseguido avançar nesse projeto.

À Profa. Dra. Daniela Ramos, que se tornou uma grande torcedora, colaboradora, incentivadora e amiga neste processo de desenvolvimento do trabalho. Suas palavras de sabedoria, suporte e abraços, foram reconfortantes nos momentos difíceis. Obrigada por literalmente segurar minha mão, e não deixar eu duvidar de mim.

Ao Prof. Dr. Martín Desimone, e a equipe e integrantes do Laboratório de NanoBioMateriais da Faculdade de Farmácia y Bioquímica na Universidade de Buenos Aires – UBA. Todos vocês foram “*tremendos*”. Mesmo com a barreira linguística, foram amistosos, pacientes, e excelentes professores. Muito Obrigada. A experiência foi inesquecível. E para finalizar, um agradecimento especial ao companheiro, namorado e amigo Wylham Klein. Você esteve comigo nesses últimos 2 anos, me ouviu, me aconselhou, me apoiou e nunca deixou de me incentivar a conquistar tudo o que almejo. Você é a minha melhor torcida. A todos meus amigos que fizeram parte dessa jornada, meu profundo agradecimento. Sem vocês, eu jamais teria chegado até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Pele.....	14
2.2 Queimaduras	15
2.3 Hiperpigmentação Pós-inflamatória (HPI)	21
2.3.1 Melanogênese	23
2.4 Tratamento de Hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras e suas limitações.	25
2.5 Curcumina.....	28
2.6 Nanotecnologia no tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras – Uso da curcumina (CUR) e do Polihexametileno biguanida (PHMB)	30
3. OBJETIVOS	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

ARTIGO. Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como barreira, mantendo a homeostase. As queimaduras cutâneas comprometem essa função, impactando a cicatrização e a qualidade estética da pele, além de gerar efeitos psicológicos. O tratamento atual prioriza a cicatrização e a sobrevivência, sem considerar adequadamente as sequelas, como a hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI). Este estudo propõe o desenvolvimento de nanoemulsões (NEs) associando curcumina (CUR) e polihexametileno biguanida (PHMB), visando acelerar a cicatrização e melhorar a qualidade da cicatriz. No entanto, a hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade da CUR e a toxicidade do PHMB limitam suas aplicações. A nanoencapsulação surge como estratégia para superar essas barreiras, promovendo maior solubilidade, biodisponibilidade e diminuição da toxicidade. Neste trabalho, as nanoemulsões foram desenvolvidas por homogeneização a alta pressão e sua estabilidade físico-química foi avaliada por 30 dias. Além disso, foram testadas as atividades antioxidante e antimicrobiana, a viabilidade celular e o potencial despigmentante. Ainda, foi realizada a padronização de um modelo de queimadura em pele suína ex-vivo. As NEs permaneceram estáveis, com tamanho de partícula aproximado de 200 nm, baixo índice de polidispersão e potenciais zeta negativo para formulações contendo apenas CUR e positivo quando o PHMB foi adicionado, sugerindo sua localização na interface das gotículas. A CUR apresentou potencial antioxidante e este se manteve após o processo de nanoencapsulação. As formulações contendo PHMB inibiram totalmente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando potencial antimicrobiano. O teste de viabilidade celular indicou a faixa de concentração que poderia ser usada sem causar toxicidade as células. Na avaliação do potencial despigmentante, foi observado que o PHMB teve potencial de inibir a tirosinase, enquanto as formulações contendo CUR e PHMB inibiram a melanogênese. A análise histológica revelou que os parâmetros testados indicaram a presença de queimadura superficial de grau I. Os resultados sugerem que as nanoformulações contendo PHMB e CUR podem ser uma alternativa promissora para o tratamento da HPI associada a queimaduras.

Palavras-chave: queimaduras, hiperpigmentação pós-inflamatória, nanoemulsão, curcumina, polihexametileno biguanida.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and acts as a barrier, maintaining homeostasis. Cutaneous burns compromise this function, impacting wound healing, aesthetic skin quality, and causing psychological effects. Current treatments prioritize wound healing and survival, often neglecting post-inflammatory sequelae, such as post-inflammatory hyperpigmentation (PIH). This study proposes the development of nanoemulsions (NEs) incorporating curcumin (CUR) and polyhexamethylene biguanide (PHMB) to accelerate wound healing and improve scar quality. However, CUR's hydrophobicity and low bioavailability, as well as PHMB's toxicity, limit their applications. Nanoencapsulation emerges as a strategy to overcome these barriers by enhancing solubility, bioavailability, and reducing toxicity. In this study, NEs were developed using high-pressure homogenization, and their physicochemical stability was assessed over 30 days. Additionally, their antioxidant and antimicrobial activities, cell viability, and depigmenting potential were evaluated. A standardized ex vivo porcine skin burn model was also established. The NEs remained stable, with an average particle size of approximately 200 nm, a low polydispersity index, and a negative zeta potential for formulations containing only CUR, which shifted to positive when PHMB was added, suggesting its localization at the droplet interface. CUR exhibited antioxidant potential, which was maintained after nanoencapsulation. Formulations containing PHMB completely inhibited *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrating antimicrobial potential. The cell viability assay determined a concentration range that could be used without causing cytotoxicity. In the depigmenting potential assessment, PHMB inhibited tyrosinase activity, while formulations containing both CUR and PHMB inhibited melanogenesis. Histological analysis indicated that the tested parameters were consistent with first-degree superficial burns. The results suggest that PHMB- and CUR-containing formulations may be a promising alternative for the treatment of PIH associated with burns.

Keywords: burns, post-inflammatory hyperpigmentation, nanoemulsion, curcumin, polyhexamethylene biguanide.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO: Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras

Tabela 1: Constituição das formulações

Tabela 2: Teor total das NEs

Tabela 3: Estabilidade das NEs ao longo de 30 dias, armazenadas em temperatura de 4°C e 25°C.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Anatomia e organização estrutural da pele humana

FIGURA 2: Representação esquemática das queimaduras e sua progressão conforme a profundidade do dano tecidual

FIGURA 3: Fases do processo de cicatrização cutânea

FIGURA 4: Estrutura química do Polihexametileno Biguanida (PHMB)

FIGURA 5: Hiperpigmentação pós-inflamatória decorrente de queimadura térmica

FIGURA 6: Principais vias de sinalização na regulação da melanogênese

FIGURA 7: Estruturas químicas de agentes despigmentantes

FIGURA 8: Esquema das rotas de permeação cutânea

FIGURA 9: Representação esquemática dos principais nanocarreadores lipídicos

ARTIGO: Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória após queimaduras

FIGURA 1: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NEs analisadas

FIGURA 2: Avaliação da atividade antioxidante das formulações pelo ensaio de inibição do radical livre DPPH

FIGURA 3: Avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 24h e 48h

FIGURA 4: Viabilidade celular (ensaio MTT) de células de queratinócitos humanos (HaCat), em 24h, 48h e 72h

FIGURA 5: Ensaio Scratch.

FIGURA 6: Percentual de atividade da tirosinase de cogumelo

FIGURA 7: Percentual do potencial inibidor de melanina total em células B16F10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK – Ácido kójico

CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados

CUR – Curcumina

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EB – Estrato Basal

EC – Estrato córneo

EE – Estrato espinhoso

EG – estrato granuloso

EL – Estrato lúcido

HAP – Homogeneização de alta pressão

HIP – Hiperpigmentação pós-inflamatória

MTT - Sal brometo de 3,(4,5-dimetil)-2,5difetil-tetrazólio (MTT)

NaOH – Hidróxido de sódio

NE – Nanoemulsão NE (A/O) – Nanoemulsão água em óleo

NE-BR – Nanoemulsão branca

NE-CUR – Nanoemulsão contendo curcumina

NE-CUR-PHMB – Nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno de biguanida

NE (O/A) – Nanoemulsão óleo em água

NE-PHMB – Nanoemulsão contendo polihexametileno de biguanida

NLS - nanopartículas sólidas lipídicas

PDI – Índice de polidispersão

PHMB - Polihexametileno de biguanida

SBF - Soro fetal bovino

TCM – Triglicerídeo de cadeia média

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como barreira entre o interior e o exterior do organismo, sendo altamente impermeável. Dividida em várias camadas e dois principais tecidos, epiderme e derme, esta barreira é considerada a primeira linha de defesa contra possíveis patógenos, lesões químicas e físicas (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008). Na epiderme, há a presença de melanócitos, células muito importantes pois auxiliam na proteção do DNA contra os raios UV e termorregulação, uma vez que produzem a melanina, principal responsável pela pigmentação cutânea (AN; KOH; BOO, 2009). A preservação da integridade e saúde da pele é essencial para que ela desempenhe adequadamente suas funções de barreira protetora, contribuindo para a manutenção da homeostase corporal. No entanto, devido às agressões diárias enfrentadas por este órgão, sua integridade pode ser comprometida resultando em lesões (BENTO-LOPES et al., 2023).

As queimaduras são lesões cutâneas que variam de gravidade devido a profundidade, extensão do corpo queimada e região do tecido atingido (SEBASTIÃO; SAMPAIO, 2007). Estas lesões podem desencadear diversos distúrbios físicos e mentais no indivíduo, sendo agravados quando acometidos em regiões do corpo mais visíveis (MORGAN et al., 2018). A hiperpigmentação pós-inflamatória é uma complicação comum em indivíduos com queimadura durante a cicatrização, sendo mais evidente naqueles de fototipos mais altos III-VI (pele mais escura). No entanto, não se sabe exatamente os mecanismos que levam a esta hiperpigmentação, mas sabe-se que o resultado é a produção excessiva e deposição desordenada de melanina nas camadas da pele (ZHONG et al., 2008) e acredita-se que seja causado pelo aumento de atividade inflamatória local (SCHWACHA et al., 2010). Apesar de não ser considerada um distúrbio fatal, ela acaba interferindo na saúde emocional e psicológica do indivíduo (LUPON et al., 2022).

Várias opções de tratamento estão disponíveis no mercado para hiperpigmentação, mas poucos visam o tratamento de hiperpigmentação pós inflamatória após queimaduras. Além disso, os tratamentos tópicos disponíveis que apresentam melhora na uniformidade de coloração da pele necessitam de grande período de tempo -até 2 anos- para obter resultado e apresentam alta toxicidade sendo associados a efeitos adversos (eritema, dermatite de contato, piora da hiperpigmentação, entre outros) (NAUTIYAL; WAIRKAR, 2021).

Neste contexto, o estudo de compostos naturais tem sido abordado como alternativa para o tratamento tópico desta condição, procurando aumentar a eficácia, otimizar o tempo de

tratamento e reduzir os efeitos colaterais. A curcumina (CUR) é derivado da *Curcuma longa*, e tem sido bastante estudada ao longo dos anos, devido suas propriedades farmacológicas. É documentado na literatura que este composto apresenta propriedades anti-inflamatórias (MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022), aumenta a proliferação de fibroblastos e possui atividade antimicrobiana (HEWLINGS; KALMAN, 2017; GERA et al., 2017). Além disso, alguns artigos relatam que a CUR pode ser um promissor agente despigmentante, uma vez que age como inibidor de tirosinase (enzima ativa na síntese de melanina).. No entanto, algumas propriedades limitam a utilização da CUR em formulações dermatológicas, entre elas à baixa solubilidade e instabilidade à luz UV visível.

Ainda, em uma formulação destinada para o tratamento de queimaduras a utilização de compostos com atividade antimicrobiana é importante pois, frequentemente o leito da queimadura é infectado por bactérias oportunistas e/ou endógenas, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O polihexametilenobiguanida (PHMB) é um potente antimicrobiano utilizado como antisséptico na medicina, em cosméticos e no meio ambiente como desinfetante. Ele é eficaz contra bactérias planctônicas Gram- positivas e Gram-negativas, bem como biofilmes e uma variedade de outras espécies, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Acanthamoeba* (KAEHN, 2010). Apesar de ser considerado tóxico mesmo em concentrações reduzidas (REMBE et al., 2016), é bem tolerado na pele, olhos, nariz, epitélio ciliado e feridas, e não apresentou efeitos sensibilizantes ou fotossensibilizantes em testes em animais (HUBNER & KRAMER, 2010), porém uma diminuição na sua toxicidade é uma busca interessante. Logo, torna-se um desafio adotar novas estratégias de entrega destes dois compostos (WAGHULE et al., 2020; DEL PRADO et al., 2019; GERA et al., 2017).

Visando a melhora dessas propriedades limitantes, a nanotecnologia surge na indústria farmacêutica, com o desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos, com o objetivo de melhorar a capacidade de incorporação desses ativos em formulações dermatológicas, aumentar o tempo de liberação dos ativos e a penetração cutânea, além de melhorar sua estabilidade e minimizar possíveis reações adversas (DRAGICEVIC & MAIBACH, 2018).

Um dos trabalhos mais recentes do nosso grupo, desenvolvido por MARTINS e colaboradores (2024), propôs o desenvolvimento de hidrogéis de hidroxietilcelulose (HMC) e de quitosana (QUI) e a incorporação com nanoemulsão (NE) contendo curcumina (CUR) e polihexametileno biguanida (PHMB), visando o tratamento de feridas cutâneas. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a NE apresentou características físico-químicas adequadas para aplicação tópica, não causando alterações bioquímicas na pele e melhorando sua função

de barreira. Já os hidrogéis contendo esta NE, mostraram maior adesão após a incorporação das NEs e ausência de irritação, indicando o potencial promissor da NE-CUR- PHMB e sua incorporação em hidrogéis para uso tópico (MARTINS et al., 2024).

Diante disso, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia das nanoemulsões contendo CUR e PHMB, para tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória após queimaduras, visando uma alternativa no manejo dessas lesões.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pele

A pele atua como uma barreira bidirecional para impedir a passagem interna ou externa de água e eletrólitos. É o maior órgão do corpo humano, desempenhando diversas funções essenciais incluindo: a barreira protetora entre o corpo e o meio ambiente (microrganismos, radiação, estímulos químicos e físicos), a manutenção da homeostase corporal, a síntese de vitamina D, a provisão de uma barreira imunológica e a contribuição para as sensações táteis e dolorosas (MORGAN et al., 2017; LIN et al., 2022; MOHD ZAID et al., 2023).

É um tecido composto por duas camadas anatômicas distintas denominadas epiderme e derme. A epiderme (figura 1) ou camada avascular é a mais externa e apresenta na diversidade celular, em sua maioria, queratinócitos, mas também, células de Langherans, células de Merkel, linfócitos e melanócitos. A epiderme é um epitélio em contínua renovação, geralmente subdividido em várias camadas ou estratos, começando com o estrato basal (EB), limitante entre a epiderme e derme; estrato espinhoso (EE); estrato granuloso (EG); estrato lúcido (EL) presente somente em regiões de pele mais espessa e o estrato córneo (EC), em contato direto com o ambiente externo (BENTO-LOPES et al., 2023, MORGAN et al., 2021). Sua principal função é proteger a pele das agressões ambientais diárias, fornecendo barreira física, química, bioquímica e imunológica. Sua matriz biológica é composta por uma mistura de lipídios, que desempenha papel crucial na neutralização da perda de água e sais da pele, bem como na prevenção da penetração de substâncias solúveis em água, atuando como uma barreira de permeabilidade (BARONI et al., 2012).

A derme ou camada vascular germinativa, é composta majoritariamente por tecido conjuntivo rico em colágeno, fibroblastos e macrófagos. Células essas muito importantes durante a renovação celular e defesa imunológica. Possui ainda nervos, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas (BARONI et al., 2012; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019). A camada dérmica ainda é capaz de produzir novas células epiteliais para substituir aquelas perdidas na epiderme, sendo este um processo natural e constante, que pode intervir em maior proliferação quando necessária, seja para rejuvenescimento ou acometimento por alguma lesão (BARONI et al., 2012; CHURCH et al., 2006).

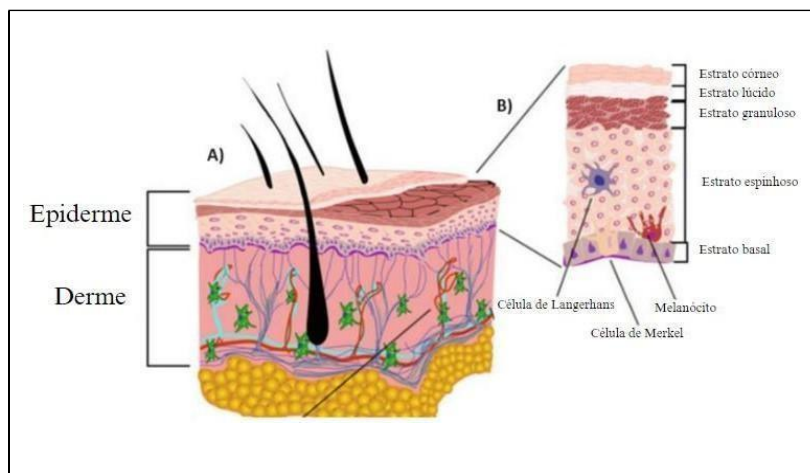


Figura 1: Anatomia e organização estrutural da pele humana. (A) Epiderme, camada mais externa, avascular e predominantemente celular, responsável pela renovação da barreira cutânea. Derme, camada profunda, vascularizada e rica em matriz extracelular, onde se encontram folículos pilosos, glândulas e terminações nervosas. **(B)** A epiderme é continuamente renovada, com o estrato basal constituído por células-tronco que proliferam e diferenciam-se em queratinócitos, os quais migram e maturam nos estratos superiores (espinhoso, granuloso, lúcido e córneo). A imagem destaca melanócitos, produtores de melanina, células de Langerhans e células de Merkel. Fonte: Adaptado de Limbert, 2019.

Visto sua importância, para que a pele desempenhe sua homeostase, é imprescindível que ela se mantenha íntegra. Contudo, diversas adversidades podem ocasionar sua ruptura, resultando em interrupções na continuidade da epiderme e das camadas mais profundas, originadas por doenças, intervenções cirúrgicas, danos físicos e térmicos (como queimaduras). Essas interrupções podem ser diferenciadas em crônicas ou agudas, conforme o tempo de cicatrização. Lesões crônicas surgem quando o processo reparador não ocorre de maneira oportuna, aumentando o risco de recorrência, uma vez que o corpo humano é suscetível a condições locais e sistêmicas que podem afetar negativamente o reparo da pele. Entre essas condições estão o estresse, a nutrição inadequada, o consumo de álcool e tabaco, a idade avançada, a hipóxia, alterações hormonais, doenças crônicas, predisposições genéticas e, claro, infecções (GUO et al., 2010). Em contrapartida, as feridas agudas – geralmente decorrentes de lesões mecânicas – tendem a cicatrizar completamente dentro de um intervalo de tempo previsível, representando, assim, um cenário de reparo mais eficiente (OLUTOYE *et al.*, 2023).

Neste trabalho, abordaremos as queimaduras de forma mais detalhada, suas distintas classificações e possíveis intervenções tópicas a serem utilizadas para melhora no seu processo de cicatrização.

2.2 Queimaduras

Queimaduras são lesões traumáticas e agudas, resultantes da exposição a agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos, os quais afetam o tecido cutâneo. Essas lesões podem resultar na destruição parcial ou total da pele, podendo também afetar estruturas adjacentes como músculos, tendões e até mesmo os ossos (SEBASTIÃO; SAMPAIO, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as queimaduras estão associadas com altas taxas de morbimortalidade, limitação funcional, desfiguração e estigma social. Estima-se que ocorram cerca de 180 mil mortes por ano devido a queimaduras, principalmente em países de baixa e média renda (OMS, 2018). Em nível nacional, a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), estima que ocorram em torno de 1.000.000 de acidentes por queimaduras ao ano, em todo o território. Dentre esses casos, cerca de 100.000 procuram tratamento hospitalar e destes, 2.500 vão a óbito (SUS, 2017).

As queimaduras têm o poder de desencadear uma série de distúrbios físicos, afetando o equilíbrio orgânico e emocional do paciente. Estes incluem dor, perda de volume de líquidos, alterações metabólicas, deformidades corporais, risco de infecções, perda de qualidade de vida e capacidade de retorno ao trabalho, causando problemas psicológicos e perdas físicas e materiais (MORGAN *et al.*, 2018). Logo, a aplicação de um tratamento eficaz e precoce poderia minimizar essas sequelas (JESCHKE *et al.*, 2020).

Embora existam situações que podem resultar em queimaduras e a pele tolerar uma temperatura média de até 44°C, a maioria das queimaduras ocorrem devido ao contato com líquidos quentes derramados, chamas ou materiais sólidos aquecidos (JESCHKE *et al.*, 2020). Dependendo do agente térmico, do tempo de contato, pressão exercida, bem como da profundidade e das camadas de tecido afetadas, as queimaduras podem ser classificadas em diferentes graus de comprometimento (figura 2) (MARKIEWICZ- GOSPODAREK *et al.*, 2022):

- Grau I: Queimaduras superficiais – Tempo de cicatrização: 5 a 10 dias. Afetam apenas a epiderme, acompanhado de vermelhidão, leve inchaço e dor transitória e aparentemente, não deixam cicatrizes visíveis. Típica de queimadura solar superficial.
- Grau II: Queimaduras superficiais de espessura parcial. Danificam tanto a epiderme como a derme, podendo ser subdivididas em dois tipos:
 - IIA: Tempo de cicatrização: 14 a 21 dias. Afetam a epiderme e camadas superficiais da

derme, acompanhadas de bolhas dolorosas que se formam devido à separação da epiderme da membrana basal.

- IIB: Tempo de cicatrização: 21 a 35 dias. Afetam a epiderme e camadas dérmicas em diferentes profundidades, podendo resultar em vermelhidão, umidade e dor intensa. Podem causar distúrbios no processo de cicatrização e, em alguns casos, deixar cicatrizes.
- Grau III: Queimaduras profundas de espessura total. Tempo de cicatrização: variável. Danificam completamente a espessura da pele, resultando em pele seca, dura e com coloração marrom, bronze ou vermelha. Devido à destruição das terminações nervosas, há ausência de dor. Este tipo de queimadura exige tratamento cirúrgico ou reconstrutivo para recuperação adequada.
- Grau IV: Queimaduras de espessura total incluindo tecidos mais profundos. Tempo de cicatrização: variável. Caracterizam-se pela destruição da epiderme, derme, hipoderme e estendendo-se até músculos e ossos. Queimadura mista, pois combina as características das queimaduras de grau III e IV. Podem requerer tratamento conservador e/ou cirúrgico, dependendo da extensão da gravidade da lesão.

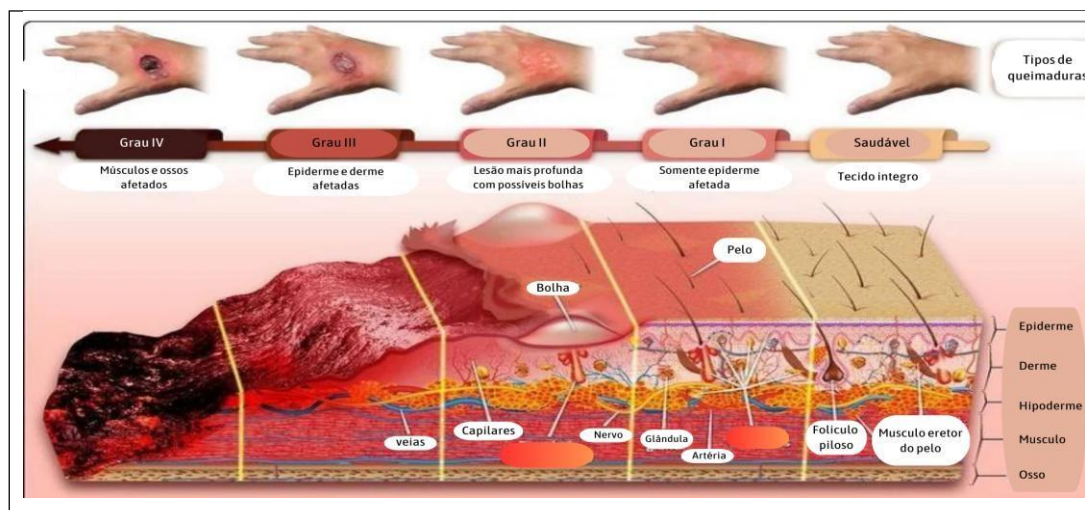


Figura 2: Representação esquemática das queimaduras e sua progressão conforme a profundidade do dano tecidual. A imagem ilustra a estrutura histológica da pele saudável e os diferentes graus de queimaduras, classificados de acordo com a extensão do acometimento dos tecidos. Além disso, a imagem também destaca componentes estruturais da pele, como vasos sanguíneos, nervos, glândulas, folículos pilosos e músculos eretores do pelo, evidenciando o impacto das queimaduras nesses elementos histológicos (Adaptado de Farokhi, 2018).

Portanto a cicatrização de uma queimadura, demora mais ou menos tempo, dependendo do agente causador, grau da lesão e tempo de exposição ao agente causador. A cicatrização é um fenômeno dinâmico, complexo e desafiador. Uma vez que, requer equilíbrio entre os

processos inflamatórios e proliferativos para promover uma recuperação eficaz e regeneração adequada dos tecidos afetados, iniciando assim que ocorre o trauma. (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; MALIK et al., 2019). Para que esse fenômeno ocorra, 3 diferentes estágios principais devem acontecer sucessivamente. Essa regulação intrincada assegura uma cicatrização eficiente e coordenada nas lesões (figura 3) (KULAC et al., 2013; MALIK et al., 2019; MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022).

- 1- Inflamação: Estágio inicial que dura até uma semana. É marcado por resposta vascular que visa estabilizar a hemostasia por meio da formação de coágulos sanguíneos e facilitar a rápida renovação tecidual. Durante este processo, moléculas são liberadas por células lesionadas atuando como quimioatraentes para leucócitos, que desempenham papéis cruciais na remoção de agentes infecciosos e na liberação de interleucinas pró (IL-1, IL-2, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa e beta) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) e interferon-gama (INF-gama) (MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022). A constante sinalização intercelular regula a liberação de citocinas, permitindo um controle de *feedback* em tempo real durante este estágio.
- 2- Proliferação: Inicia-se após a fase inflamatória e geralmente ocorre nas duas semanas seguintes. Caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, marcando transição para este estágio. Os principais eventos incluem ativação de fibroblastos, responsáveis pela produção de colágeno e outras matrizes extracelulares e neoangiogênese, estimulada a partir de fatores de crescimento (FGF, PDGF, EGF, TGF e VEGF) para fornecer nutrientes ao novo tecido em formação.
- 3- Remodelação: A terceira e última fase, que pode se estender por até dois anos, visa restaurar a morfologia e a função do tecido. Durante este estágio, ocorre a reorganização gradual do tecido de cicatrização, com aumento da força e da flexibilidade do tecido cicatricial, mas sem a restauração completa das características do tecido original.

A infecção, como a septicemia, é mais comum nos primeiros 10 dias após a queimadura, podendo ser causada por fungos, vírus e bactérias (SOUTO et al., 2020). A infecção é diagnosticada quando a carga microbiana na queimadura ultrapassa 10^5 UFC/g de tecido, enquanto valores inferiores, sem sinais inflamatórios evidentes, indicam apenas colonização (KUMARI; NANDA, 2023). O diagnóstico clínico é desafiador, pois sinais como dor e eritema podem ocorrer mesmo sem infecção, uma vez que pacientes queimados frequentemente apresentam um estado pró-inflamatório (CABIASO-DANIEL et al., 2018). Inicialmente, a colonização ocorre por bactérias Gram-positivas da microbiota cutânea, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (CHURCH et al., 2006). Com a progressão, bactérias Gram-

negativas endógenas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, tornam-se predominantes, podendo ser adquiridas por contato com superfícies contaminadas e manipulação inadequada (MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022; KELLY et al., 2022). Esses microrganismos iniciam mecanismos de sobrevivência, como adesão às células hospedeiras, evasão do sistema imune e formação de biofilmes, dificultando o tratamento (SOUTO et al., 2020). Queimaduras extensas (> 20% da área corporal) aumentam o risco de complicações sépticas, elevando custos, tempo de internação e mortalidade (MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022).

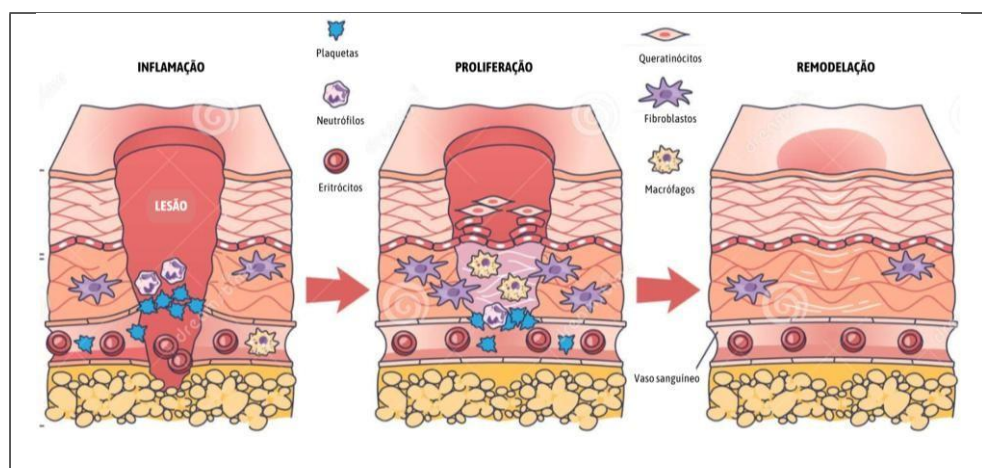


Figura 3: Fases do processo de cicatrização cutânea. A fase inflamatória envolve hemostasia, liberação de citocinas e migração de leucócitos para a área lesionada. Na fase proliferativa, ocorre proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, além da deposição de matriz extracelular e angiogênese. A fase de remodelação é caracterizada pela reorganização da matriz extracelular, substituição do colágeno III por colágeno I e apoptose de células provisórias. Fonte: Adaptado de GUSHIKEN, 2021.

Sabendo que a queimadura é frequentemente infectada por microrganismos, é de extrema importância a presença de antimicrobianos para o seu tratamento. Um exemplo é o polihexametileno biguanida (PHMB). O PHMB foi inicialmente sintetizado nos laboratórios da ICI Ltda. em meados de 1950 e introduzido na prática médica, para fins de tratamento antisséptico, aproximadamente 40 anos depois. Trata-se de um polímero catiônico de biguanida e seu mecanismo de ação se baseia na interação com a membrana celular das bactérias, uma vez que ele se liga aos fosfolipídicos da membrana que são carregados negativamente, causando alterações na estrutura. O PHMB promove o aumento da distância entre as moléculas lipídicas da membrana, interferindo na função adequada das bombas iônicas, diversas enzimas e receptores bacterianos. Além disso, ele induz à rigidez da bicamada lipídica, resultando em um aumento da permeabilidade celular. Mecanismo esse eficaz principalmente, contra bactérias Gram-negativas, que possuem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS), facilitando a atração e interação com compostos catiônicos. (BABALSKA; KORBECKA-PACZKOWSKA; KARPINSKI, 2021),

agindo como excelente antimicrobiano, causando a morte bacteriana. (SZKOŁUDA; KARPIŃSKI, 2020). Apesar do PHMB já ser utilizado atualmente em feridas e queimaduras, ele é mais conhecido como um antimicrobiano, em solução, utilizado na descontaminação de superfícies em ambiente hospitalar (Curatec, 2024).

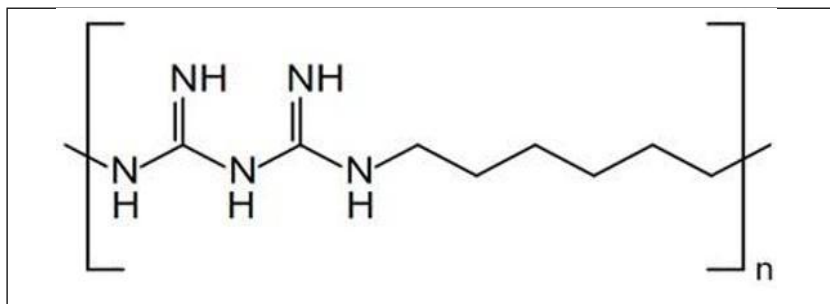


Figura 4: Estrutura química do Polihexametileno Biguanida (PHMB). O PHMB é um polímero catiônico composto por unidades repetitivas de biguanida interligadas por cadeias de hexametileno ($-\text{[CH}_2\text{]}_6-$).

Em relação ao tratamento, as vítimas de queimadura devem ser tratadas imediatamente após a lesão, removendo-se o tecido morto (a partir do grau II), para que haja restauração da barreira epitelial, com o intuito de prevenir a desidratação, perda de regulação da temperatura corporal e invasão de microrganismos, que podem desencadear infecções e defeitos funcionais e estéticos (DRAGO et al., 2010). O tratamento tópico é mais utilizado para queimaduras superficiais, de grau I e grau II, diferentemente das queimaduras de grau III e grau IV, como já mencionado acima. Ele baseia-se na aplicação de agentes que protejam a área lesada, previna infecções e promovam a regeneração epitelial (ROSSETTO et al., 2021). Dentre os tratamentos utilizados no sistema público de saúde (SUS), os cremes e pomadas com corticoides, anti-inflamatórios e antimicrobianos, como betametasona, neomicina, collagenase e sulfadiazina de prata são os mais prescritos, devido ao baixo custo e facilidade de aplicação (MILNER e FELDMAN, 2012). A pomada de sulfadiazina de prata 1% é um dos tratamentos tópicos mais empregados devido sua efetividade na ação antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, estimulação da reepitelização, além de reduzir o risco de infecção secundária (CLEMENTINO et al., 2024). O estudo realizado por ARAÚJO e colaboradores em 2021 avaliou os tratamentos tópicos mais utilizados no Centro de referência em assistência a Queimados da Associação de Caridade Santa Casa do Rio Grande-RS, nos anos 2016 e 2017, mais de 90% dos pacientes queimados grau I e II, foram tratados com sulfadiazina e cerca de 78% com collagenase. Já a collagenase é uma pomada que apresenta atividade enzimática, tendo como ação a liquefação do tecido necrótico sem prejudicar o tecido granular, inibe a cicatrização hipertrófica, mantém as células vivas

viáveis além de contribuir para a angiogênese e epitelização (et al., 2021).

As queimaduras podem resultar em diversas sequelas cutâneas, incluindo cicatrizes hipertróficas, contraturas e alterações na pigmentação da pele. Entre essas consequências, a hiperpigmentação pós-inflamatória (HIP) é uma das mais comuns e impactantes, afetando significativamente a estética e a qualidade de vida dos pacientes. A HIP ocorre devido ao aumento na produção de melanina em resposta à inflamação e ao dano tecidual, podendo persistir por meses ou anos após a cicatrização da lesão. Diante disso, a HIP será abordada com mais detalhes a seguir, destacando os mecanismos envolvidos e as estratégias terapêuticas para seu manejo.

2.3 Hiperpigmentação pós-inflamatória

A hiperpigmentação pós inflamatória (HIP) é um distúrbio de pigmentação adquirido, que resulta na superprodução ou à dispersão irregular de melanina na pele (DAI et al., 2018; MOOLLA; MILLER-MONTHROPE, 2021). Isto acontece, possivelmente, devido à inflamação e/ou traumas locais, onde a melanina pode ser depositada na epiderme, derme ou em ambos (COSTIN; HEARING, 2007). Possivelmente, a elevada quantidade de citocinas pró inflamatórias liberadas durante a resposta imunológica após queimadura estimula os melanócitos aumentando a melanogênese (WILSON et al., 2022).

Um estudo realizado em camundongos lesionados por queimadura térmica, examinou as citocinas inflamatórias produzidas localmente, constatando que a lesão pós-queimadura aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF) α e IL-6, MCP-1 e quimiocinas derivadas de queratinócitos (KC) por queimar o tecido da ferida (SCHWACHA et al., 2010). Estudo esse que corrobora com os resultados de TOMITA e colaboradores (1992) que observou que as prostaglandinas E2 e D2, os leucotrienos LT-C4 e LT D4, o tromboxano 2, IL-1, IL-6, o fator de crescimento epidérmico, o óxido nítrico, o TNF e outras citocinas podem estar todos associadas ao aumento da estimulação dos melanócitos. Quando a HIP se manifesta na epiderme, sabe-se que há aumento na produção e transferência de melanina para os queratinócitos vizinhos, ou seja, aumento da atividade dos melanócitos, associada a mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio. Quando há manifestação na derme, os queratinócitos do EB são danificados pela inflamação exacerbada, o que resulta numa grande libertação de melanina da epiderme, para a derme. Os macrófagos fagocitam o

pigmento livre formando melanófagos. Os melanófagos por sua vez, se estabelecem na derme superior e tornam-se evidentes, podendo ser visualizados como uma mancha azul-acinzentada no local da lesão, que pode persistir por anos. Sendo este o tipo de HIP mais difícil de ser tratado (MOOLLA; MILLER-MONTHROPE, 2021; DAVIS; CALLENDER, 2010).

Visível a olho nu, a condição é identificada por áreas escurecidas e planas na superfície de distribuição do processo cicatricial inflamatório, podendo exibir variações de tons, indo do marrom ao preto, de acordo com a severidade do dano e a tonalidade da pele (figura 5). (COSTIN; HEARING, 2007; MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022; DAVIS; CALLENDER, 2010). Apesar de ser o distúrbio mais comum em pacientes com pele pigmentada, a literatura é escassa quando comparada à hiperpigmentação causada por radiação UV (PATEL et al., 2020). Consequentemente, esta condição parece estar diretamente relacionada ao tom de pele de um indivíduo, com prevalência aumentada nos tipos de fototipo III-VI, na escala de Fitzpatrick (TAYLOR, 2003). Esta escala (FITZPATRICK, 1975) foi desenvolvida para definir resposta de diferentes tipos de pele à luz UV, através do eritema e/ou bronzeamento, e adaptada ao longo dos anos, sendo ainda hoje utilizada para nortear possíveis abordagens e tratamentos para diferentes tipos de pele. Sendo assim, indivíduos de pele branca, mais clara, são classificados na escala de Fitzpatrick com fototipos I-III e indivíduos de pele negra, mais escura, com fototipos do IV-VI (DE AVELAR ALCHORNE et al., 2024).

Dentre os grupos étnicos específicos, é mais provável que a HIP seja relatada naquelas com pele mais escura, como visto em estudo realizado nos Estados Unidos. Neste estudo, grupos étnicos constituídos de pessoas ditas brancas (nativos americanos) comparadas com pessoas não brancas (negros, hispânicos, asiáticos) constatou que, entre as principais queixas dermatológicas as discromias hiperpigmentadas, incluindo a HIP, foi uma das reclamações entre os grupos não brancos, independentemente da idade e sexo (TAYLOR, 2003). Há registros de pacientes de pele mais pigmentada que sofreram queimaduras, especialmente aqueles de origem africana e asiática (DAI et al., 2018), que convivem com alterações de pigmentação de longo prazo, o que acaba reduzindo significativamente sua qualidade de vida após queimaduras devido a HIP, já que, mais da metade das pessoas que sofrem alguma queimadura, cerca de 60%, acabam desenvolvendo esta hiperpigmentação cutânea (GREENHALGH, 2015; ZHONG et al., 2023). Embora não esteja bem documentado, é clinicamente possível observar que alguns pacientes queimados com resposta inflamatória grave, apresentam maior proporção de hiperpigmentação do que pacientes menos graves (ZHONG et al., 2023).

O tratamento da lesão por queimadura, dependerá de diversos fatores, principalmente profundidade da lesão e o tipo de agente causador da queimadura. Um estudo foi realizado com crianças majoritariamente de pele pigmentada acometidas por queimadura térmica grau II após, em média, 63 meses após a lesão, constatou que durante os primeiros 3 anos, as alterações de coloração no local da cicatrização, variaram. Enquanto, após este tempo, foi observado hiperpigmentação acumulativa no local da queimadura. Ou seja, aumento progressivo na deposição de melanina no local da cicatrização com o passar do tempo (DE CHALAIN; TANG; THOMSON, 1998).

Queimaduras de grau I e II necessitam de tratamento tópico, mas frequentemente o foco do tratamento é a cicatrização, não levando em consideração a questão estética, que pode resultar em forte hiperpigmentação local. O desagradável escurecimento da pele pode ser causado pela ativação dos melanócitos nas áreas da pele não afetadas diretamente pela queimadura, devido à inflamação subsequente. Esse processo aumenta a multiplicação celular, levando a uma maior produção de melanina na região da cicatrização (DAI et al., 2018). Desta forma, as indústrias farmacêuticas e cosméticas, têm buscado continuamente por novas soluções, visto que, distúrbios de pigmentação cutânea promovem importante impacto na qualidade de vida dos pacientes e muitas vezes, entregam resultados não satisfatórios após longos períodos de tratamento (VIDEIRA, 2017).



Figura 5: Hiperpigmentação pós-inflamatória decorrente de queimadura térmica. Lesões hiperpigmentadas resultantes do processo cicatricial após queimadura térmica, ocorrida durante o preparo de alimentos. A hiperpigmentação pós-inflamatória é uma resposta cutânea comum a agressões térmicas, caracterizada pelo aumento da produção e deposição de melanina na epiderme e/ou derme, frequentemente exacerbada por inflamação e exposição solar. FONTE: ABDEL-NASER, 2005.

2.3.1. Melanogênese

O melanócito é uma célula dendrítica, presente ao longo do EB da epiderme, sendo

responsável pela pigmentação cutânea através do estímulo de organelas já que, possuem a capacidade de sintetizar, armazenar e exportar a melanina produzida na organela intracelular, melanossomos, para os queratinócitos (unidade epidérmica de melanina), através de seus dendritos (WU; HAMMER, 2014; DAI et al., 2018). A unidade epidérmica de melanina é composta por 1 melanócito, que através de seus dendritos, consegue entrar em contato com até 40 queratinócitos, fazendo o transporte da melanina.

Melanina é um biopolímero pigmento que fornece fotoproteção (protegendo o DNA) e termorregulação. (ZHONG et al., 2023; VIDEIRA, 2017) para a pele. Portanto, podemos dizer que, tanto os melanócitos, quanto a melanina atuam como reguladores da homeostase local e geral dos sistemas melanogênicos. A coloração da melanina pode variar do marrom ao preto, denominada eumelanina que é insolúvel, e do amarelo ao marrom - avermelhado, denominada feomelanina solúvel em meio alcalino (GREENHALGH, 2015; LIN, 2007; DEL BINO *et al.*, 2015). Independentemente de grupo étnico, a quantidade de melanócito se mantém constante, a diferença dar-se-á ao número dos melanossomos presente, a quantidade e tipo de melanina produzida e à transferência e distribuição de melanina aos queratinócitos. Sendo esta, responsável pela diversidade fenotípica de pigmentação (LIN, 2007; GREENHALGH, 2015; VIDEIRA, 2017).

O estímulo dos melanócitos ocorre por múltiplas vias de sinalização (Figura 6), incluindo PKA, MAPK, PKC, WNT/ β -catenina e BMP/Smad. O fator de transcrição MITF, em sua forma fosforilada ativa, desempenha um papel central na regulação dessas vias, promovendo a expressão de enzimas melanogênicas, como Rab27a e PMEL17. O receptor de melanocortina 1 (MC1R), um dos principais determinantes do pigmento cutâneo, regula a produção e o tipo de melanina. Sua ativação ocorre pela ligação de agonistas como α -MSH, ACTH e produtos clivados da POMC, desencadeando a via adenilato ciclase/cAMP/PKA. Isso leva à fosforilação da proteína CREB e à indução transcricional do MITF, essencial para a regulação da tirosinase (TYR), TRP1 e TRP2. Além da via POMC/MC1R/cAMP, o MITF também é estimulado pelo fator de célula-tronco (SCF) ao se ligar ao receptor c-kit. Outros mediadores, como b-FGF, endotelina-1 (Edn-1), SCF, prostaglandinas e leucotrienos, produzidos por queratinócitos e fibroblastos, também influenciam sua expressão (MOOLLA; MILLER-MONTHROPE, 2021; ZHONG et al., 2023).

Neste processo de ativação da melanogênese, os melanossomos passam por quatro fases de maturação (I-IV). Nas fases I e II, são pré-melanossomos esféricos e imaturos, sem síntese

de melanina. No final da fase II, tornam-se alongados e fibrilares. No estágio III, inicia-se a atividade da tirosinase (TYR) e a deposição de melanina nas fibrilas internas. A maturação final ocorre no estágio IV, onde a síntese e o transporte de melanina se completam. Sendo que a forma do melanossomo define o tipo de melanina produzido: os arredondados e fibrilares geram eumelanina, enquanto os menores e menos pigmentados produzem feomelanina. O transporte dos melanossomos maduros para os queratinócitos ocorre por exocitose, citofagocitose ou fusão da membrana plasmática (ZHONG et al., 2023).

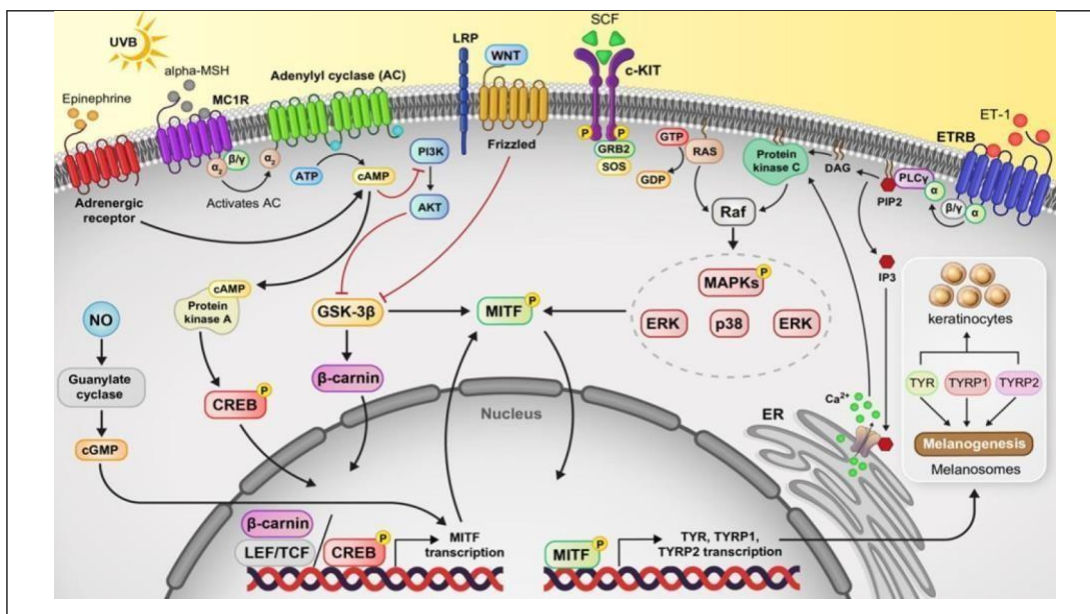


Figura 6: Principais vias de sinalização na regulação da melanogênese. A melanogênese é regulada por múltiplas vias de sinalização, incluindo MC1R/cAMP/PKA, WNT/β-catenina, c-KIT/MAPK e ET-1/PKC. Essas vias ativam o fator de transcrição MITF, que controla a expressão de enzimas essenciais como tirosinase (TYR), TRP1 e TRP2, promovendo a síntese de melanina nos melanossomos. FONTE: ZHONG et al., 2023.

2.4 Tratamentos de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras e suas limitações

Por se tratar de uma hiperpigmentação cutânea, nesta situação a HIP é um efeito secundário desencadeado pela lesão por queimadura (DAVIS; CALLENDER, 2010) e as terapias para seu tratamento são escassas. Sabendo que a principal abordagem de queimaduras de grau I e II na pele é por via tópica, os tratamentos disponíveis mais utilizados para a HIP também são por via tópica, acabando por complementar-se. Diferentes aspectos da patogênese da HIP são alvos de terapias e pesquisas para melhora da coloração cutânea (MOOLLA; MILLER-MONTHROPE, 2021). Agentes clareadores tópicos, menos invasivos e de aplicação

mais confortável, são utilizados como tratamento de primeira linha (LUPON et al., 2022). Os tratamentos têm diferentes mecanismos de ação, tais como: (I) Retardar/diminuir a produção de melanina, (II) aumentar a renovação celular, (III) diminuir a inflamação e (IV) eliminar/quebrar a melanina (DAI et al., 2018). Desta forma, são considerados antagonistas dos receptores celulares, inibidores do estímulo dos melanócitos, inibidores de tirosinase e inibidores da transferência de melanosomos para os queratinócitos (NAUTIYAL; WAIRKAR, 2021; VERONESE et al., 2024).

O uso de despigmentantes tópicos são a solução menos invasiva e devem ser combinados com o uso de protetor solar com alto fator de proteção contra UVB e UVA, uma vez que a radiação irá estimular a melanogênese (VERONESE, 2024). Atualmente, a hidroquinona, a arbutina e o ácido kójico são os agentes clareadores e despigmentantes mais conhecidos e utilizados (Figura 7).

O padrão ouro para tratamento de HIP é a hidroquinona sendo eficaz na concentração de 2% a 4%. Utilizado desde a década de 60, atua inibindo a tirosinase interferindo na síntese de melanina. Apesar de causar melhora na maioria dos indivíduos tratados, comparativamente com os não tratados, efeitos adversos como erupções e prurido foram relatados em 25% dos participantes (HADDAD et al., 2003). Outros efeitos deletérios da hidroquinona foram descritos, como eritema, despigmentação permanente pela morte dos melanócitos (COSTA et al., 2010), diminuição da capacidade de cicatrização da pele podendo chegar a condições patológicas como câncer, quando utilizado a longo prazo (JOSEPH; KLEIN-SZANTO; JAISWAL, 1998). Além disso, outras desvantagens relacionadas à hidroquinona são a fácil oxidação, apresentando baixa estabilidade em formulações e difícil penetração da pele devido sua estrutura hidrofílica (HSIEH et al., 2014). De acordo com a ANVISA, a utilização da hidroquinona em produtos cosméticos no Brasil não é permitida, sendo restrito ao uso dermatológico (BRASIL, 2016). Assim como ocorre nos Estados Unidos da América, regulamentado pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) e em países da Europa, regulamentado pela “*European Medicines Agency*” (EMA).

A arbutina, derivado da hidroquinona, possui estrutura semelhante a tirosina, substrato da tirosinase, atuando como inibidor de tirosinase (NAUTIYAL; WAIRKAR, 2021). Mais segura de que a hidroquinona, porém menos eficaz, a concentração em formulações pode chegar a 7% (DESMEDT et al., 2016). Contudo, em um estudo utilizando-a a concentração de 3%, no

tratamento de hiperpigmentação solar, apresentou eficácia em indivíduos de pele mais clara, mas sem resposta em indivíduos de pele mais escura. Podendo a cor da pele, ser um fator limitante e a ser observado para tratamento mais adequado (BOISSY et al., 2005). Além desta desvantagem, assim como a hidroquinona ela possui baixa penetração cutânea e pode sofrer hidrólise da ligação glicosídica e acabar liberando hidroquinona (DESMEDT et al., 2016).

O ácido kójico (AK) é um metabólito natural produzido por diversas espécies de fungo. Seu mecanismo de ação também é inibidor da tirosinase, contudo, ele atua quelando o cobre presente na proteína, sendo eficaz na concentração de 1% a 4%. Ele apresenta menor toxicidade que a hidroquinona e a arbutina (SAEEDJ; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019). Em estudo comparando a eficácia de 0,75% AK com 4% de hidroquinona em uma população indiana com hiperpigmentação, o AK foi considerado menos eficaz que a hidroquinona. Sendo os efeitos colaterais reportados, transitórios, com menos de 4% dos indivíduos que utilizaram o AK, relatando eritema, apesar de ser um efeito colateral comum, associado ao desenvolvimento de dermatite alérgica de contato, uma vez que o AK é um potencial agente sensibilizante (MONTEIRO et al., 2013). No entanto, o uso de AK em formulações cosméticas é limitado por sua alta solubilidade em água, dificultando a incorporação do ativo em formulações cosméticas à base de óleo (LAJIS; HAMID; ARIFF, 2012). Ele também pode causar irritação na pele e instabilidade durante o armazenamento (KHEZRI et al., 2020).

Desta forma, a busca por novos agentes despigmentantes que sejam eficazes e apresentem menor toxicidade que os tratamentos convencionais é uma área de pesquisa promissora. Em busca de novos despigmentantes descobriu-se a aloesina, a hesperidina e a curcumina. A aloesina é uma glicoproteína derivada do *aloe vera* que age inibindo a oxidação da L-DOPA e exibindo afinidade maior do que outros tratamentos mais usuais, como arbutina e AK, apresentando atividade anti- tirosinase de forma dependente da dose. Contudo, sua penetração no estrato córneo foi limitada devido à sua natureza hidrofílica e seu elevado peso molecular, indicando a necessidade de desenvolver novos sistemas de entrega para melhorar sua eficácia (CHOI et al., 2002). A hesperidina é um flavonoide presente e extraído de frutas cítricas, conhecido por sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, fotoprotetora e anti-tirosinase, quando testado em melanócitos humanos (ZHU & GAO, 2008). A *Curcuma longa*, também conhecida como curcuma, açafrão indiano ou somente açafrão, composto utilizado ao longo das gerações como agente aromatizante, fitoterápico e corante. Nela estão presentes os

curcuminóides, grupo de pigmentos polifenólicos representados pela curcumina (CUR), em maior quantidade, desmetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BDMC) (WAGHULE et al., 2020; HEWLINGS; KALMAN, 2017; MOHD ZAID et al., 2023). Abaixo descrevermos com mais detalhes sobre a Curcumina por se tratar do composto escolhido neste trabalho.

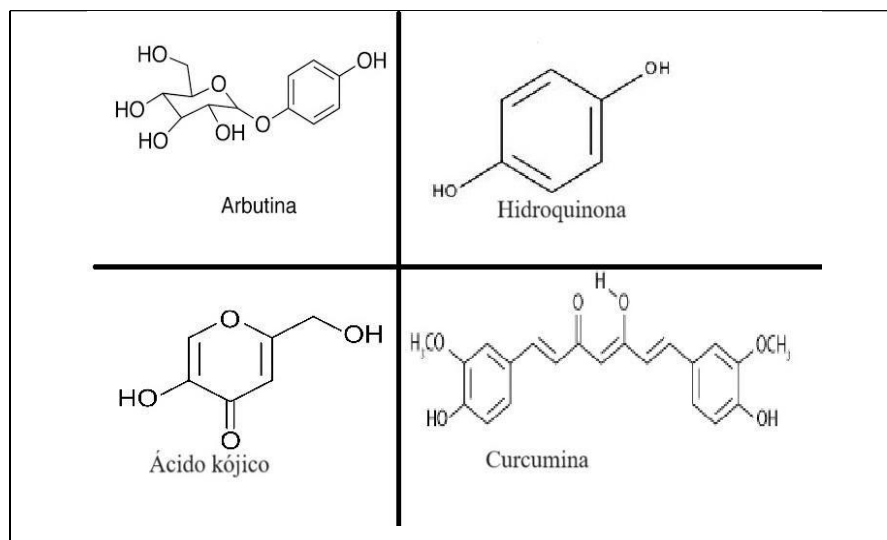


Figura 7: Estruturas químicas de agentes despigmentantes. Representação das fórmulas químicas da arbutina, hidroquinona, ácido kójico e curcumina, compostos utilizados na modulação da melanogênese devido às suas propriedades inibidoras da tirosinase e ação antioxidante.

2.5 Curcumina

A curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) é um polifenol cuja estrutura química é composta por dois anéis aromáticos contendo grupos metoxila e hidroxila na posição orto, ligados por uma cadeia de sete carbonos contendo uma fração β -dicetona α,β -insaturada. Essa configuração molecular permite que a curcumina apresente tautomerismo ceto-enol, predominando a forma ceto em pH ácido e neutro, enquanto a forma enólica se torna mais estável em condições alcalinas. Além disso, a molécula exibe isomerismo cis-trans, sendo a forma trans a mais estável devido à orientação espacial de seus grupos fenólicos. Sendo altamente lipofílica, apresenta um coeficiente de partição log P de 3,2, o que a torna praticamente insolúvel em água, mas solúvel em lipídios. Essa característica favorece sua permeabilidade transmembrana, essencial para interações biológicas, mas também dificulta sua biodisponibilidade em formulações aquosas (KUMARI et al., 2022; MOHD ZAID et al., 2023).

A CUR apresenta diversos benefícios, já que, possui propriedades anti-inflamatórias e

antioxidante, eliminando os radicais livres e propriedades antimicrobiana (bactérias, fungos e vírus) pois interage com a membrana da célula forçando-a a apoptose (WAGHULE et al., 2020), além da atividade despigmentante citada acima.

Devido ao seu caráter antioxidante e anti-inflamatório a CUR tem sido estudada como um potencial tratamento para doenças da pele. Sua atividade anti-inflamatória, suprimindo a expressão de interleucinas e outros mediadores inflamatórios, reduzem as taxas de citocinas, melhorando a cicatrização de feridas, a proliferação de fibroblastos, a angiogênese e reepitelização. Quando referido ao crescimento microbiano, a CUR o inibe, devido a promoção da perturbação na membrana celular, ocasionando em apoptose precoce. Assim, torna-se um excelente antimicrobiano (PATEL et al., 2020). Em um estudo realizado por NGWABEBHOH (2018) em modelo *in vivo*, avaliou-se esta atividade, utilizando a emulsão Pickering (PE) carregada com CUR e cumarina contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. Faecalis* e *E. coli* utilizando o método de difusão à disco. A região de inibição da PE- CUR contra as bactérias, foi encontrada em: 9,81mm; 14,00mm; 12,8mm; 9,88mm e 10,69mm, respectivamente. A CUR provou ser muito útil no tratamento de infecções por queimaduras, mas devido à baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e outras limitações, a utilização da CUR como medicamento é limitada (KUMARI; NANDA, 2023).

No que se refere a capacidade cicatrizante, a CUR atua em diferentes etapas e estímulos para melhora da cicatrização. SHARMA e colaboradores (2022) desenvolveram um trabalho que puderam observar a partir de experimentos de migração celular, angiogênese e proliferação celular, que a CUR colaborou efetivamente na cicatrização da ferida, uma vez que ela fechou mais rapidamente, durante a fase proliferativa, quando comparada ao controle. Corroborando com os resultados obtidos em testes realizados *in vitro*. Já MOBARAKI e colaboradores (2022), puderam verificar um aumento na taxa de regeneração tecidual, viabilidade celular além de aumento significativamente maior no processo de cicatrização no tratamento com CUR em comparação ao controle. Sendo evidente a efetividade da CUR na regeneração celular, potencializando a cicatrização ao modular a resposta celular, reduzir a inflamação e promover reestruturação tecidual eficiente.

Em relação a atividade despigmentante, sabendo que, a inibição da tirosinase é crucial na síntese de melanina (AKTER et al., 2019), impedindo o amadurecimento dos melanossomos e, por conseguinte, a produção de melanina, dois compostos fenólicos, CUR e a DMC, foram isolados de extratos metanólicos de *Artocarpus altilis* e apresentaram atividades inibidoras da tirosinase mais potentes do que o controle positivo do ácido kójico (NGUYEN et al., 2012).

AKTER e colaboradores (2019), a partir de testes *in vitro* utilizando células de melanoma murino (B16F10), avaliaram a atividade inibitória da tirosinase e os efeitos antimelanogênicos na síntese de melanina da CUR extraída de 3 diferentes espécies de *Curcuma sp.* Obtendo resultados promissores, quando comparada a atividade da arbutina, utilizado como controle positivo na atividade anti-tirosinase, e eficaz no tratamento da hiperpigmentação cutânea. Foi constatado uma atividade significativamente maior da CUR, além de consequentemente também terem desempenhado bons resultados quanto a atividade antimelanogênica, de maneira dose-dependente.

Já o estudo de JEON e colaboradores (2023), também realizou uma investigação visando os efeitos de inibição melanogênica a partir da via de sinalização MC1R, da CUR, DMC e BDMC *in vitro* (em células B16F10) e *in vivo* em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*). Nesta pesquisa constataram que o DMC não apresentou qualquer atividade biológica. Contudo, a CUR e o BDMC reduziram a produção de melanina induzida por alfa-MSH, de maneira dose dependente, e regularam negativamente a expressão dos genes TYR, MITF, TRP-1 e TRP-2, relacionados à produção de melanina. Entretanto, foram relatados efeitos tóxicos de CUR com concentração mínima eficaz de 5 μ M, sendo assim, tóxico para embriões de peixe zebra durante o período de desenvolvimento inicial.

No entanto, as propriedades físico-químicas limitam a utilização comercial da CUR, devido à baixa solubilidade, instabilidade, sensibilidade à luz UV visível, insolubilidade em pH neutro entre outros. Para superar essas limitações, a curcumina pode ser incorporada em veículos aquosos utilizando surfactantes, lipídios, biopolímeros e proteínas, sendo as micelas e sistemas nanoestruturados, como nanoemulsões, estratégias eficazes para aumentar sua solubilidade e estabilidade (MOHD ZAID et al., 2023; WAGHULE et al., 2020; DEL PRADO et al., 2019; GERA et al., 2017).

2.6 Nanotecnologia no tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras- Uso da Curcumina e PHMB

Nos sistemas de administração tópica de medicamentos, a pele serve como um dos órgãos primários e acessíveis para aplicação de fármacos. No entanto, a pele é uma barreira altamente eficaz que restringe a penetração da maioria dos medicamentos utilizados para fins terapêuticos. Apenas alguns compostos têm a capacidade de penetrar significativamente na pele. Como resultado, a maioria das formas farmacêuticas tópicos disponíveis hoje no mercado têm baixa capacidade de penetração, levando a benefícios terapêuticos limitados. As

dificuldades de alcançar a absorção adequada de medicamentos através da pele usando formulações tópicas enfatizam a necessidade de novas tecnologias de administração (YUNIARSIH *et al.*, 2024). O uso de nanocarreadores para administração de medicamentos tem ganhado interesse crescente como meio não invasivo para melhorar a administração cutânea e transdérmica de medicamentos que possuem propriedades de penetração desfavoráveis (figura 8) (DRAGICEVIC & MAIBACH, 2018).

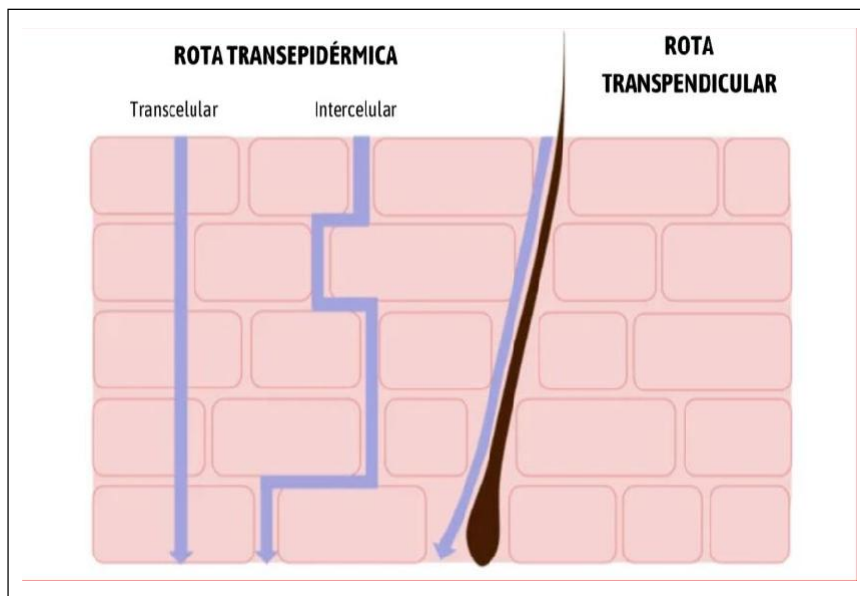


Figura 8: Esquema das rotas de permeação cutânea. A rota transepidérmica ocorre diretamente através da epiderme e pode seguir a via transcelular, célula a célula, ou a via intercelular, percorrendo o espaço entre as células. A rota transpendicular utiliza estruturas anexiais, como folículos pilosos e glândulas, permitindo um caminho alternativo para a absorção de substâncias. Fonte: Adaptado de BRITO, 2024.

Os nanocarreadores lipídicos (NLs), atraíram grande visibilidade na administração tópica devido à biocompatibilidade, baixa toxicidade e semelhança com os constituintes cutâneos, apresentando vantagens como melhor permeação e retenção através da pele, sem mencionar liberação prolongada, dose otimizada, aprimoramento da farmacocinética e adesão terapêutica do paciente (WAGHULE *et al.*, 2020). Dentre os sistemas lipídicos temos os lipossomas, que são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico; as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), que são esferas compostas por lipídeos sólidos, com diâmetro médio variando entre 10 e 1000 nm, permanecendo em estado sólido à temperatura ambiente; os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), que são constituídas por lipídeos sólidos e líquidos, proporcionando

maior estabilidade de armazenamento e capacidade de encapsulação, além de minimizar a expulsão do ativo encapsulado durante o armazenamento; e as nanoemulsões (NE), que são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis, formados a partir de óleos, água e surfactantes, podendo ser óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o) (figura 9) (SINGH *et al.*, 2022). Estas serão abordadas com mais detalhes por serem foco deste trabalho.

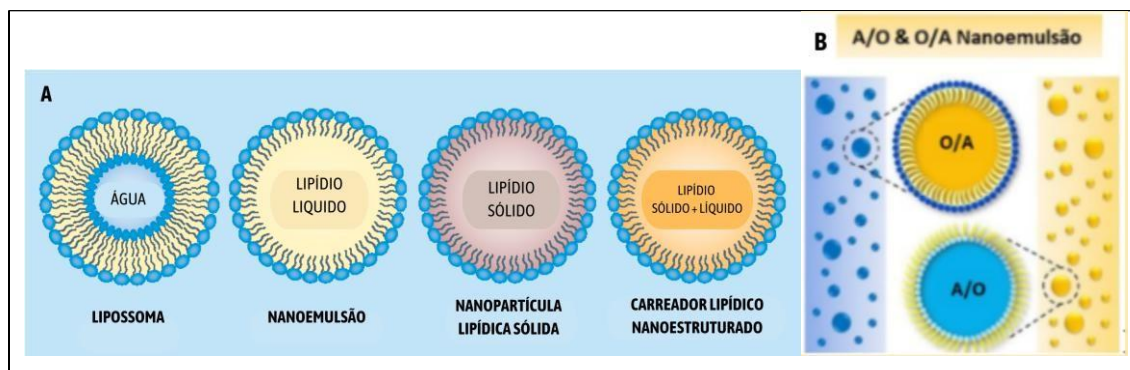


Figura 9: Representação esquemática dos principais nanocarreadores lipídicos. A) Lipossoma é composto por uma bicamada fosfolipídica que encapsula uma fase aquosa; nanoemulsão contém um núcleo lipídico líquido estabilizado por surfactantes; nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) possuem um núcleo lipídico sólido e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) combinam lipídios sólidos e líquidos para maior capacidade de encapsulação. B) Distintos tipos de nanoemulsões (A/O – água em óleo e O/A – óleo em água), utilizadas para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos hidrofílicos e lipofílicos. FONTE: Adaptado de SINGH, 2017.

Nas NEs um dos líquidos compõe a fase dispersa, pois se dispersa sobre os outros líquidos, enquanto o outro forma o meio dispersante, cada fase revestida por moléculas surfactantes. Em comparação com formulações tópicas convencionais, como géis, cremes, loções e pomadas, as NEs oferecem vantagens devido à sua capacidade de solubilização, uso de agentes surfactantes adicionais e maior área superficial de contato. Essas características proporcionam estabilidade a longo prazo, maior solubilidade e permeação do medicamento através das camadas da pele. (KUMAR *et al.*, 2019; WAGHULE *et al.*, 2020; TAMBUNLERTCHAI; GEARY; SALEM, 2021). Ainda, possuem grande proporção entre superfície e volume, sendo assim, os medicamentos são absorvidos rapidamente e a biodisponibilidade é aumentada.

Em relação ao tamanho de gotículas, elas possuem até 500 nm (KUMAR *et al.*, 2019; WAGHULE *et al.*, 2020). Neste caso, a composição das NEs em termos qualitativos e quantitativos dos componentes presentes na formulação, desempenham um papel crucial na determinação do tamanho e uniformidade das gotículas, sendo estes fatores chave para a entrega do medicamento e/ou fármaco (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O índice de polidispersão (PDI), um parâmetro de estabilidade, está intimamente relacionado a estes fatores, uma vez que esta medida fornecerá informações sobre uniformidade ou heterogeneidade do tamanho das

partículas presentes na NE. Sendo assim, um PDI baixo indica gotículas de tamanho semelhantes resultando em uma distribuição mais uniforme, enquanto, um PDI alto indica tamanho de gotícula diverso e distribuição menos uniforme, sugerindo heterogeneidade nas propriedades das partículas podendo causar instabilidade do sistema (SOUTO *et al.*, 2022). Outro parâmetro importante, é o potencial zeta, que se refere à carga elétrica presente nas partículas dispersas na NE, onde quanto mais elevado o valor do potencial zeta em módulo (30 mV) maior a tendência as gotículas têm de se repelir, sendo o ideal, já que, evita a coalescência e agregação das mesmas, indicando maior estabilidade (SOUTO *et al.*, 2022).

Para produzir as nanoemulsões, são necessárias duas etapas principais: primeiramente são formadas as emulsões grosseiras (Ultra-turrax[®]) e na sequência técnicas de baixa ou alta energia são aplicadas, para diminuir e homogeneizar o tamanho das gotas em escala nanométrica (WILSON *et al.*, 2022). A técnica de homogeneização a alta pressão (HAP), método amplamente descrito, consiste na passagem de uma dispersão grosseira por um equipamento que fará a aplicação de uma força que, em alta pressão e velocidade, cria alto cisalhamento e turbulência nas emulsões, resultando na quebra, diminuição e uniformidade das partículas. Sendo este método um processo de fabricação escalonável, utilizado em larga escala na indústria farmacêutica (KUMARI; NANDA, 2023; SOUTO *et al.*, 2022; BRUXEL *et al.*, 2012).

Sendo assim, as NEs são formulações versáteis, pois oferecem flexibilidade na formulação e na aplicação de medicamentos ou cosméticos. Ainda para uso dermatológico ela pode ser incorporada em diferentes tipos de apresentação, como: líquidos, cremes, sprays, hidrogéis, entre outros (SINGH *et al.*, 2022). Desta forma, é uma estratégia para melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e liberação controlada de compostos hidrofóbicos, como a CUR, proporcionando melhor penetração cutânea e efeito terapêutico. Além disso, no caso do PHMB, a nanotecnologia pode minimizar a toxicidade tecidual, em ensaios *in vitro*, tornando sua aplicação mais segura e eficaz.

Em relação a avaliação da melhora da cicatrização de queimaduras de segundo grau e a atividade antimicrobiana na CUR, Kianvash e colaboradores (2017) analisaram a curcumina nanoencapsulada em propilenoglicol, bem como a estabilidade e biocompatibilidade da formulação (testes segundo normas ISO e citotoxicidade em fibroblastos humanos). Em modelo *in vivo* com animais queimados, a formulação contendo 3% de CUR demonstrou uma significativa aceleração no reparo da ferida (maior regeneração em 8 dias e contração completa

em 18 dias) e apresentou atividade antibacteriana semelhante à do creme de sulfadiazina de prata 1%, sem efeitos adversos na pele íntegra (KIANVASH et al., 2017).

Já o estudo de Araújo e colaboradores (2023) comparou dois sistemas de nanoencapsulação de curcumina – nanoemulsão (NE-CUR) e carreador lipídico nanoestruturado (NLC-CUR) – visando avaliar qual apresenta melhor desempenho no tratamento de queimaduras. Para isso, foram formuladas ambas as nanopartículas, caracterizadas quanto ao tamanho (~200 nm), eficiência de encapsulamento (>90%), estabilidade (120 dias), perfil de liberação, permeação e retenção cutânea, além de testes de citotoxicidade, em células BJ5TA de fibroblastos, e atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que ambas as formulações eram fisicamente estáveis e não tóxicas e que a nanoemulsão apresentou maior permeação e retenção cutânea, tanto em pele íntegra quanto em pele queimada, além de maior efeito antimicrobiano, especialmente quando combinada com gentamicina.

Partoazar e colaboradores (2016) investigaram a capacidade de um nanocarreador lipídico de curcumina em promover a regeneração tecidual e combater infecções em queimaduras de segundo grau, medindo parâmetros de cicatrização (reepitelização, neovascularização, deposição de colágeno, formação de granulação, contração da ferida) e redução da flora bacteriana da lesão. Os resultados indicaram uma eficácia antimicrobiana comparável à do creme de sulfadiazina de prata, sendo ~11% mais potente que a curcumina livre na redução da carga bacteriana.

Shrotriya e colaboradores (2018), desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) de CUR incorporadas em gel de carbopol, visando melhorar a entrega tópica da curcumina além de tratar a hiperpigmentação, avaliando a permeação, a deposição cutânea da formulação e sua atividade despigmentante por inibição da tirosinase. A formulação de CUR–SLN (~51 nm, 93% de encapsulamento) apresentou liberação controlada por 24h, alta retenção na pele e inibição significativa da tirosinase *in vitro* (potencial despigmentante). Demonstrando-se ser um seguro e efetivo gel de CUR nanoencapsulada para tratar hiperpigmentação.

Farooqui e colaboradores (2022) desenvolveram nanovesículas lipídicas como aditivo promotor de permeação (PE-NVs) carregadas com curcumina com objetivo de aumentar a absorção cutânea e a eficácia tópica da curcumina no tratamento de hiperpigmentação e avaliaram suas características físico-químicas, permeação através da pele e efeito terapêutico em um modelo de hiperpigmentação induzida por radiação solar em coelhos. Os resultados

indicaram que as PE-NVs de curcumina apresentaram permeação e acúmulo cutâneo superiores, levando a uma maior redução das lesões hiperpigmentadas em comparação à curcumina em solução. Além disso, exames histopatológicos confirmaram a diminuição da pigmentação na pele tratada. Os resultados indicam que as nanovesículas permeadoras constituem um sistema promissor e efetivo para terapia tópica de hiperpigmentação pós-inflamatória e distúrbios cutâneos associados.

Em relação a eficácia da atividade antimicrobiana e promoção da cicatrização, os sistemas nanoestruturados contendo PHMB mostraram ampla eficácia antimicrobiana *in vitro* contra patógenos de lesões cutâneas. Lipossomas com PHMB demonstraram ação prolongada contínua atuando sobre bactérias após a aplicação, evitando a recolonização (AHANI *et al.*, 2021). Já Müller e colaboradores (2011) combinaram emulsões O/A ou lipossomas contendo fosfatidilcolina de gema de ovo e PHMB e avaliaram a atividade bacteriana dos sistemas contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e citotoxicidade. Foi observado que tanto o sistema de emulsões quanto os lipossomas foram capazes de diminuir a citotoxicidade sem alterar o efeito antisséptico.

Já o efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina de nanopartículas carregadas com PHMB e nadifloxacina foi alvo de pesquisa por parte de Kamaruzzaman e colaboradores (2018). A associação dos compostos PHMB e nadifloxacina formulados como nanopartículas demonstrou ser mais eficaz que a utilização dos antimicrobianos livres (sozinhos ou em associação). Além disso, a formulação em nanopartículas reduziu a toxicidade do PHMB e manteve inalterado seu poder antimicrobiano. Em modelos *in vivo*, feridas tratadas com curativos de PHMB nanoestruturado geralmente exibem redução mais rápida da carga microbiana, menor resposta inflamatória local e aceleração na formação de tecido de granulação em comparação a controles. Ni e colaboradores (2020) relataram fechamento mais rápido de feridas superficiais em camundongos tratados com a formulação que continha PHMB nanoestruturado. Já He e colaboradores (2022) observaram reepitelização e neovascularização mais acentuadas em feridas infeccionadas tratadas com nanopartícula híbrida de ouro com PHMB, resultado atribuído à eficaz eliminação bacteriana e modulação benéfica de macrófagos no leito da ferida.

Importante notar que vários estudos enfatizam a segurança dessas formulações: a encapsulação ou imobilização de PHMB atenua sua toxicidade em testes *in vitro*. Testes de viabilidade celular (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais) mostraram aumentos na

proliferação e migração celular quando comparados a tratamentos com PHMB livre na mesma dose (GRUTZNER *et al.*, 2015). Em outras palavras, ao controlar a liberação e evitar picos de concentração, os carreadores nanoestruturados permitem que a PHMB atue contra microorganismos sem prejudicar a cicatrização – muitas vezes até criando um ambiente mais favorável à regeneração do que tratamentos convencionais (p. ex. iodóforos ou prata, que podem retardar a cicatrização).

Diante dos benefícios da nanotecnologia na otimização da biodisponibilidade e estabilidade de compostos bioativos, a incorporação de curcumina (CUR) e poliexametileno biguanida (PHMB) em nanocarreadores lipídicos representa uma abordagem inovadora e promissora para o tratamento de queimaduras e distúrbios de pigmentação cutânea. A capacidade dessas nanoformulações de modular a cicatrização, exercer efeito antimicrobiano eficaz e regular a melanogênese amplia suas aplicações terapêuticas, superando desafios relacionados à solubilidade, permeação e degradação dos compostos no meio biológico. Os resultados obtidos até o momento são encorajadores e indicam que a associação CUR-PHMB em nanocarreadores lipídicos pode representar uma alternativa eficaz e segura para o manejo de queimaduras e hiperpigmentação pós-inflamatória.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficácia de nanoemulsões contendo curcumina e PHMB como possível tratamento da hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras.

3.2 Específicos

- Preparar NEs contendo CUR e PHMB e caracterizá-las quanto às suas características físico-químicas e morfológicas;
- Realizar estudo de estabilidade das NEs;
- Avaliar atividade antioxidante das NEs;
- Avaliar a viabilidade e a migração celular das NEs *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das NEs *in vitro*, com foco na prevenção de infecções que agravam a resposta inflamatória em lesões cutâneas;
- Avaliar o potencial despigmentante *in vitro*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTER, Jesmin et al. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 215, p. 9-17, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Guia de Cosméticos 2004; ANVISA: Brasília, Brasil, 2004.

ARAÚJO, Gabriela de Moraes Soares et al. Toward a Platform for the Treatment of Burns: An Assessment of Nanoemulsions vs. Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Curcumin. **Biomedicines**, v. 11, n. 12, p. 3348, 2023.

ARAÚJO, Gabriela de Moraes Soares et al. Designing and characterization of curcumin-loaded nanotechnological dressings: A promising platform for skin burn treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, p. 122712, 2023.

BABALSKA, Z. Ł.; KORBECKA-PACZKOWSKA, M.; KARPIŃSKI, T. M. Wound Antiseptics and European Guidelines for Antiseptic Application in Wound Treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 1253, 2021.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BENTO-LOPES, Liliana et al. Melanin's Journey from Melanocytes to Keratinocytes: Uncovering the Molecular Mechanisms of Melanin Transfer and Processing. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 14, p. 11289, 2023.

BHATTACHARYA, Debalina; GHOSH, Biva; MUKHOPADHYAY, Mainak. Development of nanotechnology for advancement and application in wound healing: A review. **IET nanobiotechnology**, v. 13, n. 8, p. 778-785, 2019.

BOISSY, Raymond E.; VISSCHER, Marty; DELONG, Mitchell A. DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. **Experimental dermatology**, v. 14, n. 8, p. 601-608, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Parte I: Métodos Gerais, Brasília, 2010.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsions as parenteral drug delivery systems. **Química Nova**, v. 35, p. 1827-1840, 2012.

CAMBIASO-DANIEL, J.; BOUKOVALAS, S.; BITZ, G. H.; BRANSKI, L. K.; HERNDON, D. N.; CULNAN, D. M. Topical antimicrobials in burn care: Part 1—topical antiseptics. *Annals of Plastic Surgery*, 2018

CHE, Xueyan et al. Aplicação de hidrogel à base de quitosana na promoção da cicatrização de feridas: uma revisão. **Polímeros**, v. 16, n. 3, pág. 344, 2024.

CHEN, Xushan et al. Preparation and application of quaternized chitosan-and AgNPs-base

- synergistic antibacterial hydrogel for burn wound healing. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 4037, 2021.
- CHOI, S. et al. Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. **Clinical and experimental dermatology**, v. 27, n. 6, p. 513-515, 2002.
- CHURCH, Deirdre et al. Burn wound infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 403-434, 2006.
- COSTA, Adilson et al. Association of emblica, licorice and belides as an alternative to hydroquinone in the clinical treatment of melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, p. 613-620, 2010.
- COSTIN, Gertrude-E.; HEARING, Vincent J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB journal**, v. 21, n. 4, p. 976-994, 2007.
- DAI, Niann-Tzyy et al. Restoration of skin pigmentation after deep partial or full-thickness burn injury. **Advanced drug delivery reviews**, v. 123, p. 155-164, 2018.
- DAVIS, Erica C.; CALLENDER, Valerie D. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 3, n. 7, p. 20, 2010.
- DE AVELAR ALCHORNE, Mauricio Mota et al. Dermatology in black skin. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2024.
- DE CHALAIN, T. M. B.; TANG, C.; THOMSON, H. G. Burn area color changes after superficial burns in childhood: can they be predicted. **The Journal of burn care & rehabilitation**, v. 19, n. 1, p. 39-49, 1998.
- DEL BINO, Sandra et al. Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. **Pigment cell & melanoma research**, v. 28, n. 6, p. 707-717, 2015.
- DEL PRADO-AUDELO, María L. et al. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 56, 2019.
- DESMEDT, B. et al. Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 30, n. 6, p. 943–950, 2016
- DRAGO, H., et al. The Next Generation of Burns Treatment: Intelligent Films and Matrix, Controlled Enzymatic Debridement, and Adult Stem Cells. **Transplantation Proceedings**, v. 42, p. 345-349, 2010.
- FRANCESKO, Antonio; PETKOVA, Petya; TZANOV, Tzanko. Hydrogel dressings for advanced wound management. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 41, p. 5782-5797, 2018.
- GERA, Meeta et al. Nanoformulations of curcumin: An emerging paradigm for improved remedial application. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66680, 2017.
- GREENHALGH, David G. A primer on pigmentation. **Journal of Burn Care & Research**, v. 36,

n. 2, p. 247-257, 2015.

HATEM, Shymaa et al. Functionalized chitosan nanoparticles for cutaneous delivery of a skin whitening agent: an approach to clinically augment the therapeutic efficacy for melasma treatment. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 1212-1231, 2022.

HEWLINGS, Susan J.; KALMAN, Douglas S. Curcumin: A review of its effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HSIEH, P. W. et al. Hydroquinone-salicylic acid conjugates as novel anti-melasma actives show superior skin targeting compared to the parent drugs. *Journal of Dermatological Science*, v. 76, n. 2, p. 120–131, 2014.

HÜBNER, N.-O.; KRAMER, A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. **Skin pharmacology and physiology**, v. 23, n. Suppl. 1, p. 17-27, 2010.

ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test—Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. In ICCVAM Test Method Evaluation Report; National Institute of Health (NIH): Research Triangle Park: Durham, NC, USA, 2010; pp. B30 –B38, ISBN 1661- 6596.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.

JEON, Hwang-Ju et al. Antimelanogenic effects of curcumin and its dimethoxy derivatives: mechanistic investigation using B16F10 melanoma cells and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Foods**, v. 12, n. 5, p. 926, 2023.

JESCHKE, Marc G. et al. Burn injury. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 11, 2020.

JOSEPH, P.; KLEIN-SZANTO, A. J. P.; JAISWAL, A. K. Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and in vivo tumorigenesis. **British journal of cancer**, v. 78, n. 3, p. 312-320, 1998.

KAEHN, K. Polihexanide: a safe and highly effective biocide. **Skin pharmacology and physiology**, v. 23, n. Suppl. 1, p. 7-16, 2010.

KHODJA, Assia Nacer et al. Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: pharmacological and toxicological tests. **Burns**, v. 39, n. 1, p. 98-104, 2013.

KOPECKI, Zlatko. Development of next-generation antimicrobial hydrogel dressing to combat burn wound infection. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 2, p. BSR20203404, 2021.

KULAC, Mustafa et al. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. **Journal of molecular histology**, v. 44, p. 83-90, 2013.

KUMAR, Manish et al. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review. **Preventive nutrition and food science**, v. 24, n. 3, p. 225, 2019.

KUMARI, Meera; NANDA, Dhiraj Kumar. Potential of Curcumin nanoemulsion as antimicrobial and wound healing agent in burn wound infection. **Burns**, v. 49, n. 5, p. 1003- 1016, 2023.

LAJIS, A. F. B.; HAMID, M.; ARIFF, A. B. Depigmenting effect of kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, 2012.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIMBERT, Georges (Ed.). **Skin biophysics: from experimental characterization to advanced modelling**. Springer, 2019.

LIN, Y. et al. Recent Advances in Nano-Formulations for Skin Wound Repair Applications. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 16, p. 2707–2728, 2022.

LOPES, D. C.; FERREIRA, I. L. G.; ADORNO, J. *Manual de queimaduras para estudantes*. Brasília: Sociedade Brasileira de Queimaduras, 2021. 178 p. Disponível em: <https://sbqueimaduras.org.br/material/3091>. Acesso em: 25 fev. 2025.

LORENZ, Kairi et al. Development of In Vitro and Ex Vivo Biofilm Models for the Assessment of Antibacterial Fibrous Electrospun Wound Dressings. **Molecular pharmaceutics**, v. 20, n. 2, p. 1230-1246, 2023.

LUPON, Elise et al. Treatment of hyperpigmentation after burn: A literature review. **Burns**, v. 48, n. 5, p. 1055-1068, 2022.

MALIK, Khafsa et al. Um estudo etnobotânico de plantas medicinais usadas para tratar doenças de pele no norte do Paquistão. **BMC Medicina Complementar e Alternativa**, v. 19, p. 1-38, 2019.

MARKIEWICZ, Ewa et al. Post-inflammatory hyperpigmentation in dark skin: Molecular mechanism and skincare implications. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 2555-2565, 2022.

MARKIEWICZ-GOSPODAREK, Agnieszka et al. Burn wound healing: clinical complications, medical care, treatment, and dressing types: the current state of knowledge for clinical practice. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 3, p. 1338, 2022.

MARTINS, J.R.T.L. Desenvolvimento de hidrogéis contendo nanoemulsão de curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de feridas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências da Saúde) – Laboratório de Nanotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS.

MEDEIROS, A.C., et al Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. **Acta Cir Bras**, v. 14, n. 4, 1999.

MEDEIROS, Leonardo et al. Synthesis of films based on chitosan and protic ionic liquids to be used as wound dressing on the oral mucosa. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 127134, 2023.

MOHD ZAID, Nurul Amirah et al. Promising natural products in new drug design, development, and therapy for skin disorders: An overview of scientific evidence and understanding their

mechanism of action. **Drug design, development and therapy**, p. 23-66, 2023.

MOOLLA, Siddiq; MILLER-MONTHROPE, Yvette. Dermatology: how to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. **Drugs in context**, v. 11, 2022.

MONTEIRO, Rochelle C. et al. A comparative study of the efficacy of 4% hydroquinone vs 0.75% kojic acid cream in the treatment of facial melasma. **Indian journal of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. 157, 2013.

MORGAN, Michael et al. Burn pain: a systematic and critical review of epidemiology, pathophysiology, and treatment. **Pain medicine**, v. 19, n. 4, p. 708-734, 2018.

NGUYEN, Hien Minh et al. Biomedical materials for wound dressing: Recent advances and applications. **RSC advances**, v. 13, n. 8, p. 5509-5528, 2023.

NGUYEN, Mai Ha Khoa et al. Phenolic constituents from the heartwood of *Artocarpus altilis* and their tyrosinase inhibitory activity. **Natural product communications**, v. 7, n. 2, p. 1934578X1200700214, 2012.

NGWABEBHOH, Fahanwi Asabuwa; ERDAGI, Sevinc Ilkar; YILDIZ, Ufuk. Pickering emulsions stabilized nanocellulosic-based nanoparticles for coumarin and curcumin nanoencapsulations: In vitro release, anticancer and antimicrobial activities. **Carbohydrate polymers**, v. 201, p. 317-328, 2018.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55- 63, 1983.

NAUTIYAL, Avni; WAIRKAR, Sarika. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. **Pigment cell & melanoma research**, v. 34, n. 6, p. 1000-1014, 2021.

OMS - Organização mundial da Saúde Brasil. Sistema de informação Hospitalar do SUS. Brasília: DTASUS; 2017. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/4>

PATEL, Sita Sharan et al. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 6, p. 887-939, 2020.

PATRA, Jayanta Kumar et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, p. 1-33, 2018.

PROKSCH, Ehrhardt; BRANDNER, Johanna M.; JENSEN, Jens-Michael. The skin: an indispensable barrier. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

RATHEE, Jatin et al. Recent Update on Nanoemulsion Impregnated Hydrogel: a Gleam into the Revolutionary Strategy for Diffusion-Controlled Delivery of Therapeutics. **AAPS PharmSciTech**, v. 24, n. 6, p. 151, 2023.

REMBE, J. D. et al. Comparing two polymeric biguanides: chemical distinction, antiseptic and cytotoxicity of polyaminopropyl biguanide and polyhexamethylene biguanide. *J Med Microbiol.* v. 65, n. 8, p. 867-876, 2016.

RENZONI, A. et al. Impact of Exposure of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Polyhexanide *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 10, 2017.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHWACHA, Martin G. et al. Impact of thermal injury on wound infiltration and the dermal inflammatory response. **Journal of Surgical Research**, v. 158, n. 1, p. 112-120, 2010.

SEBASTIÃO A. P., SAMPAIO, Evandro A. Rivitti. *Dermatologia. Rev e ampl.* São Paulo: Artes Médicas. 2007. 3ª Ed.

SPENCE, Rowena et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SILVA, P.S.G. **Avaliação antimicrobiana e cicatrizante de extratos da *Jatropha gossypifolia* L.: Estudo *in vitro***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2017.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOUTO, Eliana B. et al. New nanotechnologies for the treatment and repair of skin burns infections. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 393, 2020.

SUROWIECKA, Agnieszka et al. Hydrogels in burn wound management—A review. **Gels**, v. 8, n. 2, p. 122, 2022.

SZKOŁUDA, Patrycja; KARPIŃSKI, Tomasz M. Polyhexanide (PHMB)—properties and applications in medicine. **European Journal of Biological Research**, v. 10, n. 3, p. 225-231, 2020.

TAMBUNLERTCHAI, Supreeda; GEARY, Sean M.; SALEM, Aliasger K. Skin penetration enhancement strategies used in the development of melanoma topical treatments. **The AAPS journal**, v. 23, n. 1, p. 19, 2021.

TAYLOR, Susan C. Epidemiology of skin diseases in ethnic populations. **Dermatologic clinics**, v. 21, n. 4, p. 601-607, 2003.

THIRAWONG, Nartaya et al. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an in vitro evaluation using texture analyzer. **European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 132-140, 2007.

TOMITA, Yasushi; MAEDA, Kazuhisa; TAGAMI, Hachiro. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. **Pigment Cell Research**, v. 5, n. 5, p. 357-361, 1992.

VERONESE, Sheila et al. Hyper-and Hypopigmentation in a Subject with Fitzpatrick Skin Phototype VI: A New Treatment Option. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 4, p. 1036, 2024.

VIDEIRA, Inês Ferreira dos Santos; MOURA, Daniel Filipe Lima; MAGINA, Sofia. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, p. 76-83, 2013.

WAGHULE, Tejashree et al. Emerging trends in topical delivery of curcumin through lipid nanocarriers: effectiveness in skin disorders. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, p. 1-12, 2020.

WEIMER, Patrícia et al. Correlation between the skin permeation profile of the synthetic sesquiterpene compounds, beta-caryophyllene and caryophyllene oxide, and the antiedematogenic activity by topical application of nanoemulgels. **Biomolecules**, v. 12, n. 8, p. 1102, 2022.

WICHTERLE, Otto; LIM, Drahoslav. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117-118, 1960

ZHONG, Chi et al. Inflammatory response: The target for treating hyperpigmentation during the repair of a burn wound. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1009137, 2023.

ZHU, Wenyan; GAO, Jie. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Elsevier, 2008. p. 20-24.

ARTIGO 1. Nanoemulsões contendo curcumina e polihexametileno biguanida visando o tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória associada a queimaduras

Artigo a ser submetido a revista *European Journal of Pharmaceutical Science*

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como barreira protetora, mantendo a homeostase. Queimaduras comprometem essa função, impactando a cicatrização, a estética e causando efeitos psicológicos. O tratamento atual prioriza a regeneração tecidual, mas não aborda adequadamente sequelas como hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI). Este estudo desenvolveu nanoemulsões (NEs) com curcumina (CUR) e polihexametileno biguanida (PHMB) para acelerar a cicatrização, reduzir infecções e minimizar a hiperpigmentação. A nanoencapsulação melhora sua solubilidade, biodisponibilidade e reduz a toxicidade do PHMB. As NEs foram estáveis por 30 dias, com tamanho entre 176,6-232,9 nm, PDI < 0,2 e potenciais zeta de -38,6 e +38,5 mV. O potencial antioxidante da CUR foi preservado, e a nanoemulsão de CUR e PHMB inibiu *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio de viabilidade celular demonstraram menor toxicidade do PHMB nanoencapsulado, com sinergismo entre CUR e PHMB (1 + 12,5 µg/mL). A inibição da tirosinase revelou um efeito despigmentante inédito do PHMB, enquanto a formulação de CUR e PHMB apresentaram potencial para inibir a melanogênese. A análise histológica da pele suína indicou queimadura de grau I, sugerindo ajustes na padronização para modelos de segundo grau e posterior estudo da permeação cutânea. Os achados indicam que a NE-CUR-PHMB é uma alternativa promissora para tratar queimaduras e HPI, combinando efeitos cicatrizante, antimicrobiano e despigmentante. Estudos adicionais são necessários para sua otimização e segurança e eficácia clínica.

Palavras-chave: pele queimada, pigmentação cutânea, nanocarreador lipídico, *Curcuma longa*, antimicrobiano.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and acts as a protective barrier, maintaining homeostasis. Burns compromise this function, affecting wound healing, aesthetics, and causing psychological effects. Current treatments prioritize tissue regeneration but do not adequately address sequelae such as post-inflammatory hyperpigmentation (PIH). This study developed nanoemulsions (NEs) incorporating curcumin (CUR) and polyhexamethylene biguanide (PHMB) to accelerate wound healing, reduce infections, and minimize hyperpigmentation. However, CUR's low bioavailability and PHMB's toxicity limit their application. Nanoencapsulation enhances solubility, bioavailability, and reduces PHMB toxicity. The NEs remained stable for 30 days, with a particle size ranging from 176.6 to 232.9 nm, PDI < 0.2, and zeta potentials of -38.6 mV and +38.5 mV. CUR's antioxidant potential was preserved, and the CUR-PHMB nanoemulsion completely inhibited *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Cell viability assays demonstrated reduced toxicity of nanoencapsulated PHMB, with synergistic effects between CUR and PHMB (1 + 12.5 µg/mL). Tyrosinase inhibition revealed a novel depigmenting effect of PHMB, while the CUR-PHMB formulation showed potential for melanogenesis inhibition. Histological analysis of porcine skin indicated a first-degree burn, suggesting the need for model adjustments to achieve second-degree burns and further study of skin permeation. The findings suggest that the CUR-PHMB NE is a promising alternative for burn and PIH treatment, combining wound healing, antimicrobial, and depigmenting effects. Further studies are necessary for its optimization, as well as to ensure clinical safety and efficacy.

Keywords: burn injury, skin pigmentation, lipid nanocarrier, *Curcuma longa*, antimicrobial.

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha um papel essencial como barreira protetora entre o ambiente interno e externo do organismo, sendo altamente impermeável. Composta por diversas camadas e dois principais tecidos, epiderme e derme, essa barreira representa a primeira linha de defesa contra patógenos, lesões químicas e físicas (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008). A epiderme abriga os melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, pigmento essencial para a proteção do DNA contra raios UV e regulação térmica da pele (AN; KOH; BOO, 2009). A manutenção da integridade cutânea é crucial para garantir a homeostase corporal, porém, agressões externas podem comprometer essa estrutura, resultando em diversas lesões (BENTO-LOPES et al., 2023).

As queimaduras são lesões que variam em gravidade conforme a profundidade, a extensão da área atingida e o tecido acometido (SEBASTIÃO; SAMPAIO, 2007). Além das consequências físicas, podem gerar impactos psicológicos significativos, especialmente quando ocorrem em áreas expostas (MORGAN et al., 2018). Uma das complicações mais comuns durante a cicatrização é a hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI), especialmente em indivíduos de fototipos mais altos (III-VI). Embora os mecanismos exatos que levam à HPI ainda não estejam totalmente esclarecidos, acredita-se que sejam resultado do aumento da atividade inflamatória local e da produção desregulada de melanina na pele (ZHONG et al., 2008; SCHWACHA et al., 2010).

Embora diversas opções terapêuticas para hiperpigmentação estejam disponíveis, poucos tratamentos são específicos para a HPI decorrente de queimaduras. Além disso, os produtos existentes geralmente exigem longos períodos de uso para apresentar eficácia e estão frequentemente associados a efeitos adversos, como eritema, dermatite de contato e até mesmo agravamento da hiperpigmentação (NAUTIYAL; WAIRKAR, 2021). Nesse contexto, a busca por compostos naturais como alternativa terapêutica tem ganhado destaque, visando maior eficácia, redução do tempo de tratamento e minimização de efeitos colaterais.

A curcumina (CUR), derivada da *Curcuma longa*, tem sido amplamente estudada devido às suas propriedades farmacológicas. Estudos demonstram que a CUR possui atividades anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana (MARKIEWICZ-GOSPODAREK et al., 2022; HEWLINGS; KALMAN, 2017; GERA et al., 2017). Além disso, evidências indicam que a CUR pode atuar como agente despigmentante, pois inibe a tirosinase, enzima fundamental na síntese de melanina. No entanto, seu uso em formulações

dermatológicas é limitado devido à baixa solubilidade e instabilidade à luz UV e visível, dificultando sua penetração cutânea e eficácia terapêutica.

Outro composto relevante para o tratamento de queimaduras é a polihexametileno biguanida (PHMB), um antimicrobiano amplamente utilizado na medicina e na indústria cosmética. O PHMB é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, biofilmes e fungos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (KAEHN, 2010). Apesar de sua toxicidade relatada mesmo em concentrações reduzidas (REMBE et al., 2016), é bem tolerado na pele e mucosas, não apresentando efeitos sensibilizantes ou fotossensibilizantes em testes animais (HUBNER & KRAMER, 2010). No entanto, reduzir sua toxicidade sem comprometer sua eficácia antimicrobiana ainda é um desafio importante (WAGHULE et al., 2020; DEL PRADO et al., 2019; GERA et al., 2017).

Para superar essas limitações, a nanotecnologia tem sido explorada na indústria farmacêutica, possibilitando o desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos que aumentam a estabilidade e a permeação cutânea de ativos, além de reduzir reações adversas e otimizar a liberação controlada dos compostos na pele (DRAGICEVIC & MAIBACH, 2018). A nanoencapsulação da CUR e do PHMB pode, portanto, potencializar seus benefícios terapêuticos ao aumentar sua solubilidade, melhorar a biodisponibilidade e reduzir a toxicidade. Um dos estudos mais recentes do nosso grupo, desenvolvido por MARTINS et al. (2024), propôs a incorporação de nanoemulsões (NEs) contendo CUR e PHMB em hidrogéis de hidroxietilcelulose (HMC) e quitosana (QUI) para aplicação em feridas cutâneas. Os resultados indicaram que a NE apresentou características físico-químicas adequadas para uso tópico, preservando a barreira cutânea e não causando alterações bioquímicas adversas. Além disso, os hidrogéis contendo as NEs demonstraram maior adesão e ausência de irritação, destacando o potencial promissor da NE-CUR-PHMB para aplicação tópica.

Diante desses achados, este estudo tem como objetivo avaliar a eficácia de nanoemulsões contendo CUR e PHMB no tratamento da hiperpigmentação pós-inflamatória associada queimaduras, propondo uma alternativa inovadora para o manejo dessas lesões. A abordagem baseada em nanotecnologia pode oferecer uma solução eficaz, segura e acessível, unindo propriedades cicatrizantes, antimicrobianas e despigmentantes em uma única formulação. Além disso, a combinação de CUR e PHMB pode representar uma estratégia multifuncional para otimizar a regeneração da pele, prevenindo complicações estéticas e melhorando a qualidade de vida dos pacientes afetados por queimaduras.

METODOLOGIA

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e reagentes

Curcumina (CUR), monooleato de sorbitano (Span® 80), monooleato de polietilenoglicol sorbitano (Tween® 80), triglicerídeos de cadeia média (TCM), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), sal brometo de 3,(4,5-dimetil)-2,5difênil-tetrazólio (MTT), DPPH (2,2-difênil-1-picril-hidrazil), Paraplast®, Tirosinase, Ácido Kójico, tampão fosfato salino (0,1M; pH 6,8), L-DOPA e α MSH foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Polihexametileno Biguanida (PHMB) adquirido da Biosynth (Louisville, EUA). Soro fetal bovino (SBF) e solução de tripsina foram obtidos da Gibco (Grand Island, NE, EUA). Metanol, foi obtido da Pareac® (Barcelona, Espanha), formolaldeído 37% da Neon (São Paulo, Brasil) e água ultrapura foi obtida utilizando sistema Milli-Q da Millipore®. Todos os demais produtos químicos foram de grau analítico ou farmacêutico.

Métodos

Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas através do método de homogeneização a alta pressão de acordo com ARAÚJO e colaboradores (2023), com adaptações. A técnica consiste na preparação de duas fases, uma oleosa e outra aquosa, manipuladas separadamente, neste momento inicial. Primeiramente a fase oleosa – CUR, surfactante (Span 80) e TCM (triglicerídeo de cadeia média) – aquecidas a 80°C, em banho maria, sob agitação magnética a 1.100 rpm por 30 minutos. Em seguida, a fase aquosa contendo, PHMB, água e surfactante (Tween 80), foram aquecidos até atingir 60°C sob agitação magnética a 700 rpm. Posteriormente, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, sob agitação magnética durante 2 minutos. A emulsão formada foi encaminhada para o homogeneizador de alta velocidade (Ultra Turrax®) na velocidade de 14.500 rpm por 4 minutos. Por fim, a formulação foi vertida no homogeneizador a alta pressão (Avestin®) por 12 ciclos (totalizando 4 minutos), com pressão de 10.000 psi. Para preparo das nanoemulsões brancas (NE - BR), a CUR não foi adicionada na fase oleosa e o PHMB na fase aquosa (ARAÚJO et al., 2023).

Tabela 1: Constituição das formulações.

Formulação	Fase Oleosa			Fase Aquosa	
	TCM (mg)	CUR (mg)	Span 80 (mg)	Tween 80 (mg)	PHMB (mg)
NE – BR	140	-	60	40	-
NE – CUR	140	1,2	60	40	-
NE – PHMB	140	-	60	40	10
NE-CUR-PHMB	140	1,2	60	40	10

Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões

Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta.

O tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das formulações foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando-se o equipamento Litesizer® 500 (Anton Paar). O tamanho de partícula foi realizado em ângulo de 90°, na temperatura de 20°C após diluição das amostras em água Milli – Q®. O raio hidrodinâmico foi determinado usando a equação de Stokes – Einstein R.

$$R = (\kappa B T / 6 \pi \eta D D),$$

onde κB é a constante de Boltzmann (J / K), T é a temperatura (em K), D é o coeficiente de difusão e η é a viscosidade do meio - neste caso, da água ($\eta = 0,89$ cP a 25°C).

O potencial zeta foi determinado por anemometria laser doppler. Após a diluição das amostras, elas foram inseridas em cubeta eletroforética, sob potencial estabelecido de ± 150 mV. Os valores de potencial zeta foram calculados como valores médios da mobilidade eletroforética, utilizando a equação de Smoluchowski. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A análise morfológica das partículas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando um microscópio Zeiss EM 109 T a 200 keV. Para análise 10 μ l das NEs diluídas em aproximadamente 95x em água destilada foram depositadas em um *grid* de cobre revestido com carbono e acetato de uranila a 2%, utilizado como agente contrastante (VAZ et al., 2020; MUNICOY et al., 2021).

Ensaio de estabilidade

As NEs foram monitoradas após a preparação em 2 diferentes temperaturas (4°C e 25°C) nos tempos 0, 15 e 30 dias, e foram avaliadas características físico-químicas como tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão, conforme descrito anteriormente. Todas análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor e da recuperação de curcumina e PHMB

O teor de CUR e PHMB nas formulações foi realizado em um Cromatógrafo a Líquido Waters (Milford, EUA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição por gradiente, Detector por Arranjo de Diodos 2996, sistema de aquisição de dados software Empower PDA e coluna analítica Zorbax ODS C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm) (Agilent Technologies, EUA). Para a determinação da CUR, a fase móvel empregada foi composta por acetonitrila:água ultrapura pH 2,6 (50:50, v/v) com uma vazão de 1 mL/min (VAZ et al., 2020). O pH da fase móvel foi ajustado com ácido fosfórico. Para a quantificação foi utilizado o comprimento de onda de 425 nm, e uma curva analítica por calibração externa a partir de um padrão de curcumina diluído em acetonitrila na faixa de concentração entre 0,25 e 10 mg/L. As amostras, quando necessário, foram diluídas em acetonitrila. Para a determinação do PHMB, a fase móvel empregada foi composta por acetonitrila:água ultrapura 20 mM acetato de amônio pH 4 (16:84, v/v) com uma vazão de 1 mL/min (ARORA et al., 2019). O pH da água ultrapura da fase móvel foi ajustado com ácido acético. Para a quantificação foi utilizado o comprimento de onda de 235 nm, e uma curva analítica por calibração externa a partir de um padrão de PHMB diluído na fase móvel na faixa de concentração entre 25 a 200 mg/L. As amostras, quando necessário, foram diluídas na fase móvel. O conteúdo de CUR e PHMB (concentração total) na NE foi calculado após a determinação dos compostos ativos dissolvidos e foi expresso em µg de CUR/mL e µg de PHMB/mL de NE. A recuperação de CUR e PHMB foi calculada como a percentagem total do composto ativo encontrada na NE em relação à quantidade inicial adicionada. Para a realização das análises as amostras foram preparadas em triplicata (MARTINS et al., 2024).

Avaliação da capacidade antioxidante total

O ensaio colorimétrico DPPH foi realizado para avaliar a atividade antioxidante das amostras nas concentrações L-CUR (0,5 mg/mL), L-PHMB (5 mg/mL), NE-CUR (0,5 mg/mL), NE-PHMB (5 mg/mL) e NE-CUR+PHMB (0,5 mg/mL + 5 mg/mL). O método baseia-se na capacidade de eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

Para a análise, foram utilizados volumes de 20 µL e 50 µL de cada amostra, avaliando diferentes concentrações para uma melhor compreensão da atividade antioxidante (ANTEZANA et al., 2021; ANTEZANA et al., 2022). As amostras foram incubadas com 3 mL da solução metanólica de DPPH (25 mg/L) por 20 minutos. Após a incubação, a absorbância foi mensurada a 515 nm utilizando um espectrofotômetro. A porcentagem de inibição da atividade antioxidante foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = [1 - (\text{Abs. da amostra} / \text{Abs. de DPPH})] \times 100$$

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana, foi preparado um inóculo contendo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, ATCC 29213) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853). As bactérias foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (extrato de levedura, 5g/L; NaCl, 10g/L e triptona, 10g/L) a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram diluídas para atingir uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL. Para a determinação do número de UFC, foram realizadas diluições seriadas (1:100), que foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar sólido. Após incubação por 24 horas, as colônias foram contadas manualmente e o número de UFC/mL foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{UFC/mL} = (\text{N}^\circ \text{ total de colônias} / \text{Volume da amostra em mL}) \times \text{Fator de diluição}$$

As NEs e os compostos livres foram testados nas seguintes concentrações: Tratamentos com PHMB (0,5 mg/mL); tratamentos com CUR (0,05 mg/mL), ou seja 1:10 p/p. Os controles utilizados incluíram:

- Controle negativo: Meio LB sem bactérias.
- Controles positivos: (i) Meio LB + bactéria, (ii) Meio LB + bactéria + DMSO (para avaliar possível interferência do solvente).

As amostras foram incubadas com bactérias + tratamento por 24 horas a 37°C. Após esse período, alíquotas de 20 µL, foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar, e o crescimento bacteriano foi avaliado após 24 e 48 horas (MUNICOY et al., 2021).

Cultura celular

Foram utilizadas células HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) obtidas da Thermo

Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA) e B16F10 (melanoma murino). As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ambas as linhagens foram cultivadas sob as mesmas condições: 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Avaliação da Viabilidade e Migração celular *in vitro*

Ensaio com queratinócitos

As células HaCaT foram semeadas em placas de 96 e 48 poços, com densidades de 7×10^3 células/poço, respectivamente, para a realização dos ensaios de viabilidade celular (MTT) e migração celular. Após 24 horas de incubação, os queratinócitos foram tratados com compostos livres (L-CUR, L-PHMB e L-CUR-PHMB) e nanoemulsões (NE-BR, NE-CUR, NE-PHMB e NE-CUR-PHMB). Sendo o PHMB livre solubilizado em água destilada e a CUR livre em metanol e as NEs em meio DMEM.

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil)-2,5-difenil-tetrazólio), um método colorimétrico que mede a atividade metabólica celular via desidrogenase mitocondrial (MOSMANN, 1983). As células foram tratadas com compostos livres (L-CUR, L-PHMB e L-CUR-PHMB) e NEs (NE-CUR, NE-PHMB e NE-CUR-PHMB) nas concentrações de 13, 6, 3, 1 e 0,8 µg/mL para a CUR; 100, 50, 25, 12,5 e 6,125 µg/mL para o PHMB; e combinações equivalentes para CUR-PHMB. A nanoemulsão branca (NE-BR) foi utilizada como controle na concentração fixa de 9 µg/mL, juntamente com o meio (DMEM). Após o período de incubação com os tratamentos, o meio de cultura foi removido e adicionada a solução de MTT a 5 mg/mL, ajustada para uma concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram incubadas a 37 °C por 60 minutos em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O meio foi então removido e os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO sob agitação por 30 minutos. A absorbância foi medida a 492 nm utilizando um espectrofotômetro SpectraMax® M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle (DMEM), sendo as análises realizadas em triplicata (BALESTRIN et al., 2021).

Ensaio Scratch: Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada por meio do ensaio scratch-wound, realizado quando a

densidade celular atingiu aproximadamente 80%. A ferida *in vitro* na monocamada celular foi feita utilizando uma ponta de pipeta P200, sendo este considerado o tempo 0. Neste momento, foi adicionado meio de cultura DMEM 0,5% sem SBF no grupo controle e as soluções com os ativos para os grupos experimentais. As células foram tratadas com L-PHMB (25 µg/mL), L-CUR (1,68 µg/mL) e L-CUR-PHMB (1,68 + 25 µg/mL), com as nanoemulsões nas mesmas concentrações e a NE-BR na no volume fixo de 9 µL (maior volume de NE testado). As imagens do ensaio Scratch foram capturadas nos tempos de 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas utilizando uma câmera digital acoplada ao microscópio Olympus IX71 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão) (BALESTRIN et al., 2021). A análise da migração celular foi realizada por meio do software ImageJ, contabilizando todas as células que migraram para a lesão gerada ao longo do tempo. Os resultados foram expressos como valor absoluto de células migratórias e as análises foram conduzidas em triplicata (MARINHO et al., 2021).

Determinação do teor de melanina

A determinação do teor de melanina total foi realizada utilizando a linhagem de melanoma murino, B16F10. As células foram semeadas em placas de 10 cm (3×10^5 células/poço) e incubadas por 24 horas para adesão. Em seguida, foram estimuladas com hormônio α -MSH (200 nM) durante 24 horas, após, tratadas com os compostos LIVRES (L-PHMB – 0,0026 mg/mL; L-CUR – 0,00031 mg/mL) e NEs (NE-BR, NE-PHMB, NE-CUR e NE-CUR-PHMB, a 0,5 mg/mL) por 48 horas. Para diluição dos compostos livres, utilizou-se meio de cultura DMEM.

Após um total de 72 horas de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o pellet celular foi coletado. A extração da melanina foi realizada com solução de NaOH e quantificada por espectrofotometria a 475 nm (CHO et al., 2017). O ensaio foi conduzido em triplicata.

O grupo controle negativo foi normalizado para 100%, e os demais grupos foram comparados a ele. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism, utilizando ANOVA, com nível de significância de $p < 0,05$.

Ensaio de atividade da tirosinase

A avaliação da atividade da tirosinase foi conduzida *in vitro* utilizando a tirosinase de cogumelos *Agaricus bisporus* (250 u/mL) e o substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Inicialmente preparou-se a solução de tirosinase de cogumelo. Após, incluímos os tratamentos nas concentrações citadas no item 2.6.1.4 acima e incubados por 2 horas. Para os controles, foi

utilizado PBS como controle negativo e ácido kójico (AK, 50 µg/mL) como controle positivo, devido ao seu efeito inibidor clássico da tirosinase. Como branco da reação, foi preparada uma solução contendo L-DOPA sem a enzima tirosinase, analisada individualmente para cada grupo experimental. A leitura da atividade enzimática foi realizada por espectrofotometria a 475 nm, sendo a inibição da tirosinase inferida a partir da redução dos valores de densidade óptica em comparação ao controle negativo (CUI et al., 2018). O ensaio foi realizado em triplicata.

Padronização de queimadura cutânea

Para este ensaio, amostras de pele íntegra suína foram doadas pelo frigorífico Castro LTDA, localizado na cidade de Pelotas - RS. A partir da pele da orelha, foram excisionados discos de 1,70 cm de diâmetro com a utilização de bisturi e tesouras cirúrgicas.

Para realização das queimaduras térmicas, utilizamos um sistema padronizado composto por um pino cilíndrico de ferro (1 cm de diâmetro), um termômetro infravermelho para controle preciso da temperatura e um isqueiro como fonte de calor. O pino foi previamente aquecido pela chama do isqueiro até atingir as temperaturas de 110 °C e 130°C, temperatura confirmada por medição direta com o termômetro infravermelho, garantindo a padronização do processo. Após o aquecimento, o pino foi posicionado verticalmente sobre a superfície da pele sem aplicação de força, utilizando uma estante de tubos Falcon como suporte para garantir a uniformidade do contato. O pino foi mantido em contato com a pele por 10 segundos, tempo suficiente para induzir uma queimadura, adaptado de CIORNEI e colaboradores (2024) (CIORNEI et al., 2024).

Análise histológica

Após a indução de queimadura térmica cutânea, amostras da pele foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 4 horas. Os tecidos foram incluídos em parafina (Paraplast[®], Sigma, St. Louis, MO, EUA) e obtidos cortes de 5 µm de espessura em micrótomo. A técnica de hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para corar o tecido. As lâminas foram analisadas morfolologicamente e as imagens capturadas com microscópio óptico (Olympus SZX16) com câmera acoplada (Olympus SC30) com aumento de 20× e 40 x (MARQUES et al., 2020). Análise realizada de maneira inicial e visual, de acordo com as camadas da pele danificadas.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software,

San Diego, CA, EUA). ANOVA com teste post hoc de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. Todos os dados serão apresentados com média $\pm$ desvio padrão (DP). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Caracterização das nanoemulsões

Diferentes NEs foram preparadas pelo método de homogeneização a alta pressão (HAP) e observadas ao longo do tempo. As formulações foram preparadas com sucesso e conforme observações visuais não apresentaram precipitados ou separação de fases. Em relação ao tamanho das NEs, observamos tamanho médio aproximado de 200 nm e gotículas monodispersas, com PDI $< 0,2$. O potencial zeta das NEs contendo PHMB foi positivo, sendo a NE-PHMB com média de +35,66 mV e a NE-CUR-PHMB com média de + 30,26 mV. Já as demais NE, apresentaram potencial zeta negativo (NE-BR: - 32,4 mV e a NE-CUR: - 31,66 mV). Essa diferença de carga observada sugere a adsorção do PHMB na superfície das NES. O teor total de curcumina e PHMB nas formulações foram de: 0,6 mg /mL (100%) e 4,2 mg /mL (84%) e para CUR-PHMB, 0,6 mg /mL (100%) e 4,3 mg /mL (86%) respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Teor total de NEs

AMOSTRAS	CURCUMINA			PHMB		
	concentração (mg/mL)	$\pm$	DP	concentração (mg/mL)	$\pm$	DP
CUR	0,66	$\pm$	0,01	-		
PHMB	-			4.25	$\pm$ 0.03	
CUR-PHMB	0.62	$\pm$	0.008	4.38	$\pm$ 0.07	

DP- desvio padrão (injeções em duplicata no HPLC)

As nanoemulsões foram desenvolvidas com sucesso, conforme avaliação visual, uma vez que permaneceram homogêneas, sem indícios de separação de fases, sedimentação, floculação, coalescência, mudança de cor ou precipitação de componentes. Além disso, a análise do tamanho de partícula revelou valores médios adequados e dentro do esperado para cada formulação: NE-BR (225,7 nm), NE-PHMB (204,6 nm), NE-CUR (179,8 nm) e NE-CUR-PHMB (225,3 nm). A avaliação da estabilidade das nanoemulsões (NEs) ao longo de 30 dias em duas temperaturas de armazenamento (4°C e 25°C) revelou pequenas variações nos parâmetros físico-químicos analisados, incluindo tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (Tabela 3). Esses parâmetros são fundamentais para a caracterização e estabilidade das formulações, pois influenciam diretamente na dispersão

coloidal e na manutenção das propriedades físico-químicas. De acordo com o teste estatístico utilizado, não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa ao longo do período avaliado, indicando manutenção da estabilidade coloidal e ausência de alterações relevantes na dispersão das partículas. Dessa forma, as NEs testadas demonstram um perfil estável durante 30 dias, sugerindo que ambas as condições de armazenamento preservam suas características físico-químicas ao longo do tempo.

Tabela 3: Estabilidade das NEs ao longo de 30 dias, armazenadas em temperaturas de 4°C e 25°C.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Nanoemulsões	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0 (Zero)	25	NE-BR	232,9 ± 9,4	0,2 ± 0,05	-38,6 ± 5,2
		NE-PHMB	206,9 ± 7,1	0,1 ± 0,03	34,1 ± 3,6
		NE-CUR	181,7 ± 8,3	0,1 ± 0,03	-34,7 ± 4,7
		NE-CUR-PHMB	225,5 ± 12,4	0,2 ± 0,06	29,7 ± 2,5
15	4	NE-BR	223,1 ± 10,5	0,2 ± 0,04	-22,3 ± 9,5
		NE-PHMB	202,8 ± 8,5	0,1 ± 0,06	33,4 ± 0,8
		NE-CUR	182,4 ± 3,8	0,1 ± 0,06	-35,5 ± 6,5
		NE-CUR-PHMB	221,6 ± 13,3	0,2 ± 0,03	32,3 ± 1,1
	25	NE-BR	230,8 ± 11,2	0,1 ± 0,06	-38,6 ± 5,2
		NE-PHMB	205,3 ± 7,8	0,2 ± 0,03	38,5 ± 3,9
		NE-CUR	176,6 ± 3,9	0,2 ± 0,04	-27,5 ± 8,1
		NE-CUR-PHMB	229,5 ± 10,9	0,1 ± 0,06	28,6 ± 0,6
30	4	NE-BR	217,1 ± 9,5	0,2 ± 0,05	-29,5 ± 5,1
		NE-PHMB	202,3 ± 18,0	0,2 ± 0,04	37,1 ± 1,9
		NE-CUR	180,0 ± 4,8	0,1 ± 0,06	-25,0 ± 4,4
		NE-CUR-PHMB	225,2 ± 16,2	0,2 ± 0,02	29,5 ± 3,9
	25	NE-BR	224,9 ± 12,4	0,2 ± 0,07	-33,0 ± 9,5
		NE-PHMB	205,7 ± 6,1	0,1 ± 0,04	35,2 ± 3,5
		NE-CUR	178,5 ± 4,0	0,2 ± 0,06	-35,6 ± 5,1
		NE-CUR-PHMB	224,8 ± 11,5	0,2 ± 0,05	31,2 ± 0,4

*Os dados apresentam tamanho médio de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV). As medições foram realizadas no tempo zero (0 dia), 15 dias e após 30 dias. O valor representa a média ± DP para testes em triplicata. Os dados foram analisados por análise ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. *p < 0,05, diferente ao longo do tempo. NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida.

Avaliação morfológica das nanoemulsões

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanoemulsões NE-BR, NE-CUR, NE-PHMB e NE-CUR-PHMB podem ser observadas na Figura 1 e revelam que as partículas apresentam morfologia predominantemente esférica/arredondada, conforme esperado para nanoemulsões. Além disso, observa-se boa uniformidade na distribuição do tamanho das partículas, sugerindo um sistema homogêneo e disperso. Na imagem IV, há evidências da presença de aglomerados, o que poderia sugerir uma possível interação entre as partículas. No entanto, considerando que não foi observado este indicativo no teste de estabilidade avaliando os valores de PDI e potencial zeta, é possível que esses aglomerados estejam relacionados ao método de preparo da amostra para microscopia.

Portanto, os resultados obtidos pelas micrografias estão em concordância com os dados físico-químicos apresentados na tabela 3, reforçando que as nanoemulsões mantêm estabilidade e morfologia adequadas ao longo do tempo.

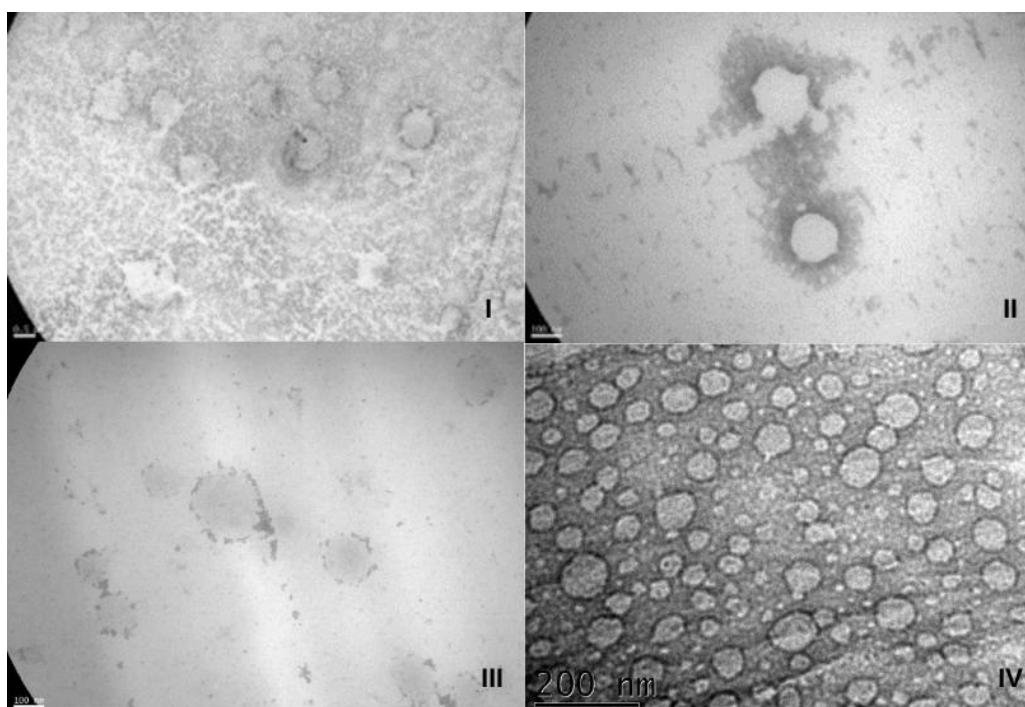


Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NEs analisadas. As imagens demonstram a morfologia e distribuição das partículas nas diferentes formulações (nm < 300nm). I) NE-BR; II) NE-CUR; III) NE-PHMB; IV) NE-CUR-PHMB.

Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante, avaliados pela porcentagem de inibição do radical DPPH, demonstraram que os tratamentos contendo somente CUR ou PHMB, apresentaram diferenças significativas entre elas, quanto a sua capacidade de inibição do radical livre. Neste ensaio pode-se observar que todos os tratamentos que continham CUR (L-CUR, NE-CUR e NE-CUR-PHMB) apresentaram alto potencial antioxidante. Já os tratamentos com a nanoemulsão branca e apenas PHMB não demonstraram atividade antioxidante (Figura 2).

Contudo, quando unimos NE-CUR-PHMB, a formulação continua apresentando potencial antioxidante elevado, o que nos leva a concluir que a CUR é o principal ativo antioxidante e que a associação com PHMB, não inibe sua capacidade, mesmo após o processo de nanoencapsulamento.

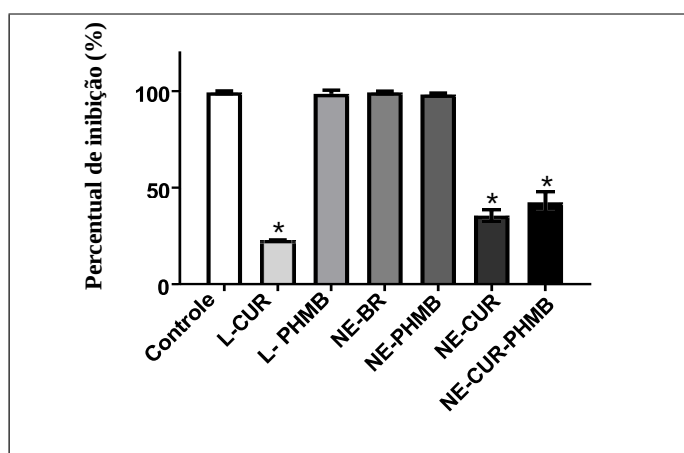


Figura 2: Avaliação da atividade antioxidante das formulações pelo ensaio de inibição do radical livre DPPH. O percentual de inibição do DPPH foi determinado após a adição de 100 μ L de cada tratamento. As formulações contendo apenas CUR (L-CUR e NE-CUR) apresentaram concentração final de 0,016 μ g/mL, enquanto as formulações contendo apenas PHMB (L-PHMB e NE-PHMB) apresentaram concentração final de 0,161 μ g/mL. As formulações contendo CUR e PHMB (NE-CUR-PHMB) apresentaram concentração final de 0,016 μ g/mL + 0,161 μ g/mL. Os resultados foram comparados ao controle e analisados estatisticamente por ANOVA, seguida do teste post hoc de Tukey. As barras marcadas com * indicam diferenças estatisticamente significativas (* $p < 0,05$) em relação ao controle.

Atividade antimicrobiana

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado durante o período de 24 e 48h (figura 3). Ele revelou que a curcumina livre (L-CUR) não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, enquanto o PHMB livre (L-PHMB) demonstrou forte atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre as nanoemulsões testadas, NE-BR e NE-CUR não exibiram atividade antimicrobiana, conforme esperado, enquanto NE-PHMB manteve a eficácia do PHMB, inibindo ambas as espécies bacterianas. A formulação contendo curcumina e PHMB nanoencapsulados (NE-CUR-PHMB) também mostrou inibição completa, indicando que a atividade antimicrobiana do PHMB não foi comprometida pelo processo de nanoencapsulação, e que a presença da curcumina não interfere nesse efeito. Tanto a presença de crescimento bacteriano, ou a ausência dele, não modificou ao longo do tempo.

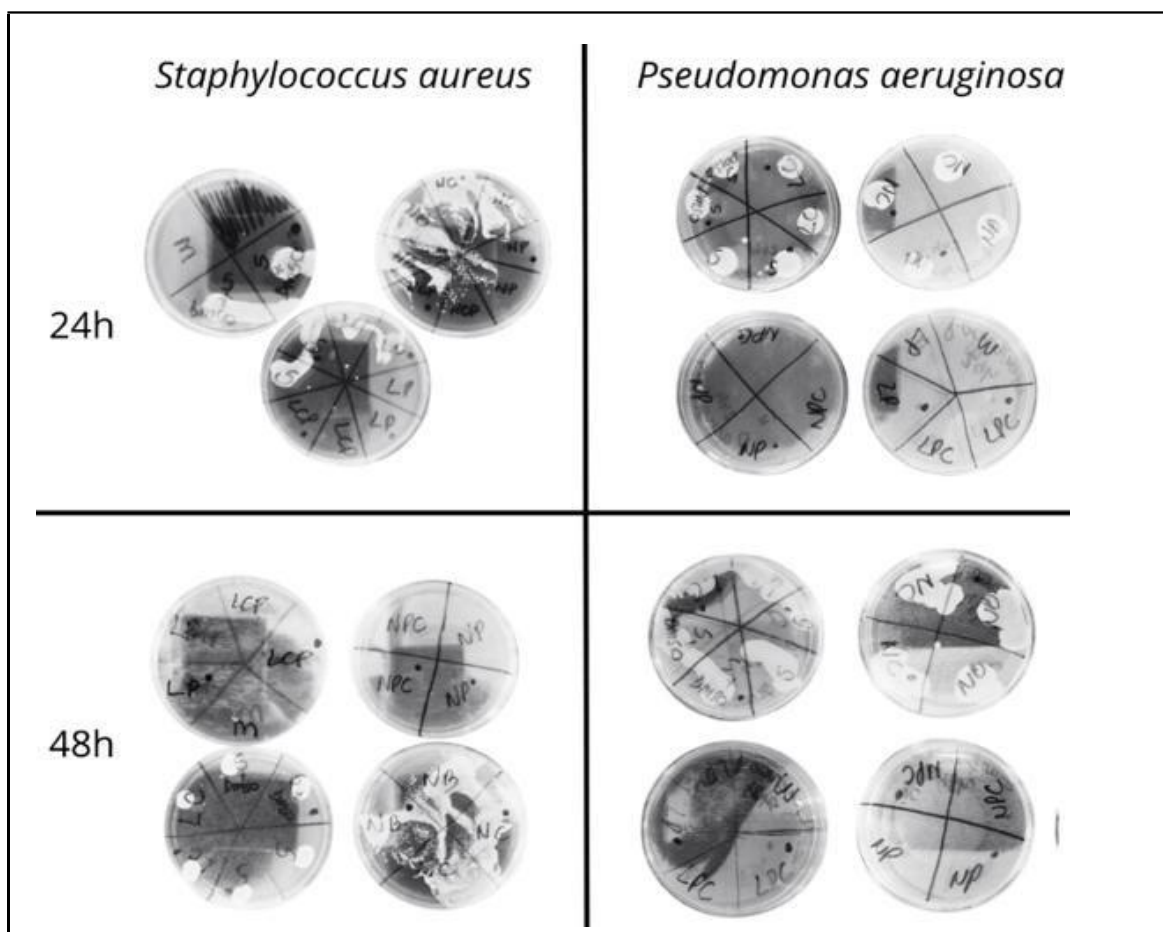


Figura 3: Avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 24h e 48h, semeadas em placas de Petri em duplicata. M, meio LB; S, bactérias; S+DMSO, bactéria+DMSO; LC=L-CUR, curcumina livre; LP=L-PHMB, PHMB livre; LCP=L-CUR-PHMB, curcumina e PHMB livre. NB=NE-BR, nanoemulsão branca; NC=NE-CUR, nanoemulsão de curcumina; NP=NE-PHMB, nanoemulsão de PHMB; NPC=NE-CUR-PHMB, nanoemulsão de curcumina e PHMB. Avaliação em duplicata, com exceção do meio LB.

Ensaio de Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular pelo ensaio MTT foi realizada em células HaCat, para avaliar o efeito citotóxico dos tratamentos livres e NEs, avaliadas em 24h, 48h e 72h em 5 diferentes concentrações (0,8µg/mL a 100µg/mL). Podemos observar, na Figura 4, que ao longo do tempo, a L-CUR e NE-CUR apresentam citotoxicidade estatisticamente significante nas concentrações mais elevadas de 13µg/mL e 6µg/ mL. Já nas menores concentrações, de 1µg/mL e 0,8 µg/mL também obtiveram significância estatística, contudo, aparentemente melhorando a viabilidade celular, comparada ao controle. Contudo, quando comparamos as mesmas concentrações para verificar o desempenho de cada dose, somente a NE-CUR nas primeiras 24 hs, foi estatisticamente significante. O PHMB demonstrou redução da viabilidade celular ao longo do tempo, tanto para a forma livre como a forma nanoencapsulada, com exceção das menores concentrações 12,5 µg/mL e 6,125 µg/mL das NE. Sendo ainda observado que a NE 12,5 µg/mL nos tempos 48 e 72h, apresentou viabilidade celular superior ao composto livre em mesma concentração. Já se tratando de quando há a junção de ambos compostos CUR-PHMB, todas

as concentrações demonstraram significância estatística nos 3 tempos, contudo, a NE-CUR-PHMB resultou em um leve aumento na viabilidade celular nas 72 horas, sugerindo que possivelmente a combinação com a CUR e/ou a adsorção dele na superfície das NEs auxilie na redução da toxicidade aguda do PHMB.

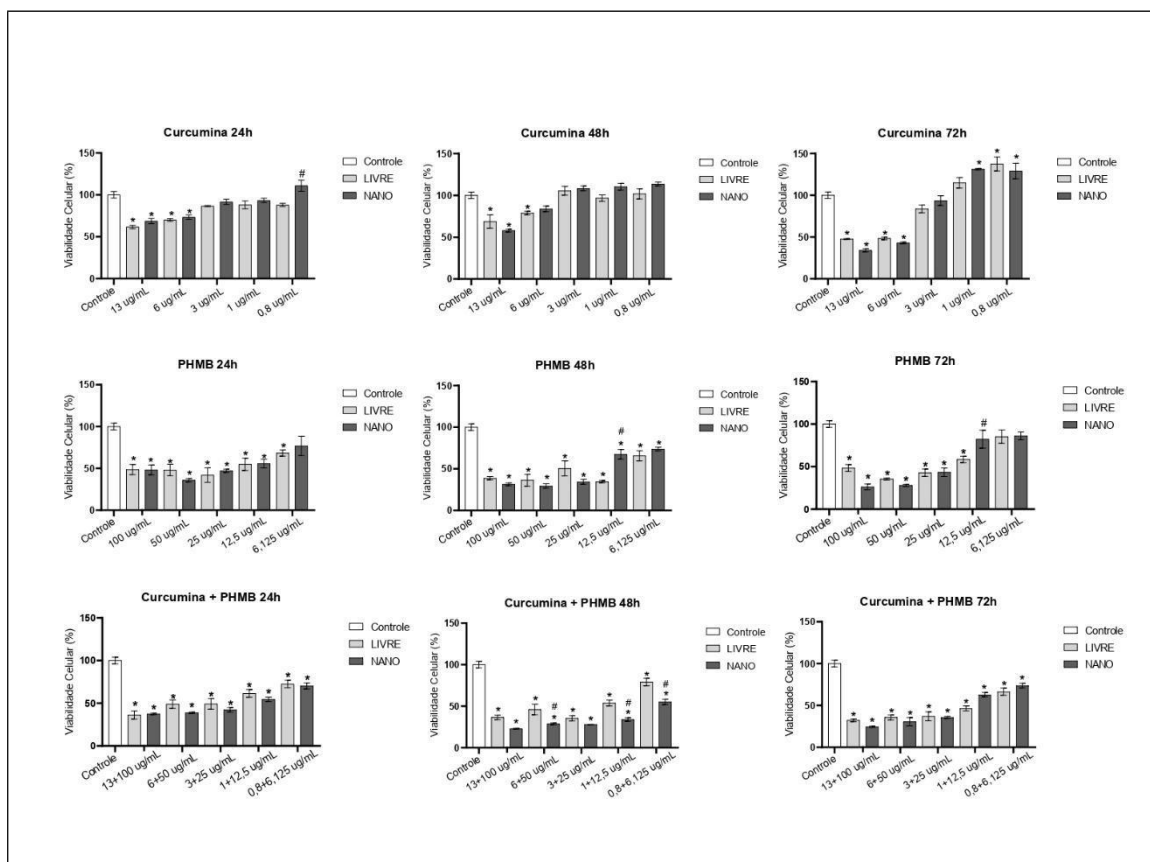


Figura 4: Viabilidade celular (ensaio MTT) de células de queratinócitos humanos (HaCat), em 24h, 48h e 72h de tratamento. Compostos LIVRE, NE e controle. O valor representa a média $\pm$ DP para testes em triplicata. Os dados foram analisados por análise ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, em relação ao controle e # $p < 0,05$, entre os grupos LIVRE e NANO de mesma concentração. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida; Nano: compostos carregados em nanoemulsão; Livre: compostos dissolvidos em veículos apropriados. Resultados para a NE-BR não foram adicionados, pois na maior concentração utilizada para as NE (9 μ L/mL) não apresentou citotoxicidade para a linhagem celular HaCat.

Ensaio Scratch

O ensaio Scratch realizado simula as condições de uma lesão técnica por meio da criação de um arranhão no meio de cultivo. Como resposta, as células tendem a migrar para ocupar a área exposta, semelhante ao que ocorre no organismo vivo. Este ensaio apresentou limitações que comprometeram sua interpretação. Os tratamentos com compostos livres L-PHMB (25 μ g/mL), e L-CUR-PHMB (1,68 + 25 μ g/mL), apresentaram contaminação, inviabilizando sua análise. Já o controle e a NE-BR (9 μ L), não apresentaram migração celular, mesmo não sendo uma concentração tóxica, uma vez testada anteriormente no ensaio de viabilidade celular. Em contrapartida, os tratamentos NE-PHMB (25 μ g/mL) e NE-PHMB (1,68 + 25 μ g/mL) apesar dos resultados não serem confiáveis, apresentaram certa migração celular e posterior declínio.

Desta forma, novos testes estão sendo realizados para confirmação desses resultados.

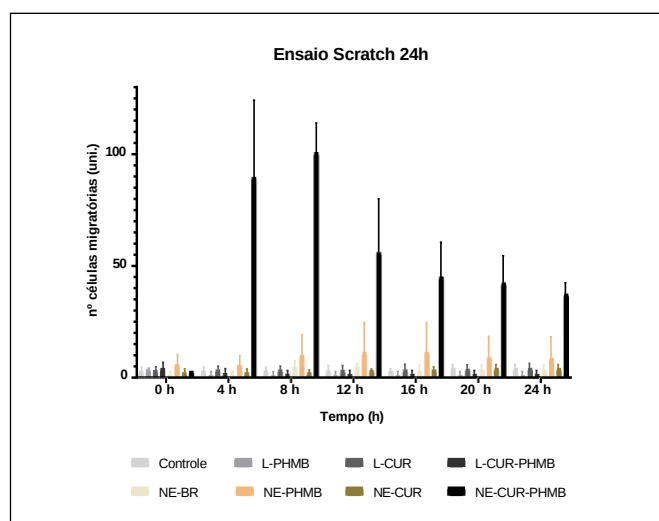


Figura 5: Ensaio Scratch. Número de células migratórias ao longo do tempo de 24 horas. Compostos Livre, NEs avaliados. Dados apresentados a partir do valor absoluto e células que migraram para a “lesão” em relação ao tempo. Os dados foram analisados somente em relação ao DS, diferente entre os grupos. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; L-CUR-PHMB: curcumina e polihexametileno livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida. Controle= somente meio.

Ensaio de atividade da tirosinase

O ensaio de inibição da tirosinase de cogumelo foi conduzido para avaliar o efeito das formulações sobre a atividade dessa enzima, que tem um forte papel na síntese de melanina. Os resultados demonstraram que, entre os tratamentos de compostos livres, os grupos L-PHMB e L-CUR-PHMB apresentaram uma redução significativa na atividade da tirosinase, quando comparados ao controle ($***p < 0,001$), sugerindo que o PHMB está atuando na regulação da tirosinase (figura 6). Esse achado é relevante, pois indica que o PHMB pode interferir na via de síntese da melanina. Em contrapartida, os grupos contendo NEs, não demonstraram efeito significativo sobre a atividade da tirosinase, mantendo os valores próximos ao controle.

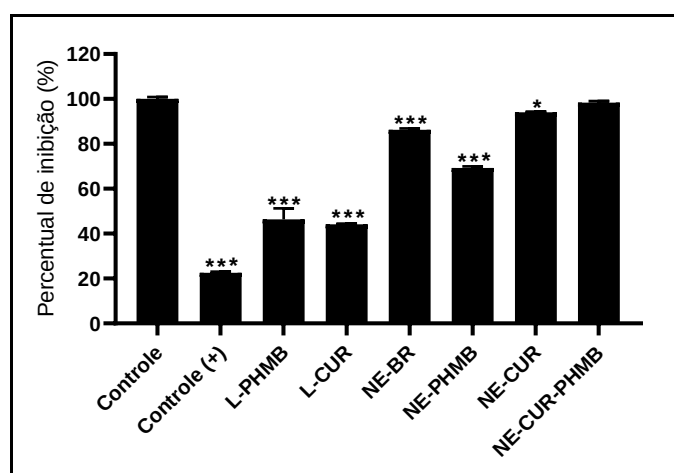


Figura 6: Percentual de atividade da tirosinase de cogumelo. Compostos Livre, NEs e Controle positivo foram normalizados em relação ao grupo controle. Os dados foram analisados por análise ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. $***p < 0,001$, diferente entre os grupos. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; L-CUR-PHMB:

curcumina e polihexametileno livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida; Controle: PBS; Controle +: ácido kójico.

Determinação do teor de melanina

Para avaliar o efeito dos compostos livres e nanoemulsões na melanogênese, células B16F10 foram estimuladas com o hormônio estimulante de melanócito (α -MSH) e, em seguida, tratadas com os compostos livres e NEs. Os resultados demonstram que os tratamentos com PHMB livre (L-PHMB e L-CUR-PHMB) apresentaram um efeito redutor significativo na produção de melanina, corroborando com o ensaio de tirosinase, onde a atividade da tirosinase também foi reduzida nesses grupos. Em contrapartida, a CUR livre (L-CUR) também apresentou redução significativa na produção de melanina, embora em menor intensidade, comparada aos grupos com PHMB livre (figura 7). Com relação às NEs, todas apresentaram redução estatisticamente significativa na produção de melanina, quando comparadas com o controle. Contudo podemos observar que apesar de inibir a produção de melanina, as NEs que contêm ativos, possuem um efeito inibidor semelhante (NE-PHMB; NE-CUR; NE-CUR-PHMB).

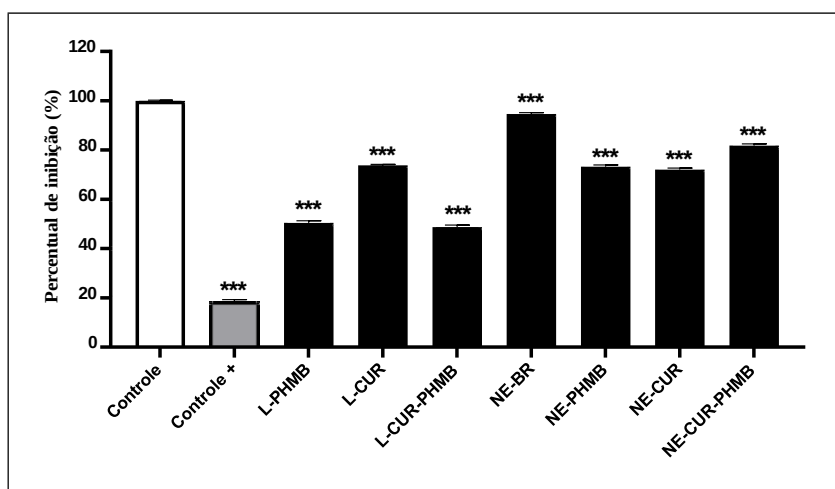


Figura 7: Percentual do potencial inibidor de melanina total em células B16F10 estimuladas por hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH). Compostos Livres, NEs e Controle positivo foram normalizados em relação ao grupo controle. Os dados foram analisados por análise ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$, diferente entre os grupos. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; L-CUR-PHMB: curcumina e polihexametileno livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida; Controle: DMEM; Controle +: ácido kójico.

Análise Histológica

A análise histológica foi realizada em pele suína, íntegra e lesionada por queimadura térmica a temperatura de 110°C e 130°C com tempo de contato de 10s (figura 8). Na pele íntegra (I), pode observar tecidos preservados, com epiderme bem definida, com estrato córneo íntegro e evidente. Papilas epidérmicas e dérmicas aderidas, seguidas da derme com distribuição homogênea das fibras colágenas. Sem rompimento do estrato córneo ou da epiderme. A pele

exposta a 110 °C por 10 segundos (II), exibe alterações morfológicas evidentes, como desorganização das camadas epidérmicas do estrato córneo, presença de bolha epidérmica resultante do descolamento da camada córnea da epiderme e possível descamação. A pele submetida a 130°C por 10 segundos (III), apresenta o mesmo dano observado na imagem II. Sem a evidência de bolha epidérmica. As características observadas nas imagens II e III, são clássicas de queimadura de grau I, que atinge exclusivamente o tecido da pele mais externo, a epiderme – estrato córneo.

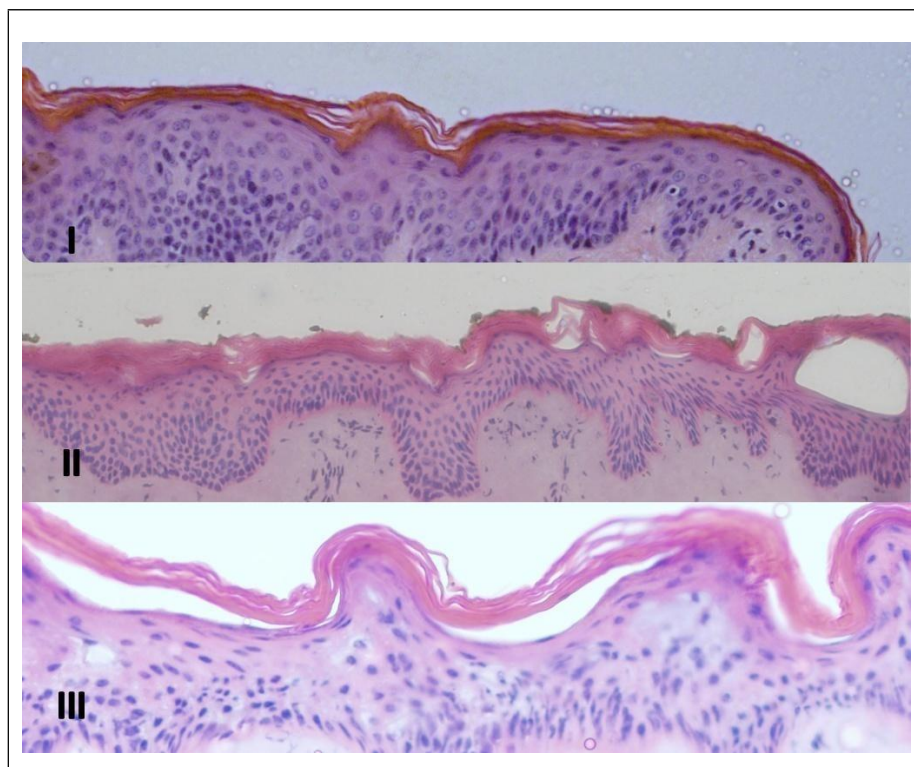


Figura 8: Imagens histológicas de pele suína. Imagens obtidas por microscopia óptica (40x). Tecido corado com técnica de hematoxilina e eosina (HE). Lâminas evidenciam camadas em pele íntegra e lesionada por queimadura térmica de grau I, onde há evidente dano da epiderme. **I)** Pele íntegra. **II)** Pele queimada a 110°C por 10s. **III)** Pele queimada a 130°C por 10s.

Discussão

As queimaduras afetam milhões de pessoas anualmente, sendo frequentemente acompanhadas por infecções bacterianas, tanto de bactérias Gram-positivas como de Gram-negativas, o que compromete o processo de cicatrização e acaba favorecendo a hiperpigmentação-pós inflamatória. Neste estudo, investigamos a associação da curcumina (CUR) e do polihexametileno biguanida (PHMB) em nanoemulsões, visando combinar suas propriedades antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante e despigmentante. Enquanto a CUR atua na modulação da inflamação, tem efeito cicatrizante auxilia na inibição da hiperpigmentação, o PHMB proporciona ação antimicrobiana prevenindo infecções secundárias.

A formulação estudada neste trabalho, baseia-se em pesquisas prévias, onde uma nanoemulsão contendo CUR foi desenvolvida por ARAUJO e colaboradores (2023) visando o tratamento de queimaduras. Posteriormente MARTINS e colaboradores (2024), incluíram o PHMB nesta formulação, resultando na NE-CUR-PHMB. No presente trabalho, foi verificado que além dos efeitos cicatrizante e antimicrobiano, ambos compostos CUR e PHMB possuem efeito despigmentante, e essa inovação possibilita uma abordagem multifuncional para o tratamento de queimaduras. Vale também ressaltar que ainda não há relatos na literatura sobre o efeito despigmentante do PHMB.

Visando a utilização deste tratamento para queimaduras, por via tópica, e sabendo que a permeação de fármacos pela pele é um desafio devido à barreira protetora imposta pelo estrato córneo (SC), sua compactação e matriz celular lipídica, as NEs surgem como uma estratégia promissora para superar essa limitação e melhorar a liberação de fármacos na pele. As nanoemulsões desenvolvidas neste estudo apresentaram tamanhos médios de partícula variando entre 176,6 nm e 232,9 nm (Tabela 1) e morfologia esférica e uniforme. Esses tamanhos e formato estão dentro da faixa considerada ideal para permeação cutânea, especialmente para sistemas que visam a liberação controlada de fármacos nas camadas mais profundas da pele (ARAÚJO et al., 2023). Estudos indicam que partículas com diâmetros entre 100 e 300 nm são capazes de penetrar na epiderme e alcançar a derme, promovendo maior eficácia terapêutica sem risco significativo de absorção sistêmica (BAROLI, 2010). No entanto, partículas maiores tendem a permanecer mais tempo na superfície da pele, podendo favorecer uma ação tópica mais prolongada, o que pode ser desejável para o tratamento de queimaduras e cicatrização (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018).

As diferenças observadas nos tamanhos das partículas entre as formulações podem estar relacionadas ao método de preparação, composição e estabilidade ao longo do tempo. As nanoemulsões contendo PHMB (NE-PHMB e NE-CUR-PHMB) apresentaram valores de tamanho médio levemente superiores (202,8 – 229 nm) às demais formulações com ativos incorporados, o que pode ser explicado pela interação do polímero catiônico com os surfactantes da emulsão e sua adsorção na superfície das gotículas (LIMA et al., 2021). Além disso, o índice de polidispersão (PDI) abaixo de 0,2 em todas as amostras confirma uma distribuição homogênea de tamanho das partículas, indicando a estabilidade das formulações e evitando a formação de agregados que poderiam comprometer a permeação cutânea.

Os testes de estabilidade realizados ao longo de 30 dias demonstraram que as nanoemulsões formuladas permaneceram estáveis mesmo em temperatura ambiente (25°C), sem alterações significativas no tamanho médio das partículas, PDI e potencial zeta (Tabela 3). Esses resultados são relevantes para a aplicação comercial, pois protegem a curcumina da degradação, melhoram a estabilidade e garantem que o produto pode ser armazenado e

transportado sem necessidade de refrigeração, reduzindo custos logísticos e aumentando sua viabilidade em regiões com infraestrutura limitada (MD SAARI et al., 2020). Também importante pois facilita a incorporação da formulação em curativos ou géis para uso hospitalar e domiciliar (SHALABY et al., 2023). Por exemplo, NEs de CUR mantiveram os parâmetros químico-físico praticamente inalterado por 6 meses a uma temperatura de 25°C (YOUSEF et al., 2019). Em outro estudo, realizado por nosso grupo de estudo, NEs e CLN carregados com CUR permaneceram estáveis por 120 dias em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C, com elevada eficiência de encapsulamento (>90%) (ARAÚJO et al., 2023).

A literatura demonstra que a estabilidade coloidal das nanoemulsões é diretamente influenciada pelo potencial zeta, sendo recomendado um valor superior a ± 30 mV para evitar agregação de partículas e garantir a homogeneidade da dispersão (LIMA et al., 2021). No presente estudo, os valores do potencial zeta das formulações foram negativos (~ -38 mV) para as NEs brancas ou com CUR e positivos ($\sim +38$ mV) quando PHMB foi adicionado na formulação. Estes dados indicam que os sistemas possuem uma estabilidade eletrostática e sugerem que o PHMB esteja na superfície ou interface das gotículas. Além disso, a carga superficial também afeta a interação com a pele. A pele possui uma carga negativa natural devido à presença de fosfolipídios como a fosfatidilcolina. Assim, NEs com potencial zeta positivo podem ter maior interação com a superfície cutânea, potencializando a permeação de fármacos. No contexto dos componentes das NEs, o (PHMB) é um polímero catiônico devido à presença de grupos biguanida, conferindo-lhe carga positiva as gotículas. Essa característica permite que NEs contendo PHMB interajam mais eficazmente com a pele, potencializando a permeação do fármaco (KAMARUZZAMAN et al., 2018). Por outro lado, a curcumina possui grupos fenólicos e enólicos que, ao ionizarem em meio aquoso, conferem uma carga negativa às NEs.

A CUR é reconhecida como um potente antioxidante e eliminador de radicais livres, requisitos importantes para a redução do estresse oxidativo em lesões de queimadura e HPI. Diversos estudos prévios, estabeleceram que a CUR possui forte atividade antioxidante e anti-inflamatória, contribuindo para a proteção tecidual (RAPTI et al., 2024). No ensaio DDPH, as NEs são colocadas em meio metanólico e isso acaba acarretando no rompimento das NEs, desta forma, neste estudo verificamos se a atividade oxidante foi afetada ou não pelo processo de produção das NEs e não se há diferença entre o composto livre ou nanoencapsulado. Como resultado do ensaio, verificamos que todos os tratamentos que continham CUR foram capazes de inibir o DDPH, com um leve efeito maior da CUR livre. Estes dados corroboram com os dados reportados por SAARI e colaboradores (2020), que observaram que apesar da atenuação

da capacidade oxidante (~8% menor do que a CUR livre), o potencial oxidante se mantém após o processo de encapsulamento.

Manter o efeito antioxidante é relevante porque, no microambiente da pele queimada, o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) pós-inflamação pode estimular a melanogênese e danificar os tecidos. Neste sentido, a CUR pode neutralizar ROS, mitigando danos e a cascata inflamatória que leva à HIP. Em estudo *in vivo* a aplicação de CUR em lesões cutâneas, reduziu marcadores de estresse oxidativo e ativou a via Nrf2/HO-1, elevando enzimas antioxidantes endógenas (como SOD, catalase) no tecido cutâneo (WU et al., 2023). Assim a atividade antioxidante da CUR, ajuda a proteger as células da pele contra o estresse oxidativo, favorecendo a regeneração tecidual com menor efeito da HIP.

Nesse sentido, a CUR age diretamente na ação redox, antioxidante, e o PHMB, indiretamente, controlando infecções, diminuindo a carga inflamatória na lesão infectada e/ou inflamada.

Queimaduras são lesões cutâneas altamente suscetíveis a infecções, como já mencionado anteriormente, e a presença de bactérias prolonga a inflamação e piora o tempo de cicatrização, podendo agravar a HIP. No ensaio de atividade antimicrobiana realizado contra patógenos comuns encontrados em queimaduras, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* testando as NEs desenvolvidas, em 24h e 48h, e observamos que nos tratamentos que continham PHMB não houve crescimento bacteriano em nenhum dos tempos (figura 3). A eficácia do PHMB já havia sido relatada em outros experimentos, inclusive contra *Candida albicans* (LÓRINCZ et al., 2024), mostrando assim que este composto é um antisséptico de amplo espectro, combatendo microrganismos que podem atrasar a reepitelização e intensificar a HIP pós-lesão. Por outro lado, apesar de haver alguns relatos indicando que a CUR possui efeito antibacteriano, este resultado não foi observado no nosso estudo, talvez em função da concentração testada e vários outros estudos também não observam este efeito para CUR. SHARMA e colaboradores (2022) (SHARMA et al., 2022), testaram a CUR em ensaio que avaliou efeito antimicrobiano utilizando a bactéria *Escherichia coli*, na concentração de 0,18 µg/ml e neste estudo também não obtiveram nenhum efeito antimicrobiano. Em estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, por ARAUJO e colaboradores (2023), pode-se observar 65% de inibição bacteriana após 24h, apenas quando foi feita uma associação da NE contendo CUR ao antibiótico gentamicina. Da mesma forma, uma revisão realizada por KUMARI e colaboradores (2023) destacou justamente o potencial da CUR como agente microbiano tópico em queimaduras, melhorando a penetração cutânea e aumentando sua eficácia contra infecções dessas lesões, mas quando associado a um outro composto antimicrobiano.

Se tratando da citotoxicidade de um tratamento inovador, avaliar a viabilidade celular e a migração celular são informações importantes. Quando acrescentamos o objetivo deste tratamento, como melhora no tempo de cicatrização ou estímulo da cicatrização, primeiramente precisamos garantir que a NE não seja citotóxica as células (queratinócitos e fibroblastos) e posteriormente avaliar se a formulação irá estimular ou pelo menos, não prejudicar a migração celular. Neste trabalho foi avaliado a viabilidade celular em células de queratinócitos humanos (HaCat), após exposição de 24-72h (figura 4). Os resultados obtidos, demonstram que tanto a CUR como o PHMB possuem um efeito citotóxico dose-dependente e que podem ser usados com segurança em concentrações mais baixas. Também verificamos que a utilização do PHMB em um sistema nanoemulsionado aparentemente pode auxiliar a diminuir sua toxicidade. Este fato corrobora com estudo de KAMARUZZAMAN e colaboradores (2018), onde a nanoencapsulação do PHMB reduziu sua toxicidade ao controlar sua liberação e limitar sua interação direta com as células. Ensaio com queratinócitos mostraram que o PHMB livre, isolado ou em combinação com nadifloxacino, causou alta liberação de lactato desidrogenase (LDH) e redução na viabilidade celular, indicando toxicidade. Por outro lado, quando formulado como nanopartículas, o PHMB apresentou liberação mais lenta, com menor efeito citotóxico, afetando a viabilidade celular apenas em concentrações mais elevadas.

A HIP acaba sendo a consequência do aumento de produção ou deposição de melanina na pele, após o processo inflamatório causado pela queimadura (DAVIS; CALLENDER, 2010). Sendo assim, é interessante que para tratá-la a NE atenua a melanogênese – inibindo a tirosinase (enzima chave da síntese de melanina) ou modulando outras vias regulatórias dos melanócitos. Há relatos na literatura que a CUR possui efeito despigmentante, sendo que em ensaios *in vitro* com melanócitos humanos, foi possível observar que a CUR reduziu significativamente a atividade da tirosinase e a síntese de melanina de forma dose-dependente, apesar de não elucidar se CUR inibe a melanogênese ou se inibe outras vias como MITF, ERK, PI3K/Akt e GSK 3 β (TU et al., 2012). Recentemente, outro estudo também indicou que a CUR e derivados curcuminóides têm atividade antimelanogênica em modelos celulares e em embriões de zebrafish (*Danio rerio*), reduzindo a pigmentação cutânea (JEON et al., 2023). No experimento realizado neste trabalho, que avaliou a inibição da tirosinase, nos tratamentos com L-PHMB e L-CUR-PHMB apresentaram efeito despigmentante maior que os outros tratamentos propostos, trazendo um dado interessante e inesperado, que é o indicativo que o PHMB também apresenta este efeito. Quando comparamos os compostos livres e as nanoemulsões, as NEs não apresentaram efeito despigmentante, mesmo aqueles contendo PHMB. Resultados como esse,

Que demonstram a diferença entre compostos livres e nanoencapsulados no potencial despigmentante, já foram verificados anteriormente. ROSELAN e colaboradores (2021) , puderam constatar que o ácido kójico nanoencapsulado teve efeito despigmentante menor que o ativo livre (ROSELAN et al., 2021). Mesma observação feita por ZILLES e colaboradores (2022) em seu ensaio. Este efeito pode acontecer pois a molécula, que apresenta o efeito biológico, está encapsulada, ou seja, dentro de uma gota de óleo nanométrica, prejudicando o contato entre a molécula e a enzima, podendo não haver a liberação rápida do ativo. Sendo assim, possivelmente o ativo precisaria de mais tempo para ser liberada, devido ao tempo curto de experimento (ZILLES; ALEGRE, 2022). Portanto, devido ao ensaio ser realizado em um curto espaço de tempo (2 horas) não visualizamos o efeito das NEs. No entanto, através deste resultado, também podemos confirmar que o PHMB, por mais que seja um composto hidrofílico e adicionado na fase externa da formulação, realmente se encontra nanoencapsulado nas nanogotículas, uma vez que este não estava disponível na fase externa para exercer o mesmo efeito do composto livre.

Além disso, gostaríamos de destacar que este é o primeiro relato na literatura de que o PHMB bloqueia a atividade da tirosinase ou interfere em outra via de síntese de melanina. Ao procurar dados do efeito despigmentante do PHMB na literatura, encontramos apenas estudos reportando que algumas biguanidas, em especial a metformina, antidiabético mais utilizado no Brasil, pode modular a melanogênese e amenizar hiperpigmentações. Neste sentido, sabe-se que a metformina tópica reduz a expressão de três proteínas melanogênicas, tirosinase, proteína relacionada à tirosina (TRP)-1 e TRP-2 (WANG et al., 2021). Apesar de estudos em humanos já estarem sendo desenvolvidos e bons resultados terem sido observados quando comparada a sua eficiência ao uso tópico de hidroquinona + tretinoína + fluocinolona (TCC) (BANAVASE CHANNAKESHAIAH; ANDANOORU CHANDRAPPA, 2020), mais estudos precisam ser realizados para entender melhor como esse efeito despigmentante acontece.

Já no ensaio de determinação do teor de melanina, os tratamentos com L-PHMB continuaram demonstrando comportamento inibitório mais pronunciado que os demais, mas neste teste, a CUR também apresentou potencial inibitório de melanogênese, corroborando com os dados de ROCCHITTA e colaboradores (2022). Diferente do ensaio de inibição da tirosinase, enzimático, este ensaio é celular, portanto requer tempo de incubação mais prolongado, pois a síntese de melanina envolve múltiplos mecanismos intracelulares, incluindo regulação gênica, transporte de melanossomos e ação de cofatores endógenos. Além disso, como este ensaio é realizado em células vivas, houve tempo suficiente para que ocorresse a liberação gradual de CUR e PHMB a partir das NEs, permitindo que o efeito despigmentante de ambos os compostos fosse observado. No entanto, aparentemente esse efeito ocorre de forma individualizada e não sinérgica.

Em relação a análise histológica, a mimetização de queimadura em pele suína, tem sido utilizada por se tratar de um tecido com uma anatomia, fisiologia e respostas terapêuticas semelhantes à nossa. Sendo assim, testes podem ser realizados quanto a permeação e retenção de fármacos em desenvolvimento para uso tópico, por exemplo. No nosso trabalho, iniciamos os testes de padronização de queimadura em modelo de pele suína de 110°C e 130°C em contato com a fonte de calor por 10s, sem exercer pressão, buscando produzir um modelo de queimadura de 2 grau. Mas as análises histológicas demonstraram que os tempos e temperaturas testados ainda não foram suficientes para ocasionar essa lesão, assim, novos testes estão sendo realizados para melhor padronização e replicabilidade adequados.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial promissor das NE-CUR-PHMB para o tratamento de queimaduras e suas complicações, como infecções secundárias e hiperpigmentação pós-inflamatória. A formulação das NEs foi eficiente na estabilização dos compostos ativos, garantindo a preservação de suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e despigmentantes. Além disso, a nanoencapsulação se mostrou uma estratégia vantajosa para reduzir a toxicidade do PHMB, quando associada com a CUR em menores concentrações, sem comprometer sua eficácia antimicrobiana, apesar de novos testes com menores concentrações serem necessários. Os ensaios indicam que, enquanto a CUR atua na modulação inflamatória, antioxidante e na redução da melanogênese, o PHMB não apenas combate infecções bacterianas, mas também apresenta um efeito despigmentante inédito na literatura, sugerindo uma abordagem terapêutica inovadora para evitar a HPI. Apesar da necessidade de repetições em alguns testes, este estudo abre caminho para futuras investigações voltadas à otimização dessas formulações e destaca uma descoberta inesperada com potencial terapêutico inovador.

Conclusão

Neste estudo, desenvolvemos e caracterizamos NEs contendo curcumina e PHMB (NE-CUR-PHMB) para o tratamento de queimaduras, com ênfase na prevenção da hiperpigmentação pós-inflamatória. As formulações apresentaram estabilidade coloidal, com tamanho de partícula adequado para permeação cutânea, baixo índice de polidispersão e potencial zeta favorável à interação com a pele. A NE-CUR-PHMB demonstrou atividade antimicrobiana eficaz contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de preservar a atividade antioxidante da CUR. Os ensaios citotóxicos indicaram que a nanoencapsulação reduziu a toxicidade do PHMB, quando associada com CUR nas menores concentrações testadas podendo isso, estar ligado ao efeito protetor e antioxidante da CUR nas células. Além disso, pela primeira vez, foi identificado o efeito despigmentante

do PHMB, sugerindo que sua ação vai além da atividade antimicrobiana e pode contribuir para o tratamento da HPI. Os testes histológicos mostraram a necessidade de ajustes na padronização do modelo de queimadura em pele suína para avaliação da permeação e retenção das NEs. No geral, os achados deste estudo reforçam a importância das nanoemulsões como estratégia multifuncional para melhorar a cicatrização e prevenir sequelas estéticas em queimaduras, possibilitando futuros avanços no manejo de queimaduras.

REFERÊNCIAS

- ANTEZANA, P. E. et al. Collagen Hydrogels Loaded with Silver Nanoparticles and Cannabis Sativa Oil. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1420, nov. 2021.
- ANTEZANA, P. E. et al. Design of a New 3D Gelatin—Alginate Scaffold Loaded with Cannabis sativa Oil. **Polymers**, v. 14, n. 21, p. 4506, jan. 2022.
- ARAÚJO, G. DE M. S. et al. Toward a Platform for the Treatment of Burns: An Assessment of Nanoemulsions vs. Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Curcumin. **Biomedicines**, v. 11, n. 12, p. 3348, dez. 2023.
- ARORA, A.; ALI.; ZZAMAN, M. T. Simple and sensitive method for determination of polyhexanide en multipurpose solution. **Electron J. Biomed.**, v. 2, p. 30-37, 2009.
- BALESTRIN, L. A. et al. Achyrocline satureioides (Lam.) DC (Asteraceae) Extract-Loaded Nanoemulsions as a Promising Topical Wound Healing Delivery System: In Vitro Assessments in Human Keratinocytes (HaCaT) and HET-CAM Irritant Potential. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1241, 12 ago. 2021.
- BANAVASE CHANNAKESHAIAH, R.; ANDANOORU CHANDRAPPA, N. K. Topical metformin in the treatment of melasma: A preliminary clinical trial. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 1161–1164, maio 2020.
- BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21–50, 1 jan. 2010.
- CHO, Y. H. et al. Tranexamic acid inhibits melanogenesis by activating the autophagy system in cultured melanoma cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 88, n. 1, p. 96–102, out. 2017.
- CIORNEI, B. et al. Experimenting with Pig-based Skin Model for Burns. Testing of Mean Literature Findings. **Chirurgia**, v. 119, n. 4, p. 417, 2024.
- CUI, H.-X. et al. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seed Oils from *Torreya grandis* Fort. ex Lindl. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 5314320, 2018.
- DAVIS, E. C.; CALLENDER, V. D. Postinflammatory Hyperpigmentation. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 3, n. 7, p. 20–31, jul. 2010.
- DE MORAES SOARES ARAÚJO, G. et al. Designing and characterization of curcumin-loaded nanotechnological dressings: A promising platform for skin burn treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, p. 122712, mar. 2023.
- DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Skin-Associated Drug Delivery. v. 127, p. 58–84, 1 mar. 2018.
- JEON, H.-J. et al. Antimelanogenic Effects of Curcumin and Its Dimethoxy Derivatives: Mechanistic Investigation Using B16F10 Melanoma Cells and Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. **Foods**, v. 12, n. 5, p. 926, jan. 2023.

- KAMARUZZAMAN, N. F. et al. Polyhexamethylene Biguanide and Nadifloxacin Self-Assembled Nanoparticles: Antimicrobial Effects against Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Polymers**, v. 10, n. 5, p. 521, maio 2018.
- KIANVASH, N. et al. Evaluation of propylene glycol nanoliposomes containing curcumin on burn wound model in rat: biocompatibility, wound healing, and anti-bacterial effects. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 5, p. 654–663, out. 2017.
- LIMA, T. S. et al. Cineole-containing nanoemulsion: Development, stability, and antibacterial activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 239, p. 105113, 1 set. 2021.
- LŐRINCZ, A. et al. Management of Pediatric Superficial Partial-Thickness Burns with Polyhexamethylene Biguanide: Outcomes and Influencing Factors. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 11, p. 3074, 24 maio 2024.
- MARINHO, M. A. G. et al. Interaction Between Near-Infrared Radiation and Temozolomide in a Glioblastoma Multiform Cell Line: A Treatment Strategy? **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 91–104, 1 jan. 2021.
- MARQUES, M. S. et al. Nanoemulsão carregada com curcumina melhora a recuperação de acidente vascular cerebral hemorrágico em ratos *wistar*. **Brain Research**, v. 1746, p. 147007, 1 nov. 2020.
- MD SAARI, N. H. et al. Curcumin-Loaded Nanoemulsion for Better Cellular Permeation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 88, n. 4, p. 44, 6 out. 2020.
- MUNICOY, S. et al. Tuning the antimicrobial activity of collagen biomaterials through a liposomal approach. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 18, p. 50330, 2021.
- RAPTI, E. et al. Potential Applications of the Anti-Inflammatory, Antithrombotic and Antioxidant Health-Promoting Properties of Curcumin: A Critical Review. **Nutraceuticals**, v. 4, n. 4, p. 562–595, dez. 2024.
- ROSELAN, M. A. et al. *In vitro* cytotoxicity assay, mushroom tyrosinase inhibitory activity and release analysis of kojic monooleate nanodelivery system and *in silico* molecular docking study against 2Y9X target enzyme. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, p. 102764, 1 dez. 2021.
- SHALABY, E. S. et al. Chitosan tamarind-based nanoparticles as a promising approach for topical application of curcumin intended for burn healing: *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Drug Targeting**, v. 31, n. 10, p. 1081–1097, dez. 2023.
- SHARMA, A. et al. Protease-responsive hydrogel, cross-linked with bioactive curcumin-derived carbon dots, encourage faster wound closure. **Biomaterials Advances**, v. 139, p. 212978, 1 ago. 2022.
- TU, C.-X. et al. Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes. **Phytotherapy research: PTR**, v. 26, n. 2, p. 174–179, fev. 2012.
- VAZ, G. R. et al. Curcumin and Quercetin-Loaded Nanoemulsions: Physicochemical Compatibility Study and Validation of a Simultaneous Quantification Method. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1650, set. 2020.
- WANG, G. et al. Mechanisms of action of metformin and its regulatory effect on microRNAs related to angiogenesis. **Pharmacological Research**, v. 164, p. 105390, 1 fev. 2021.
- WU, J. et al. Curcumin promotes skin wound healing by activating Nrf2 signaling pathways and inducing apoptosis in mice. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1127–1135, 2023.
- YOUSEF, S. A. et al. Mechanistic Evaluation of Enhanced Curcumin Delivery through Human Skin *In Vitro* from Optimised Nanoemulsion Formulations Fabricated with Different Penetration Enhancers. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, p. 639, dez. 2019.

ZILLES, J. C.; ALEGRE, P. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. [s.d.].