UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MORGANA FRANCISCO MACHADO GUZZATTI

AVALIAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA COM CURCUMINA (Curcuma longa L.) OU AÇAÍ (Euterpe oleracea) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDA PALATINA EM RATOS WISTAR

CRICIÚMA
2022

MORGANA FRANCISCO MACHADO GUZZATTI

AVALIAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA COM CURCUMINA (Curcuma longa L.) OU AÇAÍ (Euterpe oleracea) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDA PALATINA EM RATOS WISTAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira.

CRICIÚMA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G993a Guzzatti, Morgana Francisco Machado.
Avaliação da síntese verde de nanopartículas de ouro e prata com curcumina (Curcuma longa L.) ou açaí (Euterpe oleracea) no reparo tecidual de ferida palatina em ratos Wistar / Morgana Francisco Machado Guzzatti. – 2022.
63 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Cicatrização de feridas - Tratamento. 2. Nanopartículas de ouro – Uso terapêutico. 3. Nanopartículas de prata – Uso terapêutico. 4. Fotobiomodulação. 5. Curcumina – Uso terapêutico. 6. Açaí – Uso terapêutico. I. Título.

CDD 23. ed. 617.1406

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

FOLHA INFORMATIVA

A Tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver com adaptações descritas na Resolução n. 7/2015 do Colegiado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Dedico este trabalho aos presentes que recebi de Deus nessa vida: Monique, João Antônio e Thiago Guzzatti. Vocês me impulsionam e ensinam que a curiosidade e inquietação fazem a nossa jornada ser ainda mais enriquecedora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me olhar “tão de pertinho”. Graças à Ele minha vida é repleta de “insights” importantes que me conduzem por caminhos tão significativos. Minha amiga Lilian Búrigo Jacinto Silveira representa um desses “insights”, me aproximando da Fisiopatologia Experimental, assim como Viviane Machado que despropositadamente apresentou ao laboratório o quanto o açaí, produto por ela comercializado, poderia ser caracterizado e aplicado de forma antioxidante.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira por todo o aprendizado e vivência. Você representa humildade, força, competência e amor pela ciência. É o construtor de uma bela família de pesquisadores que seguem importantes convicções para o futuro da saúde. Obrigada pela chance e por considerar nossa proposta na área Odontológica.

Aos meus colegas do Grupo de Proteção e Reparo Tecidual. Grupo formado por pessoas inteligentes e fora do padrão. Vocês foram grandes parceiros. Em especial ao colega Gustavo de Bem Silveira, por toda a parceria nos experimentos diuturnamente, para você como diria Albert Einstein “Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me aproximo de Deus.” Às minhas colegas Laura Casagrande e Ligia Venturini por toda dedicação e esmero com as fotos e a histologia. Agradecimento particular também aos colegas Leandro Almeida, profa. Rubya Zaccaron, João Bittencourt, Germano Porto, profa Daniela Haupenthal, Camila Costa e Igor Ramos que acompanharam e participaram dos dias difíceis dos experimentos.

Um agradecimento especial ao meu colega de trabalho Renan Ceretta pelo incentivo quase que “imposto” para que não haja “zona de conforto”.

Aos meus pais Maria Monica e Dirnei Machado que são inspirações em minha vida e que acreditam e contemplam cada passo dado em minha trajetória mesmo que muito distante da tão sonhada e utópica “perfeição” por eles considerada.

Ao meu parceiro de vida, Thiago Guzzatti, por tornar tudo possível, apoiando e sustentando minhas escolhas sem as julgar. Te amo.

E um agradecimento excepcional à uma “menina mulher gênia” chamada Maria Eduarda. Graças ao seu empenho, conhecimento, parceria e dedicação esse trabalho foi possível. Sou sua fã.

“Quando você está estudando um assunto, ou considerando alguma filosofia, pergunte a si mesmo, somente. Quais são os fatos? E qual é a verdade que os fatos revelam? Nunca se deixe divergir pelo que você gostaria de acreditar, ou pelo que você acha que traria benefícios às crenças sociais se fosse acreditado. Olhe apenas e somente para quais são os fatos.” Bertrand Russell

RESUMO

Danos superficiais à pele e mucosa ocorrem com frequência por uma variedade de razões. Tem-se a necessidade de melhor compreensão nos processos fisiopatológicos das lesões da mucosa oral. Vários nanomateriais têm sido utilizados na odontologia, como as nanopartículas de ouro e prata, conhecidas por seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos etc. A síntese verde de nanopartículas metálicas tem despertado muito interesse devido à menor toxicidade e menor tempo de processamento. O objetivo deste trabalho é avaliar e comparar os efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) e prata (AgNPs) reduzidas pelo método de síntese verde com Curcumina (*Curcuma longa L.*) ou Açaí (*Euterpe oleracea*), a um tratamento padrão comercial do tipo farmacológico (Omcilon®) e a um agente eletrofísico (fotobiomodulação), em feridas palatinas de ratos Wistar. Foram utilizados 120 ratos Wistar que foram divididos em 2 grupos de 60 animais em cada, para que o experimento ocorresse em duas etapas e um desses grupos fosse tratado com nanopartículas de ouro e outro com nanopartículas de prata. Cada um dos 2 grupos foi então subdividido em cinco grupos de n=12, na primeira etapa: I. Lesão Palatina (LP) - sem tratamento local ou sistêmico; II. LP + Fotobiomodulação (FBM); III. LP + Omcilon®; IV. LP + GNPs-Cur (0,025mg/mL); V. LP + GNPs-Açaí (0,025mg/mL). Na segunda etapa: I. (LP); II. LP + FBM; III. LP + Omcilon®; VI. LP + AgNPs-Cur (0,125mg/mL); VII. LP + AgNPs-Açaí (0,125mg/mL). Os animais foram anestesiados com cetamina 100 mg/kg e xilazina 0,5 mg/kg via intraperitoneal e lesões circulares na mucosa palatina foram induzidas utilizando um *punch* de 4mm de diâmetro. A primeira sessão de tratamento iniciou 24h após a lesão e o gel preparado foi colocado nas lesões dos seus respectivos grupos, durante 5 dias. Foi realizada análise macroscópica e escore inflamatório, além da análise do tamanho das feridas. Após 24h da última aplicação foi realizada a eutanásia dos animais e a retirada do tecido da mucosa palatina para análise histológicas, bioquímicas e moleculares. Observa-se que GNPs-Açaí e AgNPs-Cur foram capazes de reduzir significativamente as citocinas pró-inflamatórias e aumentar as anti-inflamatórias, reduzir os marcadores oxidantes, reduzir o infiltrado inflamatório, aumentar a área de colágeno e aumentar a taxa de contração da ferida. Foi possível observar pela análise macroscópica que as GNPs-Açaí tiveram uma qualificação visual melhorada, com aparente redução do tamanho da ferida e do grau de inflamação e formação de tecido necrótico. O presente estudo demonstrou que as terapias propostas de GNPs e AgNPs sintetizadas de forma verde e podendo assim associar seus efeitos com os das plantas, favorecem o processo de reparo tecidual em ferida oral da mucosa palatina.

Palavras chave: mucosa palatina; inflamação; nanopartículas de ouro; nanopartículas de prata; fotobiomodulação; curcumina; açaí; cicatrização.

ABSTRACT

Superficial damage to the skin and mucosa frequently occurs for a variety of reasons. There is a need for a better understanding of the pathophysiological processes of oral mucosa lesions. Several nanomaterials have been used in dentistry, such as gold and silver nanoparticles, known for their anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects, etc. The green synthesis of metallic nanoparticles has aroused much interest due to lower toxicity and shorter processing time. The objective of this work is to evaluate and compare the effects of treatment with gold (GNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles reduced by the green synthesis method with Curcumin (*Curcuma longa L.*) or Acai (*Euterpe oleracea*) in palatine wounds in rats Wistar, to a standard commercial pharmacological treatment (Omcilon®) and to an electrophysical agent (photobiomodulation). 120 Wistar rats were used and divided into 2 groups of 60 animals each so that the experiment took place in two stages and one of these groups was treated with gold nanoparticles and the other with silver nanoparticles. Each of the 2 groups was then subdivided into five groups of n=12, in the first stage: I. Palatine Lesion (PL) - without local or systemic treatment; II. PL + Photobiomodulation (PBM); III. PL + Omcilon®; IV. PL + GNPs-Cur (0.025mg/mL); V. PL + GNPs-Açai (0.025mg/mL). In the second stage: I. (PL); II. PL + PBM; III. PL + Omcilon®; IV. PL + AgNPs-Cur (0.125mg/mL); VII. PL + AgNPs-Acai (0.125mg/mL). The animals were anesthetized with ketamine 100 mg/kg and xylazine 0.5 mg/kg intraperitoneally and circular lesions in the palatine mucosa were induced using a 4mm diameter punch. The first treatment session started 24h after the injury and the prepared gel was placed in the lesions of their respective groups, for 5 days. Macroscopic analysis and inflammatory score were performed, in addition to the analysis of the size of the wounds. After 24 hours of the last application, the animals were euthanized and the palatine mucosa tissue was removed for histological, biochemical, and molecular analysis. It was observed that GNPs-Acai and AgNPs-Cur were able to significantly reduce pro-inflammatory cytokines and increase anti-inflammatory ones, reduce oxidant markers, reduce inflammatory infiltrate, increase collagen area, and increase wound contraction rate. It was possible to observe through the macroscopic analysis that the GNPs-Açai had an improved visual qualification, with an apparent reduction in the size of the wound and the degree of inflammation and formation of necrotic tissue. The present study demonstrated that the proposed therapies of GNPs and AgNPs synthesized in a green way and thus being able to associate their effects with those of the plants, favor the tissue repair process in oral wounds of the palatine mucosa.

Keywords: palatine mucosa; inflammation; gold nanoparticles; silver nanoparticles; photobiomodulation; curcumin; açaí; wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. fase proliferativa - organização do trombo, secreção de fatores de crescimento, síntese de colágeno III e início da angiogênese..... 16
Figura 2. Plantas medicinais, sais metálicos, síntese verde e suas aplicações biomédicas..... 22
Figura 3: Punch dermatológico de aço inox (marca Rhosse®) com 4 mm de diâmetro..... 27
Figura 4: Fotografia da Mucosa palatina (a) e ilustração do modelo de ferida palatina no rato Wistar (b) 27
Figura 5: Desenho experimental..... 28
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão das diferentes nanopartículas obtidas. (a) GNPs com curcumina; (b) GNPs com açaí..... 32
Figura 7. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre a taxa de contração da ferida em %..... 33
Figura 8. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre a análise histológica, em que A) coloração com H&E; B) média do nº de células inflamatórias; C) coloração com tricômio de Gomori; D) % da área de colágeno..... 34
Figura 9. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias..... 35
Figura 10. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre os níveis de oxidantes e antioxidantes..... 36
Figura 11. Microscopia Eletrônica de Transmissão das diferentes nanopartículas obtidas. (a) AgNPs com curcumina; (b) AgNPs com açaí..... 37
Figura 12. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre a taxa de contração da ferida..... 38
Figura 13. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre a análise histológica, em que A) coloração com H&E; B) média do nº de células inflamatórias; C) coloração com tricômio de Gomori; D) % da área de colágeno..... 39
Figura 14. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias..... 40
Figura 15. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre os níveis de oxidantes e antioxidantes..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de tamanho médias e potencial zeta das diferentes nanopartículas..... 32
Tabela 2. Escore Inflamatório Macroscópico 33
Tabela 3. Distribuição de tamanho médias e potencial zeta das diferentes nanopartículas..... 37
Tabela 4. Escore Inflamatório Macroscópico 37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α-SMA - α-actina de músculo liso

AgNPs – Nanopartículas de Prata

BSA - Albumina Sérica Bovina (do inglês, B*ovine serum albumin*)

DCFH-DA - Diclorofluoresceína

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GNPs - Nanopartículas de Ouro (do inglês, G*old nanoparticles*)

GPx - Glutationa Peroxidase

GSH - Glutationa

H2O2 - peróxido de hidrogênio

IFN-γ - Interferon-gama

IL-10 - Interleucina 10

IL1-β - Interleucina 1β

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

KEAP1 - Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (do inglês, *Kelch like ECH associated protein 1)*

MDA - Malondialdeído

MEC - Matriz Extracelular

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*)

NFκB - Fator nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*)

NRF2 - Fator nuclear derivado de eritróide 2 (do inglês, *Nuclear factor erythroid 2–related factor 2*)

NaNO2 - Nitrito de sódio

NLC - Carreador Lipídico Nanoestruturado

NO - Óxido Nítrico

SCTG - Enxerto de Tecido Conjuntivo Subepitelial

SOD - Superóxido Dismutase

TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor*)

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral α (do inglês, *Tumor necrosis factor*)

VEGF - Fator De Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1 LESÃO TECIDUAL EM MUCOSA ORAL PALATINA 14
1.2 INFLAMAÇÃO E REPARO TECIDUAL 15
1.2.1 Estresse Oxidativo na Lesão Palatina 17
1.3 NANOTECNOLOGIA E SÍNTESE VERDE 18
1.4 JUSTIFICATIVA 24
2. OBJETIVOS 25
2.1 OBJETIVO GERAL 25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
3. METODOLOGIA 26
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS 26
3.2 ANIMAIS 26
3.3 MODELO DE LESÃO PALATINA 27
3.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA 27
3.5 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS 28
3.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA E ESCORE INFLAMATÓRIO 29
3.7 EUTANÁSIA 29
3.8 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS 29
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA 29
3.10 ENSAIOS BIOQUÍMICOS 30
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA 30
4. RESULTADOS 32
4.1 PRIMEIRA ETAPA - GNPs 32
4.1.1 Análise Macroscópica e Escore Inflamatório 32
4.1.2 Contração da Ferida 33
4.1.3 Análise Histológica 33
4.1.4 Citocinas Pró e Anti-Inflamatórias 34
4.1.5 Níveis de Oxidantes e Antioxidantes 35
4.2 SEGUNDA ETAPA – AgNPs 36
4.2.1 Análise Macroscópica e Escore Inflamatório 36
4.2.2 Contração da Ferida 37
4.2.3 Análise Histológica 38
4.2.4 Citocinas Pró e Anti-inflamatórias 39
4.2.5 Níveis de Oxidantes e Antioxidantes 40
5. DISCUSSÃO 42
6. CONCLUSÃO 50
REFERÊNCIAS 51
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA 61
ANEXO B – DIRETRIZES ARRIVE 2.0 63

1. INTRODUÇÃO

1.1 LESÃO TECIDUAL EM MUCOSA ORAL PALATINA

A integridade da mucosa oral é importante na prevenção de infecções (Leoni et al., 2015). As úlceras orais constituem um tipo de lesão que possui elevado índice de prevalência na mucosa oral. Esses tipos de lesões, na maioria das vezes, possuem aparência clínica similar, no entanto, a sua etiopatogenia pode ser variada. A etiologia pode ser local através de irritação mecânica, reações adversas a fármacos ou representar uma manifestação de diversas patologias sistémicas, tais como doenças mucocutâneas, gastrointestinais, infeciosas, imunológicas e neoplásicas. A história clínica, o exame físico e o resultado de exames complementares são importantes para o processo de diagnóstico. A informação relativa aos fatores iniciantes, fatores de agravamento, fatores de alívio, assim como frequência das lesões é importante. A doença oral possui um efeito negativo sobre o bem-estar do paciente e sobre a sua qualidade de vida (Scully e Felix, 2005). O nível de desconforto provocado pela presença de úlceras na cavidade oral é variável, uma vez que os pacientes possuem diferentes reações à ulceração oral. A dimensão de uma úlcera não é proporcional ao grau de desconforto desencadeado pela lesão, sendo ela provocada (como nos casos de remoção do enxerto epitelial do palato) ou não (Bruce e Rogers, 2003).

Por muitos anos o tratamento de retrações gengivais tem sido um desafio para os clínicos (Cueva et al., 2004). O tratamento de retrações gengivais é realizado por procedimentos cirúrgicos, os quais são a primeira opção de escolha para o tratamento desse problema, sendo indicados não apenas por questões estéticas, mas também devido à hipersensibilidade dentinária e à possibilidade de ocorrência de lesões cariosas. Na tentativa de aumentar a previsibilidade dos procedimentos de recobrimento radicular, o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (SCTG) tem sido utilizado (McGuire e Scheyer, 2010). No entanto, a remoção do SCTG gera a necessidade de uma segunda área cirúrgica (geralmente a área de escolha é o palato duro), aumentando o tempo cirúrgico, o custo do tratamento e a morbidade. A evolução das técnicas de remoção do SCTG diminui o desconforto do paciente, mas não exclui a necessidade de uma segunda área cirúrgica (Sanz et al., 2009).

Os odontólogos, em geral periodontistas e implantodontistas, costumam usar a mucosa palatina como fonte doadora de enxertos gengivais livres devido as suas vantagens anatômicas, espessura de tecido ideal e por ser considerado como “padrão-ouro” devido sua alta previsibilidade. No entanto, em virtude da formação “proposital” de uma úlcera, já que se torna inviável o encontro das bordas da ferida estimulada, complicações pós-operatórias, como sangramento persistente, dor, parestesia e desconforto, são comumente relatados após um procedimento de enxerto gengival livre.

Diferentes tratamentos têm sido testados com o intuito de evitar tais complicações e minimizar o desconforto do paciente, porém até o momento sem um sucesso absoluto. Aumentar a velocidade da cicatrização de feridas pode reduzir a possibilidade de infecção minimizando desconforto após cirurgias periodontais (Sezgin et al., 2019).

A experiência clínica e a pesquisa melhoraram a compreensão da cicatrização de feridas, o que, por sua vez, permitiu que profissionais de saúde prosperassem no processo cicatricial de feridas e os fabricantes desenvolvessem curativos modernos (Pallaske et al., 2018).

1.2 INFLAMAÇÃO E REPARO TECIDUAL

Danos superficiais à pele e mucosa ocorrem com frequência por uma variedade de razões. O processo de cicatrização de feridas, no qual a barreira cutânea se recupera e fecha após a lesão, é tradicionalmente descrito como ocorrendo em três fases sequenciais: inflamação, proliferação e remodelação (Reinke et al., 2012).

A primeira etapa da cicatrização aguda da ferida é dedicada à hemostasia e à formação de uma matriz provisória da ferida, que ocorre imediatamente após a lesão e se completa após algumas horas. Nesta fase se dá o início ao processo inflamatório. A homeostase tecidual acontece através da infiltração de neutrófilos e macrófagos que estão diretamente ligados à formação do tecido e pela liberação de fatores de crescimento e citocinas (Corrêa et al., 2020). A fase inflamatória da cascata de cicatrização de feridas é ativada durante a fase de coagulação e pode ser dividida em uma fase inicial com recrutamento de neutrófilos e uma fase tardia com o aparecimento e transformação de monócitos (Reinke et al., 2012). Na inflamação, o primeiro estágio da cicatrização da ferida, segue a hemostasia inicial e é essencial para o recrutamento do sistema imunológico inato, que ajuda a defender o corpo de patógenos invasores e remover o tecido morto (Baron et al., 2020).

Durante o estágio de proliferação, a superfície da ferida se recupera por meio de reepitelização, síntese de colágeno, formação de matriz extracelular (MEC) e restauração da rede vascular. Nessa fase, o foco principal do processo de cicatrização está na recuperação da superfície da ferida, na formação do tecido de granulação e na restauração da rede vascular. Portanto, próximo à migração de fibroblastos locais ao longo da rede de fibrina e ao início da reepitelização das bordas da ferida, a neovascularização e a angiogênese são ativadas por neoformação capilar (Reinke et al., 2012). A fase de proliferação envolve quatro estágios essenciais: angiogênese, epitelização, deposição de colágeno e formação de tecido de granulação (Lawrence, 1998).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral α (TNFα, do inglês *Tumor necrosis factor*) e se distingue por uma migração de células endoteliais e um desenvolvimento capilar, essenciais para uma cicatrização adequada. Sob o controle de citocinas reguladoras como interferon gama (IFN-γ, do inglês *Interferon gamma*) e fator de transformação do crescimento beta (TGF-β, do inglês *Transforming growth factor*), a síntese de colágeno, fibronectina e outras substâncias básicas necessárias para a cicatrização de feridas pelos fibroblastos representa a base para a nova matriz de tecido conjuntivo, servindo para o fechamento de lacunas teciduais e a restauração da resistência mecânica da ferida. Na fase posterior de proliferação, o tecido de granulação é formado na superfície da ferida por meio da interação entre fibroblastos, células inflamatórias e células epiteliais (Gao et al., 2019).

A remodelação da MEC começa após a formação dos tecidos de granulação e resulta na reorganização do tecido conjuntivo. O colágeno tipo III, que é produzido principalmente na fase de proliferação, desempenha um papel fundamental na fibrilogênese (o desenvolvimento de fibrilas de colágeno no tecido conjuntivo) e na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno (Liu et al., 1997; Gao et al., 2019). A síntese de colágeno aumenta em toda a ferida, enquanto a proliferação de fibroblastos declina sucessivamente, ajustando um equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC. A formação do tecido de granulação cessa com a apoptose das células (Reinke et al., 2012). A Figura 1 adaptada

de Reinke et al. (2012) demonstra esquematicamente a fase proliferativa, organização do trombo, secreção de fatores de crescimento, síntese de colágeno III e início da angiogênese.

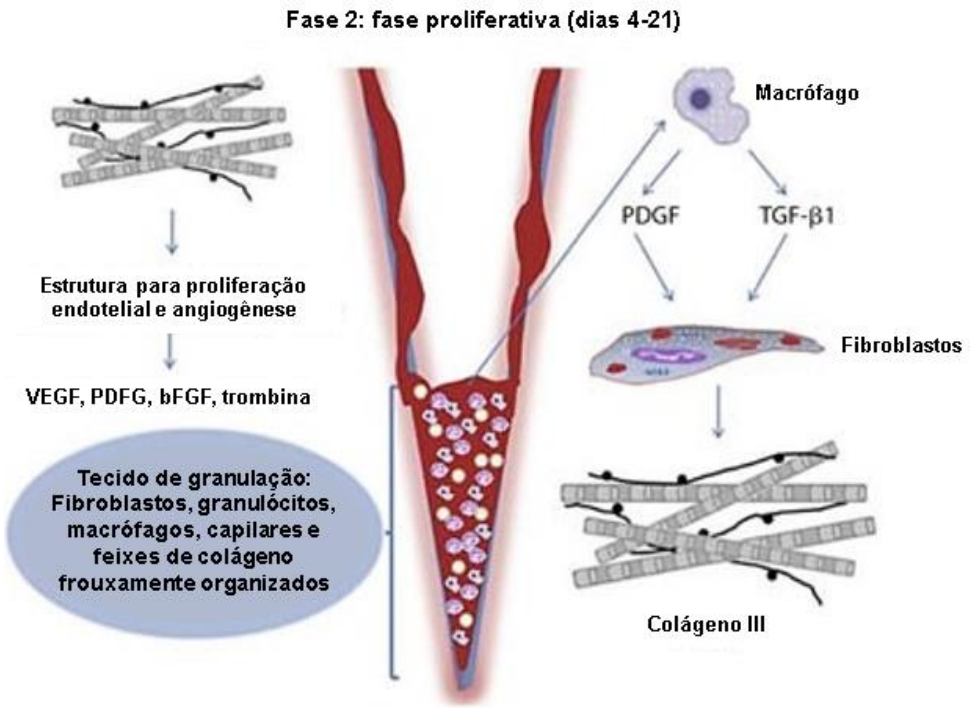

Figura 1. Fase proliferativa - organização do trombo, secreção de fatores de crescimento, síntese de colágeno III e início da angiogênese (Fonte: Reinke et al., 2012)

Na terceira e última fase de remodelação, os processos regenerativos diminuem e são substituídos pela reorganização do tecido conjuntivo e o início da resposta contrátil. A interrupção desses processos fisiológicos pode resultar na formação de feridas complexas com distúrbio de cicatrização, falha ou atraso no fechamento da ferida (Reinke et al., 2012; Baron et al., 2020). Como células pró-inflamatórias dominantes durante os estágios iniciais da cicatrização da ferida, os neutrófilos e macrófagos M1 regulam as respostas de defesa local e sistêmica à ferida. Quando a fase de inflamação está completa, os neutrófilos passam por apoptose e tornam-se fagocitados pelos macrófagos M1, também fagocitando detritos e restos bacterianos no local lesado (Krzyszczyk et al., 2019). A transformação de macrófagos M1 para M2 desempenha um papel fundamental na progressão da cicatrização da fase inflamatória para a proliferativa. Os macrófagos M2 facilitam a produção de mediadores anti-inflamatórios, o início da proliferação de fibroblastos e a angiogênese (Corrêa et al., 2020).

A ulceração oral constitui uma perda de continuidade do epitélio oral que tipicamente expõe terminações nervosas da lâmina própria, resultando, na maioria das vezes, em sintomatologia dolorosa. Neste sentido, uma úlcera é uma lesão que se forma através da perda de conteúdo pertencente ao epitélio e ao tecido conjuntivo subjacente (Scully e Felix, 2005). As feridas da mucosa oral cicatrizam de forma acelerada, com cicatrizes mínimas em comparação com as feridas cutâneas. As diferenças no resultado da cicatrização entre a mucosa oral e a pele podem ser devido às diferenças fenotípicas entre as respectivas populações de fibroblastos, que na cavidade oral são comparadas ao epitélio fetal (Shannon et al., 2006). De acordo com um estudo realizado por Mak et al. (2009) em um modelo de animais, utilizando porcos, as feridas da mucosa oral exibiram uma cicatriz clínica e histológica

significativamente menor do que as feridas da pele. Segundo os autores a resolução precoce da reação inflamatória e a redução da contração da ferida podem promover a cicatrização de feridas na mucosa oral sem cicatrizes. Além disso, a formação de cicatrizes provavelmente depende não apenas do número de miofibroblastos, mas também do ambiente extracelular que regula sua função (Mak et al., 2009).

1.2.1 Estresse Oxidativo na Lesão Palatina

A fase inflamatória precipitada pela lesão é seguida sequencialmente pelas fases de proliferação e remodelação tecidual. Múltiplas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, além das espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuem para o sucesso do reparo de feridas.

As EROs são, em sua maioria, radicais livres derivados do oxigênio, que em muitas circunstâncias, estão envolvidos na causa da lesão celular. Estas causam lesão celular através de três principais reações: peroxidação lipídica das membranas, ligação cruzada e outras alterações das proteínas e lesões do DNA. EROs são produzidas por todas as células durante o curso normal dos processos metabólicos, por exemplo na cadeia respiratória, particularmente grandes quantidades pela NADPH oxidase, um complexo enzimático que é expresso em níveis elevados por células inflamatórias e é produzido no tecido ferido e inflamado. Este fenômeno foi descrito como o “estouro respiratório”. Após a ativação da NADPH oxidase, as células produzem o ânion, radical superóxido altamente reativo. Este último é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio (H^2O^2) e água, e este processo é intensificado por vários superóxidos dismutantes. Embora H^2O^2 não seja um radical, pode causar graves danos devido à geração de radicais hidroxila na presença de íons de ferro ou cobre (reação de Fenton). Radicais hidroxila são altamente reativos, resultando na oxidação de macromoléculas celulares. Além de enzimas desintoxicantes de EROs, a defesa é alcançada por uma variedade de antioxidantes de baixo peso molecular exógenos e endógenos. Se a desintoxicação de EROs for insuficiente ou se estas são produzidas em quantidades excessivas, ocorre o estresse oxidativo, resultando em dano celular severo, envelhecimento prematuro ou mesmo transformação celular neoplásica (Sies, 1991; Schäfer e Werner, 2008).

Durante a inflamação induzida pela ferida, as EROs e as citocinas inflamatórias são liberadas pelas células do sistema imunológico para combater os microorganismos (Kumar et al., 2013). As EROs em baixos níveis desempenham um papel fundamental na resposta normal de cicatrização de feridas. Elas agem como mensageiros secundários para recrutar muitos imunócitos e células não linfóides para o local da ferida e promover a reparação do tecido (Fan et al., 2019; Roy et al., 2006). Essas moléculas são produzidas normalmente, e para evitar seus efeitos lesivos, suas concentrações intracelulares são reguladas nas células saudáveis (Kumar et al., 2013).

Apesar de baixas concentrações de EROs estarem envolvidas em numerosas vias de sinalização celular e em muitas reações fisiológicas, seu papel na lesão celular e destruição de microorganismos é bastante significativo. A elevação gradual da inflamação pode levar a um estresse oxidativo associado à degeneração tecidual e à perda das funções biológicas do colágeno, levando a alterações nas membranas celulares (Corrêa et al., 2020). EROs elevadas e sustentadas foram detectadas *in vivo* e foram associadas ao comprometimento do reparo de feridas em feridas crônicas

que não cicatrizam. O excesso de EROs pode degradar direta ou indiretamente as proteínas da matriz extracelular por meio da ativação da proteólise (Fan et al., 2019).

Uma grande percentagem da população sofre de anomalias na cicatrização de feridas, em particular indivíduos idosos, doentes com diabetes e aqueles tratados com medicamentos imunossupressores, quimio ou radioterapia. Os mecanismos subjacentes à resposta de cura prejudicada ainda são pouco compreendidos. Estudos recentes forneceram fortes evidências de um papel do estresse oxidativo na patogênese das úlceras que não cicatrizam (Schäfer e Werner, 2008). Essas moléculas causadoras do estresse oxidativo também são conhecidas por serem um fator significativo na etiologia do dano tecidual local. Há evidências de que o estresse oxidativo é um fator importante que contribui para as condições inflamatórias, como a estomatite aftosa recorrente (“afta”), que causa uma ferida na mucosa oral sem causa subjacente bem estabelecida (Kumar et al., 2013). A produção de EROs no processo inflamatório leva a uma inflamação acentuada, durante a qual é observada a secreção de vários quimioatraentes (Tamaki et al., 2016).

Vários antioxidantes de baixo peso molecular foram sugeridos para regular o “ambiente redox” na cicatrização de feridas na pele. Esses vários antioxidantes incluem moléculas endógenas, como glutationa, ubiquinonas, ácido úrico e ácido lipóico, mas também compostos presentes nos alimentos, tais como vitaminas E e C (ácido ascórbico), carotinóides e compostos fenólicos. O aumento do nível de antioxidantes de baixo peso pode ser uma estratégia para melhorar o processo de reparo de feridas (Schäfer e Werner, 2008).

Portanto, é de suma importância identificar e caracterizar funcionalmente os fatores envolvidos na geração e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. Isso fornecerá a base para o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção terapêutica (Schäfer e Werner, 2008). A manipulação de EROs apresenta um caminho promissor para acelerar a cicatrização de feridas quando elas estão tardias (Fan et al., 2019).

Esses achados reforçam a necessidade de melhor compreensão nos processos fisiopatológicos das lesões da mucosa oral, em especial da mucosa palatina, com o propósito de restabelecer o tecido danificado com refinamento e eficiência.

1.3 NANOTECNOLOGIA E SÍNTESE VERDE

Nanotecnologia é um sistema funcional de engenharia que regula diferentes átomos com o propósito de dispor da estrutura da matéria com novas propriedades e utilidades (Singh et al., 2020).

A nanotecnologia se expandiu rapidamente em todas as áreas da ciência, oferecendo alternativas significativas para resoluções de problemas científicos e médicos. Na odontologia, a nanotecnologia tem sido explorada substancialmente no desenvolvimento de materiais restauradores, além de áreas desafiadoras como controle do biofilme oral e neoplasias. Os avanços em “nanodentística” e inovações em diagnósticos relacionados à saúde bucal, prevenção e métodos terapêuticos necessários para manter e obter uma saúde bucal perfeita, têm sido exibidos. Os recentes progressos na nanotecnologia podem trazer uma mudança de paradigma na área odontológica (Abou et al., 2015).

Entre os nanomateriais, as nanopartículas (NPs) metálicas têm sido considerados para aplicação clínica, devido ao seu baixo custo, alta relação superfície-volume, alta estabilidade e segurança.

Aplicações importantes da nanotecnologia estão sendo empregadas na área da saúde e o conhecimento básico da interação de nanomateriais com células e suas consequências biológicas está começando a evoluir (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Arvizo et al., 2012).

Por possuírem propriedades excepcionais e apresentarem maior relação área superficial / volume, formato em bastão ou esférico etc., as NPs encontram aplicações em diversos campos da odontologia. NPs metálicas como ouro, prata, paládio, platina etc. têm sido amplamente utilizadas devido às suas propriedades mecânicas, químicas e ópticas (Kesharwani et al., 2019; Krishnaraj et al., 2014). As nanopartículas de ouro (GNPs) encontram muitas aplicações para uso terapêutico em drogas de detecção biológica e entrega de proteínas, genes e fármacos. Essas NPs possuem propriedades distintas e estão sendo usadas nas áreas da odontologia restauradora, periodontologia, implantes dentários, engenharia de tecidos e diagnóstico de câncer (Upadhyay et al., 2020).

Vários nanomateriais têm sido utilizados na odontologia para superar as falhas do tratamento relacionadas às patologias orais (Bapat et al., 2019). Nanopartículas de prata, sílica e zinco são ligados a adesivos e resinas compostas para prevenir a formação de biofilme nas margens restauradoras e melhorar as propriedades mecânicas desses biomateriais (Zhang et al., 2013). Nanopartículas de fosfato de cálcio recarregáveis podem ser incorporadas em adesivos, resinas e compósitos para o tratamento de lesões de cárie, assim como nanopartículas de hidroxiapatita e fluoreto de cálcio são utilizadas em dentifrícios e enxaguatórios bucais com potencial de remineralização. Superfícies de implante dentário revestidas com nanopartículas mostram ação antibacteriana facilitando a regeneração óssea. Nanopartículas poliméricas e de quitosana têm sido usadas para liberação de clorexidina com efeitos antibacterianos. Estas nanopartículas também têm sido utilizadas como carreadores para tratamento de hipersensibilidade dental e regeneração periodontal (Dabbagh et al., 2014). A resistência à fratura da porcelana é aumentada pela adição de nanopartículas de platina e prata (Bapat et al., 2020).

As nanopartículas de prata (AgNPs), especificamente, exibem bioatividade muito alta e baixos níveis de citotoxicidade quando usadas individualmente ou quando combinadas com vários antibióticos para superar a resistência das bactérias a muitas drogas. Estas já tem sido aplicadas na detecção e diagnóstico de patógenos, cicatrização tópica de feridas, administração de medicamentos, revestimento de materiais e dispositivos, incluindo têxteis, alimentos e instrumentos e aplicações médicas. Devido à sua atividade antibacteriana, também são usadas em implantes cardiovasculares e dentários (Alahmad et al., 2022).

Os principais benefícios tecnológicos das nanopartículas usadas como veículos de droga são alta estabilidade, alta capacidade de transporte, a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas e a capacidade de administrar drogas por meio de uma variedade de vias, incluindo aplicação oral e inalação. Excelente condutividade elétrica, estabilidade química, características catalíticas e antibacterianas, bem como efeitos citotóxicos em células cancerígenas foram demonstrados em nanopartículas de prata. As AgNPs são superiores a outros materiais porque têm uma boa estrutura, são estáveis e têm uma área de superfície maior (Alsareii et al., 2022).

Vale ressaltar que a atividade antibacteriana promissora das AgNPs é atribuída à sua capacidade de destruir membranas celulares, causar danos intracelulares, alterar o material genético e causar estresse oxidativo na célula bacteriana. Devido ao seu tamanho, as nanopartículas têm uma

grande área de superfície que lhes permite aderir à parede celular, penetrar na célula e causar um distúrbio na permeabilidade da membrana, levando ao vazamento do conteúdo celular (Kambale et al., 2020; Khan et al., 2018; Siddiqi, Husen e Rao, 2018).

A vantagem de usar prata especificamente para cicatrização de feridas é que ela é eficaz contra bactérias multirresistentes e formadoras de biofilme. Foi demonstrado que as nanopartículas de prata pura foram capazes de tratar a inflamação através da modulação de citocinas e induzir a cicatrização de feridas com diminuição da formação de cicatrizes (Hamdan et al., 2017).

As nanopartículas de prata têm sido também reconhecidas como eliminadoras de EROs e podem diminuir a quantidade de radicais livres emergentes durante o estágio inflamatório da cicatrização de feridas. Para a modulação do processo cicatricial, diversos mediadores inflamatórios são produzidos dentro da área da ferida, de modo que o esclarecimento das citocinas pró e anti-inflamatórias é essencial para proteger o tecido recém-regenerado dos danos causados pelo desequilíbrio de citocinas, oxidantes e antioxidantes (El-Assar et al., 2020). No estudo de Rath et al. (2016) em que nanofibras de colágeno compostas de nanopartículas de prata foram utilizadas na cicatrização de feridas, a análise histológica mostrou uma produção acelerada de colágeno, reepitelização e contração melhorada da ferida. Esses resultados foram atribuídos às condições anti-inflamatórias e assépticas proporcionadas pelas nanopartículas de prata que levam à redução da infiltração de células reativas, o que favoreceu ainda mais a proliferação do tecido conjuntivo fibroso e a regeneração sequencial da camada de queratina.

Tian et al. (2007) ressaltam também que as AgNPs revestidas por síntese verde são ainda menores em tamanho, o que expõe os locais reativos e catalíticos a contra-ataques rápidos durante a inflamação, proliferação e remodelação. O tempo de cicatrização da área danificada depende do tamanho, dose e morfologia das nanopartículas de prata.

Já o ouro, tem natureza inerte, possui baixa toxicidade e tem sido também utilizado como medicamento. Como a prata, possui grandes propriedades bactericidas e bacteriostáticas. Nanopartículas a base de ouro exibem únicas propriedades eletrônicas e ópticas, bioestabilidade, baixa citotoxicidade e recursos aprimorados de entrega de medicamentos, que potencializam seu uso em diversos campos. As nanopartículas de ouro (GNPs) têm a capacidade de penetrar no estrato córneo, além de que sua propriedade de entrega de drogas as torna ideais como carreadores tanto para grandes biomoléculas quanto para moléculas de menores (Paiva-Santos et al., 2021).

O processo de regeneração do tecido lesado é dependente de uma resposta organizada e sequencial mediada por citocinas e fatores de crescimento que são liberados pelas fibras musculares, e envolve macrófagos, células inflamatórias e tecido conjuntivo, incluindo três fases distintas: degeneração, reparo e remodelação. Nesse cenário, a regulação da resposta inflamatória é crucial para a efetividade dos mecanismos de reparo. No entanto, quando a liberação de mediadores inflamatórios é estimulada, os tecidos adjacentes sofrem danos secundários pelo excesso de infiltração leucocitária e consequente estresse oxidativo, o que requer intervenção farmacológica para restaurar ou manter um ambiente celular ideal para a regeneração muscular. Nesse sentido, vários estudos recentes têm sugerido o uso de GNPs para controle inflamatório e redox (Pinho et al., 2022).

Os efeitos anti-inflamatórios das GNPs têm sido exibidos, atuando na inibição da formação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, mecanismo este que se deve à sua capacidade de suprimir

a ação do NF-κB, considerado o principal fator de transcrição responsável pela produção de citocinas em condições patológicas. Essas moléculas apresentam também forte atividade catalítica nos processos de eliminação de radicais livres e também podem aumentar os níveis de NRF2, um fator que causa a ativação do gene antioxidante. A conformação de Keap1 é alterada pelos efeitos de GNPs em suas ligações tiol, o que libera NRF2 para continuar a transcrição de genes citoprotetores (Wang, Chang e Wu, 2018).

Observou-se no estudo de Mendes et al. (2020) que a aplicação tópica de GNPs, em ratos, acelera significativamente os processos de cicatrização, realizando um fechamento da ferida quatro vezes mais rápido, um aumento significativo na expressão de colágeno e VEGF, além de citocinas (IL10 e IL4) e fatores de crescimento (FGF e TGF-β), sugerindo também que as nanopartículas de ouro são capazes também de gerar aumento da proliferação de fibroblastos, importante na contração de feridas.

Atualmente, a síntese de nanopartículas a partir de extratos de plantas está recebendo maior atenção devido ao comportamento favorável ao meio ambiente. O extrato de plantas funciona como agente redutor e agente de cobertura na síntese de nanopartículas. A síntese verde, como esta é chamada, é definida como a prática de elementos biologicamente amigáveis como plantas, bactérias e fungos para a síntese de nanopartículas. Essas abordagens verdes impressionantes estão livres das falhas das abordagens sintéticas convencionais. Uma delas é o bioorganismo no qual o extrato vegetal está sendo usado. É favorável ao meio ambiente, não tendo efeitos de toxicidade em comparação com métodos de redução química. As biomoléculas do extrato da planta, como aminoácidos, vitaminas, enzimas e proteínas, trabalham para reduzir a concentração de íons de metal (Asif et al., 2022).

As rotas físicas e químicas de síntese de nanopartículas são perigosas em comparação com os métodos biológicos (Alsareii et al., 2022). A escolha de um meio solvente, um agente redutor ecologicamente correto e uma substância não tóxica para estabilização de NPs são componentes importantes a serem considerados durante o processo de preparação da nanopartícula. As NPs derivadas de plantas superam as NPs derivadas de microorganismos, devido ao processo de fabricação não perigoso de etapa única do primeiro. O extrato da planta é combinado com uma solução de sal metálico na síntese verde de nanopartículas metálicas (Balkrishna et al., 2021; Kavitha et al., 2013; Akhtar, Panwar e Yun, 2013).

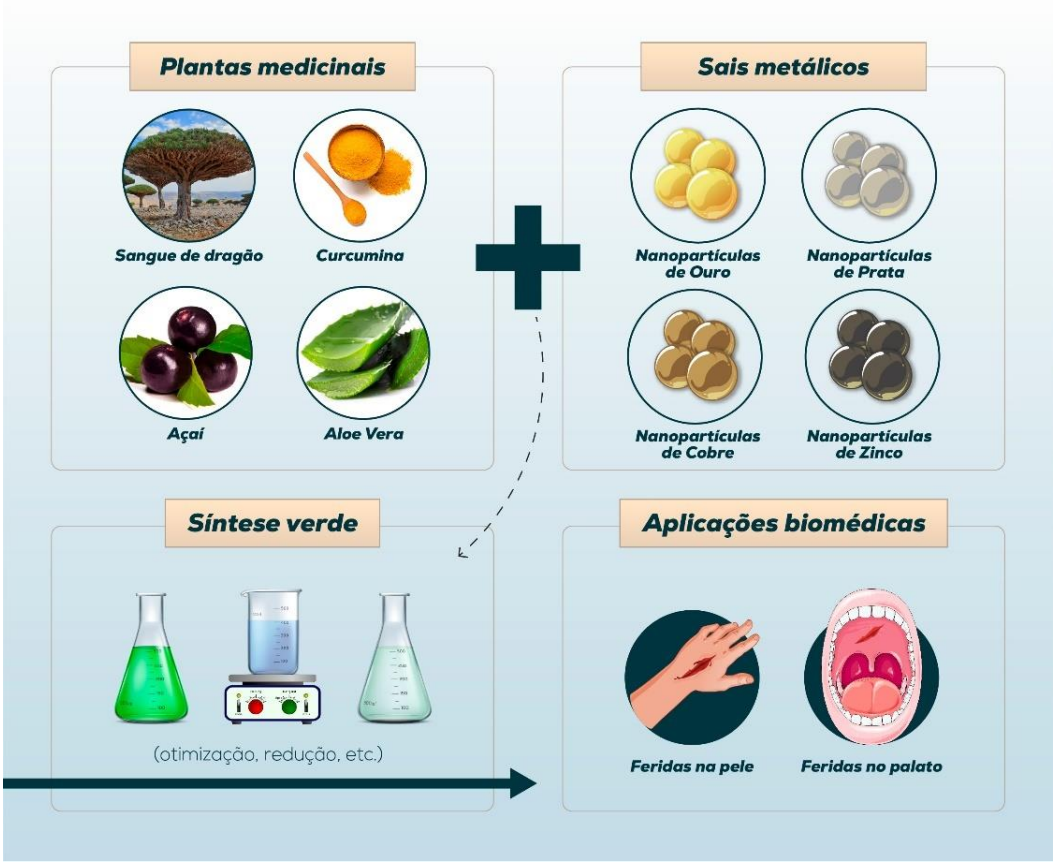

Figura 2. Plantas medicinais, sais metálicos, síntese verde e suas aplicações biomédicas

O desenvolvimento de NPs para entrega de medicamentos fitoterápicos apresenta uma série de vantagens, incluindo o aumento da solubilidade e atividade farmacológica, melhorando a estabilidade, sustentando a liberação do medicamento e protegendo o medicamento da degradação física e química (Buranasukhon et al., 2017).

Há uma variedade de tratamentos tópicos no mercado que são comumente usados para cicatrização de feridas, como pomadas antibióticas, agentes imunossupressores e antissépticos. No entanto, muitos deles têm efeitos colaterais, são caros ou ineficientes. Os extratos naturais de plantas são um meio eficaz e econômico para manter e melhorar a saúde da pele, por isso é importante descobrir remédios naturais com propriedades eficazes de cicatrização (Xiong et al., 2020).

As atividades anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidantes, pró-angiogênicas, promotoras da proliferação de fibroblastos e de síntese de pró-colágeno de algumas plantas podem ser ótimos contribuintes para o processo de cicatrização de feridas, podendo inibir a secreção de mediadores inflamatórios, estimular a produção de citocinas, promover a proliferação e migração de fibroblastos, acelerar a angiogênese, formação de tecido de granulação e reepitelização e regular a síntese e a deposição de colágeno nos sítios da ferida. Pensa-se que para maximizar os benefícios terapêuticos das drogas botânicas, diferentes tipos de curativos avançados carregados com estas plantas seriam uma nova e promissora opção de tratamento (Ning et al., 2022).

O uso de materiais à base de plantas em vez de micróbios (o que já era mais bem estabelecido) para a síntese verde de nanopartículas metálicas tem despertado muito interesse devido à menor toxicidade, menor tempo de processamento e o benefício adicional de serem agentes de cobertura

naturais. Além disso, reduz o custo de isolamento de microrganismos e emprega uma variedade de fontes redutoras (Peralta-Videa et al., 2016; Li et al., 2011).

Alguns estudos demonstram efeitos dos extratos de *Euterpe Oleracea, Curcuma longa, Croton Lechleti e Aloe Vera* no processo de cicatrização, já que estes apresentam propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e são capazes de promover a angiogênese, além de estimularem a deposição de colágeno, epitelização e contração de feridas (BinShabaib et al., 2022, Ning et al., 2022; Pona et al., 2018).

A curcumina (*Curcuma longa L.*), um polifenol extraído do rizoma da planta, é uma molécula pleiotrópica que pode interagir com vários alvos moleculares relacionados à inflamação. Controla a resposta inflamatória diminuindo a atividade da via enzimática induzível do óxido nítrico (iNOS), lipoxigenase (LOX), fosfolipases A2 (PLA2s) e ciclooxigenase-2 (COX-2) que obstrui a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pró-inflamatórios e mediadores essenciais da resposta inflamatória (Karthikeyan, Senthil e Min, 2020). Esta molécula provou ser capaz de despertar a reepitelização precoce, melhorar a neovascularização e aumentar a migração de várias células, incluindo miofibroblastos dérmicos, fibroblastos e macrófagos para o leito de feridas.

Embora a curcumina possua poderosas atividades de cicatrização, ela é limitada por sua baixa biodisponibilidade, baixa solubilidade e metabolização rápida (Ning et al., 2022). Para resolver esses problemas, as técnicas de entrega de drogas baseadas em nanopartículas são a melhor opção para expandir os usos medicinais da curcumina, já que esses materiais têm a capacidade de entrar nos tecidos e órgãos e translocar para outras células (Shanmugam et al., 2021), permitindo a entrega tópica do agente de maneira estendida. Khosropanah et al. (2016) descobriu que nanogéis carregados de curcumina eram pelo menos duas vezes mais potentes que a curcumina livre, possivelmente devido ao aumento da absorção.

O encapsulamento da curcumina em uma nanopartícula é um meio viável e vantajoso de viabilizar sua entrega. Em virtude de seu pequeno tamanho e alta relação superfície-volume, as nanopartículas podem passar através da barreira da pele e intracelularmente, ideal para entregar moléculas de maneira ideal na administração tópica de drogas. A liberação lenta e sustentada do conteúdo encapsulado limita a toxicidade, pois a quantidade máxima teórica do fármaco nunca está em contato com a pele de uma só vez (Krausz et al., 2015).

Da mesma forma, o uso de AgNPs estabilizadas com curcumina parece ser uma estratégia eficaz para o cuidado de feridas, pois, de fato, os nitratos de prata têm sido usados com segurança para o tratamento de muitas condições e doenças oftalmológicas e odontológicas, além da cicatrização de feridas. No estudo de Maghimaa e Alharbi (2020), AgNPs sintetizadas com *Curcuma longa L.* exibiram a notável potência de cicatrização de feridas através do aumento da proliferação e migração de células de fibroblastos. Além de que, os agentes de capeamento nas nanopartículas, que atuam como estabilizadores, podem protegê-las contra a aglomeração e reduzir sua citotoxicidade. As biomoléculas na superfície das AgNPs provavelmente aumentarão sua biocompatibilidade e as tornarão seguras para uso em várias aplicações biomédicas (Simon et al., 2022).

O açaí (*Euterpe oleracea*) é uma fruta tropical roxa com muitos nutrientes antioxidantes e que tem excelentes efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes na pele. Estudos têm demonstrado que essa

fruta tem efeito na reversão da disfunção mitocondrial e propriedades antienvelhecimento (Kang e Kim, 2018). Um estudo recente mostrou que o açaí possuía notável atividade antioxidante contra radicais superóxido e peroxila, atribuídos à orietina, homoorietina, vitexina, luteolina, crisoeriol e abundância de quercetina na planta (Shim et al., 2016).

A ação antioxidante da suplementação de açaí também foi examinada em alguns estudos *in vivo* realizados em ratos. As proteínas carboniladas e as concentrações séricas dos grupos sulfidrila total, livre e proteica foram reduzidas após 6 semanas de ingestão de açaí em ratos (Pala et al., 2018). Uma investigação relatou que as interações entre laserterapia de baixa potência e extrato de açaí apresentam efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiapoptóticos e promovem a proliferação de fibroblastos (Felin et al., 2022).

O estudo de Kang e Kim (2018) mostrou que o extrato aquoso de açaí teve efeito cicatrizante na mucosa oral, reduzindo significativamente a área de ferida e apresentando menor lesão inflamatória com aumento do conteúdo de colágeno na análise histológica. Em geral, o grupo tratado com açaí apresentou regeneração mais rápida do tecido. Isso pode estar associado à sua alta atividade antioxidante. A permeação da produção de colágeno pode ter aumentado a velocidade de cicatrização de feridas na mucosa oral. Tem sido relatado também que o açaí tem excelente efeito supressor na geração de espécies reativas de oxigênio e pode suprimir a ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) e TNF-α in vitro (Kang, Choi e Kim, 2017).

1.4 JUSTIFICATIVA

Dado o que foi apresentado acima e à escassez de estudos a respeito do uso desses componentes para cicatrização de feridas de mucosa oral palatinas na literatura, e pensando em atualizar e melhorar o tratamento padrão comercial feito normalmente com Omcilon® e fotobiomodulação, que muitas vezes acabam sendo mais caros e não completamente eficientes, o objetivo deste trabalho é avaliar e comparar os efeitos do tratamento com GNPs e AgNPs reduzidas pelo método de síntese verde com Curcumina (*Curcuma longa L.*) ou Açaí (*Euterpe oleracea*), em feridas palatinas de ratos Wistar.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar os efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) e prata (AgNPs) reduzidas pelo método de síntese verde com Curcumina (*Curcuma longa L.*) ou Açaí (*Euterpe oleracea*), em feridas palatinas de ratos Wistar, a um tratamento padrão comercial do tipo farmacológico (Omcilon®) e a um agente eletrofísico (fotobiomodulação).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Avaliar macroscopicamente por meio de escore inflamatório a evolução das feridas palatinas de ratos Wistar;

• Quantificação da taxa de contração da ferida palatina em % para avaliar a contração do tecido entre os dias 0 e 5 do tratamento;

• Avaliar histopatologicamente o infiltrado inflamatório e colagênese dos animais induzidos ao modelo experimental das feridas palatinas de ratos Wistar;

• Avaliar os níveis proteicos de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF-α, IL1-β, IL4, TGFβ) por meio de ELISA dos animais induzidos ao modelo experimental das feridas palatinas de ratos Wistar;

• Avaliar a produção de oxidantes e sistema de defesa antioxidante dos animais induzidos ao modelo experimental das feridas palatinas de ratos Wistar.

3. METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado sob protocolo 81/2022 (ANEXO A) pela Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7). Esta pesquisa também seguiu as Diretrizes ARRIVE 2.0 (Percie du Sert et al., 2020) (ANEXO B).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos, pesando entre 250-300g, provindos da colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x Largura 20 cm x altura 13 cm) colocados sobre estantes e sobre os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente é controlada entre 20 ±22 ºC, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum.*

Os animais foram divididos em 2 grupos de 60 animais em cada (primeira e segunda etapa), para que o experimento ocorresse em duas etapas. Um grupo foi tratado com nanopartículas de ouro e outro com nanopartículas de prata. Em cada grupo foi realizado uma subdivisão, formando um total de cinco grupos de n=12 em cada:

Primeira etapa

- **I.** Grupo Lesão Palatina (LP) - sem tratamento local ou sistêmico;
- **II.** Grupo LP + Fotobiomodulação (FBM) – tratamento padrão com Laser 660nm 2J;
- **III.** Grupo LP + Omcilon® – tratamento padrão Omcilon®;
- **IV.** Grupo LP + GNPs-Cur – tratamento com nanopartículas de ouro reduzidas com curcumina (0,025mg/mL);
- **V.** Grupo LP + GNPs-Açaí – tratamento com nanopartículas de ouro reduzidas com açaí (0,025mg/mL).

Segunda etapa

- **I.** Grupo Lesão Palatina (LP) - sem tratamento local ou sistêmico;
- **II.** Grupo LP + Fotobiomodulação (FBM) – tratamento padrão com Laser 660nm, 2J dose;
- **III.** Grupo LP + Omcilon® – tratamento padrão Omcilon®;
- **VI.** Grupo LP + AgNPs-Cur – tratamento com nanopartículas de prata reduzidas com curcumina (0,125mg/mL);
- **VII.** Grupo LP + AgNPs-Açaí – tratamento com nanopartículas de prata reduzidas com açaí (0,125mg/mL).

3.3 MODELO DE LESÃO PALATINA

Os animais foram anestesiados e mantidos sob anestesia, utilizando cetamina 100 mg/kg e xilazina 0,5 mg/kg via intraperitoneal. Ao ser constatado o efeito da anestésico, cada rato foi estabilizado e a boca mantida aberta usando um retrator. A mucosa palatina próxima aos dentes molares foi removida usando um *punch* dermatológico de aço inox de 4 mm de diâmetro (Figura 3), induzindo uma lesão circular.

Figura 3: *Punch* dermatológico de aço inox (marca Rhosse®) com 4 mm de diâmetro

A mucosa palatina envolvida na incisão circular (Figura 4) foi completamente excisionada e o periósteo se manteve exposto dentro desse diâmetro. Após controle do sangramento a área excisada foi deixada exposta para simular a cicatrização da ferida por segunda intenção.

(a) **(b)**

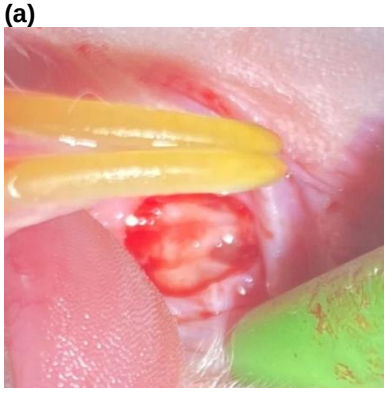

Figura 4: (a) fotografia da mucosa palatina; (b) ilustração do modelo de ferida palatina no rato Wistar

3.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA

As GNPs foram obtidas pela redução de diferentes extratos. Uma solução estoque de extrato *Curcuma longa L.* e/ou *Euterpe oleracea* foi preparada em Etanol absoluto. Soluções estoque de HAuCl4 (4 mM), foram preparadas em água Milli Q. Na sequência, uma solução pré-definida de extrato será adicionado em água Mili Q e mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90ºC. Hidróxido de sódio (NaOH) (0.1 M) foi usado para ajustar o pH entre 10 e 11. Na sequência, uma solução 1 mM de Ácido cloroáurico (HAuCl4) foi adicionada gota a gota sob agitação simultânea. A reação foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente e posterior formação das GNPs.

As AgNPs foram sintetizadas pela redução do sal AgNO3 com *Curcuma longa L.* e/ou *Euterpe oleracea* e estabilizados com citrato de sódio (Na3C6H5O7). Primeiramente, a solução foi diluída em etanol (3mg/mL). 1mL de solução de *Curcuma longa L*. e/ou *Euterpe oleracea* foi adicionada em 29mL de água deionizada contendo Na3C6H5O7 (15mg). O pH foi ajustado (pH=11) usando uma solução de NaOH (0,01M). A solução foi aquecida (90ºC) e mantida sob agitação vigorosa. Em seguida, uma

solução de AgNO3 foi adicionada gota a gota e mantida sob agitação vigorosa até o resfriamento e posterior fomação das AgNPs. A solução apresenta um amarelo escuro.

As soluções de GNPs e AgNPs foram caracterizadas por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis), em um modelo SpectraMax Plus. As nanopartículas foram medidas na região do visível (390–700 nm). O tamanho e morfologia das nanopartículas foram realizados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um JEM-1011 (100 kV). Uma gota da solução das nanopartículas foi adicionada a uma grade de cobre (300 mesh) coberta com uma fina camada de carbono. A secagem foi realizada em temperatura ambiente (24 h) e posteriormente as imagens foram obtidas. O tamanho hidrodinâmico e a carga superficial em pH 7,4 (25 °C) foram investigados através de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta, usando um Zetasizer Nano ZS. As soluções de nanopartículas foram colocadas em uma célula capilar dobrada. Todas as análises serão realizadas em triplicata, para obtenção da média e desvio padrão (DP). A estabilidade das soluções foi avaliada por espectroscopia UV-Vis e Zetasizer. A concentração de íons de prata foi determinada via absorção atômica modelo Shimadzu.

3.5 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Na primeira etapa do experimento (60 animais), 24 horas após a indução da lesão, os animais do grupo II, III, IV e V foram sedados com isoflurano 4% e receberam seus tratamentos. Ao grupo II foi executada a primeira sessão de tratamentos com fotobiomodulação com aplicação de LBP AlGaInP com emissão contínua (comprimento de onda 660nm; potência de pico 30 mW; tamanho do feixe de 0,10 cm², dose de 2 J/cm2) da empresa Laserpulse-Ibramed (São Paulo, Brasil). A irradiação foi executada sobre a ferida, com a caneta do laser perpendicular ao palato a uma distância de 0,5 cm, conforme é descrito por Morrone et al. (1998).

Nos animais do grupo III, foi realizado o tratamento tópico (50uL) com Omcilon® aplicado com um microaplicador tipo microbrush descartável sobre as feridas palatinas. Os grupos IV e V receberam aplicações de GNPs-Cur ou GNPs-Açaí (50uL, 20nm, 0.025mg/mL) também com o microbrush descartável sobre as feridas.

Os tratamentos ocorreram diariamente por 5 dias, de acordo com o desenho experimental apresentado na Figura 5.

Figura 5: Desenho experimental

As etapas dos procedimentos foram repetidas em um segundo momento de experimento, com a outra metade dos animais (60 ratos). As intervenções “fotobiomodulação com aplicação de LBP

AlGaInP” e “Omcilon®” foram novamente manipuladas nas lesões palatinas dos grupos II e III respectivamente. Já os grupos IV e V nessa etapa do experimento foram tratados topicamente com nanopartículas de prata (50uL, 20nm, 0.125mg/mL) pelo método de síntese verde, reduzidas com *Curcuma longa L.* ou *Euterpe oleracea.*

3.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA E ESCORE INFLAMATÓRIO

A avaliação macroscópica da ferida contou com uma pontuação visual geral do nível de inflamação. Os seguintes parâmetros foram incluídos no escore de inflamação:

0. Sem alteração
1. Irritação
2. Úlcera rasa (1-2mm) com bordas limpas
3. Úlcera rasa (1-2mm) com bordas necróticas
4. Úlcera rasa (3-4mm) com bordas limpas
5. Úlcera rasa (3-4mm) com bordas necróticas
6. Úlcera profunda (1-2mm) com bordas limpas
7. Úlcera profunda (1-2mm) com bordas necróticas
8. Úlcera profunda (3-4mm) com bordas limpas
9. Úlcera profunda (3-4mm) com bordas necróticas
10. Tecido necrótico com margens aumentadas

3.7 EUTANÁSIA

Após 5 dias da indução da lesão e aplicação diária dos tratamentos, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e levados a eutanásia por decapitação. A seguir, a área da mucosa palatina lesionada foi excisionada com uma margem remanescente utilizando um *punch* dermatológico de aço inox de 5mm diâmetro. As amostras foram então, armazenadas em frascos individuais para posteriores análises bioquímicas e histopatológicas.

3.8 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

O método fotográfico é uma alternativa precisa para medir a área da ferida, sendo uma técnica apropriada para feridas limpas, contaminadas ou não. Imagens digitais das feridas foram feitas na resolução: 3264 x 2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ ® 1.51. As imagens das lesões foram obtidas nos dias 0 e 6, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho (área em mm^2) calculando a variação das áreas das feridas neste período em %. Essas mensurações foram feitas pelo mesmo pesquisador, sendo realizadas 3 mensurações de cada ferida e utilizado o valor médio.

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras teciduais do palato mole (n=5 animal/grupo) foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 horas. Posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. Para

avaliação de quantificação de infiltrado inflamatório foi utilizada a coloração de hematoxilina e eosina (HE) e para avaliação e quantificação da colagênese, coloração com tricrômio de Gomori. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA) com aumento de 600x. As imagens foram gravadas com o auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas no software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA). A contagem do infiltrado inflamatório foi realizada através da utilização do Plugin “Cell Counter” do software considerando a coloração nuclear de células inflamatórias. Para quantificação da colagênese, foi utilizado o Plugin “Colour Deconvolution” do software, na qual quantifica a porcentagem da cor azul da área total da imagem.

3.10 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

• **Ensaio imunoenzimático:** As amostras foram processadas, e, posteriormente, a placa foi sensibilizada para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas (TNF-α, IL1-β, IL4, TGF-β) foi utilizado o método enzyme-linked immuno absorbent assay (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

• **Determinação intracelular de EROs e óxido nítrico:** A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2’,7’-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por EROs de acordo com o método descrito anteriormente por Dong (2010), com algumas modificações. A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO2). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

• **Defesas antioxidantes:** Os níveis de glutationa (GSH) foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogeneizado da mucosa palatina após precipitação de proteína com 1mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µm DTNB. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutationa reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

• **Conteúdo de Proteínas:** O teor de proteína a partir do homogeneizado da mucosa palatina foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolíbdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. Absorbância foi lida a 750nm.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados macroscópicos coletados foram analisados com auxílio do software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0 (IBM, 2012). As variáveis quantitativas foram

expressas por meio de média e desvio padrão, pois apresentaram distribuição Normal, e valores mínimos e máximos (Callegari-Jacques, 2004).

Os testes estatísticos foram realizados com um nível de significância α = 0,05 e, portanto, confiança de 95%. A distribuição dos dados quanto à normalidade foi avaliada por meio da aplicação do teste de Shapiro-Wilk (Field, 2009).

A comparação da média das variáveis quantitativas entre as categorias das variáveis qualitativas dicotômicas foi realizada por meio da aplicação do teste U de Mann-Whitney, pois a variável não apresentou distribuição Normal. Por sua vez, a comparação da média das variáveis quantitativas entre as categorias das variáveis qualitativas politômicas, por não apresentar distribuição Normal, foi empregado o teste H de Kruskal-Wallis seguido do post hoc teste de Dunn quando observada significância estatística (Vieira, 2010).

A investigação da existência de associação entre as variáveis qualitativas foi realizada por meio da aplicação do teste Razão de Verossimilhança, seguido de análise de resíduo quando observada significância estatística (Zar, 2010).

O restante dos dados bioquímicos e moleculares foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *two-way*, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $p<0,05$. Foi utilizado o SPSS (StatisticalPackage for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

4. RESULTADOS

4.1 PRIMEIRA ETAPA - GNPs

4.1.1 Caracterização das GNPs

A morfologia e distribuição de tamanho das partículas foram analisadas via Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), apresentando uma morfologia esférica e uma distribuição de tamanho na faixa de 10-30nm. A distribuição de tamanho de partículas (DP) e a carga de superfície foi determinada por DLS. A DP foi similar aos dados apresentados via TEM. O potencial zeta das diferentes nanopartículas foi de > -25 mV (pH 7), conferindo uma boa estabilidade das diferentes nanopartículas. Foi realizada Análise de Espectrofotômetro UV-Vis, confirmando a formação das diferentes GNPs com Curcumina e Açaí. As nanopartículas com diferentes extratos não apresentam diferença significativa (ANOVA p <0.5) no comprimento de onda máximo. Os comprimentos de onda obtidos confirmam a formação de nanopartículas metálicas.

Na Figura 6 encontram-se as imagens das nanopartículas obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Já na Tabela 1 encontram-se os resultados da distribuição de tamanho médias e potencial zeta das diferentes nanopartículas.

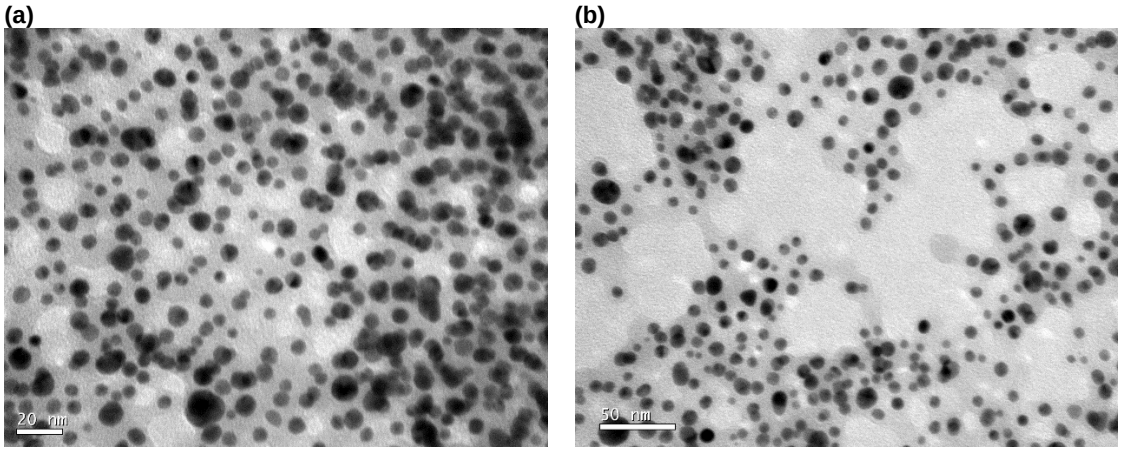

Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão das diferentes nanopartículas obtidas. (a) GNPs com curcumina; (b) GNPs com açaí

Tabela 1. Distribuição de tamanho médias e potencial zeta das diferentes nanopartículas

Amostra	DP (nm)	Potencial zeta (mV)	Comprimento de onda máximo
GNPs-Cur	39 ± 4	− 22 ± 3	524nm
GNPs-Açaí	34 ± 2	− 28 ± 3	526nm

± Desvio padrão médio de 3 determinações

4.1.2 Análise Macroscópica e Escore Inflamatório

Na Tabela 2 o valor de p= 0,027 na comparação dos tratamentos com GNPs revela que esse evento não ocorreu por acaso, indicando que o grupo GNPs-Açaí obteve um índice de condição visual inflamatória melhor que os demais tratamentos.

Tabela 2. Escore Inflamatório Macroscópico

GNPs	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo	Valor-p
LP	9	3,22 ± 1,39	1	6	0,027
LP + FBM	12	4,42 ± 3,11	1	10	
LP + Omcilon®	12	3,67 ± 2,06	2	9	
LP + GNPs-Cur	12	3,33 ± 1,96	1	7	
LP + GNPs-Açaí	12	1,92 ± 0,79*****	1	4	

H de Kruskal-Wallis
Teste post hoc de Dunn

4.1.3 Contração da Ferida

A Figura 7 representa a taxa de contração da ferida em %. Observa-se diferença significativa na contração da ferida apenas no grupo LP + GNPs-Açaí (p<0,05) em relação ao grupo LP.

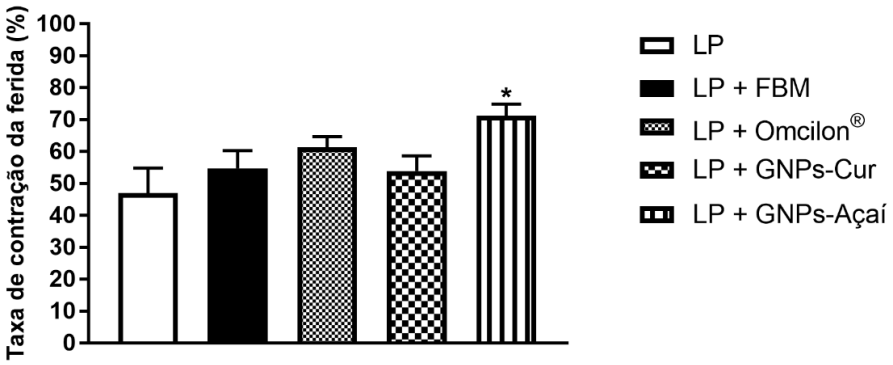

Figura 7. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre a taxa de contração da ferida em %. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.1.4 Análise Histológica

Na Figura 8A observa-se imagens representativas de cortes histológicos da mucosa palatina corados com H&E, nos quais foram realizadas quantificações da média de número de infiltrado inflamatório (figura 8B), onde se observa uma redução significativa no grupo LP + GNPs-Cur em relação ao grupo LP (p<0,05).

Já na Figura 8C apresentam-se imagens representativas de cortes histológicos da mucosa palatina que foram corados com tricômio de Gomori para visualização de colágeno, e na Figura 8D observa-se um aumento significativo da área de colágeno no grupo LP + GNPs-Açaí em relação ao grupo LP (p<0,05).

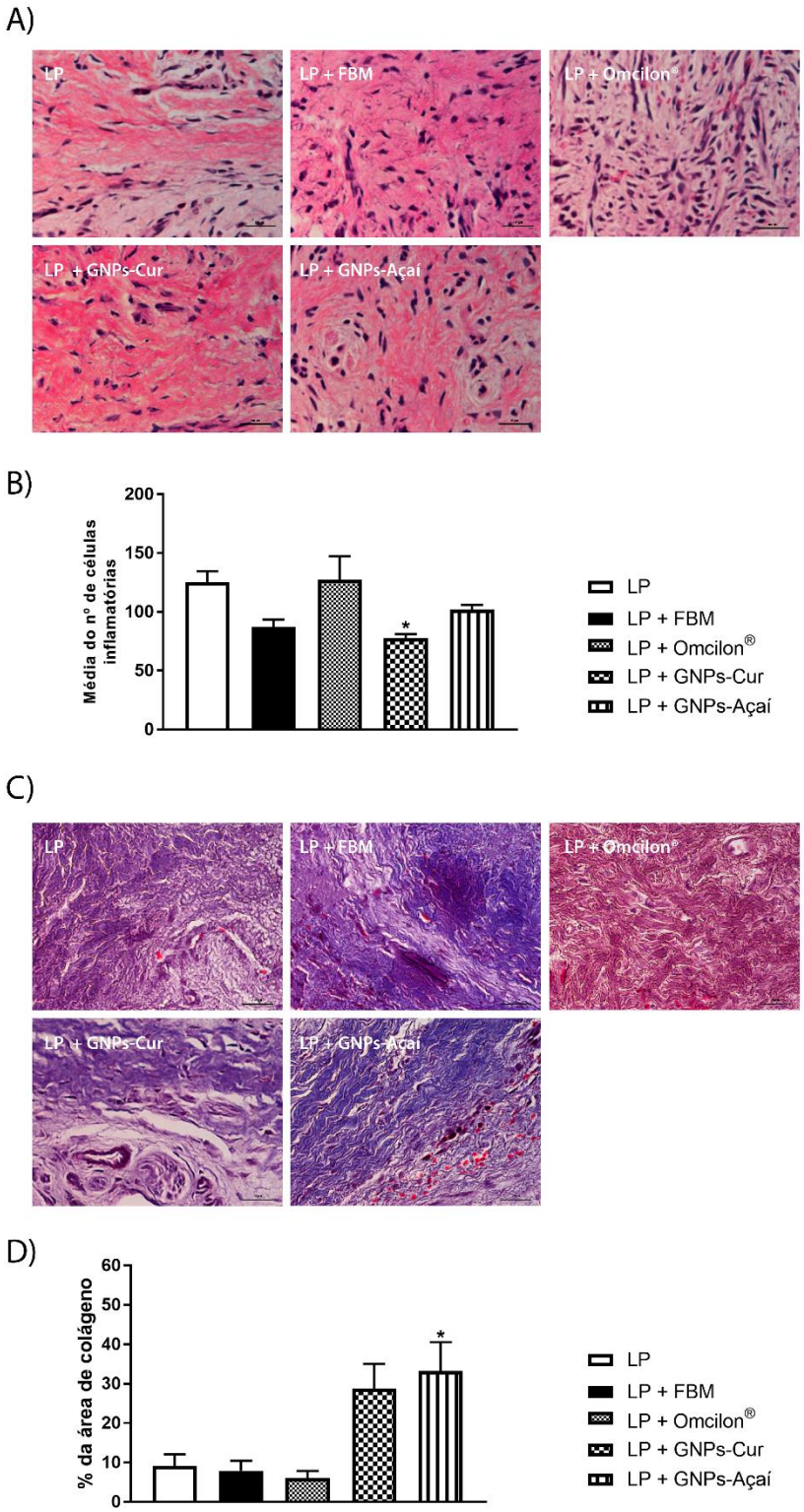

Figura 8. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre a análise histológica, em que A) coloração com H&E; B) média do nº de células inflamatórias; C) coloração com tricômio de Gomori; D) % da área de colágeno. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.1.5 Citocinas Pró e Anti-Inflamatórias

Na Figura 9 estão representados os níveis proteicos das citocinas TNF-α, IL-1β e IL4 e TGF-β. Representando as citocinas pró-inflamatórias, quando avaliados os níveis de TNF-α (Figura 9A), os

grupos LP + FBM, LP + GNPs-Cur e LP + GNPs-Açaí apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo LP ($p<0,05$). Já na Figura 9B, observa-se uma redução dos níveis de IL-1β de forma significativa no grupo LP + GNPs-Açaí, quando comparado ao grupo LP ($p<0,05$).

A respeito das citocinas anti-inflamatórias, na Figura 9C observa-se os resultados de IL4, que apresentou um aumento significativo nos grupos LP + Omcilon® e LP + GNPs-Açaí em relação ao grupo LP ($p<0,05$), assim como aconteceu com os níveis de TGF-β (Figura 9D), sendo a diferença de $p<0,01$ no grupo LP + GNPs-Açaí em relação ao grupo LP.

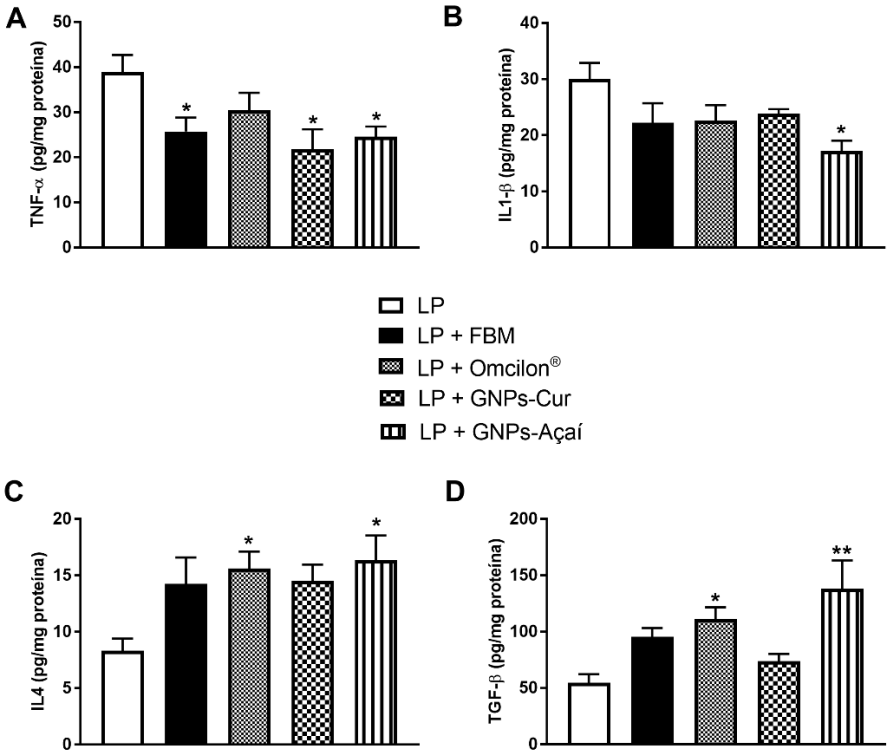

Figura 9. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); **p<0,01 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.1.6 Níveis de Oxidantes e Antioxidantes

Para avaliação de parâmetros oxidativos analisou-se os níveis de DCF e Nitrito, e como antioxidante o GSH. Na figura 10A, os níveis de DCF apresentaram-se diminuídos no grupo LP + GNPs-Açaí quando comparados ao grupo LP ($p<0,05$), assim como ocorreu com os níveis de nitrito (figura 10B). Já os níveis de GSH não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

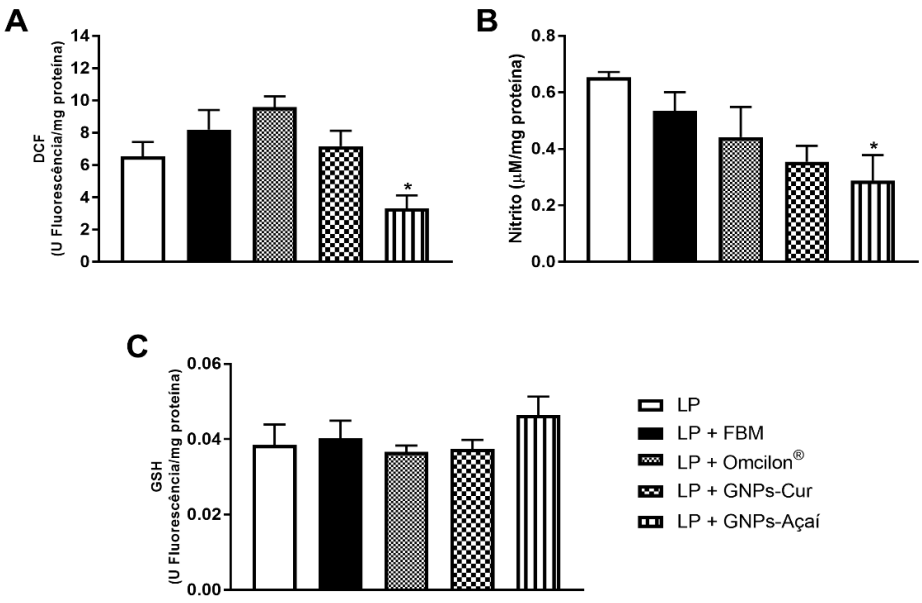

Figura 10. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, GNPs-Cur e GNPs-Açaí sobre os níveis de oxidantes e antioxidantes. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.2 SEGUNDA ETAPA – AgNPs

4.2.1 Caracterização das AgNPs

A morfologia e distribuição de tamanho das partículas foram analisadas via Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), apresentando uma morfologia esférica e uma distribuição de tamanho na faixa de 10-30nm. A distribuição de tamanho de partículas (DP) e a carga de superfície foi determinada por DLS. A DP foi similar aos dados apresentados via TEM. O potencial zeta das diferentes nanopartículas foi de > -25 mV (pH 7), conferindo uma boa estabilidade das diferentes nanopartículas.

Foram feitas análises de Espectrofotômetro UV-Vis, confirmando a formação das diferentes AgNPs com Curcumina e Açaí. As Nanopartículas com diferentes extratos não apresentam diferença significativa (ANOVA p <0.5) no comprimento de onda máximo. Os comprimentos de onda obtidos confirmam a formação de nanopartículas metálicas.

Na Figura 11 encontram-se as imagens das nanopartículas obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Já na Tabela 3 encontram-se os resultados da distribuição de tamanho médias e potencial zeta das diferentes nanopartículas.

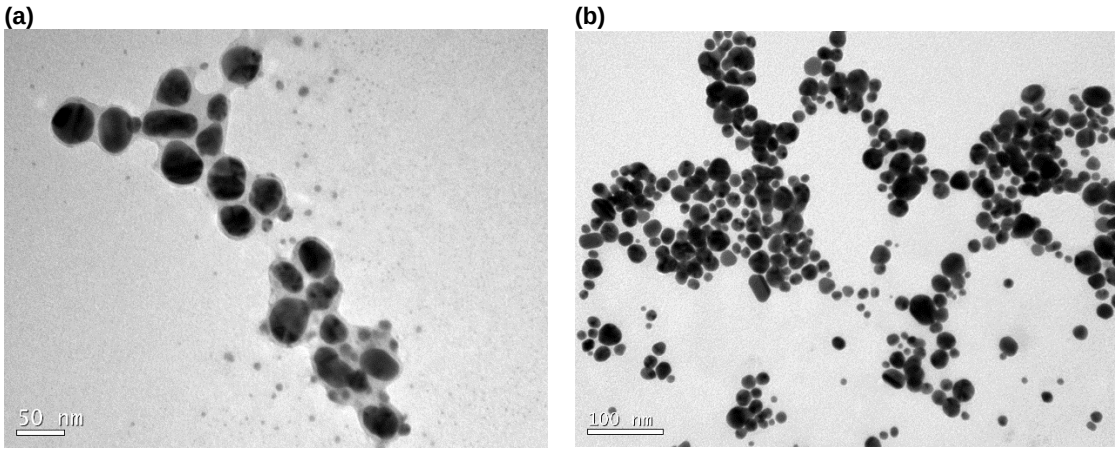

Figura 11. Microscopia Eletrônica de Transmissão das diferentes nanopartículas obtidas. (a) AgNPs com curcumina; (b) AgNPs com açaí

Tabela 3. Distribuição de tamanho médias e potencial zeta das diferentes nanopartículas

Amostra	DP (nm)	Potencial zeta (mV)	Comprimento de onda máximo
AgNPs-Cur	39 ± 6	− 26 ± 2	405nm
AgNPs-Açaí	41 ± 6	− 24 ± 2	404nm

± Desvio padrão médio de 3 determinações

4.2.2 Análise Macroscópica e Escore Inflamatório

Na Tabela 4, os grupos LP + AgNPs-Cur e LP + AgNPs-Açaí não obtiveram diferença significativa entre eles, quando analisada a percepção macroscópica da condição inflamatória.

No entanto, o grupo LP + FBM atingiu uma diferença significativa quando relacionada ao grupo LP e LP + Omcilon® que obtiveram um pior desempenho no escore inflamatório macroscópico.

Tabela 4. Escore Inflamatório Macroscópico

AgNPs	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo	Valor-p
LP	12	2,50 ± 0,67	1	3	0,001
LP + FBM	10	5,70 ± 1,76#	2	8	
LP + Omcilon®	10	4,80 ± 2,09	3	9	
LP + AgNPs-Cur	10	4,40 ± 1,50	2	6	
LP + AgNPs-Açaí	12	3,58 ± 1,88	2	8	

H de Kruskal-Wallis
Teste post hoc de Dunn

4.2.3 Contração da Ferida

A Figura 12 representa a taxa de contração da ferida em %. Observa-se aumento significativo na taxa de contração da ferida nos grupos LP + AgNPs-Cur e LP + AgNPs-Açaí ($p<0,05$) em relação ao grupo LP.

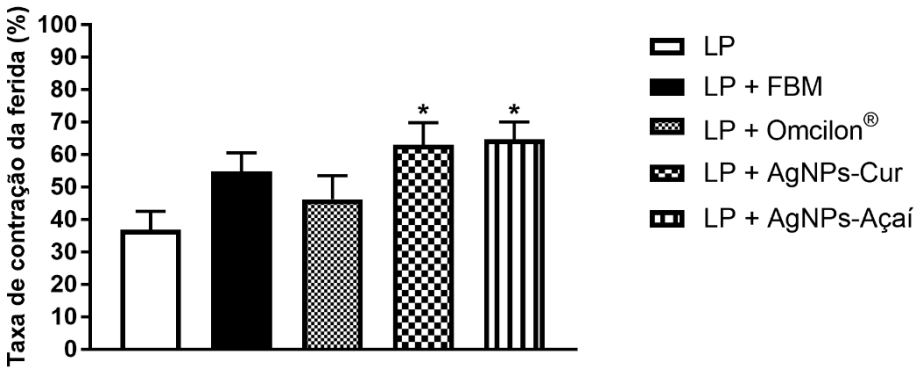

Figura 12. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre a taxa de contração da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.2.4 Análise Histológica

Na Figura 13A observa-se imagens representativas de cortes histológicos da mucosa palatina corados com H&E, nos quais foram realizadas quantificações da média de número de infiltrado inflamatório (figura 13B), e foram observadas reduções significativas em todos os grupos em relação ao grupo LP, sendo que nos grupos LP + FBM, LP + Omcilon®, LP + AgNPs-Açaí houve uma significância de $p<0,05$ e no grupo LP + AgNPs-Cur significância de $p<0,01$.

Já na Figura 13C apresentam-se imagens representativas de cortes histológicos da mucosa palatina que foram corados com tricômio de Gomori para visualização de colágeno, e na Figura 13D observa-se um aumento significativo da área de colágeno apenas no grupo LP + AgNPs-Cur em relação ao grupo LP ($p<0,05$).

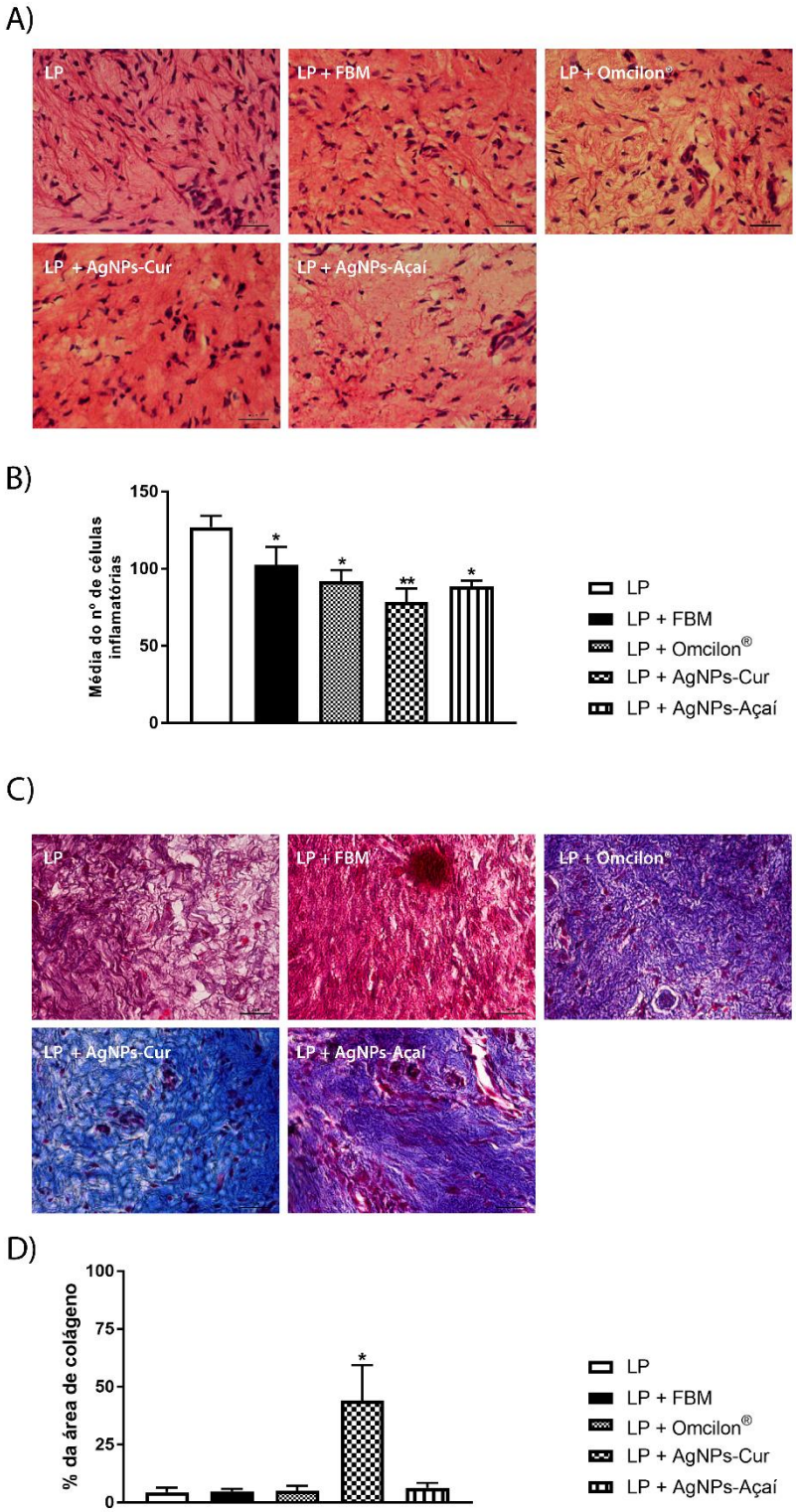

Figura 13. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre a análise histológica, em que A) coloração com H&E; B) média do nº de células inflamatórias; C) coloração com tricômio de Gomori; D) % da área de colágeno. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); **p<0,01 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.2.5 Citocinas Pró e Anti-inflamatórias

Na Figura 14 estão representados os níveis proteicos das citocinas TNF-α, IL-1β e IL4 e TGF-β. Representando as citocinas pró-inflamatórias, quando avaliados os níveis de TNF-α (Figura 14A), os

grupos LP + FBM, LP + AgNPs-Cur e LP + AgNPs-Açaí apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo LP ($p<0,05$). Já na Figura 14B, observa-se uma redução dos níveis de IL-1β de forma significativa apenas no grupo LP + AgNPs-Cur, quando comparado ao grupo LP ($p<0,05$).

A respeito das citocinas anti-inflamatórias, na Figura 14C observa-se os resultados de IL4, que apresentou um aumento significativo nos grupos LP + FBM e LP + AgNPs-Cur em relação ao grupo LP ($p<0,05$). Já os níveis de TGF-β (Figura 14D) apresentaram aumento significativo apenas no grupo LP + AgNPs-Cur em relação ao grupo LP.

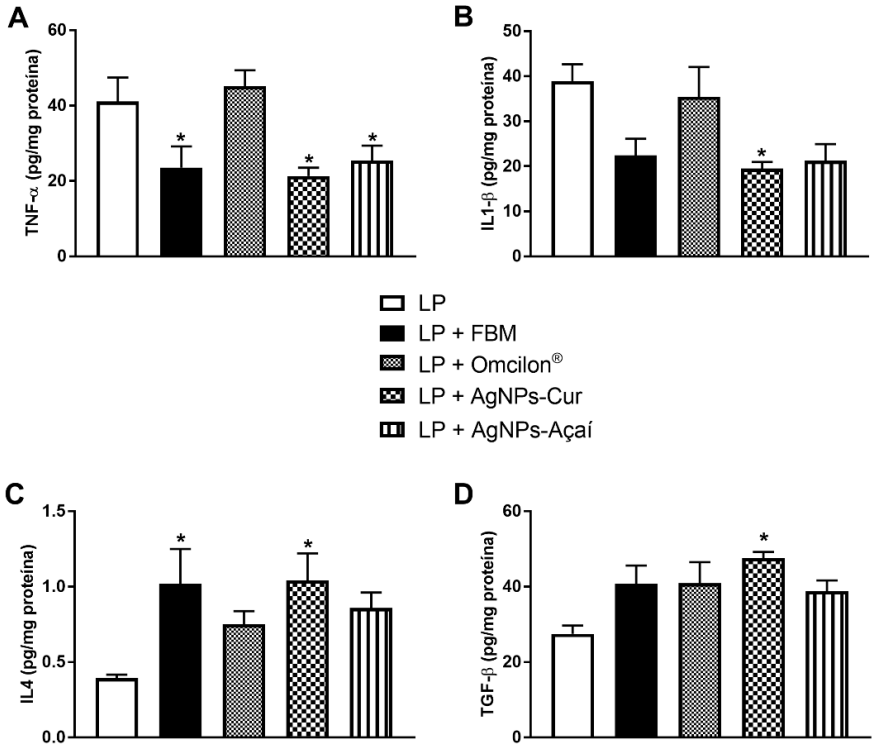

Figura 14. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.2.6 Níveis de Oxidantes e Antioxidantes

Para avaliação de parâmetros oxidativos analisou-se os níveis de DCF e Nitrito, e como antioxidante o GSH. Na Figura 15A, os níveis de DCF apresentaram-se diminuídos significativamente apenas no grupo LP + AgNPs-Cur quando comparados ao grupo LP ($p<0,05$). Já os níveis de nitrito (Figura 15B) tiveram redução significativa nos grupos LP + AgNPs-Cur e LP + AgNPs-Açaí em relação ao grupo LP ($p<0,05$). Os níveis de GSH não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

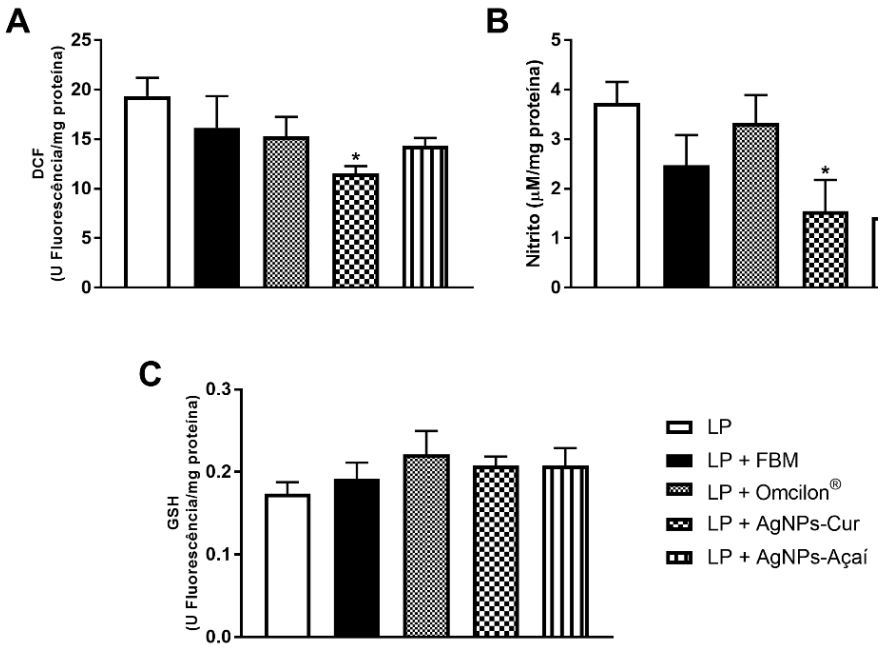

Figura 15. Efeitos do tratamento com FBM, Omcilon®, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí sobre os níveis de oxidantes e antioxidantes. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s Grupo lesão palatina (LP); (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

5. DISCUSSÃO

A mucosa reveste e protege a cavidade oral atuando como uma barreira protetora à invasão de patógenos. Quando sua integridade é comprometida, seja por desafios agudos ou crônicos como procedimentos cirúrgicos, o corpo inicia um processo de cicatrização complexo de várias etapas no local lesionado (Chaushu et al., 2020). Como a mucosa oral está sempre exposta à saliva e às bactérias orais, pode ocorrer atraso na cicatrização de feridas ou formação de cicatrizes, com dor. Muitos fatores, como mastigar e engolir alimentos, e a pronúncia, podem afetar a cicatrização de feridas da mucosa oral (Kang e Kim, 2018).

Estudos apontam que a cicatrização da mucosa oral é mais acelerada do que da pele, mas poucos estudos compararam o reparo na mucosa oral e nos locais cutâneos. As pesquisas parecem revelar que as feridas orais contêm menos IL6 e TGF-β do que as feridas cutâneas, porém não observam diferenças significativas entre feridas cutâneas e mucosas para a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL10 (Szpaderska et al., 2003). Infiltrações inferiores de neutrófilos, macrófagos e células T são consistentemente observadas no local da lesão intra-oral. Uma possibilidade é que, dentro da cavidade oral, a saliva forneça muitos fatores de crescimento necessários para intensificar o processo de reparo (van Beurden et al., 2005), tornando a função dos macrófagos menos crítica.

A citocina pró-inflamatória que desencadeia a liberação de IL8 é o TNF-α, e estas citocinas estão significativamente envolvidas em todos os processos inflamatórios, sendo que sua liberação leva à vasodilatação, acompanhada de vermelhidão, inchaço e aumento da permeabilidade vascular (Politis et al., 2016). Além das reações imunológicas sistêmicas, um desequilíbrio do ambiente bacteriano na boca também pode levar a processos inflamatórios. Assim, bactérias e certas moléculas de superfície bacterianas, como lipoproteínas ou lipopolissacarídeos (LPS), interagem com receptores de reconhecimento de patógenos (Huguet-Casquero et al., 2020).

A cavidade oral encontra constantemente uma infinidade de microrganismos. O biofilme é uma comunidade complexa de bactérias ou fungos que causa infecção se protegendo de forma organizada mantendo os microrganismos patogênicos afastados dos agentes externos, bloqueando os mecanismos de defesa do hospedeiro. Embora existam inúmeros estudos com o intuito de desenvolver agentes antimicrobianos para superar esse problema, a maioria dessas tentativas falhou em alcançar os resultados desejados devido à rápida degradação e liberação de agentes antibacterianos, causando baixa eficiência e efeitos adversos (Fernandes e Delbem, 2018).

Devido a essas particularidades e sensibilidades que ocorrem na mucosa oral, ocasionando alguns possíveis problemas da cicatrização na boca, atualmente na literatura vem ganhando atenção o desenvolvimento de biomateriais, como as nanopartículas, que podem vir a ajudar e desencadear uma cicatrização mais rápida e eficiente.

As GNPs exibem únicas propriedades eletrônicas e ópticas, bioestabilidade, baixa citotoxicidade e recursos aprimorados de entrega de medicamentos, que potencializam seu uso em diversos campos, além de seus potentes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Paiva-Santos et al., 2021). Já as AgNPs apresentam, entre outras, sua promissora atividade antimicrobiana, que é atribuída à sua capacidade de destruir membranas celulares, causar danos intracelulares, alterar o material genético e causar estresse oxidativo na célula bacteriana (Khan et al., 2018).

O uso de materiais à base de plantas para a síntese verde de nanopartículas metálicas tem despertado muito interesse devido à menor toxicidade, menor tempo de processamento e o benefício adicional de serem agentes de cobertura naturais (Peralta-Videa et al., 2016).

A curcumina, ao limitar a inflamação, permite que o tecido danificado comece mais cedo os estágios posteriores da cicatrização. A falta de proliferação e migração de fibroblastos levará ao comprometimento da cicatrização da ferida. Assim, a presença de fibroblastos no local da lesão é necessária para uma cicatrização desimpedida. A curcumina regula positivamente a infiltração de fibroblastos nos locais da ferida (Chaushu et al., 2021). Feridas de animais tratados com curcumina mostraram reepitelização precoce, neovascularização melhorada, aumento da migração de várias células, incluindo fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos para o leito da ferida, e um maior teor de colágeno (Habiboallah et al., 2008).

O açaí apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiapoptóticos e promove a proliferação de fibroblastos (Felin et al., 2022). Kang e Kim (2018) aponta que o açaí pode prevenir a inflamação, promover a reepitelização e agir na síntese de colágeno. A suplementação de açaí pode ainda proteger contra danos oxidativos ao reduzir a formação de produtos da peroxidação lipídica, sugerindo assim um potencial efeito protetor promovido pelos antioxidantes presentes no açaí (Santos et al., 2022).

Devido aos dados apresentados acima e à falta de estudos a respeito do uso desses componentes para cicatrização de feridas palatinas na literatura, este estudo se propôs a avaliar e comparar os efeitos do tratamento com GNPs e AgNPs reduzidas pelo método de síntese verde com Curcumina (*Curcuma longa L.*) ou Açaí (*Euterpe oleracea*), em feridas palatinas de ratos Wistar, a um tratamento padrão comercial do tipo farmacológico (Omcilon®) e a um agente eletrofísico (fotobiomodulação).

Primeiramente avaliou-se o processo inflamatório das feridas palatinas por meio das citocinas pró e anti-inflamatórias. Células epiteliais em regiões inflamadas expressam citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL6, e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Essa liberação leva à ativação de células imunes que se acumulam nos locais inflamados e à produção e liberação de mais citocinas (Tetyczka et al., 2021; Sugawara et al., 2002). As reações pró-inflamatórias após a lesão tecidual são desencadeadas principalmente pela IL1, que está associada ao sistema imune inato e ao TNF-α, que está significativamente envolvido em todos os processos inflamatórios e sua liberação leva à vasodilatação, acompanhada de vermelhidão, inchaço e aumento da permeabilidade vascular (Tetyczka et al., 2021).

Assim, no presente estudo, pode-se claramente observar que as duas nanopartículas, ouro e prata, sintetizadas com curcumina e açaí, foram ambas capazes de reduzir o marcador pró-inflamatório TNF-α, enquanto que a IL1-β foi reduzida significativamente apenas pelas GNPs-Açaí e pelas AgNPs-Cur. Já em relação as citocinas anti-inflamatórias, avaliamos IL4 e o fator de crescimento TGF-β, que apresentaram aumento significativo em relação ao controle nos grupos AgNPs-Cur e GNPs-Açaí, indicando que essas terapias foram capazes de modular e acelerar o processo inflamatório, favorecendo a transição para a fase proliferativa.

O controle da superexpressão de citocinas como TNF-α pode ser útil na redução da dor e aceleração da cicatrização de úlceras orais em ratos, já que reduz a inflamação aguda (Freitas et al.,

2022). No caso das GNPs, essa ação anti-inflamatória pode estar associada aos seus efeitos anti-inflamatórios atribuídos a sua capacidade de supressão do NF-κB (Wang, Chang e Wu, 2018), já que se sabe que a inibição da ativação de NF-κB leva à regulação negativa da expressão de COX-2 e iNOS, suprimindo a resposta inflamatória (Karthikeyan, Senthil e Min, 2020). Outro mecanismo sugerido é a ligação direta de GNPs a IL1-β inibindo a ligação desta citocina ao seu receptor, como dito por Mendes et al. (2020), que utilizou nanopartículas de ouro na cicatrização de feridas, também obteve redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento das citocinas anti-inflamatórias, corroborando com o presente estudo.

Além disso, recentemente, no estudo realizado por Ni et al. (2019), foi demonstrado que as GNPs podem controlar a resposta inflamatória por meio da regulação dos fenótipos de macrófagos (M1 e M2) e, portanto, gerar um microambiente com níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias e maior número de citocinas anti-inflamatórias (Mendes et al., 2022).

Wang et al. (2018) sintetizaram nanopartículas lipídicas sólidas de curcumina (Cur-SLNs) e aumentaram sua solubilidade em comparação com sua forma nativa e reduziram significativamente os mediadores pró-inflamatórios através da obstrução da ativação de NF-κB, demonstrando a atividade anti-inflamatória dessa molécula.

Estudos *in vitro* mostraram que o extrato de *Euterpe oleracea* causa *downregulation* no NF-κB e em seus genes-alvo, como TNF-α, IL6, IL8 e IL-1β, e pode aumentar a secreção de IL3, IL4, IL14 e IFN-γ (Dos Santos et al., 2022; de Oliveira et al., 2021; Brito et al., 2016).

De acordo com o estudo de Chenghui et al. (2011), camundongos que foram alimentados com suco de açaí seco em pó por 20 semanas, apresentaram menores níveis de IL6 e TNF-α no soro, sendo que o açaí não apenas reduziu os níveis basais dessas duas citocinas pró-inflamatórias, como também aumentou a resistência de secreção dessas duas citocinas pelos macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios. Os resultados também sugerem que o tratamento com açaí reduziu a ativação do NF-κB, o que pode ser parcialmente explicado pelo nível reduzido de TNF-α, que também participa da ativação de NF-κB.

Destacando agora os impactos das nanopartículas de prata, os resultados do presente estudo corroboram com o estudo de Simon et al. (2022), que demonstra uma resposta anti-inflamatória das AgNPs durante a cicatrização de feridas, modulando as expressões de vários genes de resposta inflamatória *in vitro*, como TNF-α e IL1, assim como no estudo de Aparna, Seethalakshmi e Gopal (2015), AgNPs sintetizadas de forma verde também inibiram seletivamente a expressão de IL-1β e IL-6, sugerindo sua forte atividade anti-inflamatória.

No estudo de Song et al. (2019), AgNPs sintetizadas com curcumina apresentaram melhores propriedades, resultado de um efeito sinérgico entre nanopartículas de prata e curcumina, com aumento da liberação de Ag+ na presença de curcumina. A grande área de superfície de AgNPs permite que estas estejam em melhor contato com microorganismos e, portanto, possuam boa capacidade antibacteriana mesmo em concentrações mais baixas. Quando AgNPs entram em um patógeno, a partícula libera íons de prata, matando-o. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antibacteriana das AgNPs, tais como o papel dos agentes de revestimento de superfície, geração de espécies reativas de oxigênio e estresse liberado por íons Ag+.

No processo de reparo, a fase inflamatória é acompanhada por extensa fagocitose, aumento do consumo de oxigênio e disfunção mitocondrial, o que favorece a formação de EROs e possibilita um estado de estresse oxidativo, que leva a uma retardação do processo de reparo. Devido a isso, neste trabalho avaliou-se parâmetros de oxidantes e atividade antioxidante. Tanto GNPs-Açaí quanto AgNPs-Cur foram capazes de reduzir ambos os marcadores oxidantes, DCF e nitrito, quando comparadas ao controle, enquanto que AgNPs-Açaí também reduziram nitrito.

Segundo Elsilk et al. (2022), as AgNPs podem ser essenciais para minimizar os efeitos adversos da formação excessiva de NO no corpo humano, uma vez que podem reduzir sua produção. Além disso, a atividade de eliminação pode obstruir a série de efeitos negativos causados pela criação excessiva de NO, como aumento da permeabilidade vascular, desnaturação de proteínas e alteração da membrana são apenas alguns dos muitos processos que contribuem para a inflamação. Estudos indicam também que as AgNPs têm efeitos anti-inflamatórios prevenindo a desnaturação de proteínas e usando óxido nítrico para eliminar os radicais livres.

Um benefício da *Euterpe oleracea* (açaí) é a capacidade de modular a expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), reduzindo a resposta inflamatória, além da ação sequestradora de radicais livres e do aumento da produção e atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, GPx e catalase, que ajudam a reduzir EROs (Dos Santos et al., 2022).

A ação antioxidante da suplementação de açaí também foi examinada em alguns estudos *in vivo* realizados em ratos. As proteínas carboniladas e as concentrações séricas dos grupos sulfidrila total, livre e proteica foram reduzidas após 6 semanas de ingestão de açaí em ratos (Pala et al., 2018).

Sistemicamente, a suplementação de açaí demonstrou influenciar na prevenção do dano oxidativo por mecanismo direto (Barbosa et al., 2021) e impacto positivo na atividade das enzimas antioxidantes séricas (de Liz et al., 2020). A suplementação de açaí protege contra os danos oxidativos reduzindo a formação de produtos da peroxidação lipídica, sugerindo assim um potencial efeito protetor promovido pelos antioxidantes presentes no açaí (Dos Santos et al., 2022).

Estudos revelam o papel efetivo dos GNPs como agente antioxidante por inibir a formação de EROs, ter função *scavenger* (neutralizar os radicais livres) e potencializar a ação de enzimas antioxidantes (Mendes et al., 2020). Li et al. (2012) demonstra também que as GNPs aumentam os níveis de NRF2, que induz a sinalização de genes antioxidantes, em um estudo de células endoteliais. Esse aumento foi causado pela ação de GNPs afetando as ligações tiol de KEAP1, e assim, alterando sua conformação e liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, contribuindo para o efeito antioxidante.

A síntese verde de nanopartículas foi desenvolvida para superar as desvantagens do método químico convencional que utilizava agentes redutores e de cobertura tóxicos. O estudo de Adlia et al. (2018) provou que a conjugação de curcumina com nanopartículas de ouro não afetou a atividade antioxidante da curcumina; isso ocorre porque a partícula de ouro também possui atividade antioxidante. Shaabani et al. (2017) mostra que a atividade antioxidante de GNPs sintetizadas com curcumina foi inclusive maior do que as nanopartículas de ouro sintetizadas com outro agente redutor.

A atividade antioxidante de GNPs sintetizadas de forma verde pode ser aumentada pela interação entre íons metálicos e fitoquímicos durante a formação das nanopartículas, por meio de

interações eletrostáticas. Outro fator que impacta na sua atividade antioxidante é a dose (Paiva-Santos, 2021); estudos já demonstraram que o potencial de toxicidade das GNPs está intimamente relacionado à dose, tamanho, concentração e tempo de exposição. Quanto menor o seu tamanho, maior a área de interação e maior a toxicidade. No estudo de Muller et al. (2017) os autores demonstraram que GNPs com tamanho de 20nm, na concentração de 2,5mg/mL por 21 dias, apresentaram potenciais benefícios terapêuticos sem toxicidade.

De acordo com Sathyabhama et al. (2022), a ação antioxidante da curcumina se dá por meio do aumento do efeito da SOD, GSH e catalase, o que reduz o estresse oxidativo mitocondrial. A administração de curcumina pode inativar quinases sensíveis ao estresse, eliminando os radicais livres, o que pode prevenir significativamente o dano celular. A curcumina possui grupos funcionais fenólicos e β-dicetonas, o que a ajuda a ser um antioxidante e eliminador de radicais livres. A capacidade da curcumina de penetrar nas mitocôndrias protege contra danos oxidativos e previne a disfunção mitocondrial. Além disso, a curcumina reduz a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e evita danos ao DNA e às proteínas. Em nível enzimático, a curcumina reduz a produção de EROs pelas enzimas.

Após o processo inflamatório que se dá até o reparo completo de uma ferida, espera-se que o local reparado seja reestabelecido à condição anatômica normal, assim como ao seu nível de funcionalidade. O colágeno é o principal elemento que fornece os tecidos conjuntivos com integridade e desempenha um papel importante no suporte de carga (Fratzl et al., 1999). Assim, como proteção contra estímulos externos e para fornecer uma plataforma para a reepitelização, a regeneração do colágeno após a lesão é um processo essencial (Kwan et al., 2011). Por este motivo, neste trabalho avaliamos por análise histológica a estrutura do tecido remodelado, marcando especificamente a quantidade de células inflamatórias e a área de colágeno.

Assim como nos estudos realizados por BinShabaib et al. (2022), Ning et al. (2022) e Pona et al. (2018), onde houve um estímulo à deposição de colágeno, epitelização e contração de feridas quando avaliados os efeitos dos extratos de *Euterpe oleracea* e Curcuma longa no processo de cicatrização, o presente estudo obteve como resultado um aumento significativo da área de colágeno pelas GNPs-Açaí e AgNPs-Cur. Além disso, GNPs-Cur, AgNPs-Cur e AgNPs-Açaí foram também capazes de reduzir significativamente o infiltrado inflamatório em relação ao controle, resultado este que está de acordo com a diminuição das citocinas pró-inflamatórias também vista neste estudo.

As células inflamatórias diminuídas podem ter reduzido a inflamação da mucosa oral. A inflamação suprimida e a reepitelização mais rápida levarão a uma contração mais rápida da ferida. Um fator candidato que pode estar envolvido na redução da inflamação em feridas orais é o inibidor de protease leucocitária secretora, um fator anti-inflamatório encontrado na mucosa (Ashcroft et al., 2000).

Raghuwanshi et al. (2017) obteve resultado similar ao estudar os efeitos de nanopartículas de ouro de Woodfordia fruticosa na prevenção da adesão microbiana e na aceleração da cicatrização de feridas em ratos Wistar, demonstrando que as GNPs foram capazes de regular a deposição de colágeno, organizar a matriz extracelular e gerar vasos sanguíneos, levando à rápida cicatrização e fechamento da ferida – assim como, no presente trabalho, foi avaliada a taxa de contração da ferida, e pudemos observar que as GNPs-Açaí, AgNPs-Cur e AgNP-Açaí foram capazes de promover a cicatrização fazendo com que a ferida se contraísse.

A contração da ferida neste caso é essencial para a redução da exposição da ferida a traumas constantes e bactérias, que são características do ambiente oral. Esta contração minimiza a área aberta puxando o tecido vizinho em direção ao centro da ferida. Os miofibroblastos, que surgem por diferenciação dos fibroblastos, geram a força contrátil pela qual a área da ferida se contrai durante a cicatrização da ferida (Feugate et al., 2002). Porém, um equilíbrio deve ser mantido, pois por mais que a contração da ferida seja benéfica por levar ao fechamento desta, do outro lado uma ação excessiva pode resultar em cicatrizes indesejadas (Chitturi et al., 2015).

O TGF-β, fator de crescimento que também apresentou aumento significativo no presente trabalho, desempenha um papel importante na diferenciação de miofibroblastos maduros, pois ele não apenas aumenta a expressão de α-SMA, que é um componente importante dos miofibroblastos maduros, mas também aumenta a montagem das fibras de estresse necessárias para gerar a tensão mecânica e a expressão de fibronectina (Chitturi et al., 2015).

A diferenciação de fibroblastos e a produção de colágeno podem ser o fator que contribui para as características de cicatrização de feridas acima mencionadas. Estudos *in vitro* mostraram que os fibroblastos orais possuem uma maior capacidade de fazer com que uma rede de colágeno se contraia do que fibroblastos dérmicos. No mesmo modelo *in vitro*, os fibroblastos orais produziram níveis mais altos de metaloproteinase-2 de matriz (MMP-2) (Stephens et al., 2001).

Os resultados também deste estudo corroboram com os de Liu et al. (2010), que demonstra que as AgNPs promovem a proliferação e migração de queratinócitos da borda da ferida em direção ao centro da ferida e podem de fato estimular a maturação celular e também promover a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos durante a cicatrização. Parece que tanto a reepitelização quanto a contração da ferida são aumentadas pelos respectivos efeitos diferenciais da prata nos queratinócitos e fibroblastos.

Ratificando nossos resultados, Kang e Kim (2018) mostram em seu estudo que a inflamação foi recuperada na mucosa oral do grupo em que foi aplicado açaí, assim como houve maior produção e concentração de colágeno, indicando que o açaí pode prevenir a inflamação da ferida na mucosa oral e promover a reepitelização. Além disso, pode ajudar na regeneração da mucosa e na síntese de colágeno no momento da remodelação.

Kwan et al. (2011) relataram que as AgNPs funcionam de forma eficaz na cicatrização de feridas, demonstrando melhor alinhamento do colágeno após a cicatrização quando comparado ao controle, e postulando que esse efeito é alcançado pela capacidade das AgNPs de regular a deposição de colágeno e inibir seu crescimento descontrolado, além de direcionar seu alinhamento e arranjo espacial adequados da matriz. Isso pode ser alcançado através de uma diferenciação regulada de fibroblastos e produção de colágeno.

Evidências sugerem que a curcumina desempenha um papel positivo na proteção contra a fibrose por meio da modulação de diferentes vias moleculares, por meio da atuação em uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e seus receptores relacionados, além de ser capaz de mediar a inibição da ativação de NF-κB e infiltração de macrófagos e a regulação negativa de marcadores inflamatórios como TNF-α, IL1 e IL6 (Gorabi et al., 2020). Acreditamos que os efeitos da curcumina tenham sido potencializados quando associada as GNPs e AgNPs.

Como desfecho ainda podemos apresentar os resultados da análise macroscópica feita no presente trabalho com o intuito de verificar e registrar a percepção visual do processo inflamatório, onde foi visto resultado significativo apenas nas feridas tratadas com GNPs-Açaí, que tiveram uma qualificação visual melhorada, com aparente redução do tamanho da ferida e do grau de inflamação e formação de tecido necrótico. Pode-se relacionar estes resultados com os de Weinberg et al. (2020), que avaliou macroscopicamente o padrão dimensional relacionado ao tempo de fechamento de ferida palatina excisional em ratos, e obteve uma diminuição macroscópica das dimensões da ferida de maneira temporal, o que pode ser explicado, assim como no presente estudo, por uma aceleração da reação inflamatória e atividade dos miofibroblastos.

Os resultados da análise macroscópica do presente estudo também vão de encontro aos de taxa de contração de ferida obtidos nesse trabalho, já que o grupo GNPs-Açaí conseguiu satisfatoriamente aumentar essa taxa, o que se pode explicar pelo concomitante aumento significativo da área de colágeno e aumento ainda mais significativo do fator de crescimento TGF-β, representando o potencial desta citocina de levar à reepitelização. Van Beurden et al. (2005) ressalta que o TGF-β tem um papel bifásico durante a cicatrização de feridas palatinas, já que no início da cicatrização estimula a diferenciação de miofibroblastos e após a reepitelização, estimula a apoptose dos miofibroblastos.

Correlacionando os resultados histológicos, de contração da ferida e da análise microscópica, percebe-se que apenas os grupos tratados com açaí tiveram resultado satisfatório em todos esses parâmetros. Pensa-se que é possível que esta substância tenha algum mecanismo que a possibilite apresentar melhores resultados visuais do que a nível bioquímico, já que na análise histológica, quando associada à GNP, aumentou significativamente a área de colágeno, porém não foi capaz de diminuir significativamente o infiltrado inflamatório.

No estudo de Kang e Kim (2018), o extrato aquoso de açaí reduziu significativamente a área de ferida cirúrgica realizado no dorso dos animais, mostrando um efeito de cicatrização de feridas significativamente potente *in vivo* com base na observação macroscópica e histológica. No entanto, de acordo com os mesmos autores ainda pouco se sabe sobre o efeito cicatrizante do açaí ou seus mecanismos de ação.

Já a curcumina, foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório tanto quando associada as GNPs quanto as AgNPs, indicando seu forte efeito anti-inflamatório. Ressalta-se também que a curcumina quando associada as GNPs, esteve próxima a aumentar a área de colágeno, embora este resultado não tenha sido significativo; porém, já quando associada as AgNPs, obteve um resultado muito mais significativo em aumentar o colágeno do que o resultado obtido com o açaí, nos levando à hipótese de que essas moléculas possam ter uma melhor ligação entre si e, assim, capacidade de combinar seus efeitos de forma mais eficaz. Maghimaa e Alharbi (2020) em sua pesquisa sintetizaram AgNPs com curcumina e essa ligação exibiu uma importante migração de fibroblastos, resultando em uma melhora considerável na velocidade da cicatrização de feridas. O encapsulamento da curcumina em uma nanopartícula parece ser um meio viável e vantajoso de viabilizar sua entrega (Krausz et al., 2015).

É importante ressaltar que a microbiota oral desempenha um papel dual tanto de recuperação de feridas quanto de danos orais (Vanlancker et al., 2018). As lesões em mucosa oral apesar de sofrerem um processo cicatricial relativamente breve em relação à pele ainda assim pode resultar em respostas

inflamatórias que dificultam o processo de regeneração. Os atuais modelos de tratamento disponíveis no mercado, como por exemplo as intervenções com a “fotobiomodulação” e utilização tópica de corticosteroides sintéticos, não são efetivos.

As lesões por menores que sejam são dolorosas, dificultam a mastigação, a ingestão de alimentos e a comunicação. O presente estudo apontou que o tratamento tópico com nanopartículas sintetizadas de forma verde, GNPs-Açaí e AgNPs-Cur, são potenciais recursos para recuperação de feridas cirúrgicas palatinas e para o tratamento de lesões de mucosa oral (como úlceras), prevenindo respostas inflamatórias excessivas e facilitando o processo de cicatrização das feridas.

Acreditamos que, tomados em conjunto, com os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e de reepitelização das GNPs e do açaí, foi possível que essas substâncias associadas apresentassem resultados estatisticamente mais significativos do que os outros tratamentos abordados, assim como é possível afirmar que o proposto tratamento apresenta melhor eficiência quando comparado aos tratamentos padrão utilizados na prática clínica.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que as terapias propostas de GNPs e AgNPs sintetizadas de forma verde com seus efeitos associados com os das plantas, favorece o processo de reparo tecidual em ferida oral da mucosa palatina.

Os achados sugerem uma opção mais eficaz do que os tratamentos padrão utilizados na prática clínica, visto que ocorreu redução de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias, atenuação do estresse oxidativo, aumento da área de colágeno e aumento da taxa de contração da ferida, além de uma melhora do grau de inflamação de forma visual, indicando que os tratamentos, principalmente GNPs-Açaí, que se apresentou estatisticamente mais significativo, podem reduzir a resposta inflamatória aguda e promover o início do reparo tecidual.

Entretanto, estudos futuros são necessários para avaliar outros mecanismos envolvidos no reparo do tecido palatino e também o uso dessas terapias em outros modelos experimentais da mucosa oral.

REFERÊNCIAS

Abou Neel EA, Bozec L, Perez RA, Kim HW, Knowles JC. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. Int J Nanomedicine. 2015;10:6371-94.

Adlia A, Tomagola I, Damayanti S, Mulya A, Rachmawati H. Antifibrotic Activity and In Ovo Toxicity Study of Liver-Targeted Curcumin-Gold Nanoparticle. Sci Pharm. 2018;86(4):E41.

Akhtar MS, Panwar J, Yun YS. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. ACS Sustain. Chem. Eng. 2013;1(6):591–602.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2001;302(2):141-5.

Alahmad A, Al-Zereini WA, Hijazin TJ, Al-Madanat OY, Alghoraibi I, Al-Qaralleh O, et al. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Hypericum perforatum L. Aqueous Extract with the Evaluation of Its Antibacterial Activity against Clinical and Food Pathogens. Pharmaceutics. 2022;14(5):1104.

Alsareii SA, Manaa AA, AlAsmari MY, Bawahab MA, Mahnashi MH, Shaikh IA, Shettar AK, Hoskeri JH, Kumbar V. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from Rhizophora apiculata and Studies on Their Wound Healing, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activity. Molecules. 2022;27(19):6306.

Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus RA, Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee PJCSR. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2943-70.

Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. Nat Med. 2000;6(10):1147-53.

Asif M, Yasmin R, Asif R, Ambreen A, Mustafa M, Umbreen S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and their Antibacterial Potential. Dose Response. 2022;20(1):15593258221088709.

Balkrishna A, Kumar A, Arya V, Rohela A, Verma R, Nepovimova E, Krejcar O, Kumar D, Thakur N, Kuca K. Phytoantioxidant Functionalized Nanoparticles: A Green Approach to Combat Nanoparticle-Induced Oxidative Stress. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021:3155962.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal. 2006;32:279-312.

Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. Indian J Dent Res. 2010;4:575-8.

Bapat RA, Chaubal TV, Dharmadhikari S, Abdulla AM, Bapat P, Alexander A, Dubey SK, Kesharwani P. Recent advances of gold nanoparticles as biomaterial in dentistry. Int J Pharm. 2020;586:119596.

Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, Chaubal TV, Pandurangappa R, Jnanendrappa N, Gorain B, Khurana S, Kesharwani P. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. Drug Discov. Today. 2019;24(1):85-98.

Barbosa PO, Souza MO, Silva MPS, Santos GT, Silva ME, Bermano G, Freitas RN. Açaí (Euterpe oleracea Martius) supplementation improves oxidative stress biomarkers in liver tissue of dams fed a high-fat diet and increases antioxidant enzymes' gene expression in offspring. Biomed Pharmacother. 2021;139:111627.

Baron J, M, Glatz M, Proksch E. Optimal Support of Wound Healing: New Insights. Dermatology. 2020;236:593-600.

Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. Br. Med. J. 2002;324(7344):1018-22.

Bhattacharya R, Mukherjee PJAddr. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. 2008;60(11):1289-306.

BinShabaib MS, ALHarthi SS, Helaby BS, AlHefdhi MH, Mohammed AE, Aabed K. Comparison of the Anti-bacterial Efficacy of Saussurea costus and Melaleuca alternifolia Against Porphyromonas gingivalis, Streptococcus mutans, and Enterococcus faecalis: An in-vitro Study. Front Oral Health. 2022;3:950840.

Brito C, Stavroullakis AT, Ferreira AC, Li K, Oliveira T, Nogueira-Filho G, Prakki A. Extract of acai-berry inhibits osteoclast differentiation and activity. Arch Oral Biol. 2016;68:29-34.

Bruce AJ, Rogers RS 3rd. Acute oral ulcers. Dermatol Clin. 2003;21(1):1-15.

Buranasukhon W, Athikomkulchai S, Tadtong S, Chittasupho C. Wound healing activity of Pluchea indica leaf extract in oral mucosal cell line and oral spray formulation containing nanoparticles of the extract. Pharm Biol. 2017;55(1):1767-74.

Callegari-Jacques SM. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Campanili TCGF, Santos VLCG, Strazzieri-Pulido KC, Thomaz PBM, Nogueira PC. Incidência de úlceras por pressão em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva Cardiopneumológica. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 2015;49:7-14.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. Biomater Sci. 2004;25(5):843-50.

Chaushu L, Rahmanov Gavrielov M, Chaushu G, Vered M. Palatal Wound Healing with Primary Intention in a Rat Model-Histology and Immunohistomorphometry. Medicina (Kaunas). 2020;56(4):200.

Chaushu L, Rahmanov Gavrielov M, Chaushu G, Zar K, Vered M. Curcumin Promotes Primary Oral Wound Healing in a Rat Model. J Med Food. 2021;24(4):422-30.

Chen CC, Tsai TH, Huang ZR, Fang JY. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics. Eur J Pharm Biopharm. 2010;74(3):474-82.

Chitturi RT, Balasubramaniam AM, Parameswar RA, Kesavan G, Haris KT, Mohideen K. The role of myofibroblasts in wound healing, contraction and its clinical implications in cleft palate repair. J Int Oral Health. 2015;7(3):75-80.

Choudhury, H., Zakaria, N.F.B., Tilang, P.A.B., Tzeyung, A.S., Pandey, M., Chatterjee, B., Alhakamy, N.A., Bhattamishra, S.K., Kesharwani, P., Gorain, B., Md, S., Formulation development and evaluation of rotigotine mucoadhesive nanoemulsion for intranasal delivery. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2019;54:1773-2247.

Corrêa MEAB, Dos Santos Haupenthal DP, Mendes C, Zaccaron RP, de Roch Casagrande L, Venturini LM, Porto GD, Bittencourt JVS, de Souza Silva JI, de Sousa Mariano S, de Andrade TAM, Silveira PCL. Effects of Percutaneous Collagen Induction Therapy Associated with Hyaluronic Acid on Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Collagen Production. Inflammation. 2020;43(6):2232-2244.

Corrêa MEAB, Mendes C, Bittencourt JVS, Takejima A, de Souza IC, de Carvalho SCD, Orlandini IG, de Andrade TAM, Guarita-Souza LC, Silveira PCL. Effects of the Application of Decellularized Amniotic Membrane Solubilized with Hyaluronic Acid on Wound Healing. Ann Biomed Eng. 2022.

Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. Chem Biol Drug Des. 2013;81(1):136-47.

Cueva MA, Boltchi FE, Hallmon WW, Nunn ME, Rivera-Hidalgo F, Rees T. A comparative study of coronally advanced fl aps with and without the addition of enamel matrix derivative in the treatment of marginal tissue recession. J Periodontol. 2004;75(7):949-56.

Dabbagh, A., Hayaty, N., Kasim, A., Bakri, M.M., Wakily, H., Ramasindarum, C., Johan, B., Abdullah, J., Polyethylene-glycol coated maghemite nanoparticles for treatment of dental hypersensitivity. Mater. Lett. 2014;121:89–92.

D'Agostino A, Stellavato A, Busico T, Papa A, Tirino V, Papaccio G, La Gatta A, Rosa M, Schiraldi C. In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HÁ complexes. BMC Cell Biol. 2015;11(16):19.

Das S, Chaudhury A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. AAPS PharmSciTech. 2011;12:62-76.

de Liz S, Cardoso AL, Copetti CLK, Hinnig PF, Vieira FGK, da Silva EL, Schulz M, Fett R, Micke GA, Di Pietro PF. Açaí (Euterpe oleracea Mart.) and juçara (Euterpe edulis Mart.) juices improved HDL-c levels and antioxidant defense of healthy adults in a 4-week randomized cross-over study. Clin Nutr. 2020;39(12):3629-36.

de Oliveira AC, Miyagawa LM, Monteiro KM, Dias ALS, Longato GB, Spindola H, Vendramini-Costa DB, QuetinLeclercq J, Carvalho JE, Rogez H. Phenolic composition, antiproliferative and antiulcerogenic activities of a polyphenol-rich purified extract from açaí (Euterpe oleracea) fruits. Int. J. Food Sci. Technol. 2021;56:6626–34.

Ding Q, Cui J, Shen H, He C, Wang X, Shen SGF, Lin K. Advances of nanomaterial applications in oral and maxillofacial tissue regeneration and disease treatment. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2020;13(2):81669.

Dong J, Sulik KK, Chen, S. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. Toxicol Lett. 2010;193(1):94-100.

Dos Santos VRN, Frazão DR, Ferreira RO, Mendes PFS, Baia-da-Silva DC, Souza-Monteiro D, Bittencourt LO, de Moura JDM, Perdigão JM, Teixeira BJB, Varela ELP, Balbinot GS, Percário S, Rogez H, Rösing CK, Collares FM, Lima RR. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Attenuates Oxidative Stress and Alveolar Bone Damage in Experimental Periodontitis in Rats. Antioxidants (Basel). 2022;11(10):1902.

El-Aassar MR, Ibrahim OM, Fouda MMG, El-Beheri NG, Agwa MM. Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/Hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: In-vitro and in-vivo studies. Carbohydr Polym. 2020;238:116175.

Elsilk SE, Khalil MA, Aboshady TA, Alsalmi FA, Ali SS. Streptomyces rochei MS-37 as a Novel Marine Actinobacterium for Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Biomedical Applications. Molecules. 2022;27(21):7296.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. Sci Transl Med. 2014;6(265):265sr6.

Fan Y, Wu W, Lei Y, Gaucher C, Pei S, Zhang J, Xia X. Edaravone-Loaded Alginate-Based Nanocomposite Hydrogel Accelerated Chronic Wound Healing in Diabetic Mice. Mar Drugs. 2019;17(5):285.

Felin FD, Maia-Ribeiro EA, Felin CD, Bonotto NAC, Turra BO, Roggia I, Azzolin VF, Teixeira CF, Mastella MH, de Freitas CR, Greijanim J, Santos D, Flores EMM, Barbisan F, Cruz IBM, Ribeiro TA. Amazonian Guarana- and Açai-Conjugated Extracts Improve Scratched Fibroblast Healing and Eisenia fetida Surgical Tail Amputation by Modulating Oxidative Metabolism. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:3094362.

Fernandes GL, Delbem ACB. Nanosynthesis of Silver-Calcium Glycerophosphate: Promising Association against Oral Pathogens. Antibiotics (Basel). 2018;7:52.

Feugate JE, Li Q, Wong L, Martins-Green M. The cxc chemokine cCAF stimulates differentiation of fibroblasts into myofibroblasts and accelerates wound closure. J Cell Biol. 2002;156(1):161-172.

Field AP. Discovering statistics using SPSS. Los Angeles: Sage, 2009.

Flohé L, Gunzler W. Assay of glutatione peroxidase. Methods in Enzymology.1984;05:114-21.

Fratzl P, Misof K, Zizak I, Rapp G, Amenitsch H, Bernstorff S. Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. J Struct Biol 1998;122:119-22.

Freitas MO, Fonseca APR, de Aguiar MT. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) blockage reduces acute inflammation and delayed wound healing in oral ulcer of rats. Inflammopharmacol. 2022 Oct;30(5):1781-98.

Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2003;32:358–66.

Gao Y, Sun Y, Yang H, Qiu P, Cong Z, Zou Y, Song L, Guo J, Anastassiades TP. A Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Derivative Accelerates Excisional Wound Healing by Modulating Pro-Inflammation, Promoting Epithelialization and Neovascularization, and Remodeling Collagen. Int J Mol Sci. 2019;20(15):3722.

Glim JE, Everts V, Niessen FB, Ulrich MM, Beelen RH. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin. Arch Oral Biol. 2014;59(10):1048-55.

Gorabi AM, Hajighasemi S, Kiaie N, Rosano GMC, Sathyapalan T, Al-Rasadi K, Sahebkar A. Anti-fibrotic effects of curcumin and some of its analogues in the heart. Heart Fail Rev. 2020;25(5):731-43.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. J Pharm Biomed Anal. 2007; 43(2):619-624.

Guex N, Peitsch MCJ. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. 1997;18(15):2714-23.

Habiboallah G, Nasroallah S, Mahdi Z, Nasser MS, Massoud Z, Ehsan BN, Mina ZJ, Heidar P. Histological evaluation of Curcuma longa-ghee formulation and hyaluronic acid on gingival healing in dog. J Ethnopharmacol. 2008;120(3):335-41.

Hamdan S, Pastar I, Drakulich S, Dikici E, Tomic-Canic M, Deo S, Daunert S. Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. ACS Cent Sci. 2017;3(3):163-75.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 1976; 74(1):214-226.

Huguet-Casquero A, Xu Y, Gainza E, Pedraz JL, Beloqui A. Oral delivery of oleuropein-loaded lipid nanocarriers alleviates inflammation and oxidative stress in acute colitis. Int. J. Pharm. 2020;586:119515.

IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Tutihashi RMC, Ferreira MC. Alterações no processo de reparo fisiológico. Rev Bras Queimaduras. 2011;10(2):61-65.

Jeong, Su Ji, Shim, Hee Ryung, Lee, Ji-Soo, Nam, Hee-Sup, Lee, Hyeon Gyu. Antioxidant and Synergistic Activities of Fruit and Vegetable Concentrates. Korean Journal of Food Science and Technology [Internet]. 2015;47(2):240–5.

Kambale EK, Nkanga CI, Mutonkole BI, Bapolisi AM, Tassa DO, Liesse JI, Krause RWM, Memvanga PB. Green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using aqueous leaf extracts from three Congolese plant species (Brillantaisia patula, Crossopteryx febrifuga and Senna siamea). Heliyon. 2020 Aug 5;6(8):e04493.

Kang MH, Choi S, Kim BH. Skin Wound Healing Effects and Action Mechanism of Acai Berry Water Extracts. Toxicol Res. 2017;33(2):149-156.

Kang MH, Kim BH. Oral Wound Healing Effects of Acai Berry Water Extracts in Rat Oral Mucosa. Toxicol Res. 2018;34(2):97-102.

Karthikeyan A, Senthil N, Min T. Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. Front Pharmacol. 2020;11:487.

Kavitha KS, Baker S, Rakshith D, Kavitha HU, Yashwantha HC, Harini BP, Satish S. Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. Int. Res. J. Biol. 2013;2:66–76.

Kesharwani, P., Choudhury, H., Meher, J.G., Pandey, M., Gorain, B. Dendrimerentrapped gold nanoparticles as promising nanocarriers for anticancer therapeutics and imaging. Prog. Mater. Sci. 2019;103:484-508.

Khan, S.U.; Saleh, T.A.; Wahab, A.; Khan, M.H.U.; Khan, D.; Khan, W.U.; Rahim, A.; Kamal, S.; Khan, F.U.; Fahad, S. Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. Int. J. Nanomed. 2018;13:733–62.

Khosropanah MH, Dinarvand A, Nezhadhosseini A, Haghighi A, Hashemi S, Nirouzad F, Khatamsaz S, Entezari M, Hashemi M, Dehghani H. Analysis of the Antiproliferative Effects of Curcumin and Nanocurcumin in MDA-MB231 as a Breast Cancer Cell Line. Iran J Pharm Res. 2016;15(1):231-9.

Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, Chandra D, Liang H, Gunther L, Clendaniel A, Harper S, Friedman JM, Nosanchuk JD, Friedman AJ. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. Nanomedicine. 2015;11(1):195-206.

Krishnaraj C, Muthukumaran P, Ramachandran R, Balakumaran MD, Kalaichelvan PT. Acalypha indica Linn: Biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles and their cytotoxic effects against MDA-MB-231, human breast cancer cells. Biotechnol Rep (Amst). 2014;4:42-49.

Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. Front Physiol. 2018;9:419.

Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins, Patologia Básica. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

Kwan KH, Liu X, To MK, Yeung KW, Ho CM, Wong KK. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. Nanomedicine. 2011;7(4):497-504.

Lawrence, WT. Physiology of the acute wound. Clinics in Plastic Surgery. 1998;25(3):321–40.

Leoni G, Neumann P-A, Sumagin R, Denning T L, Nusrat A: Wound repair: Role of immune–epithelial interactions. Mucosal Immunol. 2015;8:959–68.

Lesk AM. Introdução à Bioinformática. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2008.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990;186:464-78.

Li X, Xu H, Chen ZS, Chen, G. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. J. Nanomater. 2011:2011;270974.

Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. Wounds. 2016;28(3):78-88.

Liu X, Lee PY, Ho CM, Lui VC, Chen Y, Che CM, et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. ChemMedChem. 2010;5:468-75.

Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(5):1852-6.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

Machado RA, Schneider FS. Induction of Neutralizing Antibodies against Mutalysin-II from Lachesis muta muta Snake Venom Elicited by a Conformational B-cell Epitope Predicted by Blue Star Sting Data Base. Immunome Research. 2015;11(1).

Maghimaa M, Alharbi SA. Green synthesis of silver nanoparticles from Curcuma longa L. and coating on the cotton fabrics for antimicrobial applications and wound healing activity. J Photochem Photobiol B. 2020;204:111806.

Mak K, Manji A, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart DA, Larjava H, Häkkinen L. Scarless healing of oral mucosa is characterized by faster resolution of inflammation and control of myofibroblast action compared to skin wounds in the red Duroc pig model. J Dermatol Sci. 2009;56(3):168-80.

Mendes C, Thirupathi A, Zaccaron RP, Corrêa MEAB, Bittencourt JVS, Casagrande LdR, de Lima ACS, de Oliveira LL, de Andrade TAM, Gu Y, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. Microcurrent and Gold Nanoparticles Combined with Hyaluronic Acid Accelerates Wound Healing. Antioxidants. 2022; 11(11):2257.

Mendes C, Dos Santos Haupenthal DP, Zaccaron RP, de Bem Silveira G, Corrêa MEAB, de Roch Casagrande L, de Sousa Mariano S, de Souza Silva JI, de Andrade TAM, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. Effects of the Association between Photobiomodulation and Hyaluronic Acid Linked Gold Nanoparticles in Wound Healing. ACS Biomater Sci Eng. 2020;6(9):5132-44.

Merrifield RBJJ. The synthesis of biologically active peptides and proteins. 1969;210(7):1247-54.

McGuire MK, Scheyer ET. Xenogeneic collagen matrix with coronally advanced flap compared to connective tissue with coronally advanced fl ap for the treatment of dehiscence-type recession defects. J Periodontol. 2010;81(8):1108-17.

Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking interleukin-1β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. Diabetes. 2013;62(7):2579-87.

Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. Int J Pharm. 2002;242(1-2):121-8.

Muller AP, Ferreira GK, da Silva S, Nesi RT, de Bem Silveira G, Mendes C, Pinho RA, da Silva Paula MM, Silveira PCL. Safety protocol for the gold nanoparticles administration in rats. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;77:1145-50.

Neshich G, Rocchia W, Mancini AL, Yamagishi ME, Kuser PR, Fileto R et al. JavaProtein Dossier: a novel web-based data visualization tool for comprehensive analysis of protein structure. 2004;32:W595-W601.

Ni C, Zhou J, Kong N, Bian T, Zhang Y, Huang X, et al. Gold nanoparticles modulate the crosstalk between macrophages and periodontal ligament cells for periodontitis treatment. Biomaterials. 2019;206:115–32.

Ning S, Zang J, Zhang B, Feng X, Qiu F. Botanical Drugs in Traditional Chinese Medicine with Wound Healing Properties. Front Pharmacol. 2022;13:885484.

Paiva-Santos AC, Herdade AM, Guerra C, Peixoto D, Pereira-Silva M, Zeinali M, Mascarenhas-Melo F, Paranhos A, Veiga F. Plant-mediated green synthesis of metal-based nanoparticles for dermopharmaceutical and cosmetic applications. Int J Pharm. 2021;597:120311.

Pala D, Barbosa PO, Silva CT, de Souza MO, Freitas FR, Volp ACP, Maranhão RC, Freitas RN. Açai (Euterpe oleracea Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. Clin Nutr. 2018;37(2):618-23.

Pallaske F, Pallaske A, Herklotz K, Boese-Landgraf J. The significance of collagen dressings in wound management: a review. J Wound Care. 2018;27(10):692-702.

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. Int J Pharm. 2009;366(1-2):170-84.

Peralta-Videa JR, Huang Y, Parsons JG, Zhao L, Lopez-Moreno L, Hernandez-Viezcas JA, Gardea-Torresdey JL. PlantBased Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Scientific Curiosity or a Realistic Alternative to Chemical Synthesis? Nanotechnol. Environ. Eng. 2016;1(4).

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLOS Biology. 2020;18(7):e3000410.

Pinho RA, Haupenthal DP, Fauser PE, Thirupathi A, Silveira PCL. Gold Nanoparticle-Based Therapy for Muscle Inflammation and Oxidative Stress. J Inflamm Res. 2022;15:3219-3234

Politis C, Schoenaers J, Jacobs R, Agbaje JO. Wound Healing Problems in the Mouth. Front. Physiol. 2016;7:507.

Pona A, Cline A, Kolli SS, Taylor SL, Feldman SR. Review of future insights of Dragon's Blood in dermatology. Dermatol Ther. 2019;32(2):e12786.

Rath G, Hussain T, Chauhan G, Garg T, Goyal AK. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. J Drug Target. 2016;24(6):520-9.

Raghuwanshi N, Kumari P, Srivastava AK, Vashisth P, Yadav TC, Prasad R, Pruthi V. Synergistic effects of Woodfordia fruticosa gold nanoparticles in preventing microbial adhesion and accelerating wound healing in Wistar albino rats in vivo. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;80:252-62.

Reinke J, M, Sorg H: Wound Repair and Regeneration. Eur Surg Res. 2012;49:35-43.

Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. Mol Ther. 2006;(1):211-20.

Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol. 1993;234(3):779-815.

Salwowska NM, Bebenek KA, Żądło DA, Wcisło-Dziadecka DL. Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. J Cosmet Dermatol. 2016;15(4):520-6.

Santos AM. Técnicas de Bionformática aplicadas ao estudo de Poligalacturonases de fungos. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2012.

Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. J Clin Periodontol. 2009;36(10):868-76.

Sathyabhama M, Priya Dharshini LC, Karthikeyan A, Kalaiselvi S, Min T. The Credible Role of Curcumin in Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction in Mammals. Biomolecules. 2022;12(10):1405.

Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. Pharmacol Res. 2008;58(2):165-71.

Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. Front. Mol. Biosci. 2020;7:587997.

Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner. Aphthous and other common ulcers. Br Dent J. 2005;199(5):259-64.

Shaabani E, Amini SM, Kharrazi S, Tajerian R. Curcumin coated gold nanoparticles: Synthesis, characterization, cytotoxicity, antioxidant activity and its comparison with citrate coated gold nanoparticles. Nanomed J. 2017;4:115–25.

Shanmugam R, Subramaniam R, Kathirason SG, Ali D, Balusamy SR, Gurusamy A, Arunachalam K, Sellami H. Curcumin-Chitosan Nanocomposite Formulation Containing Pongamia pinnata-Mediated Silver Nanoparticles, Wound Pathogen Control, and Anti-Inflammatory Potential. Biomed Res Int. 2021;2021:3091587.

Shannon DB, McKeown ST, Lundy FT, Irwin CR. Phenotypic differences between oral and skin fibroblasts in wound contraction and growth factor expression. Wound Repair Regen. 2006;14(2):172-8.

Sharifiaghdam Z, Dalouchi F, Sharifiaghdam M, Shaabani E, Ramezani F, Nikbakht F, et al. Curcumin-coated gold nanoparticles attenuate doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating apoptosis in a mouse model. Clinical and experimental pharmacology & physiology. 2022;49(1):70-83.

Siddiqi KS, Husen A, Rao RA. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. J. Nanobiotechnology. 2018;16(14).

Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med. 1991;91(3C):31S-38S.

Simon S, Sibuyi NRS, Fadaka AO, Meyer S, Josephs J, Onani MO, Meyer M, Madiehe AM. Biomedical Applications of Plant Extract-Synthesized Silver Nanoparticles. Biomedicines. 2022;10(11):2792.

Singh S, Alrobaian MM, Molugulu N, Agrawal N, Numan A, Kesharwani P. Pyramid-Shaped PEG-PCL-PEG Polymeric-Based Model Systems for Site-Specific Drug Delivery of Vancomycin with Enhance Antibacterial Efficacy. ACS Omega. 2020;5(21):11935-45.

Song Z, Wu Y, Wang H, Han H. Synergistic antibacterial effects of curcumin modified silver nanoparticles through ROS-mediated pathways. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;99:255-63.

Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. J Endotoxin Res. 2002;8(6):465-8.

Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. J Dent Res. 2003;82(8):621-6.

Tamaki N, Orihuela-Campos RC, Fukui M, Ito HO. Hydrogen-Rich Water Intake Accelerates Oral Palatal Wound Healing via Activation of the Nrf2/Antioxidant Defense Pathways in a Rat Model. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:5679040.

Tetyczka C, Hartl S, Jeitler R, Absenger-Novak M, Meindl C, Fröhlich E, Riedl S, Zweytick D, Roblegg E. Cytokine-Mediated Inflammation in the Oral Cavity and Its Effect on Lipid Nanocarriers. Nanomaterials (Basel). 2021 May 18;11(5):1330. doi: 10.3390/nano11051330. PMID: 34070004; PMCID: PMC8157841.

Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. ChemMedChem 2007;2(1):129-36.

Tian Y, Chen W, Mo G, Chen R, Fang M, Yedid G, Yan X. An Immunosuppressant Peptide from the Hard Tick Amblyomma variegatum. Toxins (Basel). 2016;8(5):133.

Upadhyay A, Pillai S, Khayambashi P, Sabri H, Lee KT, Tarar M, Zhou S, Harb I, Tran SD. Biomimetic Aspects of Oral and Dentofacial Regeneration. Biomimetics (Basel). 2020;5(4):51.

van Beurden HE, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. J Dent Res. 2005;84(10):871-80.

Vanlancker E, Vanhoecke B, Sieprath T, Bourgeois J, Beterams A, De Moerloose B, De Vos WH, Van de Wiele T. Oral microbiota reduce wound healing capacity of epithelial monolayers, irrespective of the presence of 5-fluorouracil. Exp Biol Med (Maywood). 2018;243(4):350-60.

Vieira S. Bioestatística: tópicos avançados. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Wang J, Wu J, Li Y, Wen J, Cai J, Tang T, Hu X, Xiang D. The Brief Analysis of Peptide-combined Nanoparticle: Nanomedicine's Unique Value. Curr Protein Pept Sci. 2020;21(4):334-43.

Wang X, Chang J, Wu CJAMT. Bioactive inorganic/organic nanocomposites for wound healing. 2018;11:308-19.

Wang W, Chen T, Xu H, Ren B, Cheng X, Qi R, Liu H, Wang Y, Yan L, Chen S, Yang Q, Chen C. Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Enhanced Anticancer Efficiency in Breast Cancer. Molecules. 2018;23(7):1578.

Weinberg E, Tagger-Green N, Lusthaus M, Vered M, Mijiritsky E, Chaushu L, Kolerman R. The Impact of Corticosteroid Administration at Different Time Points on Mucosal Wound Healing in Rats: An Experimental Pilot In Vivo Study. Biology (Basel). 2022;11(9):1309.

Weinberg E, Vered M, Atzil S, Chaushu G, Chaushu L. The dynamics of closure following excisional mid-palatal mucoperiosteal wound in a rat model. Clin Oral Investig. 2020;24(12):4385-93.

Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. J Control Release. 1997;48(2–3):223–36.

Xiong J, Matta FV, Grace M, Lila MA, Ward NI, Felipe-Sotelo M, Esposito D. Phenolic content, anti-inflammatory properties, and dermal wound repair properties of industrially processed and non-processed acai from the Brazilian Amazon. Food Funct. 2020;11(6):4903-4914.

Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y. CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. Histol Histopathol. 2002;17(3):945-50.

Zar JH. Biostatistical analysis. 5. ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice-Hall, 2010.

Zhang K, Cheng L, Imazato S, Antonucci JM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Bai Y, Xu HHK. Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. J. Dent. 2013;41:464–74.

Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE, Bui HH, Buus S, Frankild S, Greenbaum JJN. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). 2008;36:W513-W518.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **19/04/2022**.

Título do projeto	Avaliação da biocompatibilidade e ação *in vivo* de um gel experimental à base de nanoparticulas lipídicas, ácido hialurônico e colágeno em um modelo de ferida palatina em ratos Wistar
Project title	Evaluation of the biocompatibility and *in vivo* action of an experimental gel based on lipid nanoparticles, hyaluronic acid and collagen in a palatal wound model in Wistar rats.
Número do protocolo **Protocol number**	81/2020 adendo
Pesquisador principal **Principal Investigator**	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores **Researchers**	Morgana Francisco Machado Guzzatti, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Laura de Roch Casagrande, Carolini Mendes, João Vitor Silvano Bittencourt, Lariani Tamires Witt Tietbohl, Ligia Milanez Venturini, Leandro Almeida da Silva, Rubya Pereira Zaccaron, Gustavo de Bem Silveira.
Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/10/2021 a 13/10/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	60 dias /250-300g
Número de animais	168 / masculino
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 19 de abril de 2022

Josiane Budni

Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

ANEXO B – DIRETRIZES ARRIVE 2.0

Os 10 itens essenciais

Estes itens são o mínimo a ser incluído em um manuscrito. Sem estas informações, leitores e revisores não serão capazes de avaliar a confiabilidade dos resultados.

Desenho do Estudo	1	Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo: a. Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado. b. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).
Tamanho da amostra	2	a. Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados. b. Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.
Critérios de inclusão e exclusão	3	a. Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente. b. Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente. c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.
Randomização	4	a. Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização. b. Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.
Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).
Desfechos	6	a. Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais). b. Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.
Métodos estatísticos	7	a. Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado. b. Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.
Animais experimentais	8	a. Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso. b. Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.
Procedimentos experimentais	9	Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo: a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado. b. Quando e com que frequência. c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimatação). d. Por quê (justifique os procedimentos).
Resultados	10	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: a. Estatísticas resumidas/descritivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude). b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.

Os itens recomendáveis

Estes itens complementam os 10 essenciais e adicionam contexto relevante ao estudo. Relatar os itens nos dois conjuntos representa a prática ideal.

Resumo	11	Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.
Embasamento científico	12	a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental. b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.
Objetivos	13	Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).
Declaração ética	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
Alojamento e manejo	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
Cuidados com animais e monitoramento	16	a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia. b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado. c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.
Interpretação / Implicações científicas	17	a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura. b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.
Aplicabilidade / tradução	18	Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).
Registro do Protocolo	19	Faça uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a pergunta do estudo, principais pontos do desenho experimental e plano de análise) foi preparado antes do estudo e, caso tenha sido, onde foi registrado.
Acesso aos dados	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
Declaração de interesses	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.

Diretrizes ARRIVE 2.0: diretrizes atualizadas para relato de pesquisas com animais. Originalmente publicado na *PLOS Biology*, Julho de 2020.

ARRIVE

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

TERMO DE APRESENTAÇÃO DE TESE

No dia 16 (dezesseis) do mês de dezembro de 2022, às 08h30 (oito horas e trinta minutos), via ferramenta digital *Google Meet* e na Sala 308/Bloco R2, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da Tese intitulada: **"AVALIAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA COM CURCUMINA (Curcuma longa L.) OU AÇAÍ (Euterpe oleracea) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDA PALATINA EM RATOS WISTAR"**, da candidata **Morgana Francisco Machado Guzzatti.** A Banca examinadora foi composta pelos (as) professores (as): **Dra. Cinara Ludvig Gonçalves** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Jaqueline da Silva Generoso** (Membro Interno – UNESC), **Dr. Renan Antonio Ceretta** (Membro Externo – UNESC) e **Dr. Ricardo de Souza Magini** (Membro Externo – UFSC). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da Tese:

(X) **Trabalho aprovado**

( ) **Trabalho não aprovado**

Observações:
Realizar as alterações pontuadas pela banca

Criciúma, SC, 16 de dezembro de 2022.

Cinara Ludvig Gonçalves
Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES (Membro Relator - UNESC)

Jaqueline Generoso
Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENOROSO (Membro Interno – UNESC)

Renan Antonio Ceretta
Prof. Dr. RENAN ANTONIO CERETTA (Membro Externo – UNESC)

Documento assinado digitalmente
Ricardo de Souza Magini
CPF: ***.385.***-**

Prof. Dr. RICARDO DE SOUZA MAGINI (Membro Externo – UFSC)

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DA 169ª DEFESA DE TESE

Ata da Defesa Pública da Tese de Doutorado de Morgana Francisco Machado Guzzatti. No dia 16 (dezesseis) do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e dois às 08h30 (oito horas e trinta minutos), reuniram-se via ferramenta digital Google Meet e na Sala 308/Bloco B2, os membros da Banca Examinadora, composta pelos (as) senhores (as) professores (as): **Dra. Cinara Ludvig Gonçalves** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Jaqueline da Silva Generoso** (Membro Interno – UNESC), **Dr. Renan Antonio Ceretta** (Membro Externo – UNESC) e **Dr. Ricardo de Souza Magini** (Membro Externo – UFSC), e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de arguirem a tese de Doutorado de **Morgana Francisco Machado Guzzatti**, subordinada ao título: **"AVALIAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA COM CURCUMINA (Curcuma longa L.) OU AÇAÍ (Euterpe oleracea) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDA PALATINA EM RATOS WISTAR"**. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube a candidata, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se fizeram necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para avaliação final da candidata. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Tese, declarou **Morgana Francisco Machado Guzzatti** Aprovada

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

_____

_____

Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA (Orientador)

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES (Membro Relator - UNESC)

Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO (Membro Interno – UNESC)

Prof. Dr. RENAN ANTONIO CERETTA (Membro Externo – UNESC)

Prof. Dr. RICARDO DE SOUZA MAGINI (Membro Externo – UFSC)

CANDIDATA:

MORGANA FRANCISCO MACHADO GUZZATTI

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Reconhecido pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pela candidata **MORGANA FRANCISCO MACHADO GUZZATTI**, sob o título **"AVALIAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA COM CURCUMINA (Curcuma longa L.) OU AÇAÍ (Euterpe oleracea) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDA PALATINA EM RATOS WISTAR) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDA PALATINA EM RATOS WISTAR"** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Tese.

Criciúma, SC, 16 de dezembro de 2022.

Profa. Dra. CINARA LÜDVIG GONÇALVES
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO
Membro Interno – UNESC

Prof. Dr. RENAN ANTONIO CERETTA
Membro Externo – UNESC

Prof. Dr. RICARDO DE SOUZA MAGINI
Membro Externo – UFSC

Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira
Orientador

Prof. Dr. Emilio Luiz Strieck
Coordenador do PPGCS