



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - CFS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - PPGMCF

BRUNA KARLA DO AMARAL

A UTILIZAÇÃO DE NANOCARREADORES NA ACELERAÇÃO DO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS EM
CAMUNDONGOS

Florianópolis

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - CFS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PPGMCF

A UTILIZAÇÃO DE NANOCARREADORES NA ACELERAÇÃO DO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS EM
CAMUNDONGOS

Mestranda: Bruna Karla do Amaral

Orientador: Dr. Wagner Luis Reis

Coorientadora: Dra. Ana Flávia Marçal

Pessoa Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção de título de Mestre.

Florianópolis

2022

Bruna Karla do Amaral

A UTILIZAÇÃO DE NANOCARREADORES NA ACELERAÇÃO DO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS EM
CAMUNDONGOS

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Guilherme Fina Fleury
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Tarcísio Vitor Augusto Lordani
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Coordenação do Programa de Pós- Graduação

Prof. Dr. Wagner Luis Reis
Orientador

Florianópolis, 2022

*“É comum vermos homens zombarem do que
não podem compreender”
(Sir Arthur Conan Doyle)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de uma pós graduação de alto nível, gratuita e de qualidade. Além disso, sou grata aos professores envolvidos neste projeto que auxiliaram na realização de um sonho, sendo eles, o Professor Dr. Wagner Luis Reis, Professora Dra. Ana Flávia Marçal Pessoa, Professora Dra. Morgana Duarte e ao Professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, que observará a realização desta banca em outro plano.

Agradeço também ao suporte familiar de meus pais, que mesmo longe me deram todo apoio emocional para seguir na pós graduação. À Luiz Guilherme Fonseca Rosa, toda minha gratidão pelo companheirismo durante a realização deste estudo.

Agradeço a bolsa de estudos concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina que auxiliou no período da dissertação. Além disso, agradeço a parceria e o fornecimentos das formulações oferecidas pela coorientadora deste estudo da Universidade de São Paulo..

Sou grata pela ajuda de meus colegas de laboratório (LANDI, LIM 26 e LENEC) que me auxiliaram entre experimentos e rotinas, em especial, Camila Safranski Martins, Caroline Cadore, Jhonatan Ribeiro, Jeane Bachi, Scheila Kraus e Jessica Alves.

Por fim agradeço a banca titular e suplente pela disponibilidade de ler este trabalho e realizar suas considerações.

RESUMO

A cicatrização de lesões é a capacidade de regeneração para que a pele possa continuar exercendo a função de proteção. Compostos de origem natural são comumente utilizados para tratar doenças e sintomas devido a sua eficácia e baixo custo. A nanomedicina é uma nova tecnologia que vem demonstrando uma melhora na entrega sustentada de fármacos melhorando diversos tratamentos. Neste sentido, a incorporação de produtos naturais em nanocarreadores vem se mostrando eficiente no tratamento de lesões cutâneas. Sendo assim, o presente estudo visa avaliar o efeito de compostos naturais utilizando nanocarreadores sobre o processo de cicatrização. Camundongos machos da linhagem Swiss, foram randomicamente divididos em 4 grupos (Controle sem nenhum tratamento, nanopartícula vazia e dois conjuntos com compostos naturais em nanopartículas, sendo fórmula completa contendo Ácido Hialurônico, Ácido Kójico, Retinol e T-Growth e a fórmula parcial contendo apenas Ácido Hialurônico, Ácido Kójico e Retinol). Foram realizadas lesões cutâneas de 1cm² no dorso do animal que receberam diariamente 50µl das formulações ou do veículo. A avaliação das lesões ocorreram no 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dia de tratamento. A pele foi extraída nos dias 3 e 14 e parte utilizada para confecção de lâminas histológicas, coradas em Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson, para análise da epitelização, neovascularização e colágeno. A outra parte do tecido foi usada para análise bioquímica dos mediadores P38 e NFkb (envolvidos na proliferação celular), SIRT-1 (envolvido na sobrevivência celular), PGC1 e TFAM (envolvidos na biogênese mitocondrial) pela técnica de Western Blotting. A análise estatística foi realizada utilizando a variância ANOVA two-way e o nível de significância utilizado foi de p<0,05. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em uso de animais sob protocolo 1285201021. A avaliação do processo de cicatrização revelou que o grupo tratado com a fórmula completa apresentou uma aceleração na aproximação das bordas no 3º dia de tratamento da fase inflamatória do processo de cicatrização quando comparado ao grupo sem tratamento. Ainda, ao longo do tratamento, os resultados da fórmula completa se mantiveram elevados comparados a fórmula parcial (7 dia) e ao veículo (10 e 12 dia). Não houve diferença estatística nas análises de epitelização e neovascularização. A fórmula completa teve um aumento do NFkb e sustentou até a fase de remodelação, tendo também uma diminuição do TFAM na fase inflamatória. Nossos resultados demonstram que a fórmula completa foi capaz de reduzir o tempo de cicatrização, por meio da proliferação celular durante o processo. Por fim, os dados deste trabalho sugerem que o tratamento com compostos naturais por meio de nanocarreadores é benéfica na restauração da função de barreira da pele durante lesões cutâneas.

Palavras Chave: cicatrização de lesões; nanocarreadores; compostos naturais.

ABSTRACT

Wound healing is the capability of regeneration that the body provides to heal the damage. Natural compounds are widely used to treat symptoms and diseases due the low cost and efficacy. Nanocarriers are a new technology to carry materials and improve drug delivery in recent medical treatments. Furthermore, natural compounds associated with nanomedicine can be an alternative to facilitate wound healing. Thus, the current study aims to evaluate the healing activity of natural compounds by using nanocarriers. Male Swiss mice were divided randomly in 4 groups (Control without any treatment; complete formula compound by Hialuronic acid, Kojic acid, Retinol and T-Growth; half formula compound by Hialuronic acid, Kojic acid and Retinol; and empty nanocarrier). Wound of 1cm² on the animal's back received daily 50µl of the formula or vehicle. Wound healing evaluation occurred at the 3^o, 7^o, 10^o, 12^o and 14^o days, using digital capture camera, and analysis was carried out using Image Pro Plus software. The skin was extracted for the confection of histological blades, colored in Hematoxylin and Eosin for the epithelialization and neovascularization analysis. The image analysis was done using the Image Pro Plus software. Biochemic analysis was using Western Blotting technique to measure biomarkers such as P38 and NFkb (related to cell proliferation), SIRT-1 (related to cell survival), PGC1 and TFAM (related to mitochondrial biogenesis). Statistical analysis of ANOVA two-way variance was used and $p < 0,05$ was considered significant. This study was approved by the Ethics Committee (1285201021). The evaluation of the cicatrization process revealed that the group treated with complete formula showed a higher border approximation on the 3^o day of treatment in the inflammatory phase of wound healing. On the 7^o, 10^o and 12^o days of treatment, the results of the complete formula maintain elevated wound closure compared with the Vehicle and half formula. No difference was observed at 14^o day. There's no statistical difference on epithelialization and neovascularization analysis. Complete formula has an increase of NFkb and is sustained until remodeling phase, as so has a decrease of TFAM on inflammatory phase. Our results demonstrate that the complete formula was able to reduce healing time involving cell proliferation. Thus,our study suggests that natural compounds by using nanocarriers may have a beneficial effect on the cicatrization restoring the barrier function of the skin during cutaneous wounds.

Key Words: wound healing; nanocarriers; natural compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da Pele.....	13
Figura 2. Fases da Cicatrização.....	15
Figura 3. Cicatrização da Pele.....	43
Figura 4. Fotomicroscopia de uma nanopartícula de 400 nm de diâmetro.....	98
Figura 5. Três modelos de incorporação de medicamentos pelas NLSs.....	98
Figura 6. Delineamento experimental.....	45
Figura 7. Representação fotográfica das lesões induzidas em camundongos Swiss tratados com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia nos diferentes períodos de tratamento.....	47
Figura 8. Porcentagem do grau de contração em camundongos machos durante o tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores.....	47
Figura 9. Representação de cortes histológicos (Hematoxilina e Eosina) de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 3º dia de tratamento.....	47
Figura 10. Representação de cortes histológicos (Hematoxilina e Eosina) de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 14º dia de tratamento.....	48
Figura 11. Representação de cortes histológicos da espessura da epitelização em camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 14º dia de tratamento (Coloração de Hematoxilina e Eosina; Objetiva 10x).....	48

Figura 12. Efeito de diferentes formulações sob a Espessura da Epitelização e a Angiogênese após 14 dias de tratamento.....	49
Figura 13. Representação de cortes histológicos na coloração de Tricrômico de Masson de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 3º dia de tratamento.....	49
Figura 14. Representação de cortes histológicos na coloração de Tricrômico de Masson de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 14º dia de tratamento.....	49
Figura 15. Efeito de diferentes formulações utilizando nanocarreadores sob parâmetros bioquímicos de animais em processo de regeneração tecidual durante a fase inflamatória (3 dias) e de reparo (14 dias).....	45

LISTA DE SIGLAS

AMPc.....	Monofosfato de Adenosina cíclica
ATP.....	Adenosina Tri-Fosfato
CEUA.....	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLN.....	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
CTE.....	Cadeia Transportadora de Elétrons
Cm.....	Centímetros
EGF.....	Fator de Crescimento Epidermal
ERNs.....	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs.....	Espécies Reativas de Oxigênio
FMUSP.....	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE.....	Hematoxilina e Eosina
IL-6.....	Interleucina 6
IL- β	Interleucina 1 β
LIM.....	Laboratório Investigação Médica
MAPK.....	Proteína Quinase Ativadora Mitogênica
mtDNA.....	DNA mitocondrial
MEC.....	Matriz Extracelular
μ m.....	Micrômetros
NF κ B.....	Fator Nuclear kappa B
NLSs.....	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NRF1.....	Fator Respiratório 1
NRF2.....	Fator Respiratório 2
NV.....	Nanopartícula Vazia
PDGF.....	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGC-1.....	Coativador Alfa do Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma
PIC.....	Práticas Integrativas e Complementares

PMN.....Polimorfonucleares
PNPIC.....Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SIRT-1.....Sirtuína 1
SUS.....Sistema Único de Saúde
TFAM.....Fator de Transcrição Mitocondrial
TLR.....Receptor Tool-Like
TNF- αFator de Necrose Tumoral α
TGF- βFator de Transformação do Crescimento β
UFSC.....Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF.....Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Pele	13
1.2. Lesões do Tecido Cutâneo	16
1.3. Cicatrização	17
1.3.1. Hemostasia ou Coagulação	19
1.3.2. Fase Inflamatória	20
1.3.3. Fase Proliferativa	21
1.3.4. Fase de Remodelação ou Reparo	22
1.4. Derivados Naturais	24
1.5. Nanopartículas Lipídicas Sólidas	26
2. Objetivos	30
3. Metodologia	31
4. Resultados	37
4.1 Avaliação do reparo tecidual	37
4.2 Avaliação histomorfométricas do reparo tecidual	39
4.3 Avaliação bioquímica do reparo tecidual	45
5. Discussão	47
6. Conclusão	53
7. Referências Bibliográficas	54
8. Anexos	64

1. Introdução

As lesões cutâneas são descontinuidades da pele que afetam a vida de milhares de indivíduos, sendo um agravo de saúde epidemiologicamente crescente, muitas vezes associada a diversas comorbidades, como a obesidade e diabetes mellitus (MANDELBAUM et al., 2003). Manter a homeostase é um processo inato e crítico do corpo humano, sendo ele, o seu mecanismo de manter o equilíbrio e atuar no reparo de eventuais danos como as lesões cutâneas (SHEDOEVA et al., 2019). Dentro deste contexto, buscar substâncias e produtos naturais que atuem na regeneração tecidual, bem como na aceleração deste processo de reparo são de suma importância.

Este trabalho visa avaliar diferentes formulações e sua atuação na pele e durante o processo cicatricial, sendo assim, a seguir, uma breve descrição dos componentes e processos mais relevantes, bem como das fases da cicatrização para melhor embasamento do presente estudo.

1.1. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, chegando a corresponder a 16% do peso corporal. O tecido tegumentar humano exerce papéis básicos, como uma barreira física de proteção, manutenção da temperatura e abriga anexos e diferentes tecidos com diversas funcionalidades. (WATHONI et al., 2019).

A pele é formada pela junção de três camadas de composições diferentes, sendo elas, epiderme, derme e hipoderme ou tecido adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A epiderme é a camada mais externa e superficial da pele, formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. O principal tipo celular desta camada é o queratinócito, sendo responsável pela produção da queratina, mas também são encontrados outros tipos celulares, como os melanócitos, células de Langerhans e as células de Merkel (TOSATO et al., 2012; WOUNDS CANADA, 2021). Os queratinócitos formam camadas derivadas de diferenciações deste mesmo tipo celular, sendo elas, a camada basal, espinhosa, granular, lúcida e cornificada ou estrato córneo (WOUNDS CANADA, 2021).

Na camada basal, há o contato direto com a derme, tendo células de alto

poder proliferativo, dando origem a novas células que migram para as camadas superficiais, onde sofrem apoptose até desprender-se no estrato córneo (PÓVOA; DINIZ, 2011). Este processo de renovação celular e formação de uma nova epiderme pode demorar em torno de 35 a 45 dias. Há a presença de células de Merkel, mecanoreceptoras, que têm a função de converter estímulos mecânicos em sinalizações aferentes de sensibilidade (LIRA et al., 2004; PÓVOA & DINIZ, 2011). Ademais, os melanócitos presentes nesta camada, são responsáveis pela produção do pigmento melanina em organelas chamadas de melanossomas (WOUNDS CANADA, 2021).

Na camada escamosa, as células de Langerhans ficam alocadas e exercem funções imunológicas, relacionadas a captação de antígenos, e a apresentação dos mesmos para os linfócitos T (LIRA et al., 2004; PÓVOA & DINIZ, 2011). A camada granular é formada por uma área de transição para o estrato córneo, abrigando células em processo de apoptose, que já não exercem as funções básicas e não abrigam organelas fundamentais, como é visto pela ausência do núcleo. A camada lúcida, é a camada mais interna do estrato córneo, encontrada na palma das mãos e nas solas dos pés, proporcionando o aumento da espessura destas áreas com finalidade de maior proteção. O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, abriga os restos celulares de queratinócitos e queratina, esta camada é importante para regulação da hidratação, controle da temperatura e do pH (4,0-6,5), que deve manter-se levemente ácido fortalecendo a barreira cutânea contra bactérias e fungos (WOUNDS CANADA, 2021). A espessura total da epiderme pode variar, sendo mais espessa na palma da mão e na planta dos pés podendo atingir até 1,5 mm. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017) (Figura 1).

A derme é a camada intermediária da pele, onde encontra-se tecido conjuntivo dividido em duas camadas, papilar e reticular. A camada papilar possui um tecido conjuntivo frouxo e grande quantidade de fibras de colágeno, dando aderência e fixação da derme à epiderme. Na camada reticular, encontra-se uma camada espessa de tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, inervação periférica, folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas. Em ambas as camadas, o tipo celular prevalente são os fibroblastos, sintetizadores da elastina e do colágeno que formam a matriz extracelular (MEC). Além da

alocação de glândulas e vasos, outra função da derme é a sustentabilidade do tecido cutâneo, sua maleabilidade, onde todos os compostos formam uma malha pantográfica resistente (MENDONÇA; CARVALHO; SOUZA, 1993; WOUNDS CANADA 2021).

A hipoderme, também chamada de tecido subcutâneo, é a camada mais profunda, formada por células adiposas ou adipócitos e constituindo um tecido adiposo branco. Este tecido auxilia na manutenção da temperatura corporal e no armazenamento de lipídios. O tamanho do tecido adiposo pode variar conforme a quantidade de armazenamento de lipídios no interior dos adipócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

A pele apresenta apêndices, que podem estar presentes na derme e epiderme. Dentre eles, destacam-se as glândulas sudoríparas e sebáceas e os pêlos. A função destes apêndices varia entre regulação da temperatura da pele, produção de substâncias protetoras, de pH ideal contra a ação de microorganismos e manutenção da barreira cutânea (PÓVOA & DINIZ, 2011) (Figura 1).

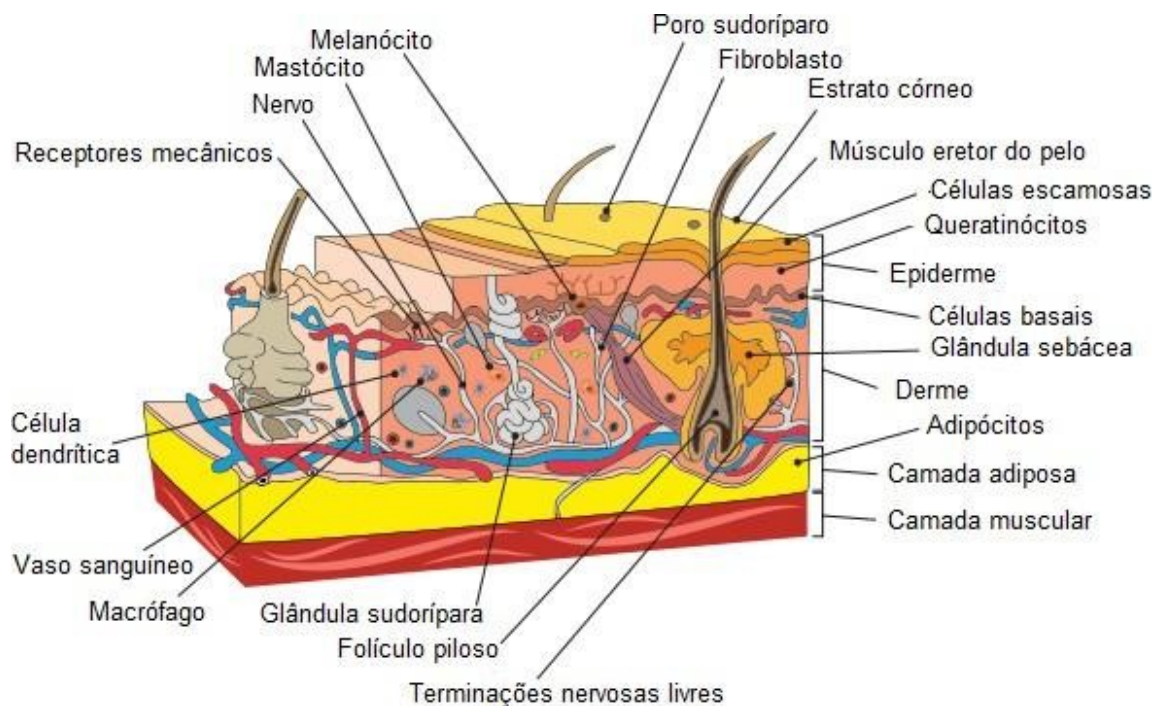


Figura 1. Componentes da pele. A imagem representa a pele em suas camadas, destacando seus componentes. Ao lado direito encontra-se a epiderme superficialmente, com a representação dos queratinócitos e estrato córneo. Logo abaixo, a derme e seus inúmeros componentes, dentre eles

as glândulas, folículos, vasos e nervos. Na porção inferior da imagem apresentam-se as camadas adiposas (tecido adiposo subcutâneo, ou hipoderme) e a camada muscular. Tipos celulares são destacados em todas as camadas (Adaptado de Wounds Canada, 2021)

1.2. Lesões do Tecido Cutâneo

As lesões cutâneas são alterações que prejudicam a funcionalidade de barreira e proteção da pele, podendo afetar a qualidade de vida, bem como estar relacionadas com o aumento do tempo de hospitalização, infecções e consequentemente no aumento da mortalidade (SINGER; CLARK, 1999; KULA; GAPUD, 2018; LOTFI et al., 2019). Ao sofrer um dano tecidual, a pele sofre um processo de regeneração para continuar exercendo a função de proteção do organismo (WOUNDS CANADA, 2021).

As lesões cutâneas acometem indivíduos em diferentes âmbitos, por exemplo, indivíduos acometidos com lesões crônicas têm uma diminuição da qualidade de vida devido aos efeitos associados como baixa mobilidade, incapacidade total de locomoção ou dores intensas (MANDELBAUM et al., 2003). Este agravo vem crescendo devido a fatores epidemiológicos emergentes, como a obesidade e a diabetes mellitus, sendo um agravante nestas doenças, servindo de porta de entrada para diversos microrganismos (MANDELBAUM et al., 2003). Estima-se que 570 mil brasileiros adquirem uma nova lesão crônica a cada ano (OKAMONTO, 2012).

A perda tecidual pode atingir os diferentes tipos de tecidos da pele, podendo atingir a epiderme apenas, aprofundar-se à derme, parcialmente ou totalmente até expor o tecido subcutâneo ou o transpor expondo a fáscia muscular. Pode-se classificar um tipo de lesão conforme a sua profundidade, podendo ser uma lesão de espessura parcial (atingindo a parcialmente a derme) ou uma lesão de espessura total (atingindo totalmente a derme). A perda da espessura total comumente apresenta cicatriz perceptível devido à necessidade da formação total de um novo tecido (MANDELBAUM et al., 2003; COX, 2019).

As lesões podem ser classificadas em lesões agudas e crônicas. As lesões agudas, são lesões que seguem o processo de reparo de forma ordenada, respeitando as fases da cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010). Alguns tipos de lesões podem não cicatrizar em seu tempo hábil, como ocorre em lesões crônicas, que não progridem na sequência oportuna de reparo devido a fatores não

resolvidos. Portanto, nestes casos, há a busca pela oclusão total das lesões no menor tempo possível, sendo assim, indispensável a compreensão do processo fisiológico deste evento (WOUNDS CANADA, 2021; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Casos de lesões crônicas estão intimamente relacionados com a persistência e agravamento na fase inflamatória do processo, ou a deficiência nas fases seguintes (RAHIM et al., 2016). Os mecanismos envolvidos no retardo da cicatrização ainda não são claros, porém sabe-se que o estresse oxidativo causado pelo aumento e desbalanço na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) contribuem para o aumento de citocinas e atraso na formação de novos vasos, tecido de granulação e epitelização. O desequilíbrio entre o sistema antioxidante e as EROs e ERNs são fatores contribuintes para o dano tecidual e são comumente encontrados em lesões de diferentes etiologias (WOUNDS INTERNATIONAL, 2013; MENKE, 2008).

1.3. Cicatrização

A cicatrização é a capacidade auto-regenerativa dos organismos de promover a homeostase de um tecido lesado, podendo restabelecer a sua função ou em alguns casos ter perda da sua capacidade funcional pela formação de um tecido fibroso (BALBINO et al., 2005). Ao sofrer um dano tecidual, a pele sofre um processo para tentar se regenerar e continuar exercendo a função de proteção do organismo (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019).

Uma organela importante para que o processo cicatricial aconteça é a mitocôndria, devido a sua produção inerente de Adenosina Trifosfato (ATP) proveniente da cadeia transportadora de elétrons (XIAO et al., 2012). Para formação do ATP, o oxigênio proveniente da rede vascular é indispensável, sendo ele, uma das moléculas mais importantes deste processo. Além disso, para formação de ATP em grandes quantidades necessárias para suprir a demanda do processo cicatricial, a quantidade de mitocôndrias envolvidas no processo deve ser regulada constantemente. O processo de *turnover* (renovação) desta organela recebe o nome de biogênese mitocondrial, sendo definido como uma ação coordenada do conteúdo e número de mitocôndrias para manter as funções homeostáticas de cada situação (XIAO et al., 2012; MURPHY et al. 2018). Neste

processo estão envolvidos genomas mitocondriais, como o coativador alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), o fator respiratório 1 e 2 (NRF1 e NRF2) e o o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) (MANDELBAUM et al., 2003; GOSAIN; DIPIETRO, 2004).

Outras vias como P38 MAPK (MAP Kinase) e a ativação de fatores como NF-kb estão envolvidos no processo de proliferação celular (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019). Em específico, a via do NF-kb é de extrema importância devido aos fatores de transcrição envolvidos. Nesta via, há a ativação da enzima Sirtuína 1 (SIRT-1), devido a necessidades de reparos no DNA ou apoptose celular, a fim de preservar a sobrevivência das células, que por sua vez, age via NFkB, ativando-o. A ativação do NF-kB culmina na sua ligação em fatores de transcrição no DNA que estão relacionados à proliferação celular e fatores inflamatórios, como a Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1- β (IL-1 β). Por outro lado, a via que envolve a P38 MPAK também é ativada em momentos que as células necessitam entrar em processo de mitose, sendo assim, fatores mitogênicos são ativados por esta enzima, aumentando a proliferação celular (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019; XIE et al., 2022).

O processo cicatricial ocorre em uma cascata de eventos celulares e moleculares, para a pavimentação tecidual. De maneira organizada, a cicatrização tecidual ocorre em fases, sendo que as principais fases são: Fase Inflamatória; Fase Proliferativa; Fase de Reparo. Anteriormente ao início das fases da cicatrização ocorre a coagulação dos vasos ou hemostasia, onde ocorre uma cascata de eventos que geram a agregação plaquetária e assim, previnem o extravasamento de sangue (MANDELBAUM et al., 2003; GOSAIN; DIPIETRO, 2004; FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019) (Figura 2).



Figura 2. Fases da cicatrização. Imagem ilustrativa da fase de hemostasia, fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (Adaptado de Wounds Canada, 2018).

1.3.1. Hemostasia ou Coagulação

A coagulação é o evento que visa o retorno da homeostase hemodinâmica. Tal evento se divide em estágios que exercem funções diferentes para atenuar a perda sanguínea. Em seu primeiro estágio há a constrição dos vasos sanguíneos, em seu segundo estágio há a agregação plaquetária, em seu terceiro estágio há a ativação da cascata de coagulação, que de certa forma leva ao quarto estágio onde há a formação da parede de fibrina (WANG et al., 2019; FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019).

Logo após o surgimento de uma lesão, há o extravasamento do sangue

para a matriz extracelular levando à constrição dos vasos adjacentes. Com o extravasamento de sangue há a chegada de citocinas e marcadores inflamatórios como a IL-1, secretada principalmente pelos queratinócitos afetados, levando à adesão plaquetária (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019). A ativação da cascata de coagulação, visa estabelecer a homeostase e é evidenciada por várias ações dos fatores de coagulação (CHAPIN; HAJJAR, 2015). O primeiro modelo aceito de cascata de coagulação foi proposto por Macfarlane, Davie e Ratnoff (1964), para explicar a ativação sequencial que resultava na coagulação sanguínea. A coagulação ocorre em uma via intrínseca e extrínseca, iniciando pela via extrínseca onde o fator VII de origem plasmática é ativado por um fator tecidual que resulta na ativação do fator X. A via intrínseca, há a ativação do fator XII no sangue que leva a ativação do fator XI, que por sua vez culmina na ativação do fator IX. O fator IX em sua forma ativa, estando na presença do fator VIII ativa traços de trombina e ao entrar em contato com o íon cálcio ativa o fator X da coagulação, havendo sinergia com a via extrínseca resultando na geração de trombina e conseqüentemente a formação de fibrina (MACFARLANE, 1964; FERREIRA et al., 2010).

Desta forma, a formação do coágulo culmina no ajuste das bordas da lesão, mas também como uma forma de barreira contra microorganismos e na estabilidade provisória da matriz para que as células da fase inflamatória possam ingressar na lesão (MANDELBAUM et al., 2003; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

1.3.2. Fase Inflamatória

A fase inflamatória é caracterizada pela atração de células inflamatórias devido a mediadores químicos. A secreção de citocinas proveniente das plaquetas envolvidas na hemostasia, como o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), promovem a quimiotaxia de células imunes para o sítio da lesão (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019).

As células participantes deste evento, são os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN são as primeiras células a aparecerem no momento da lesão e podem ficar entre três a cinco dias no tecido, sendo eles

o mecanismo de defesa primária contra bactérias devido a sua capacidade fagocitária (GUO; DIPIETRO, 2010). Os monócitos são atraídos para o ambiente e sofrem uma diferenciação para tornar-se macrófagos, que permanecem a partir do terceiro até o décimo dia de lesão, e são os protagonistas da fase inflamatória por fagocitar bactérias, células apoptóticas, desbridar corpos estranhos e principalmente produzir citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento como IL-6, IL-1 β , Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), PDGF, TGF- β e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), direcionando a formação do tecido de granulação. Há também a produção de prostaglandinas que atuam como vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos vasos. Os linfócitos aparecem após 7 dias e seu papel não é bem esclarecido, porém sabe-se que exercem um papel sobre os macrófagos (MANDELBAUM et al., 2003; GUO; DIPIETRO, 2010; FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009) (Figura 3).

A inflamação pode induzir ao processo de cicatrização, bem como prevenir infecções adjacentes, porém a estagnação nesta fase pode acarretar em prejuízos para o tecido (WANG et al., 2019). Dentre as injúrias causadas pelo prolongamento da fase inflamatória estão as fibroses, que podem ocasionar na redução da funcionalidade do tecido, devido a perda da elasticidade, o aumento de rubor e dor ao redor da lesão e principalmente o prolongamento da cicatrização, visto que se a fase inflamatória se prolonga, a lesão não atinge a fase subsequente, impedindo-a de evoluir (SINGER; CLARK, 1999; LUI et al., 2012).

1.3.3. Fase Proliferativa

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento da lesão, nela se inicia o processo de reepitelização, a migração de queratinócitos e os fatores de crescimento, que são responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia. Para que isso ocorra, os macrófagos produzem e liberam mediadores químicos que atraem fibroblastos para a área da lesão, tais células são responsáveis por um processo denominado fibroplasia, que por sua vez, é a formação da matriz celular composta principalmente por fibras de colágeno e o tecido de granulação (SMIGIEL; PARKS, 2018). Sendo assim, o fibroblasto é a principal célula no tecido

de granulação, pois além de produzir o colágeno, produz uma nova matriz extracelular formada por elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e as proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento da lesão (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

O colágeno é uma das proteínas mais abundantes em mamíferos, podendo atingir cerca de 30% da massa proteica total. Sua descoberta foi feita por Miller e Matukas (1969) e deu origem a uma nova busca por proteínas da mesma família, ou similares. Desde então, o papel biológico, a estrutura química e a importância da família do colágeno vêm sendo estudada (BLUM, 2011). Até o momento 28 tipos de colágeno foram identificados, bem como 46 genes relacionados a sua produção e atividade foram codificados no genoma humano (HENNET, 2019). O colágeno é formado por três cadeias de polipeptídeos que podem ser homotrímeras ou heterotrímeras. As cadeias variam de tamanho de acordo com o tipo de colágeno, podendo ter até 3152 aminoácidos nos humanos (BLUM, 2011). Na pele, majoritariamente pode-se encontrar colágeno do tipo III e do tipo I. Na fase proliferativa, a sintetização de colágeno realizada pelos fibroblastos é inteiramente de colágeno do tipo III, que são consideradas fibras imaturas por ter alta maleabilidade porém baixa sustentação e firmeza (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019).

Nesta etapa, é importante ressaltar também, para que estes eventos aconteçam de maneira eficiente, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), que é modulada pelo fator de crescimento vascular e tem como finalidade, nutrir e dar suporte para o metabolismo celular, contribuindo para a formação da fibroplasia (MANDELBAUM et al., 2003; FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019). A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida devido à um estímulo mitogênico causado por fatores como VEGF e TGF- β nas células do endotélio vascular (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

1.3.4. Fase de Remodelação ou Reparo

A fase de remodelação é a última fase da cicatrização, sendo que esta fase pode ocorrer em meses e nela a vascularização regride. (MANDELBAUM et al., 2003). Nesta fase há a presença de macrófagos e fibroblastos, agindo para a formação e maturação do colágeno, que é responsável pela sustentação e pelo

aumento da força do tecido. As fibras de colágeno imaturas (colágeno tipo III) são degradadas e substituídas por fibras de colágeno maduras (colágeno tipo I), que vão se estabelecendo e melhorando a tensão do tecido. (FARHDIHOSSEINABADI et al., 2019).

Com a evolução da maturação das fibras de colágeno acentuada e matriz extracelular estabelecida, as células transitórias como os fibroblastos, entram em processo apoptótico para a formação da cicatriz, porém, caso persistam neste processo, podem formar cicatrizes hipertróficas ou quelóides. Por fim, a formação da cicatriz, bem como a sua resistência é dada pela quantidade de fibras de colágeno e a forma de sua organização. Ao fim do processo cicatricial os folículos pilosos e as glândulas, bem como os melanócitos sofrem um processo regenerativo limitado, tornando a cicatriz muitas vezes sem pelos e com coloração pálida em relação à pele saudável (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005) (Figura 3).

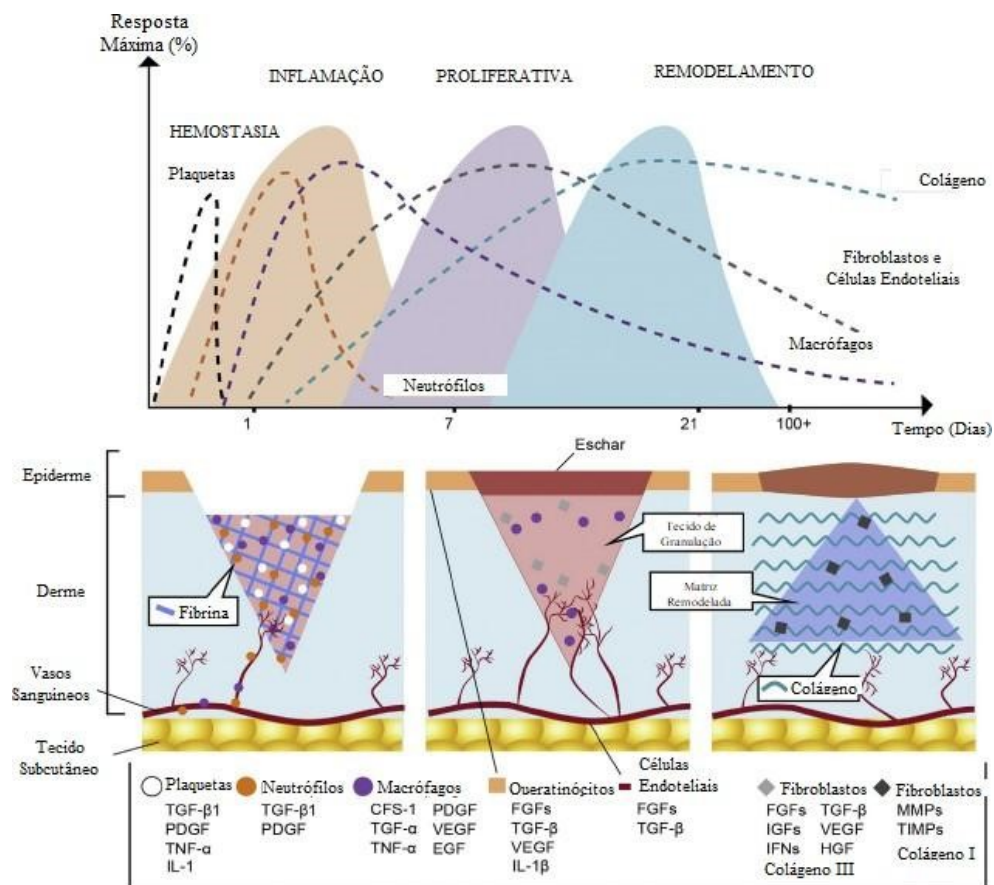


Figura 3. Cicatrização da pele em humanos. A imagem em sua porção superior ilustra um gráfico representando cada fase em um espaço de tempo, determinando a sua duração. Na porção inferior, pode-se observar a representação figurativa do processo cicatricial elencando os fatores bioquímicos envolvidos (Adaptado de Zomer e Trentin, 2018).

1.4. Derivados Naturais

O uso de produtos naturais para fins de promoção da saúde vem sendo utilizado desde os tempos antigos, como extratos e ervas medicinais, sendo implicado como medicamento, bem como, alimentos suplementares, nas populações que utilizam medicina tradicional, bem como na Medicina tradicional chinesa (LUO et al., 2019; WAHED et al., 2019).

Nas últimas duas décadas o interesse pela utilização de extratos e derivados de origem natural cresceu exponencialmente. Antioxidantes de origem natural são comumente utilizados para tratar o estresse oxidativo associado à diversas doenças (WAHED et al., 2019), incluindo o câncer, como a cúrcuma, ginseng, a *Camellia sinensis*, popularmente conhecido como chá verde ou chá da Índia (LUO et al., 2019). Estudos epigenéticos sugerem que alguns produtos naturais como polifenóis, carotenos e compostos da cúrcuma e do genistein, podem afetar diretamente no DNA (MICELI et al., 2014).

Atualmente, os derivados naturais são explorados como inspirações diretas para o design de novos medicamentos, seja pelos compostos presentes ou suas vias metabólicas, que podem ser mimetizadas sinteticamente. Um breve exemplo, é a rosuvastatina, amplamente utilizada no combate aos níveis elevados de colesterol. Tal droga mimetiza a ação de um produto natural chamado de mevastatina, encontrado no fungo *Penicillium citrinum* (RODRIGUES et al., 2016).

Várias são as plantas medicinais utilizadas para fins de manutenção à saúde desde a idade antiga. Diante disso, o comércio de plantas e fitoterápicos para fins terapêuticos está ascendendo, sendo que 59% das empresas do ramo demonstram uma perspectiva positiva para a produção e desenvolvimento do segmento fitoterápico em território brasileiro (HASENCLEVER et al., 2017; WAHED et al., 2019). No Brasil, iniciou-se o debate sobre Práticas Integrativas e Complementares (PICS) no final da década de 70, mas somente em maio de 2006, o Ministério da Saúde aprovou através da Portaria GM/MS nº 971 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PNPIC), ofertando até 29 procedimentos de PICS (BRASIL, 2019). A partir disso, em 2006 criou-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, pelo Decreto nº 5.813, com objetivo de garantir à população acesso seguro ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos

(BRASIL, 2006). Nos dias de hoje, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferta as PICS em 54% dos estados, sendo em maioria (78%) distribuídos na atenção básica, e em

média 85 mil tratamentos fitoterápicos ofertados pela rede pública (BRASIL, 2019).

Na cicatrização de feridas, algumas plantas obtiveram resultados satisfatórios demonstrando reepitelização, migração de fibroblastos, neovascularização e efeitos anti-inflamatórios (SHEDOEVA et al., 2019). Óleos essenciais com base de plantas são utilizados dentro das PICS e comumente utilizados para fins terapêuticos.

Estudos realizados com produtos naturais como a *Glycyrrhiza Glabra*, popularmente conhecida como Alcaçuz, revelam propriedades antivirais, de proteção oxidativa, potencializadora de fatores de crescimento. Dentre os fatores benéficos relacionados à pele, como redução de edemas e eritemas em concentrações seguras que variam de 5,4% à 0,5% em testes in vitro e in vivo (PASTORINO et al, 2018; VERATTI et al., 2011; GRIPPAUDO; DI RUSSO, 2016; SOLANO et al., 2006).

Produtos de origem natural muito utilizados na medicina tradicional chinesa como o *Panax ginseng* também possuem efeitos sobre a cicatrização, alterando vias de sinalização como a via Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPC) reduzindo o tempo de fechamento total de lesões cutâneas em animais nas concentrações que se demonstraram seguras de 0,5% (KIM et al., 2013). No que tange às fibras de colágeno e a atuação dos fibroblastos, o ginseng na concentração de 10ng/ml apresentam segurança no uso e aumentam a síntese de colágeno, bem como na proliferação de fibroblastos (GEUM-YOUNGLEE et al., 2015; MEN et al., 2019).

Outro composto de origem natural que vem sendo estudado é o *Piper nigrum* conhecido principalmente na culinária como pimenta preta ou pimenta do reino. A atuação biológica dos compostos presentes na *Piper nigrum* inclui os efeitos imunomodulador, antioxidante, anticarcinogenico e antiinflamatório, seguros em concentrações que variam de 10 a 20mg/kg (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013).

A implementação de ácidos em formulações relacionadas à pele está cada vez mais frequente tanto na indústria cosmética, quanto na indústria terapêutica pela sua segurança e eficácia. Ácidos como o hialurônico são amplamente

utilizados e pesquisados, demonstrando um fator hidratante importante, bem como, fatores anti-inflamatórios e regeneradores (DALMEDICO et al., 2016; LITWINIUK et al., 2016). A sua eficácia e segurança foram comprovadas em estudos randomizados e duplos cegos tanto na prática estética como terapêutica (KIM; SKYKES, 2011).

Da mesma forma, os ácidos retinóicos derivados da Vitamina A, apresentam efeitos benéficos à pele e fatores cicatrizantes em lesões crônicas (ARANTES et al., 2019; ZINDER et al., 2019). Existem diferentes tipos de moléculas de retinol, sendo que sua aplicabilidade e segurança quanto a toxicidade foi descrita por Mukherjee et al, 2006.

Seguindo a mesma proposta, o ácido kójico é considerado um agente potencial na cicatrização de feridas cutâneas, tendo boa absorção na pele (BURNETT et al., 2010; MOHAMMADPOUR et al., 2012).

1.5. Nanopartículas Lipídicas Sólidas

A Nanomedicina é definida como o uso de novos nanomateriais e ferramentas de nanotecnologia em áreas médicas, com as finalidades de diagnóstico e tratamento. A nanotecnologia envolve a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, a nível atômico, molecular e de estruturas supramoleculares (APUZZO, LIU, 2001; IWGN WORKSHOP, 2000). A busca de novas ferramentas tecnológicas para criação de produtos eficientes de fácil acesso no tratamento de feridas é de extrema importância, visto o tempo de permanência em hospitais e o aumento de gastos no tratamento de feridas cutâneas. O número crescente de publicações revela que novas tecnologias e estratégias de adição de derivados naturais em polímeros e biopolímeros, revelou novas aplicações para materiais seguros e sustentáveis (DINTCHEVA et al., 2020). Com o avanço das técnicas de síntese e captura de derivados diretos, hoje há modelos moleculares computacionais que possibilitam a exploração e aplicação dos produtos para descoberta de novos produtos. Softwares podem antecipar a interação de proteínas para predispor a compatibilidade e ação de alguns compostos em doenças alvo (RODRIGUES et al., 2016). Neste sentido, a incorporação de produtos naturais em nanocarreadores vem se mostrando eficiente no tratamento de lesões cutâneas (BERTHET et al., 2017). Sua relevância à terapêutica está na capacidade de

melhorar a biodisponibilidade e estabilidade dos agentes bioativos (Devalapally et al., 2007), permitindo o direcionamento do fármaco e diminuição da sua toxicidade (DEVALAPALLY et al., 2007; NAAHIDI et al., 2013). É necessário considerar que cerca de 40% das novas moléculas desenvolvidas não chegam à fase clínica de estudo por falha em sua eficácia e segurança, devido à suas propriedades biofarmacêuticas inadequadas, que se traduz por baixa biodisponibilidade e propriedades farmacocinéticas indesejáveis (DEVALAPALLY et al., 2007; NAAHIDI et al., 2013).

Assim, a utilização de nanopartículas lidera o caminho para novas estratégias nas terapias de regeneração e reparo de tecidos. A utilização tópica de nanocarreadores carregados com extratos e outras substâncias de origem natural, permite manter a estabilidade, uma entrega contínua e eficiente dos produtos à derme (BERTHET et al., 2017), e nas mais diversas afecções da pele, seja no câncer ou em feridas crônicas (THOMAS et al., 2014), restaurando sua função e melhorando o tratamento (BERTHET et al., 2017).

Os sistemas de entrega em escala nanométrica são classificados em dois grupos gerais: a) líquidos: como nanoemulsões e nanolipossomas e b) sólidos: nanopartículas lipídicas (compostas por nanopartículas lipídicas sólidas-NLSs e carreadores lipídicos nanoestruturados- CLNs), nanopartículas poliméricas (compostas por nanoesferas e nanocápsulas) e nanocristais (BOREL; SABLIOV, 2014). Dentre esses, as partículas lipídicas sólidas vêm atraindo considerável atenção para aplicação cutânea.

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) foram desenvolvidas por Müller (2000), com base nas emulsões para nutrição parenteral, introduzidas na rotina clínica nos anos 1950. As NLSs são sistemas coloidais, derivadas de emulsões óleo/água (O / A), por simples substituição do óleo por um lipídio sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal (Müller et al., 2007; Pessoa et al., 2021). Atualmente existe a segunda geração de NLSs, representada pelos carreadores lipídicos nanoestruturados, os quais foram desenvolvidos a partir da junção de um lipídio sólido com um lipídio líquido, a qual também se apresenta sólida à temperatura ambiente (Müller et al., 2007) (Figura 4). A vantagem da segunda geração é a maior capacidade de carga de ativos em comparação às NLSs e, ainda, firme inclusão do ativo dentro da matriz da partícula durante períodos de estocagem (STECOVÁ et al., 2007).

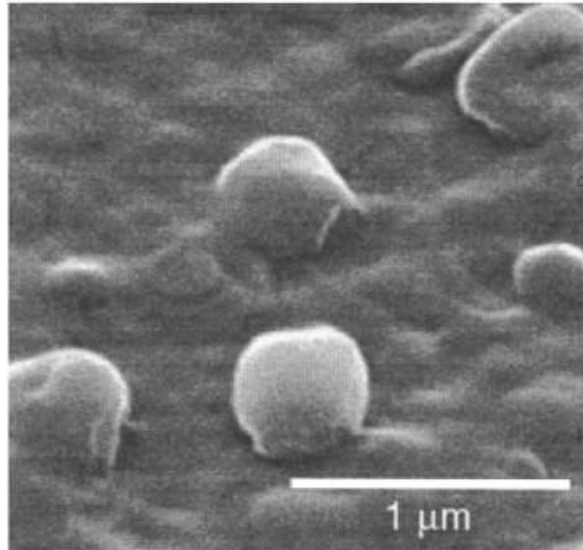


Figura 4. Fotomicroscopia de uma nanopartícula de 400 nm de diâmetro (Adaptado de Muller, 2000)

Há três modelos de incorporação de drogas pelas NLSs, isso irão depender da sua solubilidade que resultará nos seguintes modelos: 1 - Modelo de solução sólida; 2 - Modelo invólucro enriquecido com droga, com matriz lipídica; 3 - Modelo invólucro lipídico, com a droga enriquecendo a matriz (Figura 5).

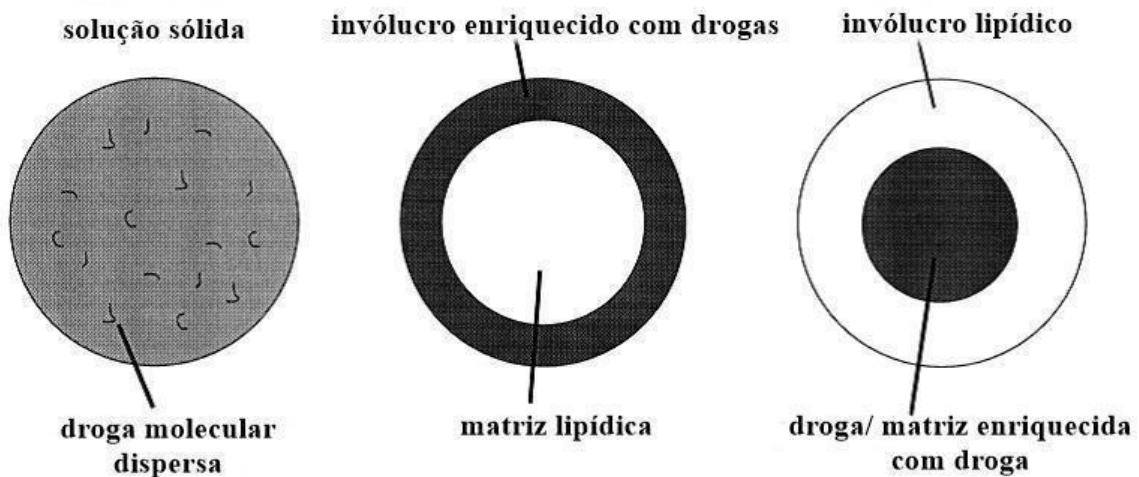


Figura 5 - Três modelos de incorporação de medicamentos pelas NLSs. Modelo de solução sólida (esquerda); 2. Modelo invólucro enriquecido com drogas, com matriz lipídica (centro); 3. Modelo invólucro lipídico, com a droga enriquecendo a matriz (direita). Fonte: Muller et al. (2000).

Estes sistemas foram desenvolvidos para veiculação de ativos lipofílicos, e apresentam a possibilidade de direcionamento do composto encapsulado à pele, maximizando o tempo de residência desses compostos e, conseqüentemente, a concentração local. Como resultado, a redução da

exposição sistêmica e da incidência de efeitos adversos são geralmente observados. Embora dificilmente penetrem intactos através do estrato córneo, esses nanocarreadores acumulam-se nos folículos pilosos aumentando a localização de ativos na pele e promovendo liberação prolongada. Essa propriedade é conferida pela substituição de lipídios líquidos utilizados em sistemas emulsionados por lipídeos sólidos, uma vez que a mobilidade do fármaco poderia ser consideravelmente reduzida (MEHNERT; MÄDER, 2001).

O planejamento de nanocarreadores contendo fármacos envolve uma série de estudos de pré – formulação, visando à obtenção de formulações realmente nanotecnológicas (que apresentam tamanho nanométrico de partículas), com adequada eficiência de encapsulação do fármaco, a estabilidade físico-química e biocompatibilidade, que são fundamentais à otimização da ação terapêutica de substâncias bioativas nanoencapsuladas (MORA-HUERTAS et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Vários produtos baseados em nanotecnologia já estão no mercado, como o Doxil® (injeção de lipossomos com cloridrato de doxorrubicina) e Abraxane (partículas que se ligam às proteínas de paclitaxel para suspensão injetável) (DEVALAPALLY et al., 2007; NAAHIDI et al., 2013). Cada nanodispositivo ou nanocarreador é capaz de armazenar diferentes tipos de componentes, sejam eles orgânicos (como lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos) ou inorgânicos (como os metais). As NLSs exclusivamente não oferecem fator terapêutico, são utilizadas como uma ferramenta carreadora de drogas e ativos. As vias de administração são as mais variadas, como oral, parenteral ou tópica (BERTHET et al., 2017).

Compostos naturais demonstram ser capazes da encapsulação em escala nanométrica, como Aloe vera, vitamina E, cúrcuma e melatonina, sendo eles compostos potencialmente benéficos para a cicatrização (BERTHET et al., 2017).

Os gastos gerados para tratar lesões cutâneas aumentaram devido ao custo elevado do tratamento e da taxa de estadia hospitalar. Ainda, os produtos comercializados para cicatrização e tratamento de lesões cutâneas possuem alto custo e atingem apenas uma parcela da população. Assim, estudos que visem a investigação de novas matérias primas e/ou produtos naturais de fácil acesso pela população, fazem-se necessários. Dentro deste cenário, as nanotecnologias

apresentam ser um sistema eficaz de distribuição de componentes, podendo ser utilizadas no âmbito das lesões cutâneas e potencialmente uma inovação na área de coberturas de liberação sustentada de fármacos e ativos naturais para reconstrução da função cutânea (BERTHET et al., 2017).

Assim, este trabalho hipotetiza que utilizando NLSs como carreador para ativos de origem natural podem potencializar a sua ação. Além disso, a junção de compostos em formulações biocompatíveis utilizando nanocarreadores pode beneficiar o processo cicatricial.

2. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a atuação cicatrizante de nanopartículas carreadoras em diferentes formulações, contendo ácido Hialurônico, ácido Kójico, retinol, *Glycyrrhiza glabra*, *Panax ginseng* e *Piper nigrum* em lesões cutâneas induzidas em camundongos.

Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade do reparo tecidual pela contração das bordas de lesões cutâneas tratadas com nanopartículas e produtos naturais;
- Avaliar as características histomorfométricas do reparo tecidual em lesões cutâneas tratadas com de nanopartículas e produtos naturais;
- Avaliar as características bioquímicas nas diferentes fases da cicatrização de lesões cutâneas tratadas com nanopartículas e produtos naturais.

3. Metodologia

Local da Pesquisa

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), no Departamento de Ciências Biológicas da UFSC.

Animais experimentais

Diante da aprovação do protocolo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) (protocolo 1285201021) (Anexo 1), foram utilizados 52

camundongos da linhagem Swiss, machos e adultos, oriundos do biotério central da UFSC. Os animais foram acondicionados individualmente, a fim de minimizar traumas nas lesões, que poderiam ser causados por outros animais. O acondicionamento ocorreu em gaiolas de polietileno com assoalho coberto por serragem durante o estudo, sendo que as estantes permaneceram ventiladas sob condições ambientais controladas (temperatura $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12h). Água e ração foram fornecidas ad libitum.

Procedimentos:

Ato operatório

Após a acomodação dos animais no laboratório setorial, ocorreu a indução da lesão cutânea. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina (10mg/kg) e Cloridrato de Quetamina (75mg/kg), misturadas e administradas na mesma seringa por via intraperitoneal (IP) (LAPCHIK et al., 2010).

A avaliação anestésica foi baseada na ausência dos reflexos córneo palpebral, interdigital e pinçamento de cauda. Após constatada anestesia por tais estímulos reflexos ao animal, houve o posicionado em decúbito ventral e a imobilização sobre uma prancha cirúrgica com contenção dos membros, e foi realizado a depilação na região dorsocostalis com uma lâmina.

Foi realizada a incisão de uma lesão cutânea utilizando um bisturi acompanhado de tesoura previamente afiada, no tamanho de 1cm^2 , aprofundando até a expor a fáscia muscular em toda lesão, similarmente ao protocolo de Lordani (2021). A hemostasia foi realizada por compressão digital utilizando uma gaze estéril. Nenhuma cobertura ou curativo foi sobreposta na área da lesão durante o tratamento, bem como nenhum tipo de sutura foi realizada similarmente com outros estudos da área (AZEVEDO et al., 2015; BANDEIRA et al., 2015; AZEVEDO et al., 2017).

Pós-operatório

Após o ato operatório, os animais foram acondicionados individualmente em gaiolas de polietileno, permanecendo isolados até o fim do tratamento. Foi adicionado Tramadol (1 mg/ml) na água de consumo dos animais para fins de

analgesia pós-operatória durante 72h (LAPCHIK et al., 2010; CEUA-UNIFESP, 2020). Nenhuma droga de ação anti-inflamatória foi utilizada para não interferir na ação do tratamento durante a fase inflamatória das lesões. Os animais foram supervisionados diariamente, sendo manipulados apenas uma vez ao dia para o tratamento a fim de minimizar o estresse. Para controle do sofrimento do animal, além da droga analgésica ofertada, foi avaliado diariamente os parâmetros da escala de dor Grimace, sendo eles: oclusão orbital, projeção nasal, projeção das orelhas, projeção da bochecha e alterações nos bigodes. Cada parâmetro é avaliado como presente, moderadamente presente ou ausente, gerando uma pontuação de 0 a 10, onde 0 é ausência de dor e 10 é dor intensa (NC3RS, 2019).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

A formulação e a caracterização da nanopartícula foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM 26) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pela Profa. Dra. Ana Flávia Marçal Pessoa, coorientadora do trabalho. O modelo de incorporação foi de invólucro lipídico com os compostos enriquecendo a matriz (MULLER et al., 2000). Os formulações geraram então um produto em forma de creme.

Controle: Animal sem nenhum tratamento.

Nanopartícula Vazia: Veículo composto por gel aniônico (Caboximetilcelulose).

Fórmula Completa: Ácido Hialurônico, Ácido Kójico, Retinol e T-Growth (*Glycyrrhiza Glabra*, *Panax ginseng* e *Piper nigrum*), dissolvidos no veículo.

Fórmula Parcial: Ácido Hialurônico, Ácido Kójico e Retinol, dissolvidos no veículo.

As formulações descritas acima são passíveis de registro de produto, portanto devem permanecer sigilosas, bem como as concentrações das substâncias, podendo ser reveladas posteriormente.

Tratamento

Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos: Controle; Nanopartícula Vazia; Fórmula Completa e Fórmula Parcial. Os tratamentos foram nomeados com letras do alfabeto a fim de cegar o experimentador durante o tratamento e as avaliações. O grupo Controle, foi o único grupo a não receber tratamento algum, as demais lesões receberam a quantidade de 50 µl do tratamento proposto cobrindo toda a região da lesão de forma uniforme. O

tratamento foi realizado diariamente durante 14 dias, tendo sempre o mesmo horário de aplicação. Não houve a remoção de eventuais resquícios do tratamento do dia anterior, a fim de minimizar a manipulação. Para coleta dos tecidos para as análises (3º e 14º dias de tratamento) (Figura 6), os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina (10mg/kg) e Cloridrato de Quetamina (75mg/kg), e a pele foi extraída utilizando uma tesoura previamente afiada, respeitando uma margem de segurança de 1cm nas laterais e até a exposição da face muscular quanto a profundidade. Posteriormente, o material coletado foi encaminhado para fixação ou congelamento em freezer -80°C.

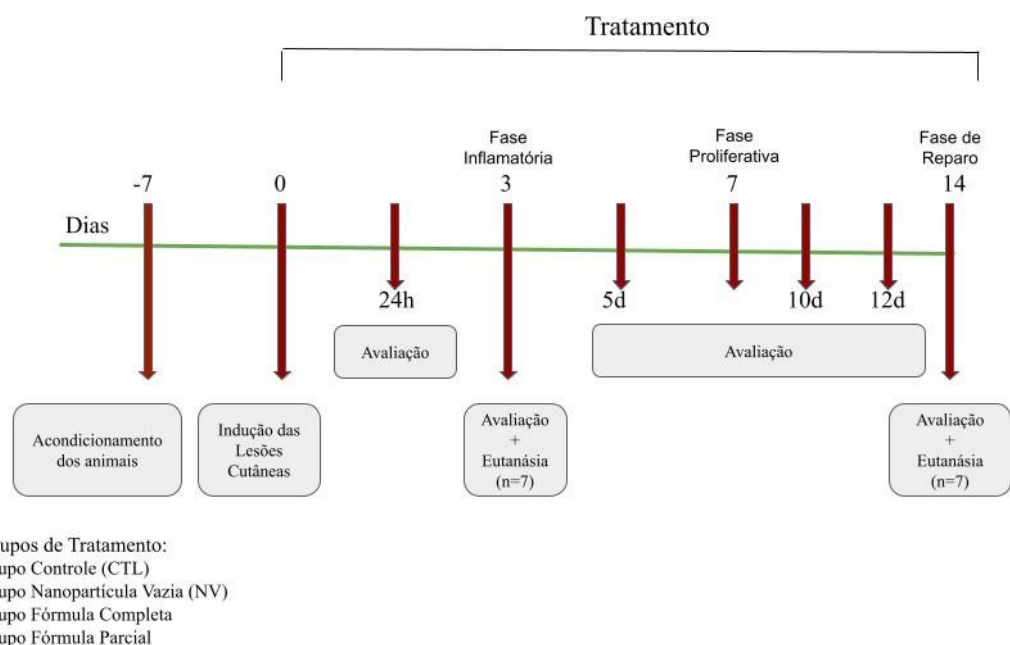


Figura 6. Delineamento experimental. Representação da linha do tempo do protocolo de tratamento e avaliação dos animais submetidos a lesões cutâneas e tratados com diferentes tratamentos.

O protocolo então contou com os seguintes grupos experimentais: Grupo Controle: 3 dias (n=5); 14 dias (n=5). Grupo Nanopartícula Vazia: 3 dias (n=7); 14 dias (n=7). Grupo Fórmula Completa: 3 dias (n=7); 14 dias (n=7). Grupo Fórmula Parcial: 3 dias (n=7); 14 dias (n=7).

Análise Macroscópica

Para a realização da avaliação macroscópica, os animais foram

anestesiados e as lesões foram fotografadas com uma câmera digital, utilizando um tripé para estabilização da imagem e mantendo uma distância padronizada de 10 cm acima do leito da lesão, a fim de capturar toda a sua extensão. As imagens foram realizadas nos seguintes períodos de tratamento: 24h, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias e 14 dias após a cicatrização total. Para que ocorra a realização das imagens sem o movimento dos animais, foi realizada a narcose com isoflurano associada ao propilenoglicol apenas para captura das imagens. A contabilização foi realizada através do software Image J Pro Plus utilizando as imagens capturadas anteriormente. Na avaliação observou-se o aspecto cicatricial das lesões conforme o grau de contração, utilizando o seguinte cálculo: $(A0 - A1/A0) \times 100$, gerando uma porcentagem de grau de contração das imagens avaliadas (ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2013).

Para Análises Histológicas e Bioquímicas

As avaliações ocorreram no 3º e 14º dia após indução das lesões, sendo assim, os animais foram eutanasiados sob anestesia e o tecido lesionado extraído com auxílio de um bisturi e/ou tesoura cirúrgica, respeitando 1cm da borda de cada lesão. As peças foram acondicionadas em frascos contendo paraformoldeído em uma concentração de 10% por um período de 24h e posteriormente, lavadas e acondicionadas em álcool 70%.

Análise Histomorfométrica

Para confecção das lâminas histológicas, o material foi emblocado em parafina e cortado com auxílio de um micrótomo em cortes semiseriados (intervalo de 10 cortes) com espessura de 5 µm (3 cortes/lâmina e 3 lâminas/ lesão), posteriormente serão coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) (PESSOA et al., 2016) para análises da reepitelização e neovascularização e Tricrômico de Masson para análise das fibras de colágeno.

Para avaliação histomorfométrica, as lâminas em coradas em HE foram fotografadas em um microscópio Olympus BX40 obtendo diferentes campos (3 campos/ corte) nas objetivas de 10x e 40x e posteriormente avaliadas pelo programa Image J Pro Plus. Além disso, para uma avaliação qualitativa de diversos campos, as lâminas foram escaneadas um microscópio Panoramic 250 flash III, 3D Histech e avaliadas no software Caseviwer 3DHistech Ltd. H-1141

Budapest, Öv u. 3., Hungary.

Para a mensuração da espessura epitelização utilizou-se imagens do centro da lesão (objetiva 10x) e utilizando a ferramenta “comprimento” do *software* Image Pro Plus, para mensuração do comprimento da espessura epitelizada. Os resultados foram expressos em μm de espessura epitelizada.

Para contagem de vasos sanguíneos foram utilizadas imagens do centro da lesão (objetiva 40x). O *software* Image Pro Plus será utilizado para análise da contagem utilizando o plug-in grid. O número de vasos sanguíneos foi contabilizado e expressos em média de número de vasos por animal.

Para análise das fibras de colágeno, foram observadas lâminas histológicas corados pela técnica tricrômio de Masson para a observação de depósitos de colágeno causando possível fibrose tecidual e observação do perfil inflamatório. Neste documento apresentamos as imagens representativas de cada grupo, as quais discutiremos aspectos qualitativos. As análises quantitativas das fibras de colágeno serão avaliadas posteriormente (PESSOA et al., 2016).

Immunoblotting

A análise proteica pelo método de *immunoblotting* foi realizada com extrato da pele da área da lesão que foi homogeneizada em tampão de extração (Tris, pH 7,4, 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 10%; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM). As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 minutos a 4° C e o sobrenadante separado. A quantificação proteica do sobrenadante foi realizada através do método colorimétrico com reagente de Bradford (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). O sobrenadante foi então homogeneizado com tampão *Laemmli* (azul de bromofeno 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50% e SDS 10%) e amostras contendo 20 μg de proteína foram separadas eletroforéticamente em géis de acrilamida e então transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 μm de diâmetro). A solução de Ponceau S foi usada para calcular o teor relativo de proteínas que foram transferidas para as membranas. As membranas foram então bloqueadas e incubadas com os anticorpos primários. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundário acoplados à peroxidase em solução de bloqueio (2,5% BSA em TBST) por 2 horas e a membrana foi revelada com kit de quimioluminescência

(SuperSignal West Pico, REF: 34080, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A.). A quantificação foi realizada com o auxílio do *software* Image J, utilizando a ferramenta “Gels”. As bandas obtidas nos géis foram recortadas para representação de cada um dos grupos nas figuras correspondentes (MISHRA et al., 2017).

Análise estatística

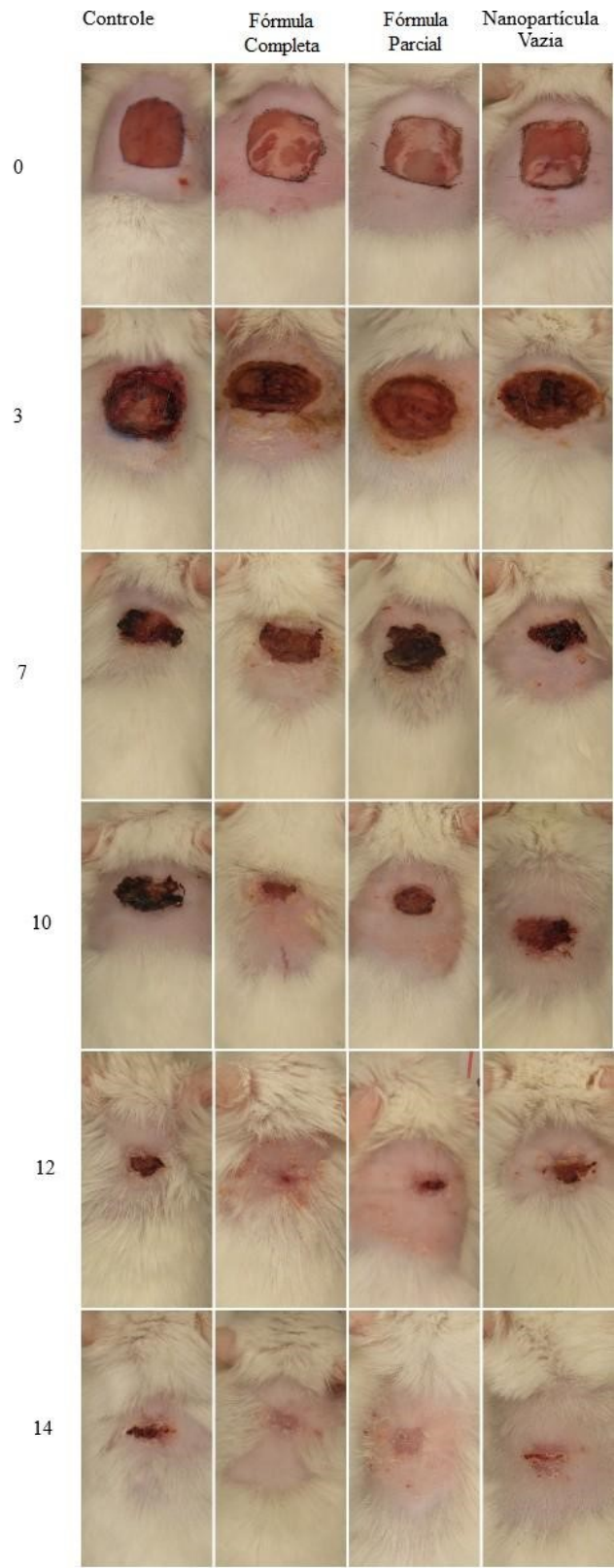
Os resultados foram analisados utilizando o *software* Graph Pad Prisma 6.0. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. A análise realizada entre os grupos foi determinada pela variância *two-way* (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey e medidas repetidas quando apropriado. O nível de significância utilizado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Avaliação do reparo tecidual

As lesões cutâneas foram fotografadas em cada período de análise, como representadas na Figura 7. Os dados gerados perante as análises do Grau de Contração das lesões, ou seja, a aproximação das bordas no intuito do fechamento total da lesão pode ser observada na figura 8.

Até o 3º dia de tratamento, o controle se manteve em posição estagnada de contração, diferenciando-se dos animais tratados ($p < 0,0001$; $p < 0,0070$; $p < 0,0027$; $F = 652.3$). Além disso, a fórmula completa teve um aumento significativo no grau de contração quando comparado à fórmula parcial ($p < 0,0196$), demonstrando um benefício nesta fase da cicatrização ao 3 dia. Ao 7º dia de tratamento, a fórmula completa se demonstrou superior à fórmula parcial ($p < 0,0181$). Ao 10º e 12º dia de tratamento, a Fórmula completa obteve um aumento em relação a nanopartícula vazia ($p < 0,0136$; $p < 0,0305$; alcançando 90% de contração), em contrapartida, a nanopartícula vazia teve uma queda na performance, em relação aos demais tratamentos, tal queda é justificada pela sua atividade hidratante nas primeiras fases de cicatrização. Ao 14º dia todos os animais atingiram parâmetros de contração próximos de 100%.



Dias de Tratamento

Figura 7. Representação fotográfica das lesões induzidas em camundongos Swiss tratados com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia nos diferentes períodos de tratamento.

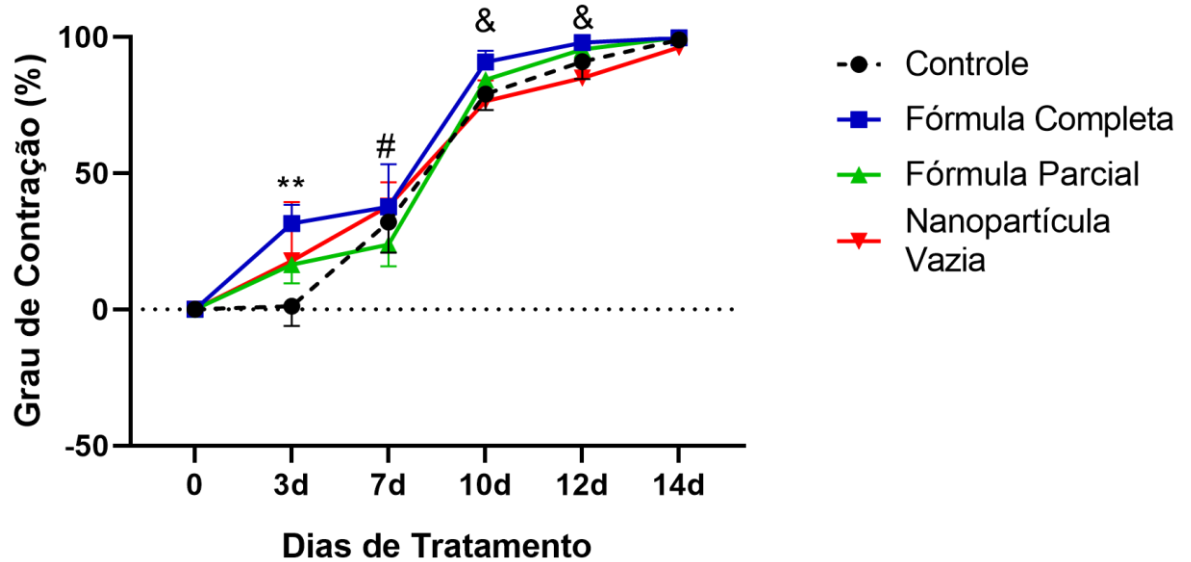


Figura 8. Porcentagem do grau de contração em camundongos machos durante o tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores. Dados estão expressos em média \pm desvio padrão, sendo utilizado medidas repetidas investigando a associação entre os grupos e o tempo ($n = 7$). O símbolo “***” representa diferença estatística dos demais grupos quando comparado ao controle; símbolo “#” representa diferença estatística da fórmula completa e nanopartícula vazia quando comparado à fórmula parcial; símbolo “&” representa diferença estatística da fórmula completa quando comparado à nanopartícula vazia ($p < 0.05$) na variância ANOVA Two-Way.

4.2 Avaliação histomorfométricas do reparo tecidual

Nas análises histológicas do terceiro dia pós-tratamento podemos observar presença de células do sistema imune distribuídas ao longo do tecido avaliado, Ademais, é possível notar uma densidade maior de células imunes no tecido tratado com a fórmula completa (Figura 9).

No décimo quarto dia pós tratamento (Figura 10), há a persistência de células do sistema imune e o melhor arranjo da derme no grupo tratado com a fórmula completa quando comparada ao grupo tratado com a NV e com a fórmula parcial. Todos os grupos foram capazes de induzir o processo de epitelização.

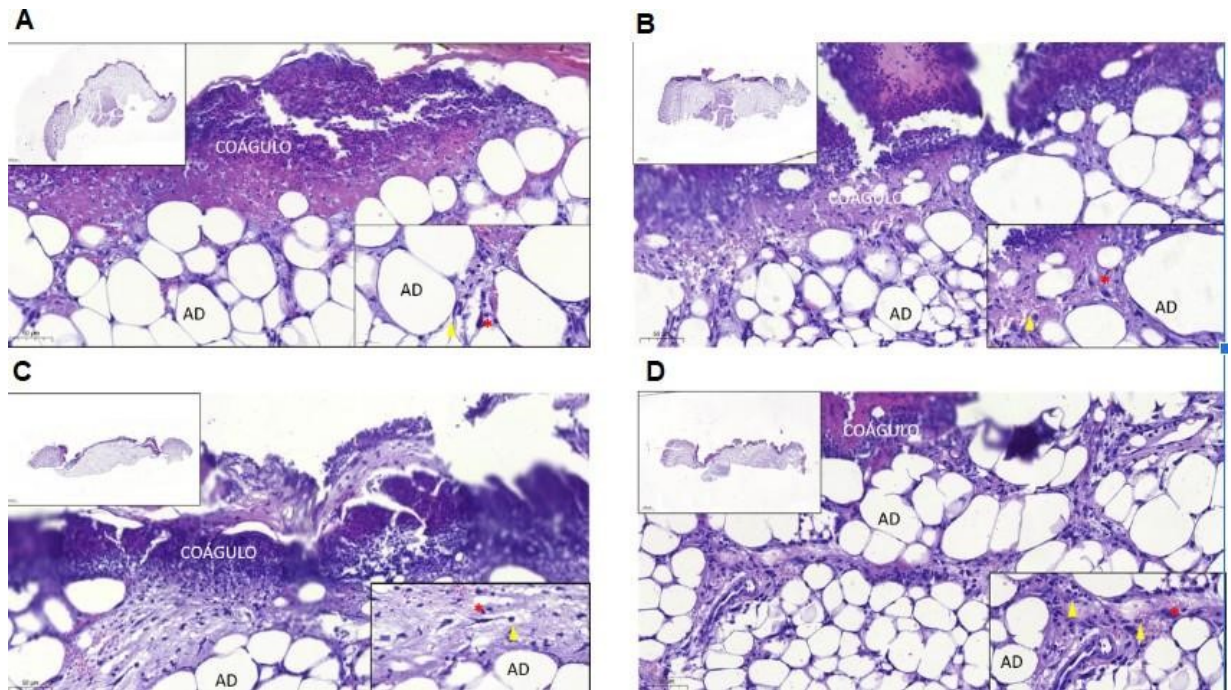



Figura 9. Representação de cortes histológicos (Hematoxilina e Eosina) de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 3º dia de tratamento (Inserte superior=0.8X; Inserte inferior=63x; Figura central= 20x). A letra “A” representa o grupo controle; A letra “B” representa o grupo tratado com a Nanopartícula Vazia; A letra “C” representa o grupo tratado com a fórmula parcial; A letra “D” representa o grupo tratado com a fórmula completa; Os símbolos nas imagens representam as seguintes estruturas: AD= adipócito;  = Células do sistema imune; * = Fibroblasto. Imagens capturadas em um microscópio Panoramic 250 flash III, 3D Histech avaliadas no software Caseviwer 3DHistech Ltd. H-1141 Budapest, Öv u. 3., Hungary.

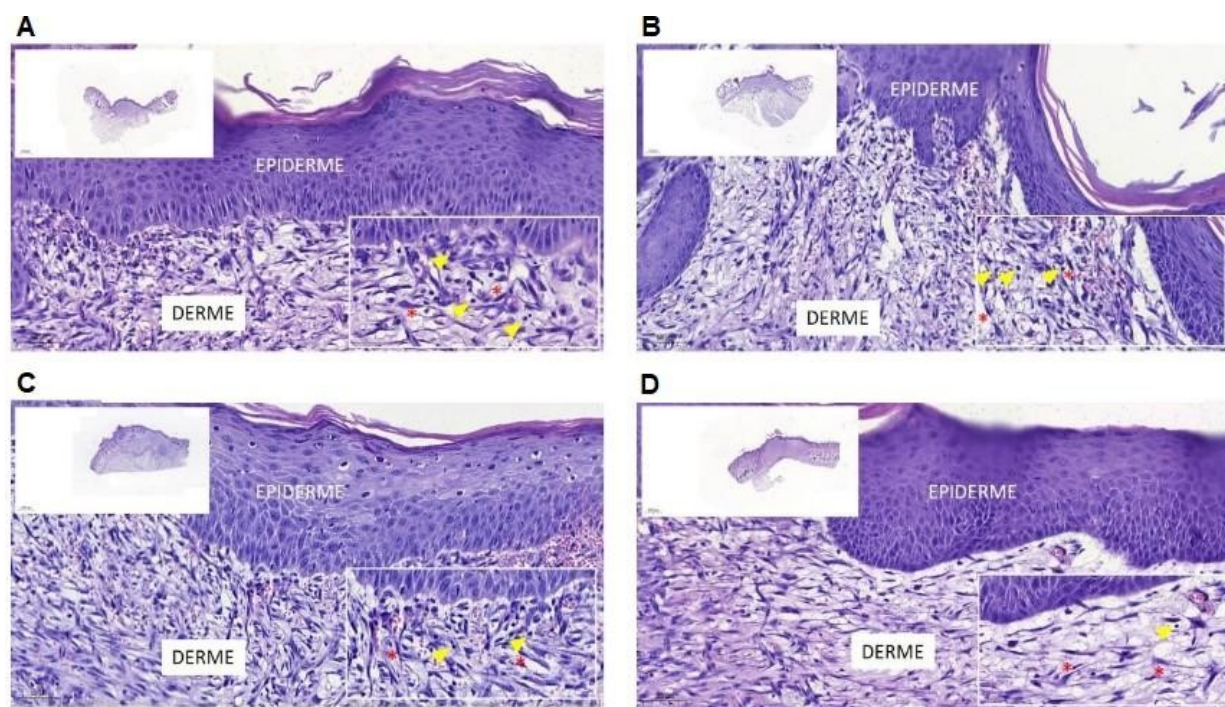


Figura 10. Representação de cortes histológicos (Hematoxilina e Eosina) de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 14º dia de tratamento (Inserção superior=0.8X; Inserção inferior=63x; Figura central= 20x). A letra “A” representa o grupo controle; A letra “B” representa o grupo tratado com a Nanopartícula Vazia; A letra “C” representa o grupo tratado com a fórmula parcial; A letra “D” representa o grupo tratado com a fórmula completa; Os símbolos nas imagens representam as seguintes estruturas: AD= adipócito; Δ = Células do sistema imune; * = Fibroblasto. Imagens capturadas em um microscópio Panoramic 250 flash III, 3D Histech avaliadas no software Caseviwer 3DHistech Ltd. H-1141 Budapest, Öv u. 3., Hungary.

Quando analisados os parâmetros morfométricos aos 14 dias de tratamento, como demonstrado na Figura 11, observa-se que os tratamentos não alteraram significativamente a espessura da parede epitelizada ($p=0.0510$), bem como na angiogênese de vasos sanguíneos ($p=0.0829$) (Figura 12). Apesar da Fórmula completa não apresentar um aumento significativo, verifica-se um perfil maior da espessura e angiogênese quando comparado aos demais grupos.

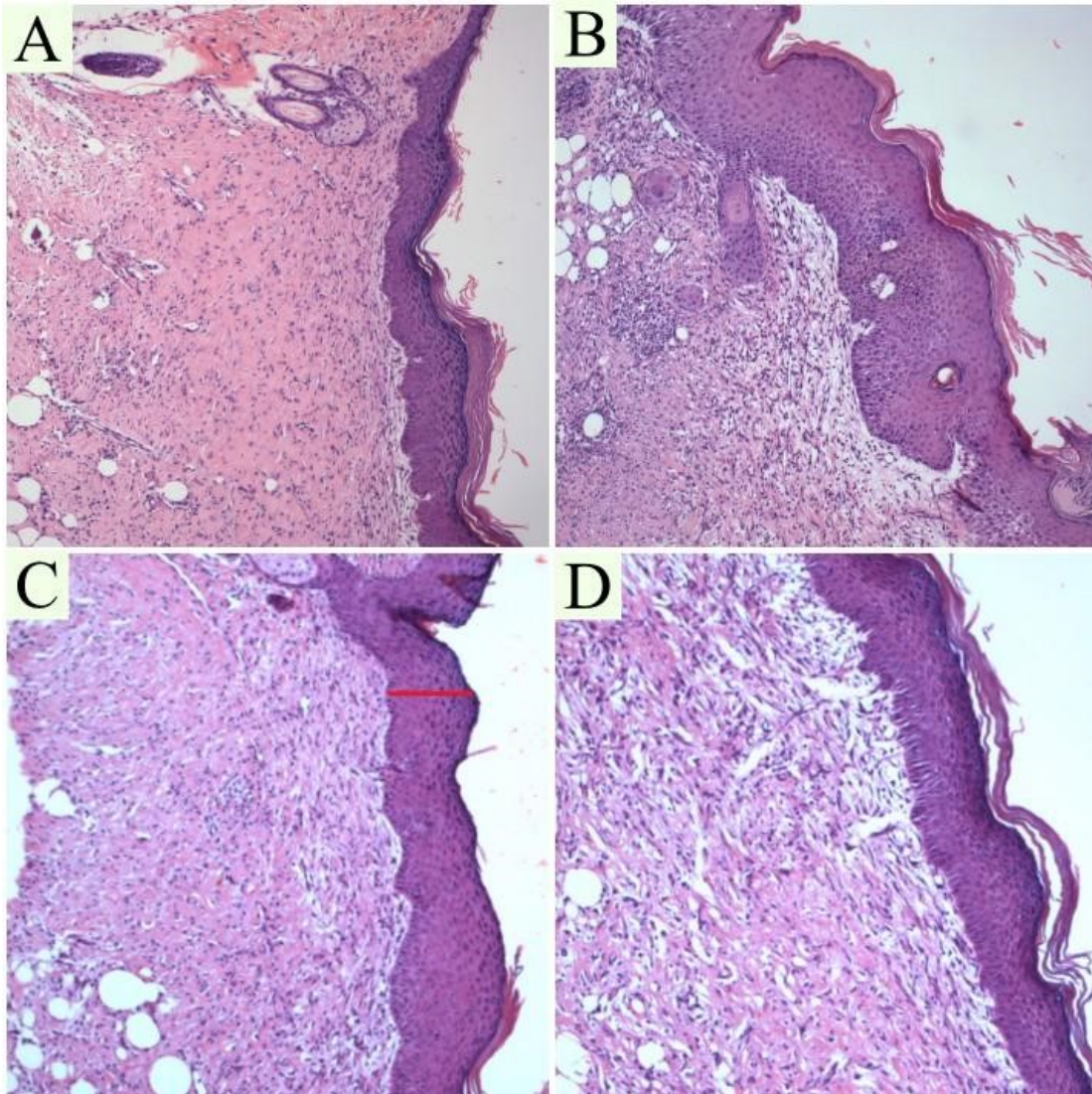


Figura 11. Representação de cortes histológicos da espessura da epitelização em camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 14º dia de tratamento (Coloração de Hematoxilina e Eosina; Objetiva 10x). A letra “A” representa o grupo controle; A letra “B” representa o grupo tratado com a fórmula completa; A letra “C” representa o grupo tratado com a fórmula parcial; A letra “D” representa o grupo tratado com a Nanopartícula Vazia. A linha vermelha representa a espessura da epitelização. Imagens capturadas em um microscópio Olympus BX40 analisadas no software Image J.

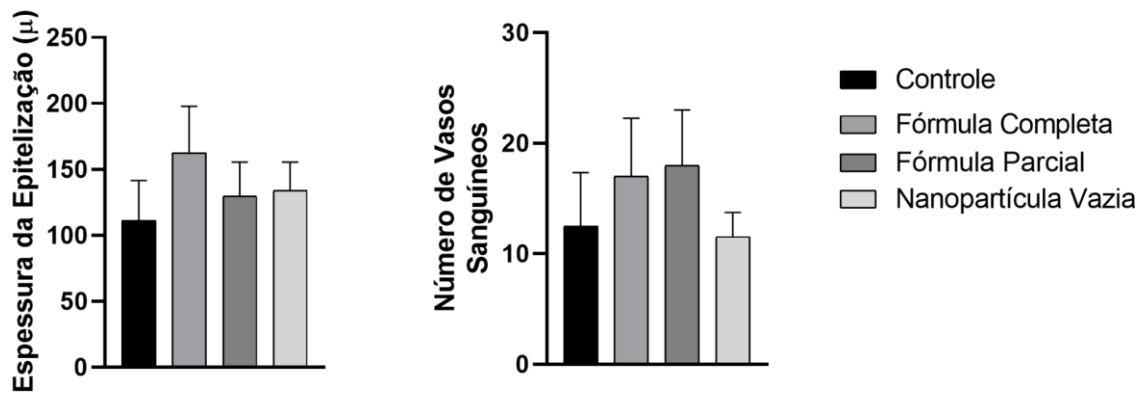


Figura 12. Efeito de diferentes formulações sob a Espessura da Epitelização e a Angiogênese após 14 dias de tratamento. Dados estão em média \pm desvio padrão ($n=7$) perante a variância ANOVA Two-Way e o nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($p<0,05$).

Ainda, a análise morfofuncional revelou que no terceiro dia pós tratamento há a presença de tecido conjuntivo neoformado na borda da lesão, local onde se inicia o processo de epitelização e fechamento da ferida nos grupos tratados com a Fórmula completa e Fórmula parcial, quando comparadas aos grupos controle e a Nanopartícula Vazia. Além disso, é nítido observar uma intensificação para a coloração de Masson na Fórmula Completa, significando a presença de grandes filamentos de fibras colágenas (Figura 13).

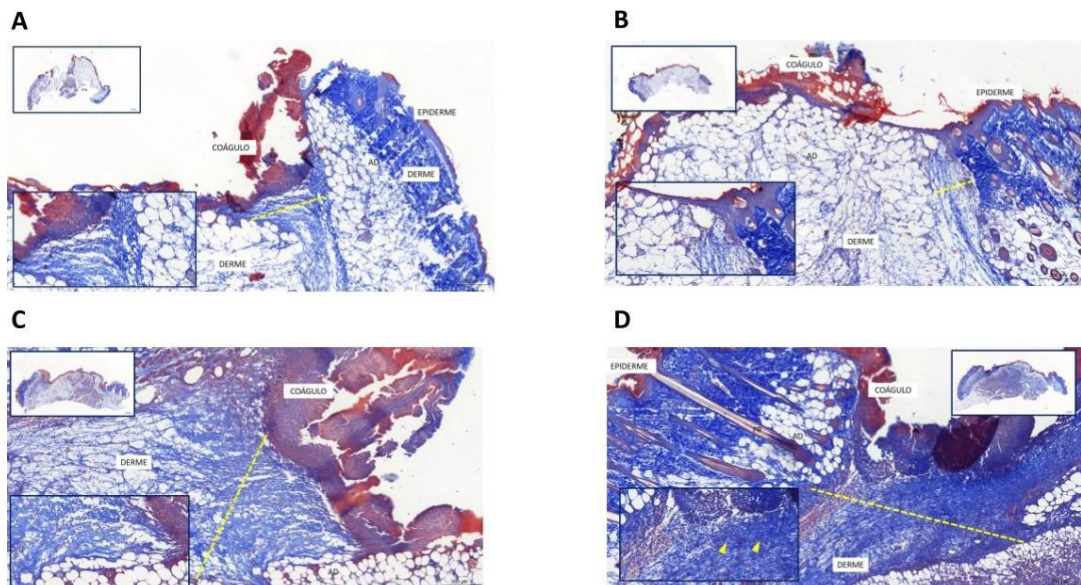


Figura 13. Representação de cortes histológicos na coloração de Tricrômico de Masson de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 3º dia de tratamento (Inserte superior=1.0X; Inserte inferior=52x; Figura central= 20x). A letra “A” representa o grupo controle; A letra “B” representa o grupo tratado com a Nanopartícula Vazia; A letra “C” representa o grupo tratado com a fórmula parcial; A letra “D” representa o grupo tratado com a fórmula completa; Os símbolos nas imagens representam as seguintes estruturas: linha tarcejada = tecido conjuntivo; FP= folículo piloso; AD= adipócito; ▲ = Células do sistema imune; *= Fibroblasto; Seta= filamento de fibras colágenas. Imagens capturadas em um microscópio Panoramic 250 flash III, 3D Histech avaliadas no software Caseviwer 3DHistech Ltd. H-1141 Budapest, Öv u. 3., Hungary.

No décimo quarto dia pós tratamento (Figura 14), a persistência de células do sistema imune, e do desarranjo da derme foram observados nos grupos não tratado e tratados, quando comparados ao grupo tratado com a fórmula completa, em que se observa uma redução na presença de células do sistema imune e a recuperação da malha pantográfica característica da derme.

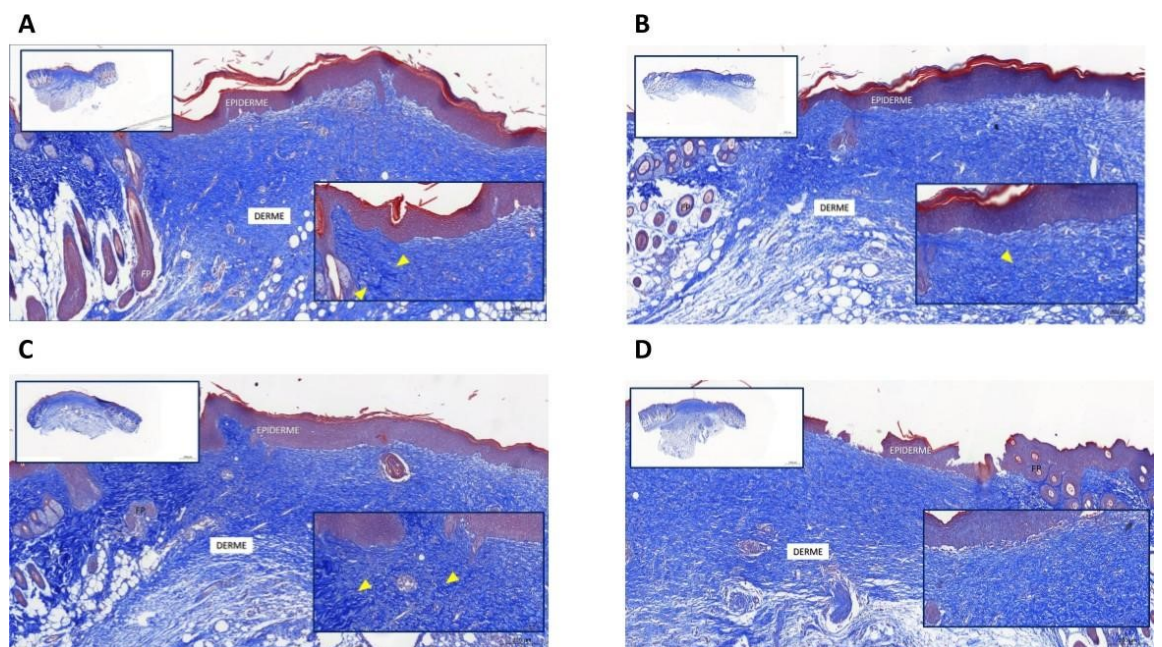


Figura 14. Representação de cortes histológicos na coloração de Tricrômico de Masson de camundongos Swiss submetidos ao tratamento com diferentes fórmulas utilizando nanocarreadores comparados ao controle e nanopartícula vazia no 14º dia de tratamento (Inserte superior=1.0X; Inserte inferior=52x; Figura central= 20x). A letra “A” representa o grupo controle; A letra “B” representa o grupo tratado com a Nanopartícula Vazia; A letra “C” representa o grupo tratado com a fórmula parcial; A letra “D” representa o grupo tratado com a fórmula completa; Os

símbolos nas imagens representam as seguintes estruturas:FP= folículo piloso; AD= adipócito; = Células do sistema imune; *= Fibroblasto; Seta= filamento de fibras colágenas. Imagens capturadas em um microscópio Panoramic 250 flash III, 3D Histech avaliadas no software Caseviwer 3DHistech Ltd. H-1141 Budapest, Öv u. 3., Hungary.

4.3 Avaliação bioquímica do reparo tecidual

Perante a análise de diversos mediadores no processo de reparo tecidual (Figura 15), observou-se uma diminuição do NFkB na fórmula parcial e na Nanopartícula Vazia quando comparado ao controle e à Fórmula completa no 3º dia de tratamento ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$). Entretanto, quando avaliado no 14º dia de tratamento, observou-se uma sustentação da expressão desta proteína nos animais tratados com a fórmula completa quando relacionado aos demais tratamentos ($p < 0,0017$; $p < < 0,0001$; $p < < 0,0001$), sugerindo um aumento da ativação dos fatores de transcrição relacionados à proliferação celular. Outro achado, é o aumento do PGC-1 α nos animais tratados quando relacionados ao grupo controle no 3º dia de tratamento ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0003$). Em contrapartida, houve uma redução significativa do TFAM nos animais tratados quando comparados ao grupo controle ao 3º dia de tratamento ($p < 0,0006$; $p < 0,0003$), sugerindo que o fator de transcrição mitocondrial não foi ativado via PGC-1 α . As proteínas P38 e SIRT-1 não apresentaram diferenças estatísticas relevantes perante o teste ANOVA.

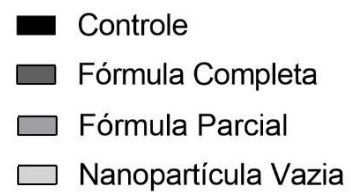
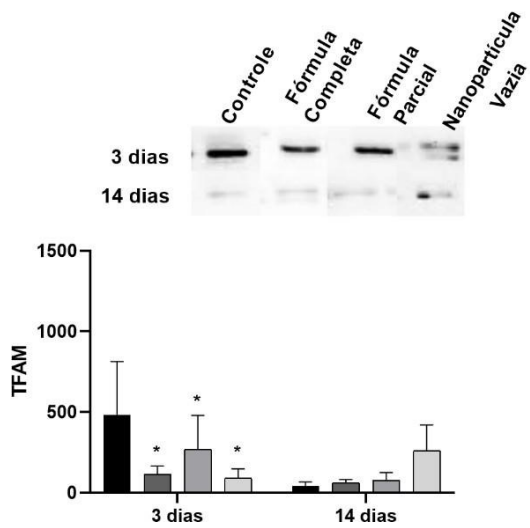
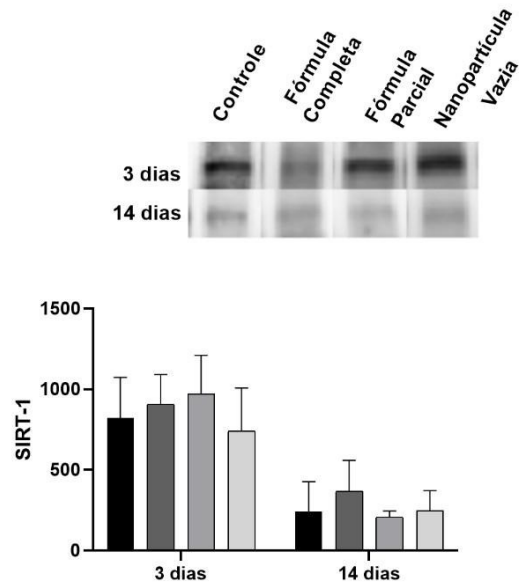
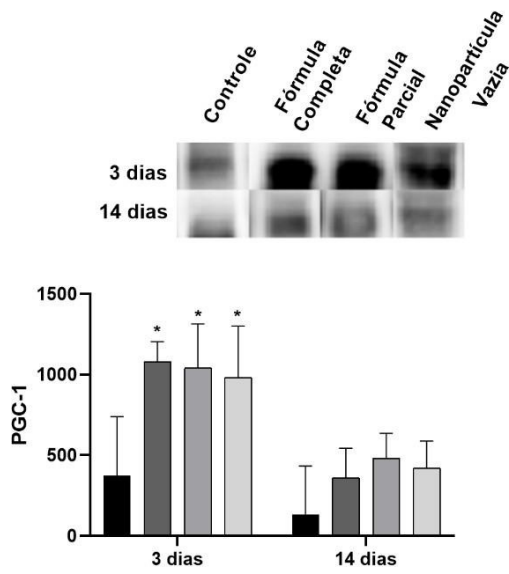
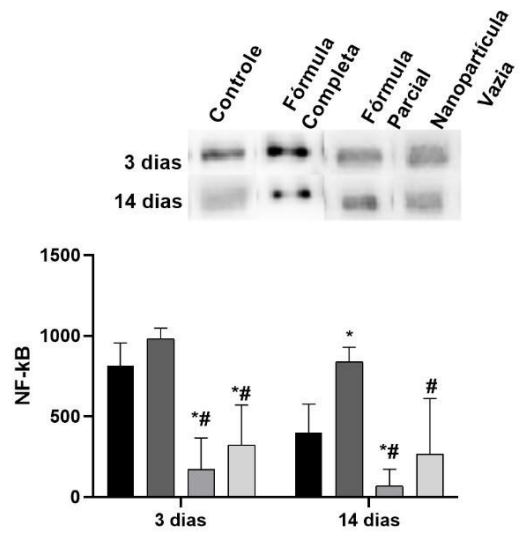
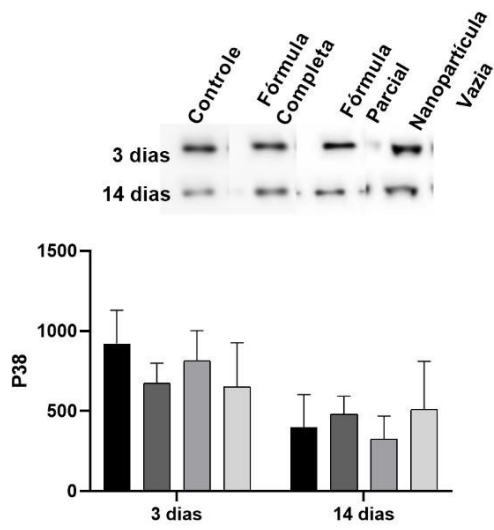


Figura 15. Efeito de diferentes formulações utilizando nanocarreadores sob parâmetros bioquímicos de animais em processo de regeneração tecidual durante a fase inflamatória (3 dias) e de reparo (14 dias); Os dados apresentados foram obtidos pela técnica de Western Blotting. O símbolo “*” representa diferença estatística quando comparado ao controle; o símbolo “#” representa diferença estatística quando comparado à fórmula completa. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=7) perante a variância ANOVA Two-Way e o nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$).

5. Discussão

O processo de reparo tecidual para o retorno da homeostase cutânea envolve processos biológicos complexos e ordenados, como cascatas bioquímicas e eventos de sinalização. Consequentemente, produtos que aceleram tais eventos são amplamente estudados, dentre eles coberturas baseadas em compostos biodegradáveis e biocompatíveis que interfiram neste processo de forma a aprimorar suas etapas para restabelecer a função da pele (BERTHET et al., 2017).

A nanomedicina vem mostrando sua aplicabilidade em diversas áreas, tendo bons resultados por ser biocompatível com diversas substâncias, baixa toxicidade, boa permeabilidade e uma capacidade de distribuição contínua dos compostos aplicados. A adição de nanopartículas em coberturas para distribuição de drogas para promoção e aceleração do processo cicatricial tem se mostrado efetiva, ainda tendo discussões acerca da sua atuação no processo de cicatrização crônica (YAH et al., 2015). Em específico, as NLS oferecem um sistema de liberação de fármacos e compostos proporcionados por uma matriz lipídica invólucra que possibilita uma liberação controlada e específica. Nela, os fármacos permanecem encapsulados até o momento da aplicação, resultando na maior estabilidade e absorção (LIPPACHER et al., 2001; MAIA et al., 2000).

Partindo destes princípios, a avaliação de diferentes tecnologias como a nanomedicina associada a diferentes compostos na cicatrização de feridas faz-se necessária para desvendar novos mecanismos de atuação em lesões cutâneas.

Considerando as NLS como uma ferramenta de liberação de fármacos, uma revisão feita por Berthet et al (2017), questionava o futuro de coberturas

utilizando nanocompostos na cicatrização de feridas, chegando a conclusão de que a implementação de nanopartículas em coberturas aprimoraria a reconstrução da pele, por manter a liberação sustentada do fármaco proposto, tornando-se uma premissa inovadora no tratamento de feridas. Adicionalmente as NLSs possuem similaridade ao tecido da pele, favorecendo a formação da matrix extracelular da lesão (SAHANA et al., 2018). Interessantemente, e partindo desse princípio, nosso estudo revelou que a aplicação de nanopartícula vazia (sem fármaco) foi capaz de induzir efeitos benéfico ao processo de cicatrização, dada ao aumento do grau de contração e aumento do mediador PGC-1, ambos observados ao 3 dia de tratamento.

A utilização de compostos nanoencapsulados oferece benefícios na permeabilidade podendo potencializar a sua atuação, isso devido sistema de controle de distribuição, que induz gradualmente os efeitos do produto. Quando comparado a atuação de compostos como o ácido retinóico, percebe-se uma melhora do processo de cicatrização, obtendo um grau de contração superior ao tratado com a Nanopartícula Vazia (ARANTES et al., 2019; ZINDER et al., 2019). Corroborando com os dados da literatura, este trabalho demonstrou que nanoencapsulados contendo ácido retinóico (nanopartícula completas e parciais) foram capazes de acelerar a contração da lesão nos primeiros dias (ambas fórmulas), mas somente a Fórmula Completa elevou o grau de contração da lesão nos demais dias de tratamento, sugerindo que os demais elementos contidos na nano completa são relevante nesse processo.

Outro ácido amplamente estudado na estética e atualmente na cicatrização é o ácido hialurônico, que se comporta como uma molécula que participa ativamente do processo de reparação, principalmente na angiogênese, (LITWINIUK et al., 2016; DALMEDICO et al., 2016; KIM; SKYKES, 2011). Os resultados revelaram que apesar de haver uma tendência ao aumento da angiogênese nos tratamentos com a nanopartícula contendo ácido hialurônico, os resultados não foram significativamente diferentes dos grupos nanopartícula vazia ou controle. Uma provável explicação poderia ser devido ao uso do ácido hialurônico em diferentes concentrações estudadas, tendo resultados na angiogênese em doses de 2 a 4% (NEUMAN et a., 2015).

Neste estudo, a nanopartícula completa obteve resultados mais promissores que a nanopartícula parcial, isso pode estar relacionado aos

compostos aditivos implementados na sua composição. A *Glycyrrhiza Glabra*, composto presente na nanopartícula completa, pode ter auxiliado no aumento do grau de contração, bem como na sustentação de fatores de crescimento como o Fator Nuclear kappa B (NF-kB). Importante lembrar que o NFkB é um importante fator de transcrição relacionado à proliferação celular, e os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram isso quando comparado a nanopartícula incompleta e vazia nos dois períodos avaliados. Essas alterações em fatores de crescimento e aplicação da *Glycyrrhiza Glabra* já foram anteriormente descritas (PASTORINO et al, 2018; VERATTI et al., 2011; GRIPPAUDO; DI RUSSO, 2016; SOLANO et al., 2006). Além disso, o *Panax ginseng*, também presente na Fórmula completa, foi descrito como potencializador da cicatrização e atuante na proliferação de fibroblastos, interferindo assim na síntese de colágeno (KIM et al., 2013; GEUM-YOUNGLEE et al., 2015; MEN et al., 2019). Corroborando com os dados presentes na literatura, observamos que a nanopartícula completa apresenta uma nítida intensificação da marcação de fibras de colágeno, vista pela coloração de Masson. Adicionalmente aos dois produtos naturais citados anteriormente e presentes na nanopartícula completa, o *Piper nigrum* possui efeitos descritos como um possível agente anti-inflamatório (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). Os resultados obtidos pela identificação de células do sistema imune no tecido lesionado revelaram que no 14º dia de tratamento, a nanopartícula completa foi capaz de espaçar a distribuição de células imunes. Importante ressaltar que apesar dos resultados ir ao encontro com a literatura, as análises qualitativas das lâminas histológicas são limitações para afirmar que a nanopartícula completa reduz o número de células imunes, sendo necessário outras abordagens para tal conclusão.

Quanto às análises bioquímicas realizadas pela técnica de Western Blott, as proteínas avaliadas foram P38 para avaliação da via MAPK, coativador alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) para avaliação da ativação da biogênese mitocondrial por interagir com o fator respiratório 1 e 2 (NRF1 e NRF2), bem como a ativação do fator de transcrição mitocondrial (TFAM). Como descrito anteriormente, outro fator importante na regulação da sobrevivência celular, reparos no DNA e apoptose é a enzima SIRT1, que é uma desacetilase NAD dependente pertencente à família das histonas. Esta enzima

está envolvida com a regulação da ativação e transcrição relacionada ao gene p53 e na ativação de fatores de transcrição como o PGC-1 α e NF- κ B (YI; LUO, 2010).

Durante a cicatrização, estão envolvidos eventos intracelulares, dentre eles, genomas nucleares e mitocondriais desempenham papéis de extrema importância, como o PGC-1 α que atua como coativador transcricional induzível, interagindo com NRF1 e NRF2 e conseqüentemente regulando a expressão das subunidades da cadeia de transferência de elétrons (CTE), que se ligam aos promotores de genes envolvidos na transcrição do mtDNA (DNA mitocondrial), como o TFAM, aumentando a transcrição e replicação do mtDNA (KELLY; SCARPULLA, 2004; MURPHY et al. 2018; BROWN et al 2010; BOUCHEZ et al 2019). Várias são as vias que implicam no controle e ativação do PGC-1 α , sendo uma das vias conhecidas, a ativação da P38 MAPK, que comumente gera uma cascata de eventos intracelulares envolvidos na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose. Sendo assim, quando a via P38 MAPK é acionada em casos de proliferação celular, pode-se ter a ativação da PGC-1 α , levando ao aumento de TFAM e biogênese mitocondrial (KELLY & SCARPULLA, 2004). Havíamos a expectativa de demonstrar que o processo de reparação tecidual envolvesse essas vias de ativação mitocondrial, entretanto, os resultados apesar de apresentarem o aumento significativo do fator de transcrição PGC-1 α , que atua como coativador de reguladores da biogênese mitocondrial, como NRF1 e NRF2, seguido da diminuição do TFAM, nos 3 primeiros dias de tratamento com a nanopartícula completa, sugere que o fator de transcrição mitocondrial não foi ativado mesmo em condições de aumento do PGC-1 α , não estando correlacionado à via clássica PGC-1 α - NRF- TFAM.

Um estudo realizado por Miceli et al (2014) sugere que alguns produtos naturais como polifenóis, carotenos e compostos da cúrcuma e do genistein, podem afetar a metilação do DNA, acetilação e modificação de histonas, mas ainda os conceitos e as implicações futuras ainda não foram estudadas e debatidas. A implicação desta enzima sobre a cicatrização ainda vem sendo estudada, um estudo recente realizado por Beegum et al (2022) avaliou diferentes Sirtuínas na cicatrização, concluindo que a deficiência de Sirt-1 reduz o recrutamento de macrófagos, fibroblastos e neutrófilos, podendo atrasar o processo. Deste ponto de vista, avaliar a estabilidade desta enzima se faz

importante para avaliações bioquímicas de processos cicatriciais. Apesar de estar envolvida na regulação da sobrevivência celular, reparo no DNA e apoptose, os resultados encontrados neste estudo, demonstram que a fórmula completa ou incompleta não obtiveram diferenças significativas na enzima SIRT1 quando comparado aos demais grupos. Interessantemente, os dados revelaram a atuação do PGC-1 α e NF- κ B no processo de reparação tecidual sem a ativação da via SIRT1, abrindo possibilidades para outras vias de ativação destes fatores de transcrição. Uma alternativa presente na literatura recente para a ativação do NF- κ B está relacionada aos Receptores Toll-like (TLR) que, normalmente, encontram-se em membranas de macrófagos, sendo eles, tipos celulares muito importantes na cicatrização. A ativação destes receptores ocorre em microambientes onde há o aumento de fatores inflamatórios, como IL-6 e IL-1 β . Neste contexto, a ativação dos TLR culmina na ativação do NF- κ B e em seus efeitos fisiológicos já descritos. Desta forma, uma alternativa para a ativação e persistência do NF- κ B nos animais tratados com a fórmula completa pode estar relacionada a ativação dos TLR via mediadores inflamatórios (XIE et al., 2022).

Além disso, a geração de EROS na pele é natural para o metabolismo celular, sendo que este processo tem início na mitocôndria e posteriormente é revogado pelos antioxidantes (WAGNER et al., 2013). A formação de EROs e ERNs (íons superóxido, hidroxila, peróxidos e hidroperóxidos peroxinitritos) em excesso associada a uma deficiência dos sistemas antioxidantes celulares como Superóxido Dismutase 1 (SOD1), Catalase (CAT) e a Glutathione Peroxidase (GPx) causa o fenômeno chamado de estresse oxidativo. (JOHANSEN et al., 2005; MARITIM et al., 2003). O dano causado é resultado da alta produção de EROs na cadeia respiratória mitocondrial pode ocasionar em modificações em proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membranas (peroxidação lipídica) podendo gerar mitocondriopatias (PÉRES-MATUTE et al., 2009; SCOTT; KING, 2004; MURPHY et al., 2018). No que tange à alterações de radicais livres, o ácido fólico é estudado por seu potencial antioxidante, demonstrando-se um possível aliado na cicatrização (MOHAMMADPOUR et al., 2012; BURNETT et al., 2010). Os resultados descritos neste trabalho mostraram que ambas formulações, completa e parcial continham o ácido fólico, e este produto natural pode estar relacionado ao aumento do grau de contração observado.

Utilização de produtos naturais como estratégias farmacológicas capazes de intervirem nos fatores de transcrição e proteínas reguladoras, pode ser uma alternativa para o tratamento de feridas crônicas, e outras doenças; uma vez que a mitocondriopatia está associada às mais diversas doenças. (MURPHY et al. 2018; BROWN et al 2010). Ao longo do processo cicatricial, várias vias de sinalização moleculares estão envolvidas, como a via MAPK e a via do NF-κB que está associada à proliferação, adesão celular, inflamação e regulação das EROs. O NF-κB pertence a uma família de monômeros que formam dímeros que podem se ligar ao DNA, regulando vias que controlam a transcrição gênica de fatores inflamatórios (MITCHELL et al., 2016). Portanto, a via do NF-κB está relacionada a processos estressores como ocorre na cicatrização, podendo regular algumas de suas etapas (HAYDEN et al., 2006; GOSH & KARIN, 2002; PARK et al., 2017).

Visto que, em relação a fatores de transcrição relacionados à proliferação celular e inflamação, o NF-κB apresentou uma sustentação desde a fase inflamatória até o fechamento da lesão nos animais tratados com a Nanopartícula completa, devido a tendência no aumento aos 3 dias e elevação significativa no 14 dia, quando comparados ao grupo controle. Assim, o NF-κB pode estar relacionado a processos estressores como ocorre na cicatrização, sua atuação na proliferação pode ter sido crucial para o aumento do grau de contração nos animais tratados com esta formulação. Por outro lado, a via proliferativa da P38 MAPK não demonstrou diferença entre as fórmulas testadas, bem como quando comparadas ao controle, descartando essa possibilidade no processo regenerativo.

A utilização de nanopartículas com base de polímeros naturais em hidrogéis contendo compostos naturais, como a cúrcuma, demonstraram a redução da inflamação, melhora do tecido de granulação e melhora do processo cicatricial (KARRI et al., 2016).

Em relação aos estudos clínicos associados à utilização de nanocarreadores e produtos naturais em lesões cutâneas, as bases de estudos ainda são limitadas, abrindo possibilidades para testes clínicos de compostos já testados em vias experimentais. Além disso, a nanotecnologia utilizada na cosmética, se demonstra segura do ponto de vista biofarmacológico, mas ainda a sofisticação de compostos associados para melhora da do ponto de vista sensorial e eficaz ainda são pontos de melhora (LEWINSKA et al., 2021). Desta

forma, os compostos apresentados na composição do presente estudo, como a *Glycyrrhiza Glabra*, *Panax ginseng* e *Piper nigrum*, demonstram resultados em pesquisas experimentais e in vitro, sendo da mesma forma, escassas em pesquisas clínicas e testes randomizados (PASTORINO et al, 2018; VERATTI et al., 2011; GRIPPAUDO; DI RUSSO, 2016; SOLANO et al., 2006).

A associação de compostos bacteriostáticos, hemostáticos e que atuem em diferentes processos fisiológicos da cicatrização, em formulações utilizando a nanotecnologia, podem gerar produtos finais com ações diretas na proliferação, angiogênese e melhora da cicatrização, como visto no trabalho de Choudhary et al (2021). A combinação de diferentes nanopartículas com fitoquímicos diversos, podem oferecer melhoras no tratamento terapêutico, demonstrando uma alternativa promissora no tratamento de lesões cutâneas (WANG et al, 2022). Dentro deste contexto, o presente estudo demonstrou que a associação de produtos naturais em formulações utilizando nanocarreadores como forma de distribuição controlada tem benefícios em diferentes fases da cicatrização, impactando no grau de contração das lesões, bem como em aspectos histológicos e bioquímicos.

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que a unificação de compostos naturais associados a modelos de nanocarreadores para liberação controlada de fármacos foi capaz de reduzir o tempo de cicatrização, o que é um fator crucial para redução da exposição a patógenos e para restauração da função de barreira da pele. Além disso, sustentou a presença de fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular até a fase de remodelação, sugerindo a correlação destes compostos naturais em vias envolvendo NF κ B, porém sem alterações em fatores como SIRT-1 e TFAM. O benefício de se utilizar diferentes fitoquímicos com diferentes atuações, bem como, explorar diferentes formulações para aprimorar o processo de preparo podem afetar diretamente na sua futura aplicabilidade, comercialização e prática clínica. A atuação em diferentes sexos também pode ser melhor explorada, testando estes compostos em camundongos fêmeas em um próximo estudo. Por fim, a combinação de diferentes compostos naturais utilizando NLSs demonstrou-se benéfica na cicatrização induzindo respostas

fisiológicas para futuramente terem suas vias melhor exploradas.

7. Referências Bibliográficas

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURTI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n1/v41n1a03.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília, 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf.

BRASIL. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006. Disponível em: <http://saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnprm/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos>.

BRASIL. Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem. s/d. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/praticas-integrativas-e-complementares>.

GOSAIN, A. & DIPIETRO, L.A. Aging and wound healing. **World J Surg**, v.28 p.321-326, 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903966/pdf/10.1177_0022034509359125.pdf

HASENCLEVER, L. *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciênc. saúde coletiva**, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232017002802559&script=sci_abstract&lng=pt.

LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu, 2.Ed. 2010.

MANDELBAUM, S. H.; DI-SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrization: current and auxiliary resources-Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78 n. 4, p. 393-410, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v78n4/16896.pdf>.

OKAMOTO R. Caso Complexo 3 Ilha das Flores: Fundamentação Teórica: feridas. São Paulo: Especialização em Saúde da Família; 2012. Disponível em: https://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/esf/1/casos_complexos/Ilha_da_s_Flor_es/Complexo_03_Ilha_das_Flores_Feridas.pdf

SHEDOEVA, A. *et al.* Wound Healing and the Use of Medicinal Plants **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v.30, 2019. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2019/2684108/>

WAHED, T.B. *et al.* Protective Role of Syzygium Cymosum leaf extract against carbofuran-induced hematological and hepatic toxicities. **Chem. Res. Toxicol.** v.03, p. 34-41, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.9b00164>.

WATHONI, N. *et al.* Sacran Hydrogel Film Containing Keratinocyte Growth Factor Accelerates Wound Healing by Stimulating Fibroblast Migration and Re-epithelization. **Chem. Pharm. Bull.** v.67 n.8, p.849–854, 2019. Disponível: https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/67/8/67_c19-00291/article.

WOUNDS CANADA. Foundations of Best Practice for Skin and Wound Management. Skin: Anatomy, Physiology and Wound Healing, 2021F. Disponível em: <https://www.woundscanada.ca/docman/public/health-care-professional/bpr-workshop/166-wc-bpr-skin-physiology/file>.

COX, J. APN-C, CWOCN Wound Care 101. **Nursing.** v. 49 n.10 - p 32-39, 2019. doi: 10.1097/01.0000580632.58318.08

HAYDEN, M.S.; WEST, A.P.; GHOSH, S. , SnapShot: NF-kappaB signaling pathways. **Cell.** v.127 n.6 p.1286-7, 2006.

GHOSH, S.; KARIN, M.; Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell.** v.109 p.81- 96, 2002.

PARK, Y.R.; SULTAN, D.T.; PARK, H.J.; MIN LEE, J.; JU, H.W.; LEE, O.J.; LEE, D.J.; KAPLAN, D.L.; PARK, C.H. NF-κB signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. **Acta Biomaterialia**, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.006>

MITCHELL, S. VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. **Rev Syst Biol Med.** v.3 p.227-41, 2016. doi: 10.1002/wsbm.1331. PMC8363188.

DINTCHEVA, N.T. INFURNA, G.; BAIAMONTE, M.; D'ANNA, F. Natural Compounds as Sustainable Additives for Biopolymers. **Polymers (Basel).** v.12 n.4 p.732, 2020. doi: 10.3390/polym12040732.

LUO, H.; VONG, C.T.; CHEN, H.; GAO, Y.; LYU, P.; QIU, L.; ZHAO, M.; LIU, Q.; CHENG, Z.; ZOU, J.; YAO, P.; GAO, C.; WEI, J.; UNG, C.O.L.; WANG, S.; ZHONG, Z.; WANG, Y. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine. **Chin Med.** v.14 n.48, 2019. doi: 10.1186/s13020-019-0270-9.

MICELI, M.; BONTEMPO, P.; NEBBIOSO, A.; ALTUCCI, L. Natural compounds in epigenetics: a current view. **Food Chem Toxicol.** v.73 p.71-83, 2014. doi: 10.1016/j.fct.2014.08.005.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.3 n.1, 2011. doi: 10.1101/cshperspect.a004978.

HENNET, T. Collagen glycosylation. **Curr Opin Struct Biol.** v.56 p.131-138, 2019. doi: 10.1016/j.sbi.2019.01.015.

MILLER, E.J.; MATUKAS, V.J. Chick cartilage collagen: A new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species. **Proc Natl Acad Sci.** v.64 p.1264–1268, 1969.

YAH, C.S.; SIMATE, G.S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **Daru-J Pharm Sci.** v.23, 2015. doi:10.1186/s40199-015-0125-6

MAIA, C. S., PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. **Int. J. Pharm.** v.363, n.1-2, p. 132–138, 2008.

LIPPACHER, A., MULLER, R. HL., MADER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 214, n. 1-2, p.9-12, 2001.

SAHANA, T.G.; REKHA, P.D. Biopolymers: applications in wound healing and skin tissue engineering. **Mol Biol Rep.** v.45 n.6 p.:2857–2867, 2018. doi: 10.1007/s11033-018-4296-3

KARRI, V.; KUPPUSAMY, G.; TALLURI, S.V. et al. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. **Int J Biol Macromol.** v.93 p.1519–1529, 2016. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.038

WANG, F.; ZHANG, W.; LI, H.; CHEN, X.; FENG, S.; MEI, Z. How Effective are Nano-Based Dressings in Diabetic Wound Healing? A Comprehensive Review of Literature. **Int J Nanomedicine.** v.11 n.17 p.2097-2119, 2022. doi: 10.2147/IJN.S361282.

LITWINIUK, M.; KREJNER, A.; SPEYRER, M.S.; GAUTO, A.R.; GRZELA, T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. **Wounds.** v.28 n.3 p.78-88, 2016.

GRIPPAUDO, F. R.; DI RUSSO, P. P. Effects of topical application of β -resorcinol and glycyrrhetic acid monotherapy and in combination with fractional CO₂ laser treatment for benign hand hyperpigmentation treatment. **Journal of Cosmetic Dermatology.** v.15 n.4 p.413–419, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TOSATO, M. G. et al. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 28, n. 3, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-31512012000300009&script=sci_abstract&tlng=pt.

LIRA, A. A. M. et al. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 35–41, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n1/07.pdf>.

MENDONÇA, J.C.; CARVALHO, C.A.; SOUZA, R.R. Arrangement of the collagen and elastic fibers in the upper human duodenum. **Hyperbaric medicine**, p.401-427, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235263>.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v.341 n.10 p. 738-46, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461>.

KULA, M.T.S. & GAPUD, R.I.P. Prevalence and risk factor assessments of pressure ulcers among medical in-patients in ripas hospital. **Brunei International Medical Journal**. v.14, p.151-156, 2018.

LOTFI, M.; AGHAZADEH A.M.; ASGARPOUR, H.; NOBAKHT, A. Iranian nurses' knowledge, attitude and behaviour on skin care, prevention and management of pressure injury: A descriptive cross-sectional study. **Nursing Open**. v.6 p.1600–1605, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6805304/pdf/NOP2-6-1600.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2019.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. **J Dent Res**, v. 89 n. 3 p. 219-229, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903966/pdf/10.1177_0022034509359125.pdf.

FARHDIHOSSEINABADI, B. et al. Inducing type 2 immune response, induction of angiogenesis, and anti-bacterial and antiinflammatory properties make lacto-n-neotetraose (LNnT) a therapeutic choice to accelerate the wound healing process. **Medical Hypotheses**. v.134, 2019.

WANG, J. et al. Effects of intensive blood pressure lowering on mortality and cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetic patients: A meta-analysis. **PLoS ONE** v.14 n.4, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0215362>. Acesso em: 10 set. 2019.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation

Blood Rev., v. 29, n.1, p.17–24, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4314363/pdf/nihms643151.pdf>.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**. v. 202 p.498-9, 1964. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14167839>.

SMIGIEL, K. S.; PARKS, W. C. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. **Current rheumatology reports**, v. 20, n. 4, p. 17, mar. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29550962>.

PESSOA, A.F.M. et al. Oral administration of antioxidants improves skin wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen.* v.24 n.6 p.981-93, 2016.

RAHIM K. et al. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol.* 2017;73(3):710-21.

MURPHY, Michael P.; HARTLEY, Richard C. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 12, p. 865-886, 2018

MEN S-Y, HUO Q-L, SHI L, et al. Panax notoginseng saponins promotes cutaneous wound healing and suppresses scar formation in mice. **J Cosmet Dermatol.** p.1–6, 2019. <https://doi.org/10.1111/jocd.13042>

APUZZO ML, LIU CY. Things to come. **Neurosurgery**. V.49 n.4 p.765-7, 2001.

RODRIGUES HG, VINOLO MAR, SATO FT, MAGDALON J, KUHL CMC, YAMAGATA

AS, et al. Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. **PLoS ONE**. v.11 n.10, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0165115

PASTORINO, G.; CORNARA, L.; SOARES, S.; RODRIGUES, F.; OLIVEIRA, M.B.P.P.

Liquorice (*Glycyrrhiza Glabra*): A Phytochemical And Pharmacological Review. **Phytotherapy Research**. v.32 n.23 p.23–2339, 2018.

<https://doi.org/10.1002/ptr.6178>

PESSOA, A. F.; AMARAL, B.; BLANCK, M. D. C.; SILVA, S.; PEDROSA, A.; MARTINS, C.; OTOCH, J. Vitamina E e Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs): parceiras na cicatrização da ferida diabética. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 95, n. 33, p. e-021023, 4 fev. 2021

VERATTI, E., ROSSI, T., GIUDICE, S., BENASSI, L., BERTAZZONI, G., MORINI, D.

MAGNONI, C. 18 β -Glycyrrhetic acid and glabridin prevent oxidative DNA fragmentation in UVB-irradiated human keratinocyte cultures. **Anticancer Research**, v.31 n.6, 2209–2215, 2011

AZEVEDO, F., PESSOA, A., MOREIRA, G., DOS SANTOS, M., LIBERTI, E.,

ARAUJO, E et. al. Effect of topical insulin on second-degree burns in diabetic rats. **Biological Research for Nursing**, v.18, p.181–192, 2015.
doi:10.1177/1099800415592175

AZEVEDO, F.F., SANTANNA, L. P., BOBBO, V. C., LIBERTI, E. A., ARAUJO, E. P., ABDALLA SAAD, M., & LIMA, M. H. M. Evaluating the effect of 3% papain gel application in cutaneous wound healing in mice. **Wounds**, v.29, p.96–101, 2017.

BANDEIRA, L. G., BORTOLOT, B. S., CECATTO, M. J., MONTE-ALTO-COSTA, A., & ROMANA-SOUZA, B. Exogenous tryptophan promotes cutaneous wound healing of chronically stressed mice through inhibition of TNF- α and IDO activation. **PLoS One**. v.10, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128439

BROWN, GUY C. et al. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays in biochemistry**, v. 47, p. 69-84, 2010.

JOHANSEN J.S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**. v.4 n.5, 2005.

WAGNER S. et al. Redox regulation of sodium and calcium handling. **Antioxid Redox Signal**. 2013.

PÉREZ-MATUTE P.; ZULET, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**. v.9 p.771–779, 2009.

SCOTT, J.A.; KING, G.L. Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1031 p. 204–213, 2004.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology: United States of America**. v.1 n.17 p.24-38, 2003.

BOUCHEZ, C.; DEVIN, A. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial reactive oxygen species (ROS): a complex relationship regulated by the cAMP/PKA signaling pathway. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 287, 2019.

IWGN Workshop Report, U.S. National Science and Technology Council. Washington D.C. Nanotechnology Research Directions: Vision for Nanotechnology in the Next Decade, 1999/2000.

International Best Practice Guidelines: Wound Management in Diabetic Foot Ulcers. **Wounds International**, 2013.

MENKE, M.N. et al. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecol Oncol**. v.111 p.87-91, 2008.

BERTHET M, GAUTHIER Y, LACROIX C, VERRIER B, MONGE C.
Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?
Trends in Biotechnology v.35, p.770-784, 2017.

NAAHIDI S et al. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **J Control Release**. Ontveraario Health Technology Assessment Series 2009.

DEVALAPALLY H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M.M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **J Pharm Sci**. v.96 n.10 p.2547-65, 2007.

MÜLLER R.H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.50 n.1 p.161-77, 2000.

BOREL T, SABLIOV CM. Nanodelivery of bioactive components for food applications: types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles. **Annu Rev Food Sci Technol**. V.5 p.197-213, 2014.

MUKHERJEE, S.; DATE, A.; PATRAVELE, V.; ROEDER, A.; WEINDL, G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. **Clinical Interventions in Aging**. v.1 n.4 p.327–348, 2006.

LORDANI, T.V.A.; AMARAL, B.K.; CARVALHO, A.R.S.; BUENO, F.G.; MENOLLI, R.A.; RANGEL, A.L.C.A.; BARBOSA, P.M.; PESSOA, A.F.M.; SANTOS, R.P.; LORDANI, C.R.F.; BECKER, T.C.A.; LONARDONI, M.C.V.; DEMARCHI, I.G. Calophyllum brasiliense cambess (jacaréúba) extract: effects under rats skin wound healing. **International Journal of Development Research**, v.11, n.03, 44937-44942, 2021. Disponível em:
<https://www.journalijdr.com/calophyllum-brasiliense-cambess-jacare%C3%BAbba-extra-ct-effects-under-rats-skin-wound-healing>

ARANTES, V.T. *et al.* Retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles surrounded by chitosan film support diabetic wound healing in in vivo study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.188, 2020,

BURNETT, C. L.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.;
LIEBLER, D. C.; MARKS, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.;
ANDERSEN, F. A. Final Report of the Safety Assessment of Kojic Acid as
Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**. v.29, n.6,
p.244S–273S, 2010. doi:10.1177/1091581810385956

DALMEDICO, M.M.; MEIER, M.J.; FELIX, J.V.C.; POTT, F.S.; PETZ, F.F.C;
SANTOS,
M.C. Hyaluronic acid covers in burn treatment: a systematic review. **Rev Esc
Enferm USP**. v.50 n.3 p.519-524, 2016. DOI:http://dx.doi.org/10. 1590/S0080-
623420160000 400020

KIM, J.; SYKES, J. Hyaluronic Acid Fillers: History and Overview. **Facial
Plastic Surgery**. v.27 n.6, p.523–528, 2013. doi:10.1055/s-0031-1298785

MOHAMMADPOUR, M.; BEHJATI, M.; SADEGHI, A.; FASSIHI, A. Wound healing
by
topical application of antioxidant iron chelators: kojic acid and deferiprone. **Int
Wound J**. v.10 n.3 p.260-4, 2013. doi: 10.1111/j.1742-481 X.2012.00971

RODRIGUES HG, VINOLO MAR, SATO FT, MAGDALON J, KUHL CMC,
YAMAGATA
AS, et al. Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel
Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. **PLoS ONE**.
v.11 n.10, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0165115

STECOVÁ, J.; MEHNERT. W.; BLASCHKE, T. et al. Cyproterone acetate
loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterisation
and skin uptake. **Pharm Res**. V.24 n.5 p.991-1000, 2007.

ZINDER, R. COOLEY, R.; VALD, L.G.; MOLNAR, J.A. Vitamin A and wound
healing.
Nutrition in Clinical Practice. n.6, p.839–849, 2019. DOI: 10.1002/ncp.10420

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T.K. Piper nigrum and Peperine: An
update. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**. **Phytother. Res**. v,27
p.1121–1130, 2013.

FERREIRA, C.N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação
baseado nas superfícies celulares e suas implicações **Rev Bras Hematol
Hemoter**. v. 32 n.5 p.416-421, 2010. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n5/en_aop_101010.pdf>.

LUI, P.P. et al. Ectopic chondro-ossification and erroneous extracellular
matrix deposition in a tendon window injury model. **J Orthop Res**. v. 30
p.37-46, 2012. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.21495>>.

PÓVOA, G.; DINIZ, L. M. O Sistema do Hormônio de Crescimento: interações

com a pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia [online]**. v. 86, n. 6 p. 1159-1165, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600015>>.

ZOMER, H.D; TRENTIN, A.G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **J Dermatol Sci**. v.90 n.1 p.3-12, 2018. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.12.009

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia [online]**. v. 84, n. 3 p. 257-262, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300007>>.

XIAO, J. *et al.* eNOS se correlaciona com a biogênese mitocondrial em corações com cardiopatia congênita e cianose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia [online]**. v. 99, n. 3, p. 780-788, 2012.. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2012005000072>>.

SOLANO, F.; BRIGANTI S.; PICARDO, M.; GHANEM, G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Res**. v.19 n.6 p.550-571, 2006. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x

KELLY, D.P.; SCARPULLA, R.C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes Dev**. v.18 n.4 p.357-368, 2004. doi:10.1101/gad.1177604

LEE, G.Y.; PARK, K.G. *et al.* Effects of *Panax ginseng* extract on human dermal fibroblast proliferation and collagen synthesis. **Int Wound J**, v.13 p.42-46, 2016. <https://doi.org/10.1111/iwj.12530>

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur J Pharm Biopharm**. v.56 n.3 p.501-505, 2003.. doi:10.1016/s0939-6411(03)00139-5

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**. v.47 n.2-3 p.165-196, 2001. doi:10.1016/s0169-409x(01)00105-3

MÜLLER, R.H.; RUNGE, S.A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, A.F.; MEHNERT, W.; SOUTO, E.B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur J Pharm Biopharm**. v.68 n.3 p.535-544, 2008. doi:10.1016/j.ejpb.2007.07.006

CHOUDHURY, H.; PANDEY, M.; LIM, Y.Q. *et al.* Silver nanoparticles: Advanced and promising technology in diabetic wound therapy. **Materials Science & engineering. C, Materials for Biological Applications**. n. 112,

2020.

DOI:10.1016/j.msec.2020.110925.

MORA-HUERTAS, C.E. et al. Polymer-Based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v.385 n.1-2 p.113-142, 2009.

NEUMAN, M.G.; NANAU, R.M.; SANCHEZ, L.O.; COTO, G. Hyaluronic Acid and Wound Healing. **J Pharm Pharm Sci**. v.18 n.1 p.53 - 60, 2015.

YI, J.; LUO, J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. **Biochim Biophys Acta**. v.1804 n.8 p.1684-1689, 2010. doi:10.1016/j.bbapap.2010.05.002

BEEGUM, F. et al. Sirtuins as therapeutic targets for improving delayed wound healing in diabetes. **Journal of Drug Targeting**. v.30 n.9 p.911-926, 2022. DOI: 10.1080/1061186X.2022.2085729

XIE J.; WU, X.; ZHENG, S. et al. Aligned electrospun poly(L-lactide) nanofibers facilitate wound healing by inhibiting macrophage M1 polarization via the JAK-STAT and NF- κ B pathways. **J Nanobiotechnol**. v.20 p. 342, 2022. DOI: 10.1186/s12951-022-01549-9

National Centre for Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research. The Mouse Grimace Scale, 2019. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-mouse>.

ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Anti-inflammatory, wound healing and in-vivo antioxidant properties of the leaves of Ficus amplissima Smith. **J Ethnopharmacol**. v.145 n. 1 p.139–45, 2013. doi: 10.1016/j.jep.2012.10.041.

MISHRA, M.; TIWARI, S.; GOMES, A.V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. **Expert Rev Proteomics**. v.14 n.11 p.1037-1053, 2017. doi:10.1080/14789450.2017.1388167

LEWIŃSKA, A. et al. Targeted Hybrid Nanocarriers as a System Enhancing the Skin Structure. **Molecules**. v.26 n.4 p.1063, 2021. DOI:10.3390/molecules260410639

8. Anexo 1



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A atuação de nanocarreadores contendo derivados naturais na cicatrização de lesões induzidas em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 1285201021 (ID 002102), sob a responsabilidade de **Wagner Luis Reis e equipe; Ana Flávia Marçal Pessoa; Bruna Karla do Amaral** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 16/05/2022.

We certify that the proposal "The role of nanocarriers containing natural compounds in wound healing induced in mice", utilizing 84 Heterogenics mice (84 males), protocol number CEUA 1285201021 (ID 002102), under the responsibility of **Wagner Luis Reis and team; Ana Flávia Marçal Pessoa; Bruna Karla do Amaral** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/16/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 05/2022 a 04/2023

Área: Ciências Fisiológicas

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **84**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: O projeto será desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da dor e inflamação (LANDI), no Departamento de Ciências Biológicas da UFSC.

Florianópolis, 16 de maio de 2022

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina