

TESE DE DOUTORADO

CAROLINI MENDES

**EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO OBTIDAS
A PARTIR DA SÍNTESE VERDE EM UM MODELO
ANIMAL DE FERIDA CRÔNICA INDUZIDA COM
RESIQUIMOD**



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

CAROLINI MENDES

**EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO OBTIDAS
A PARTIR DA SÍNTESE VERDE EM UM MODELO
ANIMAL DE FERIDA CRÔNICA INDUZIDA COM
RESIQUIMOD**

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

2023

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação

M538e Mendes, Carolini.

Efeitos das nanopartículas de ouro obtidas a partir da síntese verde em um modelo animal de ferida crônica induzida com Resiquimod / Carolini Mendes. - 2023.

85 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Ferimentos e lesões - Tratamento.
2. Feridas crônicas - Tratamento. 3.

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla -
CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



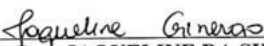
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

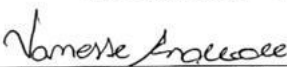
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOCTORADO** apresentada pela candidata **CAROLINI MENDES**, sob o título “**AValiação da Síntese Verde de Nanopartículas de Ouro em um Modelo Animal de Ferida Crônica Induzida com Resiquimod**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

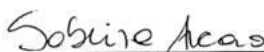
Criciúma, SC, 16 de junho de 2023.



Prof. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO
Membro Relator – UNESC



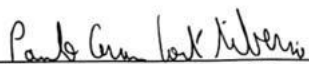
Prof. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Interno – UNESC



Prof. Dra. SABRINA ARCARO
Membro Externo – UNESC



Prof. Dra. JADE DE OLIVEIRA
Membro Externo – UFRGS



Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira
Orientador



Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Titular do PPGCS

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.

AGRADECIMENTOS

Costumo dizer que me sinto abençoada, portanto gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me permitir estar rodeada de pessoas tão incríveis. Sinto-me muito abençoada pela família e amigos que me acompanham na jornada da vida.

Gostaria de agradecer e dedicar esse trabalho ao meu pai, Aguinaldo, meu irmão, José Henrique, e em especial à minha mãe, Jadna, que é uma pessoa ímpar, forte, guerreira e que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Sempre me apoiou em todas minhas decisões, nunca questionou qualquer caminhada que eu quisesse trilhar, e me educou com muito carinho e amor. Obrigada mãe, talvez eu não tenha costume de dizer, mas não tem preço chegar em casa, depois de um dia corrido e ter tudo arrumado por você. Eu te escolheria mil vocês como minha mãe.

Sou grata também ao meu noivo, Eduardo, que há anos vem sendo meu porto seguro e ponto de refúgio. O Du é a minha pessoa no mundo, meu parceiro de vida, sempre disposto a me ver feliz e realizada. Com você quero dividir todas as conquistas que a vida nos proporcionar.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Silveira, pelo aprendizado, não apenas os ensinamentos referentes ao laboratório, mas também pela preparação para a vida, como profissional e como pessoa. O Paulo é meu orientador desde a iniciação científica no ano de 2015, e com ele aprendi lições importantes. Ele sempre nos desafia a sermos profissionais de qualidade, por isso agradeço também pelos “puxões de orelha”, pois sei que ele os dá em quem acredita no potencial. O nosso grupo de pesquisa, Proteção e Reparo tecidual, é reflexo da competência e trabalho do nosso orientador.

Nesse grupo fiz grandes amigos os quais levarei para sempre em meu coração. Aos que iniciaram essa caminhada comigo, Rubya e Gustavo, agradeço pelas longas conversas, partilhas de experiências, vivências e por sempre serem um ombro amigo. À Laura, Lígia, João e Daniela, os quais desempenham papel brilhante como amigos e como profissionais,

eu adoro ter vocês por perto. Aos ICs Camila Costa e Igor Ramos que foram excepcionais na realização das técnicas e para os dias de experimento. E por fim, e não menos importante, meu agradecimento à Maria Eduarda (Duda), minha pupila, minha parceira e amiga, obrigada por todo apoio, por toda ajuda e por sempre estar ao meu lado acreditando que daria certo. Sou muito feliz e grata por ter feito parte desse grupo e criado laços tão sinceros.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão.” Max Planck

RESUMO

As feridas crônicas são caracterizadas por uma inflamação prolongada, e representam um desafio para a área da saúde, pois impactam negativamente a qualidade de vida dos pacientes e a economia mundial devido ao seu alto custo de tratamento. Estratégias alternativas devem ser desenvolvidas para um tratamento custo-efetivo e direcionado. Nesse cenário, o campo emergente da nanobiotecnologia pode fornecer uma plataforma alternativa para desenvolver novos agentes terapêuticos para o processo de cicatrização de feridas crônicas. A síntese verde de nanopartículas de ouro (GNPs) garante menor toxicidade nos tecidos biológicos e maior segurança de aplicabilidade, além de somar os efeitos das nanopartículas (NPs) aos dos extratos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com GNPs reduzidas pelo método de síntese verde com *Euterpe oleracea*, *Croton lechleri* e *Aloe vera* em um modelo de ferida crônica, e compará-las a um tratamento padrão comercial (SafGel[®]) e laser, em ratos Wistar. Foram utilizados 105 ratos Wistar machos distribuídos randomicamente em 7 grupos experimentais (n = 15): I. Ferida Aguda (FA) - sem tratamento local ou sistêmico; II. Ferida Crônica induzida com Resiquimod (FC) – sem tratamento local ou sistêmico; III. FC + tratamento com GNPs reduzidas com *E. oleracea* (FC + GNPs-Açaí); IV. FC + GNPs reduzidas com *C. lechleri* (FC + GNPs-SD); V. FC + GNPs reduzidas com *A. vera* (FC + GNPs-AV); VI. FC + controle positivo com SafGel[®] (FC + SafGel[®]); VII. FC + controle positivo com laser 660 nm, 2J. Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. O modelo de lesão crônica foi induzido com Resiquimod aplicado topicamente durante 6 dias. Os tratamentos com GNPs foram iniciados então no oitavo dia após a última aplicação do Resiquimod, e realizados diariamente até o décimo dia. Foi realizada análise macroscópica e escore inflamatório, além da análise do tamanho das feridas. Após 12 h da última aplicação foi realizada a eutanásia dos animais, retirado o tecido (pele/lesão) para as análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Observou-se que as terapias propostas com GNPs foram capazes de reduzir significativamente o escore inflamatório

e aumentar a taxa de contração da ferida. Através da análise histológica observou-se redução do infiltrado inflamatório. Os resultados de PCR demonstraram aumento da expressão gênica de fibronectina e colágeno tipo III, principalmente no grupo Res + GNPs-AV. As terapias propostas foram ainda capazes de reduzir significativamente as citocinas pró-inflamatórias, aumentar as anti-inflamatórias e reduzir os marcadores oxidantes. O presente estudo demonstrou que os efeitos das GNPs sintetizadas pela síntese verde somam-se aos efeitos dos extratos dessas plantas e favorecem o processo de reparo tecidual em ferida epitelial crônica.

Palavras-chave: Feridas crônicas; nanopartículas de ouro; síntese verde; açaí, sangue de dragão; aloe vera.

ABSTRACT

Chronic wounds are characterized by prolonged inflammation, and represent a challenge for the health area, as they negatively impact the quality of life of patients and the world economy due to their high cost of treatment. Alternative strategies must be developed for cost-effective and targeted treatment. In this scenario, the emerging field of nanobiotechnology can provide an alternative platform to develop new therapeutic agents for the healing process of chronic wounds. The green synthesis of gold nanoparticles (GNPs) ensures less toxicity in biological tissues and greater applicability security, in addition to adding the effects of nanoparticles (NPs) to those of extracts. The objective of this work was to evaluate the effects of treatment with GNPs reduced by the green synthesis method with *Euterpe oleracea*, *Croton lechleri* and *Aloe vera* in a chronic wound model, and to compare them to a standard commercial treatment (SafGel[®]) and laser, in Wistar rats. 105 male Wistar rats were randomly distributed into 7 experimental groups (n=15): I. Acute Wound (AW) - without local or systemic treatment; II. Chronic wound induced with Resiquimod (CW) – without local or systemic treatment; III. CW + treatment with reduced GNPs with *E. oleracea* (CW + GNPs-Açaí); IV. CW + GNPs reduced with *C. lechleri* (CW + GNPs-DB); V. CW + GNPs reduced with *A. vera* (CW + AV-GNPs); VI. CW + positive control with SafGel[®] (CW + SafGel[®]); VII. CW + positive control with 660 nm laser, 2J. The animals were anesthetized with 4% isoflurane. The chronic injury model was induced with topically applied Resiquimod for 6 days. Treatments with GNPs were then started on the eighth day after the last application of Resiquimod, and carried out daily until the tenth day. Macroscopic analysis and inflammatory score were performed, in addition to the analysis of the size of the wounds. Twelve hours after the last application, the animals were euthanized and the tissue (skin/lesion) was removed for histological, biochemical and molecular analyses. It was observed that the proposed therapies with GNPs were able to significantly reduce the inflammatory score and increase the rate of wound contraction. Through histological analysis, a reduction of the

inflammatory infiltrate was observed. PCR results showed increased gene expression of fibronectin and type III collagen, mainly in the CW + AV-GNPs group. The proposed therapies were also able to significantly reduce pro-inflammatory cytokines, increase anti-inflammatory cytokines and reduce oxidant markers. The present study demonstrated that the effects of the GNPs synthesized by the green synthesis add to the effects of the extracts of these plants and favor the tissue repair process in chronic epithelial wounds.

Keywords: chronic wounds; gold nanoparticles; green synthesis; açai; dragon's blood; aloe vera.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Citocinas e fatores de crescimentos envolvidos na inflamação aguda e crônica.....	35
Figura 2. Efeitos do Resiquimod como agonista do receptor de TLR 7 e 8.....	38
Figura 3. O uso de plantas medicinais na síntese verde de nanopartículas para cicatrização de feridas.....	49
Figura 4. Desenho experimental.....	57
Figura 5. Imagens TEM de diferentes GNPs obtidas com (A) Açaí; (B) Aloe Vera; (C) Sangue de Dragão; (D) Análise de absorbância das GNPs sintetizadas com os diferentes extratos...	67
Figura 6. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a avaliação macroscópica do escore inflamatório.....	69
Figura 7. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a área de contração da ferida....	71
Figura 8. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a análise histológica. A) Infiltrado inflamatório; B) Porcentagem da área de colágeno.....	72
Figura 9. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a avaliação da expressão gênica de fibronectina e colágeno tipo III por PCR.....	74
Figura 10. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).....	75
Figura 11. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias (IL10, IL4 e TFG- β).....	77
Figura 12. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os níveis de oxidantes: DCF (A) e Nitrito (B).....	79
Figura 13. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os marcadores de dano oxidativo: Carbonil (A) e Conteúdo de Sulfidrila (B) e de defesa antioxidante: SOD (C) e GSH (D).....	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 FERIDAS.....	27
1.2 CICATRIZAÇÃO.....	30
1.3 TRATAMENTOS PADRÕES E NANOTECNOLOGIA EM FERIDAS.....	39
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3 METODOLOGIA.....	52
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	52
3.2 SÍNTESE VERDE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	52
3.3 ANIMAIS.....	53
3.4 LESÃO EPITELIAL.....	55
3.5 TRATAMENTO.....	56
3.6 EUTANÁSIA.....	57
3.7 ESCORE INFLAMATÓRIO.....	58
3.8 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS.....	59
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	60
3.10 TESTES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS.....	60
3.10.1 RT-PCR.....	60
3.10.2 Marcadores Inflamatórios.....	61
3.10.3 Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	63
3.10.4 Determinações do Conteúdo Proteico.....	65
3.11 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS.....	65
4 RESULTADOS.....	66
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS.....	66

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO ESCORE INFLAMATÓRIO.....	68
4.3 ANÁLISE DA ÁREA DE CONTRAÇÃO DA FERIDA.....	69
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	71
4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR.....	73
4.6 ANÁLISE DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	74
4.7 ANÁLISE DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS.....	76
4.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE OXIDANTES.....	78
4.9 MARCADORES DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	79
5 DISCUSSÃO.....	82
6 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO A.....	125
ANEXO B.....	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 FERIDAS

À medida que as feridas cirúrgicas se tornam menos problemáticas devido aos avanços da cirurgia minimamente invasiva, as feridas crônicas estão em ascensão, visto que frequentemente ocorrem em populações crescentes, como idosos, obesos e diabéticos (Kazemzadeh-Narbat et al., 2015). A sobrecarga global aos sistemas de saúde causada por doenças de pele ou alterações no processo de cicatrização aumentou significativamente em um período de 10 anos. Dados globais, regionais e nacionais de mais de 195 países relatados pela *Global of Disease Study* (GBD), demonstram que a prevalência de distúrbios cutâneos passou de em média 400 milhões em 2005 para aproximadamente 600 milhões em 2015 (Alven et al., 2020; Vos et al., 2016).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de pacientes com úlcera por pressão, venosa e diabética em todo o mundo, e principalmente em idosos (Kazemzadeh-Narbat et al., 2015). Um estudo na Austrália, observou que 49% dos pacientes internados em hospitais públicos desenvolveram lesões epiteliais, 31% dos pacientes tiveram feridas agudas, 9% úlceras por pressão e 8% apresentaram escoriações na pele com ruptura do tecido. Alguns estudos em ambiente hospitalar sugerem que até 50% dos pacientes internados apresentam lesões epiteliais

adquiridas (Williams et al., 2021; Lindholm et al., 2016; Zhao et al., 2016).

No Brasil, estudos apontam alta prevalência (Freitas et al., 2011) e incidência (Luz et al., 2010; Souza et al., 2010) de feridas em pessoas idosas residentes em instituições e durante a internação hospitalar (Vieira et al., 2018). Contudo, essa problemática, além de idosos, acomete a população de forma geral e constitui um problema de saúde pública, devido aos índices e custos de tratamento elevados (Moraes et al., 2008). Apesar de esta informação ser crucial para nortear as ações de cuidado voltadas a esse agravo, pontua-se, que tais taxas tendem a aumentar devido ao envelhecimento populacional e à expansão dos fatores que favorecem sua incidência, entre os quais se destacam as doenças metabólicas e vasculares, insuficiência venosa, hipertensão e diabetes mellitus (de Brito et al., 2017; Gould et al., 2015). Após incisões cirúrgicas e pequenas lacerações, as úlceras diabéticas, venosas e de pressão são as feridas mais comuns em uma escala global (MedMarket Diligence, 2015). Enquanto a maioria das incisões e lacerações cirúrgicas são categorizadas como feridas agudas e geralmente cicatrizam com complicações mínimas, as úlceras são feridas crônicas que resistem à cicatrização e requerem tratamentos caros.

Suscetível a diferentes tipos de lesões, a pele tem como função principal servir de barreira protetora contra infecções e

perda excessiva de água, é o maior órgão do corpo e por isso é mais facilmente lesionado. Pode ser dividida em uma camada epidérmica e outra dérmica. A epiderme contém principalmente queratinócitos, enquanto a parte dérmica consiste em dois compartimentos (Gurtner et al., 2008), o primeiro é o compartimento celular, que normalmente é composto por fibroblastos. O segundo é o compartimento acelular, que contém principalmente a matriz extracelular (MEC). A MEC pode ainda ser funcionalmente dividida em uma fração fibrilar, que é caracterizada por feixes de colágeno fibrilar, fibras elásticas e microfibrilas, e a fração não fibrilar que consiste em glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Todos esses compartimentos e diferentes componentes têm sua função específica e atuam em conjunto para proteger o corpo contra patógenos invasores, manutenção de outras funções como termorregulação e proteção contra perda de água (Lucas et al., 2010).

Além de fornecer uma barreira estrutural, a pele contém diversas células imunológicas que podem ser ativadas por patógenos invasores ou danos à pele. Uma das células imunes mais importantes envolvidas na cicatrização de feridas é o macrófago, que exibe diferentes funções imunológicas, incluindo fagocitose e apresentação de antígenos. Além disso, os macrófagos produzem muitas citocinas e quimiocinas que estimulam o novo crescimento capilar, síntese de colágeno e

fibrose (Mirza et al., 2009). Acredita-se que essa célula imune orquestra o processo de cicatrização de feridas ao longo das diferentes fases (Devalaraja et al., 2000; Leibovich e Ross, 1975).

1.2 CICATRIZAÇÃO

Após uma lesão, a pele precisa ser reparada para manter sua função. O processo de cicatrização no local da lesão, que normalmente resulta na formação de uma cicatriz, é um processo extremamente complexo que envolve vários tipos de células, bem como fatores de crescimento, citocinas e componentes da MEC (Breitkreutz et al., 2009). Tal processo de cicatrização consiste em eventos dinâmicos que incluem inflamação, formação de tecido de granulação (proliferação), reepitelização e remodelação. Nenhuma dessas fases corresponde a um período de tempo precisamente definido e todas as fases se sobrepõem (Eming et al., 2007). Lesões na pele causam danos às células e vasos sanguíneos. Para prevenir a perda de sangue, os vasos sanguíneos se contraem segundos após o ferimento, as plaquetas se agregam e as cascatas de coagulação e complemento são ativadas. Juntos, esses eventos são responsáveis pela formação de um coágulo sanguíneo hemostático, composto principalmente de fibrina reticulada, fibronectina, trombospondina, eritrócitos e plaquetas (Midwood et al., 2004).

As plaquetas são uma das primeiras fontes de citocinas que medeiam a ativação de macrófagos e a quimiotaxia. Uma vez

presas na rede de fibrina, as plaquetas liberam grânulos que funcionam como um reservatório para proteínas biologicamente ativas, como a trombina, fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (He et al., 2010). A trombina não apenas medeia a formação do coágulo, mas também desempenha um papel na inflamação, estimulando a vasodilatação responsável pelo extravasamento plasmático, edema e aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial que causam adesão e infiltração de monócitos. Além disso, a trombina induz a liberação de citocinas inflamatórias por monócitos do sangue periférico, incluindo as interleucinas (IL) 6, 1, interferon (IFN)- γ , e o fator de necrose tumoral (TNF)- α . Essas são citocinas tipicamente pró-inflamatórias, que provavelmente resultam na diferenciação de monócitos em macrófagos M1 (Delavary et al., 2011).

A função inicial das células inflamatórias no local da lesão é fornecer defesa contra agentes patogênicos. Os receptores *Toll-Like* (TLR) funcionam como receptores de reconhecimento de padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), os quais são expressos por agentes infecciosos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, protozoários e fungos) (Cutolo et al., 2022). Dessa maneira, a ativação da imunidade inata a

partir da associação PRR-PAMP é um passo crucial para a resposta inflamatória adquirida contra antígenos específicos (Cutolo et al., 2022).

Cada TLR tem sua própria via de sinalização intrínseca e induz respostas biológicas específicas contra micro-organismos. Quando algum PAMP é reconhecido por algum receptor *Toll-Like* específico, a proteína MyD88 recruta as cinases associadas ao receptor da IL1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Este ativa o fator de crescimento β associado à cinase 1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo IKK formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e por uma subunidade regulatória (NEMO/IKK γ). Este complexo promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que será translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias e das moléculas de adesão (Hennessy et al., 2010; Kumar et al., 2009; Arancibia et al., 2007).

As primeiras células que se infiltram na ferida são células polimorfonucleares, ou neutrófilos, que removem partículas estranhas e micro-organismos da área da ferida. Na pele, os neutrófilos aparecem no leito da ferida poucas horas após a lesão. Depois de exercer sua função, os neutrófilos são eliminados com a escara (a crosta contendo células mortas e produtos degradantes da ferida) ou fagocitados por macrófagos (Dovi et al., 2003;

Devalaraja et al., 2000). Os neutrófilos também agem como fonte importante de várias citocinas pró-inflamatórias, que vão estimular os monócitos recentemente atraídos a se diferenciarem em macrófagos M1 (Werner e Grose, 2003; Hubner et al., 1996).

Os macrófagos no leito da ferida podem exibir diferentes fenótipos funcionais (figura 2), que podem ser divididos em dois grupos: macrófagos M1 (ativados classicamente) e M2 (ativados alternativamente) (Mantovani et al., 2002). Esses fenótipos são dois extremos da função dos macrófagos. Os macrófagos M1 exibem propriedades antimicrobianas, através da liberação de mediadores inflamatórios que vão induzir a ação do TNF, óxido nítrico (NO) e IL-6. Embora isso seja importante na defesa do hospedeiro, o espectro de citocinas expressas também é capaz de induzir graves danos aos tecidos colaterais (Wilson et al., 2005; Mosser, 2003).

Por outro lado, os macrófagos ativados por IL-4 e IL-13 diferenciam-se nos chamados macrófagos ativados alternadamente (M2) (Gordon, 2003), que suprimem as reações inflamatórias e as respostas imunes adaptativas. Portanto, os dois fenótipos de macrófagos são fundamentais para o desenvolvimento da ferida, e o equilíbrio entre os dois fenótipos é importante nas diferentes fases da cicatrização da ferida. Na primeira fase, mais pró-inflamatória do processo de cicatrização da ferida, mais macrófagos M1 são necessários para limpar os detritos e matar possíveis patógenos invasores. No entanto, em

uma fase posterior em que a formação de novos tecidos é mais pronunciada, o macrófago M2 pode ter um papel mais importante (Porcheray et al., 2005; Goerdts e Orfanos, 1999).

Foi relatado que, após a fagocitose de células apoptóticas, os macrófagos M1 reverterem para os macrófagos M2 (Duffield, 2003; Gordon, 2003). Os macrófagos M2 são, uma fonte proeminente de TGF- β , fator de crescimento capaz de estimular a quimiotaxia e a produção de citocinas pelos macrófagos. O TGF- β é uma das citocinas mais importantes que influenciam a função dos fibroblastos, a quimiotaxia e a deposição de MEC. Enquanto os macrófagos fagocitam organismos estranhos, incluindo partículas e neutrófilos mortos, também liberam fatores de crescimento como o FGF e o TGF- β , entre outras citocinas, como interleucinas (IL-1 β e IL-6), que possuem um papel importante como parte do mecanismo de recuperação/reparo do tecido, além de estimular o movimento de fibroblastos e células epiteliais para a ferida iniciando a fase proliferativa (Singer e Mahdavian Delavary et al., 2011; Clark, 1999).

produzirem colágeno entre 3 a 5 dias após a lesão (Ishida et al., 2008; Vogler et al., 2003; Werner e Grose, 2003).

A decomposição da MEC é fundamental para a cicatrização de feridas e a remodelação do tecido (aumento da resistência mecânica). Um dos componentes mais importantes da MEC é o colágeno, que aumenta a resistência da ferida. Na fase de remodelação, os processos importantes são o rearranjo e a reticulação das fibras de colágeno inicialmente depositadas e a substituição do colágeno do tipo III pelo colágeno do tipo I, que é uma fibrila de colágeno mais forte. *In vivo*, o colágeno é produzido principalmente por (mio) fibroblastos. Quantidades crescentes de MEC sinalizam aos fibroblastos para diminuir a produção de colágeno subsequente (Zhao et al., 2016; Falanga, 2005).

Na última fase da cicatrização normal da ferida, o número de macrófagos é diminuído, o que resultará em menos produção de MEC. Essas alterações, juntamente com a contração da ferida, resultarão em uma diminuição no tamanho e no volume da mesma. A cicatrização da ferida é completa após apoptose de miofibroblastos e células vasculares, deixando para trás uma cicatriz rica em colágeno (Zhao et al., 2016). Em condições patológicas, os números e funções dos macrófagos podem ser alterados, resultando em cicatrizes aberrantes (Frykberg e Banks, 2015).

A inflamação prolongada é uma das principais causas de feridas crônicas em nível celular. Em feridas crônicas, o organismo não é capaz de resolver a inflamação fisiológica como parte do processo de cicatrização da ferida, e a transição para a fase de proliferação é bloqueada (Zhao et al., 2016; Velnar et al., 2009). A maioria dos modelos pré-clínicos de feridas estabelecidos não leva em consideração a inflamação prolongada, e sim a criação de feridas com cicatrização retardada que não refletem corretamente feridas crônicas em pacientes (Holzer-Geissler et al., 2022).

O Resiquimod é um membro das imidazoquinolinaminas e um agonista dos receptores TLR 7 e 8, que induz a produção de interferon, $\text{TNF-}\alpha$ e outras citocinas (Figura 2) (Dockrell e Kinghorn, 2001). Esse medicamento é usado para tratamento tópico de lesões cutâneas, mas com inflamação local como efeito colateral do tratamento (Holzer-Geissler et al., 2022; Stockfleth et al., 2019).

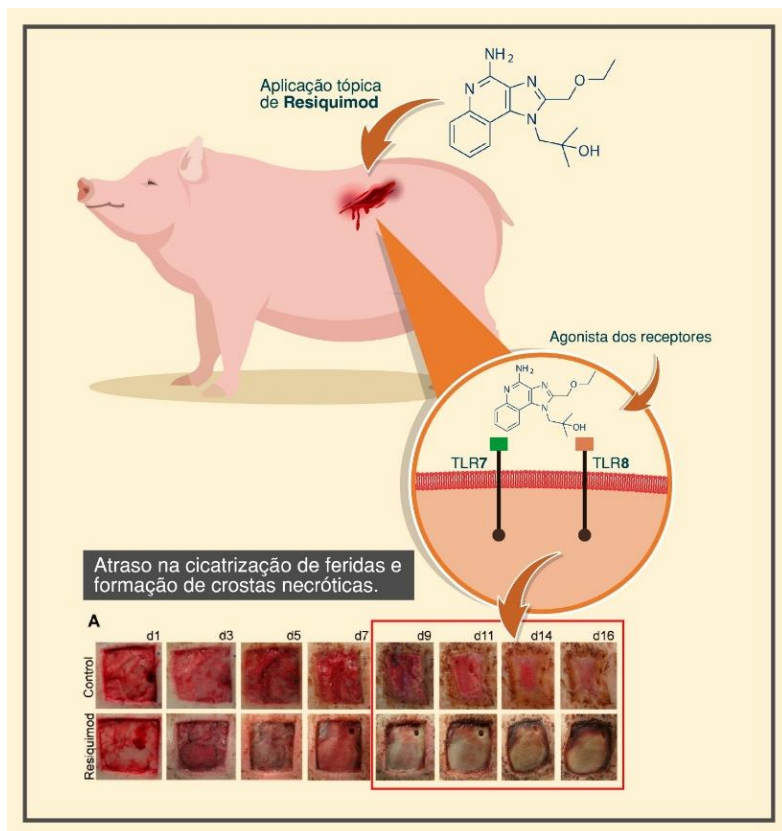


Figura 2. Efeitos do Resiquimod como agonista do receptor de TLR 7 e 8. (Figura adaptada de: Holzer-Geissler et al., 2022).

Embora a maioria das respostas de TLR e ativações de vias promovam a cicatrização fisiológica de feridas, uma superexpressão das citocinas estimuladas por essa via pode desacelerar esses processos ou até mesmo ter efeitos opostos, como inflamação prolongada e cicatrização extensa. Direcionar e

corrigir as causas celulares e moleculares da inflamação prolongada em feridas crônicas pode ser um método eficaz para devolvê-las ao estado de cura (Dasu et al., 2012).

A intenção de usar Resiquimod neste trabalho para mimetizar a cronificação das feridas baseia-se no estudo de Holzer-Geissler et al. (2022), para que se leve em consideração a inflamação prolongada e como esta afeta a cicatrização de feridas.

1.3 TRATAMENTOS PADRÕES E NANOTECNOLOGIA EM FERIDAS

Em feridas crônicas, os estágios proliferativos e de remodelação não ocorrem prontamente (Zhao et al., 2016). A ferida permanece na fase inflamatória, o que não favorece a regeneração do tecido e, portanto, a ferida não pode cicatrizar (Frykberg e Banks, 2015). Direcionar e corrigir as causas celulares e moleculares da inflamação prolongada em feridas crônicas pode ser um método eficaz para devolvê-las ao estado de cura.

A utilização do laser como forma terapêutica ocorre por meio do princípio da bioestimulação, aplicado para diversas finalidades e encarado como padrão ouro no processo de cicatrização de feridas (Hamblin, 2016; Lins et al., 2010). A fotobiomodulação (FBM) descreve o uso da luz vermelha ou do infravermelho com objetivo de estimular, curar, regenerar e

proteger os tecidos lesionados, que estão degenerando. A terapia com luz de baixa potência é promovida por dispositivos de luz, como a amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (LASER) e o *light emitting diode* (LED), ambas apresentam destaques no processo de cicatrização de feridas (Zaccaron et al., 2022; Mendes et al., 2020; Silveira et al., 2016; Silveira et al., 2011). Os efeitos biológicos dependem dos parâmetros de irradiação, como o comprimento de onda e da dose (Chaves et al., 2014).

Essa terapia quando usada em tecidos e células em uma dosagem adequada, promove funções celulares, incluindo a estimulação de linfócitos, ativação de mastócitos, aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial e proliferação de vários tipos de células, promovendo assim efeitos anti-inflamatórios (Baptista et al., 2012; Lins et al., 2010). A radiação laser é absorvida por meio de citocromos nas mitocôndrias, sendo convertido em energia pela célula, ao qual promove estimulação da proliferação celular, presente na fase de reparo da lesão tecidual (Da Silva, 2010).

A nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, tendo sua aplicação reconhecida em diversas áreas (Jeong et al., 2018). É um campo em desenvolvimento e possui um enorme potencial para impactar positivamente no sistema de saúde. Importantes aplicações da nanotecnologia estão sendo empregadas na área da saúde e o

conhecimento básico da interação dos nanomateriais com as células e suas consequências biológicas estão começando a evoluir (Bhattacharya, 2008; Arvizo et al., 2012).

Vários métodos estão disponíveis para a síntese de nanopartículas (NPs) com tamanho controlado e morfologia que permite o aprisionamento de uma ampla variedade de moléculas bioativas e sua liberação controlada (Malam et al., 2009; Ahn et al., 2013). Atualmente, as nanopartículas de ouro (GNPs) são amplamente utilizadas para a distribuição de várias moléculas bioativas melhorando a eficiência do fármaco, devido a sua distribuição direcionada, toxicidade reduzida e captação aumentada. As mesmas são consideradas excelentes carreadoras de proteínas e biomoléculas, sendo que quanto mais distribuída, melhor a sua ação terapêutica (Ghosh et al., 2017).

As GNPs vêm sendo utilizadas no tratamento de diferentes doenças devido às suas capacidades antioxidante e anti-inflamatória, inclusive no processo de reparo tecidual (Victor, 2012; Li, 2015). Possuem potentes efeitos antioxidantes na extinção de radicais livres, como OH (hidroxil), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e NO (Medhe et al., 2014; Leu et al., 2012; Esumi et al., 2003), o que depende significativamente da superfície específica (Yakimovich et al., 2008). NPs esféricas de ouro têm grande área superficial, o que resulta em alta tendência para aceitar elétrons e interagir com espécies reativas de oxigênio (EROs) para eliminá-las ou desativá-las (BarathManiKanth,

2010). Como resultado, as GNPs tornam-se um forte agente antioxidante e desempenham um papel importante na cicatrização de feridas (Muthuvel et al., 2014).

De acordo com Rattanata et al. (2015), as GNPs exibem altas atividades catalíticas de reações de eliminação de radicais livres, sendo também capazes de aumentar os níveis de fator nuclear eritroide 2 (NRF2), fator que induz a sinalização de genes antioxidantes. Este aumento é causado por ação das GNPs que afetam as ligações tióis de *keap1*, e assim, mudam sua conformação, liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, desta forma, contribuindo como um agente antioxidante (Wang et al., 2017; Chen et al., 2015).

Kim et al. (2015) observaram que a aplicação tópica de GNPs acelera significativamente os processos de cicatrização desempenhando aumento significativo da expressão do colágeno, VEGF, além de outros fatores, ocorrendo o fechamento da ferida quatro vezes mais rápido no que nos demais grupos. Em outro estudo com animais, Akturk et al. (2016) avaliou um novo nanocomposto de nanopartículas de colágeno/ouro como um potencial biomaterial de cicatrização de feridas cutâneas. Avaliou-se suas propriedades estruturais e morfológicas, biocompatibilidade *in vitro* e efeitos *in vivo* como indução ou inibição das respostas inflamatórias, influenciando o fechamento da ferida e sua possível contribuição para o aumento da reepitelização, neovascularização e formação de tecido de

granulação. Volkova et al. (2016) e Li et al. (2015) demonstraram que as GNPs além do potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano, apresentam capacidades angiogênicas capazes de aumentar a proliferação de fibroblastos e diminuir a apoptose celular no processo de cicatrização de feridas.

Atualmente diversos extratos de plantas têm sido usados para sintetizar NPs metálicas, e essa forma de síntese garante uma redução significativa da toxicidade em tecidos biológicos, segurança e maior aplicabilidade (Zhang et al., 2016). Métodos físicos e químicos usados anteriormente envolvem a produção de subprodutos tóxicos, instrumentação cara e processos experimentais intensivos em energia, limitando sua aplicabilidade. Segundo Paiva-Santos et al. (2021), a síntese baseada em plantas é mais valiosa do que a síntese baseada em micro-organismos devido à eliminação de riscos biológicos, procedimentos de isolamento demorados e elaborados. Além disso, evita o desenvolvimento e manutenção de culturas de células, bem como altos custos, uma vez que pode ser reduzido para grandes produções não assépticas e contornar as árduas etapas de modificação de superfície e o demorado processo de triagem microbiana e construção de vetores. Até esta data, uma grande variedade de plantas foi usada para a síntese de NPs (Ovais et al., 2016; Kasithevar et al., 2017; Paiva-Santos et al., 2021). As plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas devido aos seus efeitos fitoquímicos de alto valor terapêutico.

Os extratos de plantas consistem em numerosos fitoquímicos, como flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, saponinas, carboidratos, aminoácidos e proteínas e terpenoides, que desempenham um papel vital na síntese de NPs de íons metálicos, pois atuam como agentes capeadores/estabilizadores e redutores (Dada et al., 2019). As atividades anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidantes, pró-angiogênicas, promotoras da proliferação de fibroblastos e de síntese de pró-colágeno de algumas plantas podem ser ótimas contribuintes para o processo de cicatrização de feridas, podendo inibir a secreção de mediadores inflamatórios, estimular a produção de citocinas, e assim reduzir o tempo de reparo (Ning et al., 2022). Estudos indicam que as nanopartículas de ouro sintetizadas a partir de várias ervas medicinais demonstraram um notável potencial de cicatrização de feridas, com ação antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória em ratos albinos Wistar (Amjed et al., 2017; Milaneze et al., 2014).

Os extratos de *Euterpe oleracea*, *Croton lechleri* e *Aloe vera* no processo de cicatrização caracterizam-se por apresentar 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., 2019).

Devido ao seu alto teor de polifenóis, a *E. oleracea* (conhecida popularmente como açaí) demonstra uma série de

efeitos protetores benéficos no tecido humano (Shash et al., 2019; Pedro et al., 2018; Dembitsky et al., 2011; Schauss et al., 2010; Schauss et al., 2006). É uma fruta tropical roxa com muitos nutrientes antioxidantes e que tem excelentes efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes na pele. Em particular, contém antioxidantes, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais que conferem à fruta suas qualidades hipocolesterolêmicas, imunoestimulantes, anti-inflamatórios e antioxidantes (Interdonato et al., 2023).

A ação antioxidante da suplementação de açaí foi examinada em alguns estudos *in vivo* realizados em ratos. As proteínas carboniladas e as concentrações séricas dos grupos sulfidril total, livre e proteica foram reduzidas após 6 semanas de ingestão de açaí em ratos (Pala et al., 2018). Uma investigação em ratos 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). No estudo de Interdonato et al. (2023), em um modelo de ferida excisional em ratos, a administração oral de açaí causou melhorias no fechamento da ferida, granulação e reepitelização, o que contribuiu para uma restauração quase completa da epiderme nesse grupo. Outro estudo demonstrou o potencial dessa planta na redução de área da ferida, aumento do conteúdo de colágeno em análises histológicas. Em geral, o grupo tratado com açaí apresentou

regeneração mais rápida do tecido, o que pode estar associado à sua alta atividade antioxidante. Tem sido relatado também que o açaí tem excelente efeito supressor na geração de EROS e pode suprimir a ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) e TNF- α *in vitro* (Kang, Choi e Kim, 2017).

A *C. lechleri*, conhecida popularmente como Sangue de Dragão (SD), é uma planta medicinal amazônica com uma seiva vermelha característica. Sua gama de ação fitoquímica em estudos pré-clínicos inclui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas e antineoplásicas. Os estudos clínicos refletem a cicatrização de feridas e as propriedades antivirais. As atividades de cicatrização de feridas da planta sangue de dragão foram comprovadas por promover a angiogênese, deposição de colágeno, epitelização e contração (Ning et al., 2022; Pona et al., 2019).

No estudo de Zheng et al. (2021) foi observado que a planta SD apresenta de forma significativa uma ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* presentes em feridas infectadas, promove também a redução do biofilme, sendo alternativa para seu tratamento. O impacto clínico de *C. lechleri* no tratamento de feridas crônicas pode impedir a cicatrização prolongada de feridas, influenciando a fase inflamatória, proliferativa e de maturação, aumentando a síntese de colágeno, contração da ferida e migração de fibroblastos. Juntamente com a proteção antimicrobiana e oclusiva da seiva de *C. lechleri*, esta

pode fornecer uma terapia alternativa para o tratamento de feridas crônicas (Pona et al., 2019).

Em outro estudo, foi observado que o perclorato de dracorodina, extraído do sangue de dragão, foi utilizado para avaliação do processo de cicatrização em modelo de rato Wistar, sendo constatado seu poder de inibir a secreção de IL-1 e TNF- α , reduzindo a inflamação, bem como estimulando VEGF e TGF, na formação de novos vasos e na deposição do colágeno (Jiang et al., 2020). Foi relatado que o VEGF poderia acelerar o processo de angiogênese através da secreção de angiopoietina-2 (ANG-2) mediada por células endoteliais vasculares e que o extrato de *C. lechleri* pode ativar a via de sinalização Ras/MAPK nas células endoteliais, aumentando assim a angiogênese (Folkman, 2006).

A planta *A. vera* (AV), historicamente tem sido consistentemente útil no tratamento de feridas e queimaduras devido à sua capacidade de estimular a cicatrização, a regeneração dos tecidos e reduzir a cicatriz. Sua ação farmacológica inclui forte atividade anti-inflamatória e antibacteriana (Chelu et al., 2023; Jales et al., 2022). A produção de *A. vera* tornou-se uma indústria crescente por causa dos muitos benefícios à saúde alegados pela planta (Salehi et al., 2018). *A. vera* é uma planta medicinal madura com grande potencial no tratamento de feridas cutâneas. Tanto o gel de *A. vera* quanto o extrato podem promover a cicatrização de feridas *in vitro* e *in vivo*. Estudos mostram que a *A. vera* aumenta a

produção de bFGF e TGF- β para promover a deposição de colágeno, proliferação de fibroblastos e angiogênese (Lin et al., 2016; Burusapat et al., 2018 Pawłowicz et al., 2022; Razia et al., 2022). Além de diminuir significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF α , induzindo assim efeitos anti-inflamatórios, pode reduzir significativamente o período inflamatório e diminuir malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica (Budai et al., 2013).

Além dos efeitos da planta, estudos com nanopartículas contendo *A. vera* apresentam resultados promissores com propriedades antibacterianas e maiores taxas de sobrevivência de fibroblastos, bem como menor citotoxicidade e melhor liberação de drogas (Liang et al., 2021). Barkat et al. desenvolveu uma formulação de nanopartículas combinando a nanosuspensão de sulfadiazina de prata com gel de *A. vera*. A avaliação *in vitro* mostrou alta taxa de liberação do fármaco e estudos histopatológicos de ratos tratados por 14 dias mostraram melhora na cicatrização de feridas (Barkat et al., 2017).

Diante de todo exposto, acredita-se que o uso associado das GNPs com o extrato das plantas mencionadas (Figura 3) é capaz de desenvolver uma nova modalidade terapêutica no tratamento de lesões cutâneas, com efeitos potencializados envolvidos no processo de cicatrização epitelial e na redução dos danos causados pelo processo inflamatório agudo e perpetuado na pele.

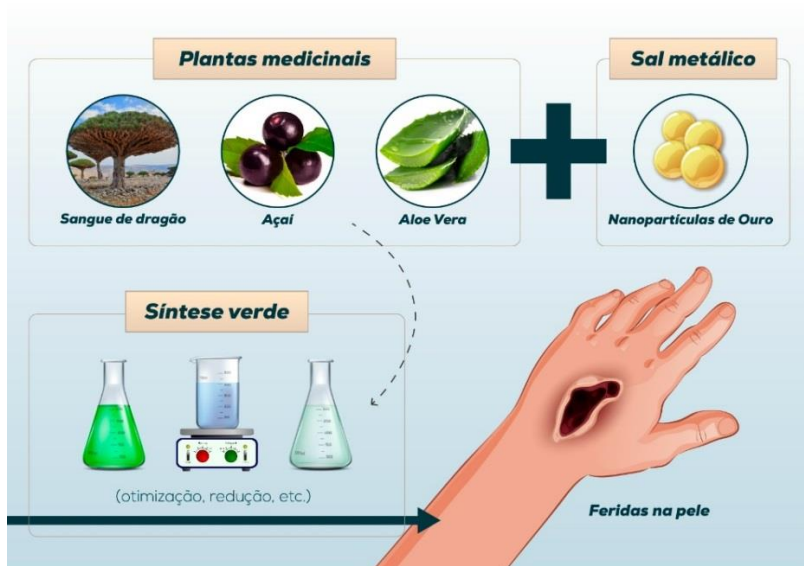


Figura 3. O uso de plantas medicinais na síntese verde de nanopartículas para cicatrização de feridas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com GNPs reduzidas pelo método de síntese verde com *E. oleracea*, *C. lechleri* e *A. vera* em um modelo de ferida crônica induzida com Resiquimod, e compará-las a um tratamento padrão comercial (Safgel[®]) e Laser, em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a utilização do Resiquimod como modelo de ferida crônica, e o potencial tratamento com GNPs sintetizadas por síntese verde em:

- Avaliação macroscópica por escore inflamatório;
- Quantificação da área (cm²) da ferida para avaliar a contração do tecido epitelial nos dias 0 e 10 do tratamento;
- Quantificação do infiltrado inflamatório e áreas de colágeno através de análise histológica após 10 dias de tratamento;
- Avaliação a expressão gênica (RT-PCR) de colágeno tipo III e fibronectina;

- Quantificação dos níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL1 β , TNF- α , IL10, IL4 e TGF- β) após 10 dias de tratamento;
- Avaliação da produção de oxidantes, níveis de dano oxidativo e atividade do sistema antioxidante após 10 dias de tratamento.

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido à Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, para aprovação dos 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). Foi aceito sob número de protocolo nº 75/2022 (anexo A). Esta pesquisa também seguiu as Diretrizes ARRIVE 2.0 (Percie du Sert et al., 2020).

3.2 SÍNTESE VERDE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As GNPs foram obtidas pela redução de diferentes extratos. Uma solução estoque de cada extrato (*E. oleracea*, *C. lechleri* e *A. Vera*) foram preparadas em etanol absoluto. Soluções estoque de ácido cloroáurico (HAuCl_4 4 mM), foram preparadas em água Milli Q. Na sequência, uma solução pré-definida de extrato foi adicionado em água Mili Q e mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90 °C. Hidróxido de sódio (NaOH) (0.1 M) foi usado para ajustar o pH entre 10 e 11. Na sequência, uma solução 1 mM de HAuCl_4 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 soluções de GNPs 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 foram realizadas em triplicata, para obtenção da média e desvio padrão (DP). A estabilidade das soluções foi avaliada por espectroscopia UV-Vis e *Zetasizer*.

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 105 ratos Wistar machos com as seguintes características: 60 dias de vida, com peso entre 250-300 g, provindos da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os

animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x largura 20 cm x altura 13 cm), distribuídos em seis animais por caixa, colocados sobre estantes e sobre os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso. Os ratos foram 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 tricotomizados e logo após induzidos a lesão epitelial aguda ou crônica de acordo com seus respectivos grupos. Foram distribuídos randomicamente em 7 grupos experimentais ($n = 15$) sendo 5 animais para histologia, e o restante foi destinado para análises bioquímicas e moleculares.

- I. (FA): Ferida Aguda - sem tratamento local ou sistêmico;
- II. (FC): Ferida Crônica induzida com Resiquimod - sem tratamento local ou sistêmico;
- III. (FC + GNPs-Açaí): FC + tratamento com GNPs reduzidas com *E. oleracea*;
- IV. (FC + GNPs-SD): FC + tratamento com GNPs reduzidas com *C. lechleri* (Sangue de Dragão);
- V. (FC + GNPs-AV): FC + tratamento com GNPs reduzidas com *A. vera*;
- VI. (FC + SafGel[®]): FC + controle positivo com SafGel[®];

- VII.** (FC + FBM): FC + controle positivo com Laser 660 nm, 2J;

3.4 LESÃO EPITELIAL

O modelo de lesão epitelial aguda foi induzido como descrito por Carvalho et al. (2006). Em todos os animais, foi retirado segmento de pele total no dorso dos animais. Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. A região medial-dorsal, entre a linha infraescapular e a cauda, foi removida com uma incisão cirúrgica de forma circular com diâmetro de aproximadamente 3 cm².

O modelo de lesão epitelial crônica foi induzido como descrito por Holzer-Geissler (2022). O modelo utiliza o Resiquimod como indutor de lesão crônica, sendo esse um membro das imidazoquinolnaminas, e agonista dos receptores TLR 7 e 8 que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon, TNF- α e outras (Holzer-Geissler et al., 2022).

O Resiquimod R848 (tlrl-r848) foi dissolvido em água estéril sem endotoxinas para gerar uma solução estoque de 5 mL de Resiquimod (15,9 mM). A solução de trabalho de Resiquimod consistiu em 593 μ L de água deionizada, 7,5 μ L de *Tween* 80 (9005656), 750 μ L de propilenoglicol (82280) e 135 μ L da solução estoque de Resiquimod R848 (1,4 mM). A solução de

trabalho foi preparada em um tubo de 3 mL e aplicada em todas as feridas.

Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. Cada rato recebeu uma incisão cirúrgica de forma circular com diâmetro de aproximadamente 3 cm², 100 µL da solução de trabalho de Resiquimod R848 1,4 mM foram aplicados topicamente por 6 dias. Após 8 dias último dia de aplicação de Resiquimod, iniciou-se o tratamento dos animais.

3.5 TRATAMENTO

Posteriormente aos 6 dias de indução da lesão crônica, as feridas foram analisadas por mais 8 dias. Os tratamentos foram iniciados então no oitavo dia após a última aplicação do Resiquimod, e realizados diariamente até o décimo dia. Nos grupos controle positivo os animais receberam tratamento tópico com 1 ml de Safgel[®], e Laser (660 nm, 2J), onde a irradiação foi executada em cinco regiões distintas ao redor da ferida, com a caneta do laser perpendicular à pele numa distância de 0,5 cm por ponto (Morrone et al., 1998).

Nos grupos com tratamento teste foram utilizadas GNPs (20 nm, 12,5 ug/mL) sintetizadas pelo método de síntese verde, reduzidas com *E. oleracea*, *C. lechleri* e *A. vera*. O tratamento tópico teve duração de 10 dias, onde foi aplicado diariamente 1 ml de GNPs e após aplicação esperava-se 10 minutos para

absorção antes da devolução dos animais às suas respectivas caixas. Após 12 horas do último dia de tratamento tópico, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e mortos por decapitação em guilhotina (figura 4). Em seguida, a pele/lesão de 5 animais de cada grupo foi retirada com margem de segurança de 0,5 cm para análise histopatológica. O restante foi destinado para análises bioquímicas e moleculares.

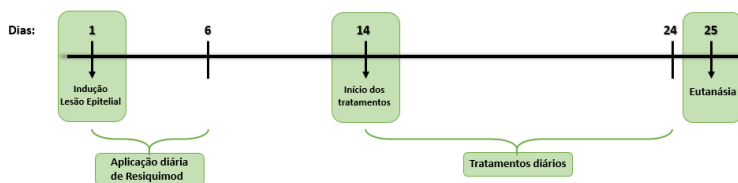


Figura 4. Desenho experimental (Figura elaborada pelo autor, 2023).

3.6 EUTANÁSIA

Após 12 horas do último tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e foram levados a eutanásia por decapitação. A partir disso, a borda externa da ferida foi cirurgicamente removida e imediatamente processada e armazenada em freezer -70 °C para posteriores análises bioquímicas, histopatológicas e moleculares. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos próprios para descarte de material biológico e armazenado em

freezer em uma câmara de congelamento científica com temperatura -20° C, da UNESC, até o recolhimento pela empresa responsável. Todos os pesquisadores envolvidos no projeto utilizaram equipamento de proteção individual requerido para cada etapa do estudo.

3.7 ESCORE INFLAMATÓRIO

A avaliação macroscópica da ferida conta com uma pontuação geral que foi dividida em pontuação de inflamação e pontuação de área.

Os seguintes parâmetros foram incluídos no escore de inflamação: presença de pus, inchaço ou eritema e a largura do eritema, se presente. Para cada parâmetro, os números individuais foram dados com base no fenótipo da ferida. As pontuações se deram da seguinte maneira: pus (pontuação 0–2), eritema (pontuação 0–4), e inchaço (pontuação 0–2), com uma pontuação máxima de soma possível de 8 para a pontuação de inflamação.

Os seguintes parâmetros foram incluídos na pontuação da área: tamanho da ferida, umidade da ferida, presença de tecido de granulação, crostas e necrose. Para cada parâmetro, os números individuais foram dados com base no fenótipo da ferida. As pontuações se deram da seguinte maneira: a umidade da ferida (escore 0–1), tamanho (pontuação 0–3), tecido de granulação (pontuação 0–2), crosta (pontuação 0–3) e necrose (pontuação 0–

4), com uma pontuação máxima possível de 13 e uma pontuação mínima possível de 0 para a pontuação da área.

A soma dessas duas pontuações resultou na pontuação geral da ferida, com uma pontuação máxima possível de 21 pontos e uma pontuação mínima possível de 0 pontos. Este sistema de pontuação usado rotineiramente em estudos onde a cicatrização de feridas é investigada (Holzer-Geissler et al., 2022).

3.8 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

O método fotográfico foi 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 10 do tratamento, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho delas (área, comprimento e largura) calculando a variação das áreas das feridas neste período em cm^2 . Essas mensurações foram feitas pelo mesmo pesquisador, sendo realizadas 5 mensurações de cada ferida e utilizado o valor médio.

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de tecido cutâneo de cinco animais por grupo foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras retiradas foram fixadas por 48 horas na mesma solução (PFA 10%), e posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. Quantificações histológicas da infiltração de leucócitos e deposição de colágeno ocorreram com hematoxilina-eosina e tricrômio de Gomori, respectivamente. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200 x, e foram capturados quatro campos oculares por corte (4 animais / grupo). 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), considerando a coloração nuclear de células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD).

3.10 TESTES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS

3.10.1 RT-PCR

A análise de expressão gênica de colágeno tipo III e fibronectina foram realizadas através de PCR – Real Time. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life

Technologies) e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O RNA obtido foi solubilizado em 30 µl de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20 °C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria em absorbância a 260nm e 280nm. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estiverem entre 1,8 e 2,0. Logo após, o DNA complementar foi sintetizado através da transcriptase reversa M-MLV, que promove uma fita de DNA complementar a partir de RNA de fita simples. A parte final inclui a PCR em tempo real, por meio do sistema do corante *SYBR Green*, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação (Bustin, 2002).

3.10.2 Marcadores Inflamatórios

A fim de determinar-se a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de interesse, foi realizado o imunoensaio de imunoabsorbância enzimática (ELISA), sanduíche indireto (DuoSet ELISA) utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas. As amostras foram primeiramente homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de proteases, com o intuito de preservar o conteúdo proteico da amostra de interesse. Com as amostras devidamente

preparadas, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando *overnight* a 4 °C. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, afim de remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo de detecção, o qual se ligou aos antígenos da amostra formando assim um “sanduiche” de anticorpo e amostra. Após período de incubação à temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem, foi adicionado 100 µl de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adicionou-se um substrato cromogênico, o tetrametilbenzidina (TMB), a qual em presença da HRP emitiu uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50 µl por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10) e fatores de crescimento (TGF- β) foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

3.10.3 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.10.3.1 Oxidantes

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFHDA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por ERO de acordo com o método descrito por Lebeland e Bondy (1992).

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540 nm. 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).

3.10.3.2 Marcadores de Danos Oxidativos

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370 nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína

empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. cm⁻¹.

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra utilizou-se o reagente de cor (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que foi mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

3.10.3.3 Atividades das Enzimas Antioxidantes

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm) segundo Bannister e Calabrese (1987). As amostras de homogenato de tecido epitelial foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 ul foram retiradas da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 ul adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180 s em intervalos de 10 s e medido em leitor de ELISA a 480 nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogenato de tecido epitelial após precipitação

de proteína com 1mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutatona reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.10.4 Determinações do Conteúdo Proteico

O teor de proteína a partir do tecido homogeneizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). O reagente Folin fenol foi adicionado para ligar-se à proteína e foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul. A absorbância foi lida a 750nm.

3.11 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste *post hoc Tukey*. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Foi utilizado o *GraphPad Prism 7* como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS

A Figura 5 representa a morfologia e distribuição de tamanho das partículas que foram analisadas via Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). As diferentes nanopartículas apresentaram morfologia esférica e uma distribuição de tamanho médio de ~5 a 30 nm. Todas as nanopartículas apresentaram superfície de carga negativa, GNPs-Açaí ($-26 \text{ mV} \pm 4$) figura 5A, GNPs-A. vera ($-22 \text{ mV} \pm 5$) figura 5B e GNPs-SD ($-19 \text{ mV} \pm 4$) figura 5C. A alta superfície de carga negativa assegurou uma boa estabilidade coloidal (>seis meses). As nanopartículas com diferentes extratos não apresentam diferença significativa (ANOVA $p < 0,5$) no comprimento de onda máximo (figura 5D). O potencial zeta das diferentes nanopartículas foi de $> 19 \text{ mV}$ (pH 7), conferindo uma boa estabilidade das diferentes nanopartículas (tabela 1). Os comprimentos de onda obtidos confirmam a formação de nanopartículas metálicas.

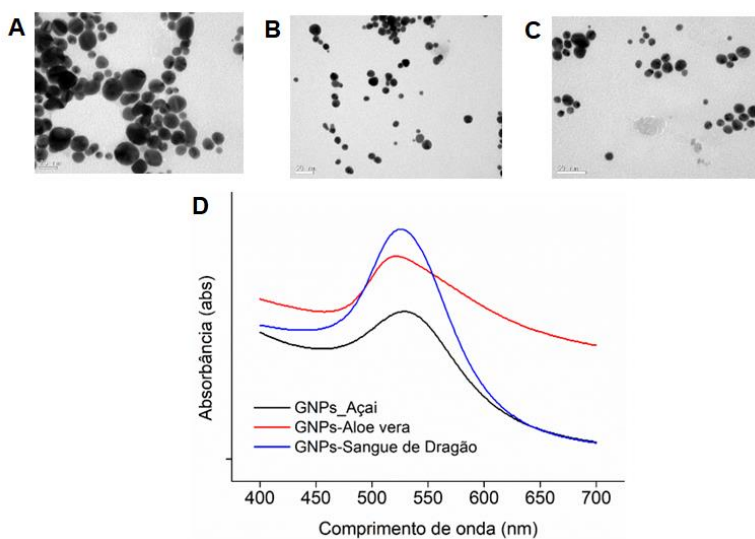


Figura 5. Imagens TEM de diferentes GNPs obtidas com (A) Açaí; (B) *A. vera*; (C) Sangue de Dragão; (D) Análise de absorvância das GNPs sintetizadas com os diferentes extratos.

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

AMOSTRAS	DP (nm)	Potencial Zeta (mV)	Comprimento de onda máximo
GNPs-Açaí	32	-26 $\pm$ 4	531 nm
GNPs-AV	24	-22 $\pm$ 5	519 nm
GNPs-SD	22	-19 $\pm$ 4	524 nm

$\pm$ Desvio padrão médio de 3 determinações

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO ESCORE INFLAMATÓRIO

Inicialmente avaliou-se macroscopicamente o escore inflamatório das feridas (Fig. 6), onde os seguintes parâmetros foram incluídos: presença de pus, inchaço ou eritema e a largura do eritema, se presente; e pontuação da área: tamanho da ferida, umidade da ferida, presença de tecido de granulação, crostas e necrose. As pontuações foram somadas gerando um escore final. Quatorze dias após a indução do modelo crônico de ferida, todos os grupos apresentaram aumento do score inflamatório quando comparados ao grupo Ferida Aguda (FA) (figura 6A, $p < 0,05$). No 24º dia, 10 dias após o término de seus respectivos tratamentos, os grupos Ferida Crônica (FC) e FC + Safgel apresentaram escore inflamatório aumentado quando comparados ao grupo LE ($p < 0,05$). Já os grupos tratados com as GNPs-Açaí e GNPs-SD ($p < 0,001$) e os grupos GNPs-AV e FBM ($p < 0,01$) apresentaram menor score inflamatório quando comparados ao grupo FC.

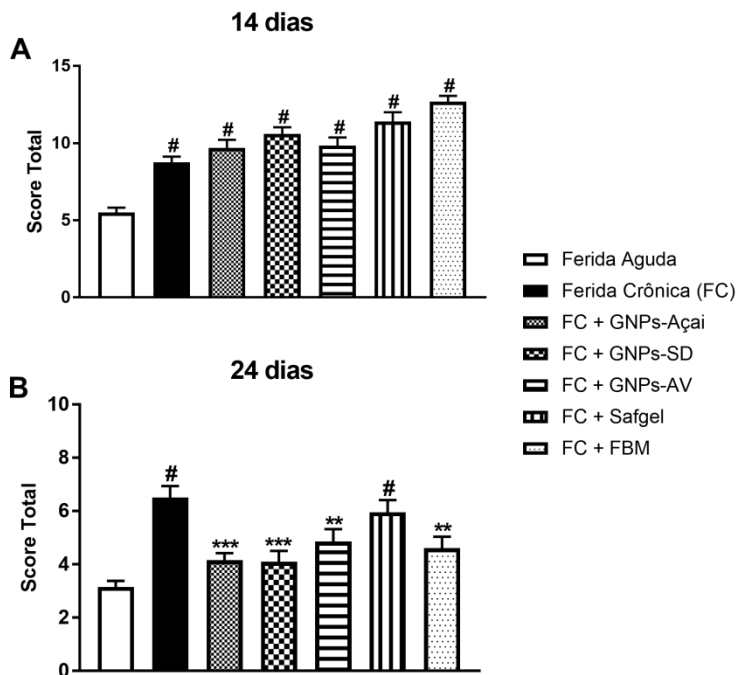


Figura 6. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a avaliação macroscópica do escore inflamatório. Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.3 ANÁLISE DA ÁREA DE CONTRAÇÃO DA FERIDA

Em relação à área de contração da ferida, representada na figura 7, no 14º dia após a indução do modelo de ferida crônica e

antes do início dos tratamentos, observou-se que todos os grupos apresentaram menor área de contração da ferida quando comparados ao grupo FA (figura 7A, $p < 0,05$). No 24º dia, que caracteriza o décimo dia após os devidos tratamentos, observou-se que o grupo FC apresentou menor área de contração da ferida quando comparado com o grupo FA ($p < 0,05$). Além disso, todos os grupos tratados apresentaram maior área de contração da ferida quando comparados ao grupo FC, sendo que os grupos tratados com GNP-SD e Safgel apresentaram valor de $p < 0,05$; o grupo tratado com GNP-açaí $p < 0,01$; o grupo GNP-AV valor de $p < 0,001$ e o grupo FBM com valor de $p < 0,0001$.

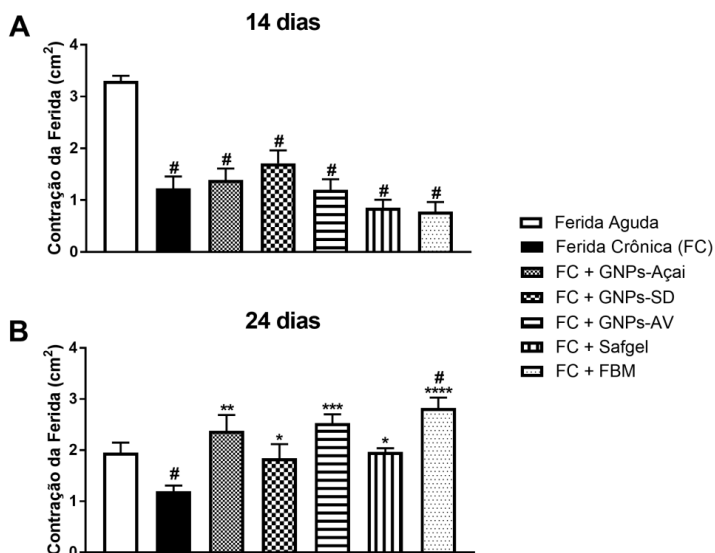


Figura 7. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a área de contração da ferida. Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na Figura 8A observa-se imagens representativas de cortes histológicos da ferida, corados com H&E, e na figura 8B as quantificações da média de número de infiltrado inflamatório. Os resultados demonstram diminuição do infiltrado em todos os grupos tratados comparados ao grupo FC, nos quais os grupos FC + GNPs-Açaí e FC + GNPs-AV apresentaram menor número de

infiltrado ($p<0,01$) que os grupos FC + GNPs-SD, FC + Safgel e FC + FBM ($p<0,05$). Os grupos FC + GNPs-Açaí, FC + GNPs-AV e FC + FBM ainda apresentaram menor número de infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo FA ($p<0,05$).

A figura 8C representa os resultados de cortes histológicos corados com tricômio de Gomori para visualização da área de colágeno, representado graficamente da figura 8D, o qual nenhum dos grupos apresentou diferença significativa.

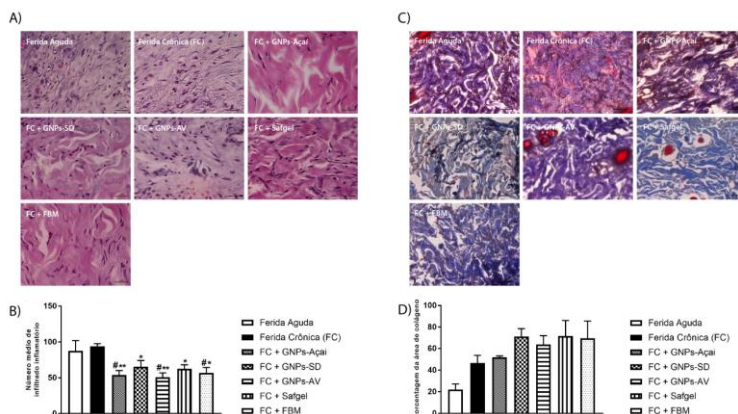


Figura 8. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a análise histológica. A) Infiltrado inflamatório; B) Número médio de infiltrado inflamatório; C) Área de colágeno; D) Porcentagem da área de colágeno. Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p<0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p<0,01$ v.s Grupo FC; *** $p<0,001$ v.s Grupo FC; *** $p<0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p<0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR

Para avaliação da expressão gênica de fibronectina e colágeno tipo III foi realizada a técnica de PCR (Figura 9). O grupo FC apresentou menor expressão desses marcadores quando comparado ao grupo FA (figura 9A, $p < 0,05$).

Ao analisar os resultados dos grupos tratados, o grupo FC + GNP-açaí apresentou aumento na expressão gênica de fibronectina quando comparado ao grupo FC ($p < 0,05$). Os grupos FC + GNP-AV, FC + Safgel e FC + FBM também apresentaram aumento na expressão gênica de fibronectina quando comparado ao grupo FC ($p < 0,001$), sendo que o grupo FC + FBM também foi diferente estatisticamente do grupo FA ($p < 0,05$).

Em relação ao colágeno tipo III (figura 9B), todos os grupos tratados demonstraram aumento da expressão gênica comparados ao grupo FC, no qual o grupo FC + GNP-Açaí apresentou um valor de $p < 0,05$. Os grupos FC + GNP-SD, FC + Safgel e FC + FBM obtiveram um valor de $p < 0,01$ e o grupo FC + GNP-AV $p < 0,0001$.

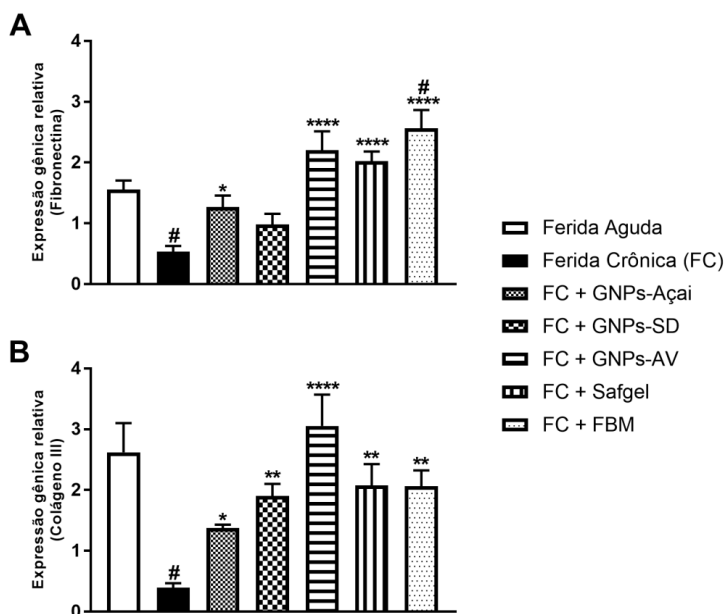


Figura 9. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre a avaliação da expressão gênica de fibronectina e colágeno tipo III por PCR. Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.6 ANÁLISE DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Na figura 10 estão representados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatória TNF- α (figura 10A) e IL-1 β (figura 10B). Na figura 10A observa-se que o grupo FC apresentou aumento significativo dos níveis de TNF- α quando comparados

ao grupo FA ($p < 0,05$), já nos grupos tratados com GNP-AV, Safgel e FBM os níveis proteicos dessa citocina diminuíram quando comparados ao grupo FC ($p < 0,05$).

Na figura 10B, o grupo FC e FC + FBM apresentaram aumento dos níveis proteicos de IL-1 β ($p < 0,05$) comparados ao grupo FA. No entanto, resultado diferente foi encontrado nos grupos tratados com GNP-SD, GNP-AV e Safgel nos quais apresentaram diminuição nos níveis de IL-1 β comparados ao grupo FC ($p < 0,05$).

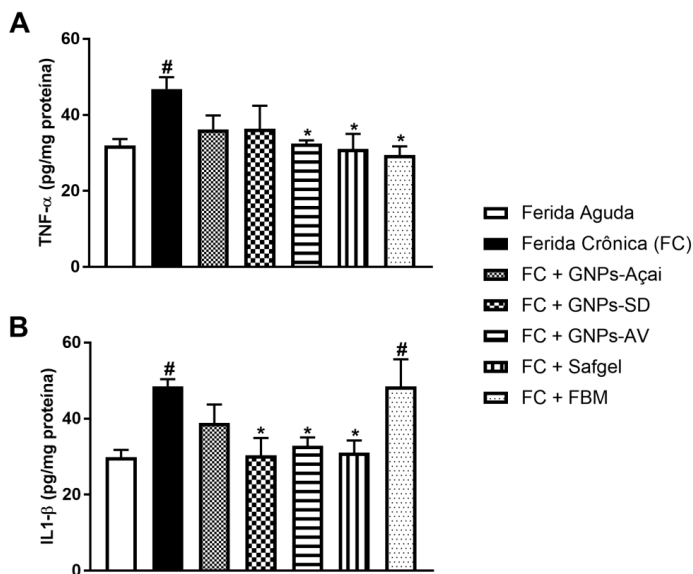


Figura 10. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e

$p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.7 ANÁLISE DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS

A figura 11 demonstra os resultados referentes aos níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias IL10 (Fig. 11A), IL 4 (Fig. 11B) e fator de crescimento TGF- β (Fig. 11C). Os níveis de IL10 apresentaram-se maior nos grupos FC + GNPs-Açaí ($p < 0,001$), FC + GNPs-SD ($p < 0,01$) e FC + GNPs-AV ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo FC. Resultado semelhante foi encontrado nos níveis proteicos de IL4, nos quais os grupos FC + GNPs-SD e FC + GNPs-AV ($p < 0,05$) e o grupo FC + GNPs-Açaí ($p < 0,01$) apresentaram aumento nos níveis desse marcador quando comparados ao grupo FC.

Na análise dos níveis do fator de crescimento TGF- β (figura 11C), o grupo FC apresentou diminuição significativa quando comparado ao grupo FA ($p < 0,05$). Já os grupos tratados apresentaram aumento nos níveis desse marcador quando comparados ao grupo FC, sendo os grupos FC + GNPs-AV, FC + Safgel e FC + FBM apresentaram valor de $p < 0,05$ e o grupo FC + GNPs-SD $p < 0,01$. O grupo tratado com GNPs-Açaí apresentou aumento significativa nos níveis de TGF- β quando comparado ao grupo FC ($p < 0,0001$) e quando comparado ao grupo FA ($p < 0,05$).

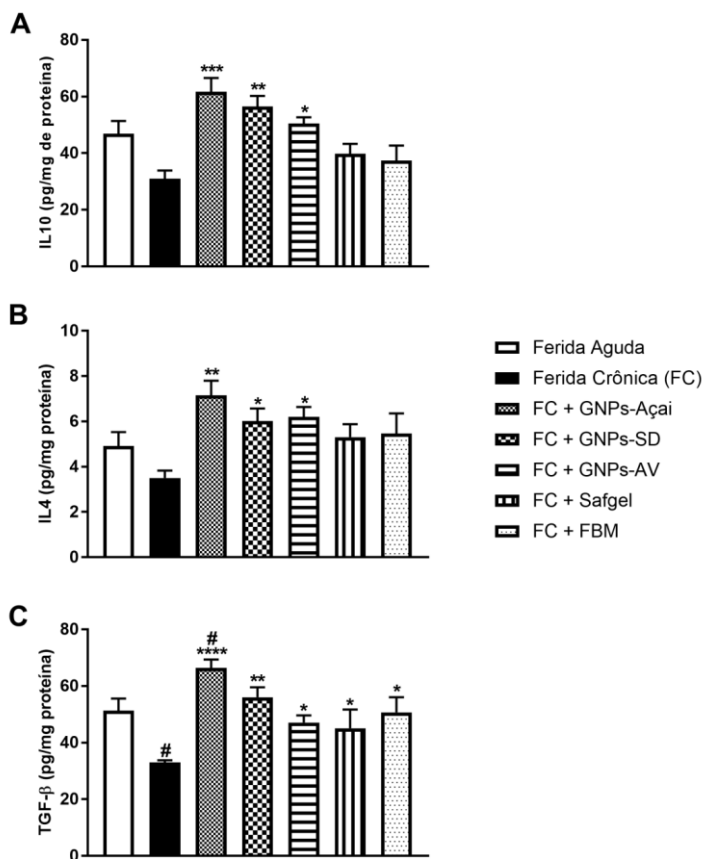


Figura 11. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias (IL10, IL4 e TGF- β). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE OXIDANTES

Os níveis de DCF e nitrito foram utilizados como parâmetros oxidativos (Fig. 12). Em relação os níveis de DCF (figura 12A) o grupo FC apresentou um aumento quando comparado ao grupo FA ($p < 0,05$). O contrário foi observado nos grupos tratados, onde os níveis de DCF estavam diminuídos nos grupos tratados com GNPs-Açaí, GNPs-SD e Safgel ($p < 0,01$) e nos grupos GNPs-AV e FBM ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo FC.

Resultado semelhante foi observado na figura 12B. Os níveis de nitrito apresentaram-se aumentados no grupo FC ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo FA. E os grupos tratados apresentaram diminuição significativa desses níveis, sendo os grupos tratados com GNPs-Açaí, Safgel e FBM ($p < 0,01$), o grupo GNPs-SD ($p < 0,05$) e o grupo GNPs-AV ($p < 0,001$) comparados ao grupo FC.

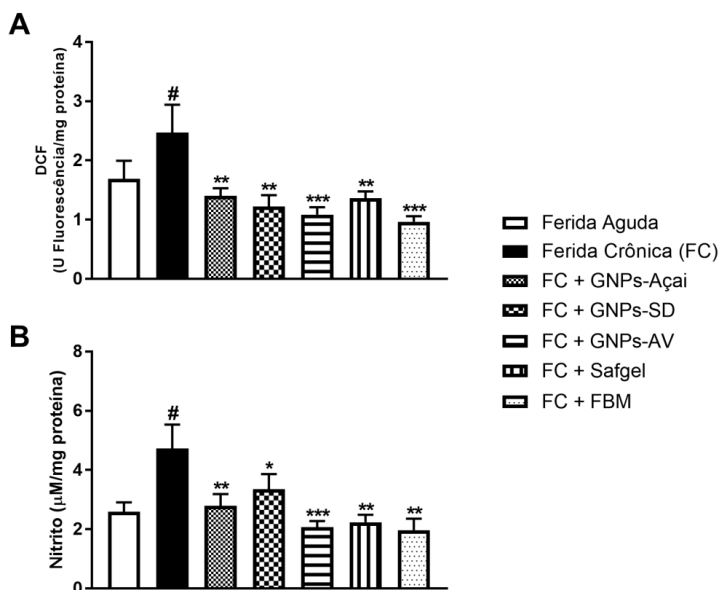


Figura 12. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os níveis de oxidantes: DCF (A) e Nitrito (B). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.9 MARCADORES DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

A figura 13 apresenta os marcadores de dano oxidativo e os níveis de enzimas antioxidantes. Como marcadores de dano oxidativo foram analisados os níveis de carbonil (figura 13A) e o conteúdo de sulfidril (figura 13B). Em relação a carbonilação de

proteínas o grupo FC apresentou aumento significativo em relação ao grupo FA ($p < 0,05$). Já os grupos tratados apresentaram diminuição significativa nos níveis desse marcador sendo os grupos FC + GNPs-Açaí, FC + GNPs-AV e FC + Safgel ($p < 0,01$) e os grupos FC + GNPs-SD e FC + FBM ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo FC. A figura 13B representa o conteúdo de sulfidrina, onde apresentou-se diminuído em todos os grupos (exceto FC + GNPs-AV) quando comparados ao grupo FA ($p < 0,05$).

A defesa antioxidante foi medida através da atividade de superóxido dismutase e glutatona reduzida. Na figura 13C a atividade de SOD estava diminuída nos grupos FC, FC + Safgel e FC + FBM comparados ao grupo FA ($p < 0,05$). Já nos grupos FC + GNPs-Açaí e FC + GNPs-AV apresentou-se aumentada ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo FC. Na figura 13D a atividade de GSH apresentou-se diminuídas nos grupos FC e FC + Safgel comparados ao grupo FA ($p < 0,05$) e o grupo FC + GNPs-AV apresentou aumento dessa atividade enzimática quando comparado ao grupo FC ($p < 0,05$).

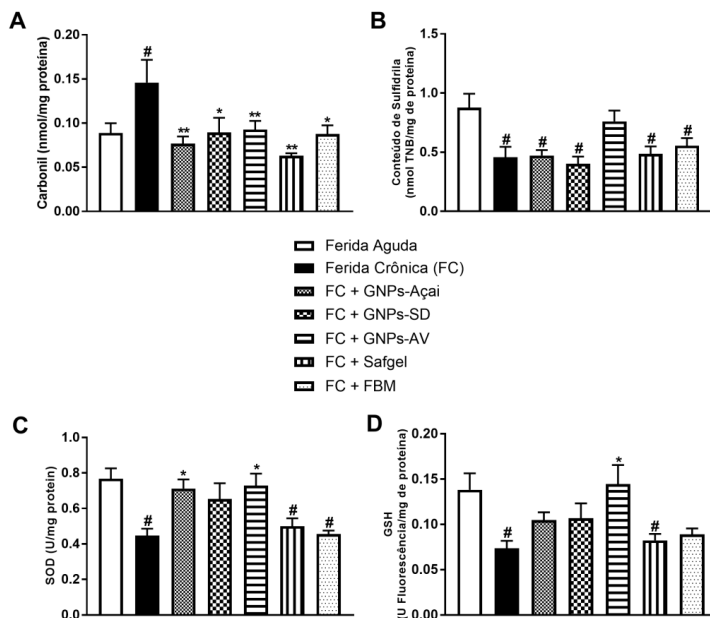


Figura 13. Efeitos do tratamento com GNPs-Açaí, GNPs-SD, GNPs-AV, Safgel e FBM sobre os marcadores de dano oxidativo: Carbonil (A) e Conteúdo de Sulfidrila (B) e de defesa antioxidante: SOD (C) e GSH (D). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A inflamação prolongada é uma das principais causas de feridas crônicas em nível celular. A inflamação crônica caracteriza-se quando o organismo não é capaz de resolver a inflamação fisiológica, e a transição para a fase de proliferação é bloqueada (Velnar et al., 2009). Muitos fatores têm sido associados à inflamação prolongada, resultando em atraso na cicatrização de feridas (Qian et al., 2016), mas ainda se investiga os mecanismos subjacentes de uma inflamação crônica e transição atrasada ou perturbada para a fase de proliferação.

A maioria dos modelos pré-clínicos de feridas estabelecidos não leva em consideração a inflamação prolongada, então eles criam feridas agudas que não refletem corretamente a prática clínica (Velnar et al., 2009). Neste estudo, analisou-se o impacto específico da inflamação na progressão da cicatrização de feridas. Para induzir a inflamação prolongada, foi realizada aplicação tópica de Resiquimod. A inflamação foi documentada por pontuação visual e área de contração da ferida, somados a análise histológica, níveis de expressão gênica de fibronectina e colágeno tipo III, e mediadores inflamatórios.

Uma vez que a inflamação prolongada desempenha um papel proeminente na cicatrização retardada de feridas, o modelo inflamatório foi confirmado pelos resultados desse estudo, já que o grupo com Resiquimod apresentou o maior escore inflamatório

quando comparado aos grupos tratados, juntamente com menor área de contração da ferida. O resultado inflamatório foi ainda confirmado pelas análises histológica e de expressão gênica de fibronectina e colágeno, em que estes marcadores se apresentaram menores no grupo FC induzida com Resiquimod. Tomados em conjunto, o grupo que recebeu Resiquimod sem tratamento apresentou resultados inflamatórios significativamente superior a todos os grupos tratados.

A aplicação biológica das GNPs vem demonstrando resultados promissores, devido à suas propriedades de funcionalização, biocompatibilidade, facilidade na permeabilidade celular e alta capacidade de aumentar o potencial terapêutico das drogas, alterando a farmacocinética, a biodistribuição ou absorção celular, além de propriedade antioxidante e anti-inflamatória, em modelos de lesão tecidual (Bhattacharya, 2008; Arvizo et al., 2012).

Afim de propor um tratamento para a inflamação prolongada, esse estudo avaliou os efeitos do tratamento das feridas com GNPs sintetizadas a partir de extratos de plantas, a chamada síntese verde. Os métodos verdes e o uso de reagentes não tóxicos na preparação de GNPS têm por finalidade aumentar a biocompatibilidade das nanopartículas de ouro, reduzir os riscos ambientais e riscos tóxicos. Esses métodos incluem o uso de plantas e seus constituintes como agentes redutores seguros no processo de síntese, reações enzimáticas biológicas e utilização

de diferentes açúcares como os mono e polissacarídeos. Além disso, a síntese de NPs à base de plantas é rápida, estável e econômica (Ovais et al., 2017).

Em outro estudo já realizado pelo grupo, o efeito das GNP's sintetizadas pelo método químico (citrato) foi superado pelos efeitos das GNP's sintetizadas pelo método verde (curcumina). Foi demonstrado o potencial efeito das GNP's-Cur em atenuar a ação das citocinas pró-inflamatórias, promover um ambiente oxirredutor equilibrado proporcionando redução de células inflamatórias, além de regular positivamente as citocinas anti-inflamatórias em relação aos demais grupos (Casagrande et al., 2023). Diante do exposto no presente estudo, foram avaliadas a eficácia do tratamento com GNP's sintetizadas a partir do extrato das plantas *E. oleracea* popularmente conhecida como açaí, *C. lechleri*, o sangue de dragão (SD), e *A. Vera* (AV), em feridas crônicas induzidas por Resiquimod.

Quando analisados os resultados de escore inflamatório, no 24º dia, totalizando 10 dias após os tratamentos diários com as GNP's sintetizadas a partir do extrato das plantas mencionadas anteriormente, foi observado que os grupos tratados com GNP's-Açaí e GNP's-SD apresentam menor escore ($p < 0,001$) inflamatório em relação ao controle. Akturk et al. (2016) avaliaram as propriedades estruturais e morfológicas das GNP's, sua biocompatibilidade *in vitro* e efeitos *in vivo*, como indução ou inibição de respostas inflamatórias, influenciando o fechamento

de feridas e sua possível contribuição ao aumento da reepitelização, neovascularização e formação de tecido de granulação. Observou-se que essas partículas estão associadas à secreção de citocinas, apresentando capacidade angiogênica capaz de aumentar a proliferação de fibroblastos e diminuir a apoptose celular (Mendes et al., 2022).

Já é evidenciado na literatura que as GNPs sintetizadas a partir de várias ervas medicinais demonstram notável potencial de cicatrização de feridas (Milaneze et al. 2014; Kim et al. 2015; Amjed et al., 2017). Os extratos de plantas medicinais reduzem as soluções salinas levando à formação das nanopartículas correspondentes. Essas nanopartículas sintetizadas pela síntese verde são formadas devido à presença de fitoquímicos, por exemplo, fenólicos, flavonoides, polissacarídeos, vitaminas e aminoácidos como agentes redutores em extratos vegetais aquosos (Ahmad et al., 2017; Ayaz et al., 2016; Kasithevar et al., 2017; Ovais et al., 2017; Zohra et al., 2019). Diversas nanopartículas metálicas sintetizadas pelo método de síntese verde foram consideradas seguras devido às suas atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória (Oyarzun-Ampuero et al., 2015; Chowdhury et al., 2017).

Ainda são poucos os estudos relatando os efeitos das GNPs reduzidas com SD. Porém, em 1994, um dos primeiros estudos com a planta SD na cicatrização de feridas, Chen e

colaboradores concluíram que as propriedades cicatrizantes da seiva podem ser o resultado de vários fatores: a capacidade de formar uma película que protege contra a invasão microbiana das feridas; atividade de eliminação de radicais livres; o alto teor de polifenólicos com seu conhecido aspecto de ligação a proteínas e enzimas; e a forte ação anti-inflamatória e antibacteriana dos polifenóis, que juntos facilitariam a cicatrização melhorada do tecido danificado (Chen et al., 1994).

As atividades cicatrizantes da planta SD foram comprovadas em outros estudos por promover a angiogênese, deposição de colágeno, epitelização e contração (Ning et al., 2022; Pona et al., 2018). O perclorato de dracorodina, extraído do SD, foi utilizado para avaliação do processo de cicatrização de feridas em modelo de ratos Wistar, sendo constatado seu poder de inibir a secreção de IL-1 α e TNF- α , reduzindo a inflamação, bem como estimulando VEGF e TGF, na formação de novos vasos e na deposição do colágeno (Jiang et al., 2020).

Acredita-se que os efeitos das plantas se somam aos efeitos das GNPs. O *C. lechleri* no tratamento de feridas crônicas pode evitar a cicatrização prolongada de feridas, influenciando a fase inflamatória, proliferativa e de maturação por meio de anti-inflamatório, antioxidante, aumentando a síntese de colágeno, contração da ferida e migração de fibroblastos (Henriques e Lopes, 2004; De Marino et al., 2008; Gupta et al., 2008; Namjoyan et al., 2016; Gordon et al., 2018). Resultado

semelhante foi observado no presente estudo ao avaliar a contração da ferida, onde o grupo tratado com SD diminuiu a área de contração quando comparado ao grupo FC ($p < 0,01$).

Seguindo no resultado da área de contração, as GNPs sintetizadas com extrato de Açaí superaram os resultados da planta SD. Muitas formulações de GNPs com extratos de plantas foram relatadas para melhorar numerosos processos durante a cicatrização de feridas. Esses processos envolvem principalmente a epitelização, a síntese de colágeno e a contração da ferida (Ovais et al., 2018; Dubey et al., 2023).

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.

O *E. oleracea* (açaí) é uma fruta roxa de uma palmeira que contém antocianina e outros compostos polifenólicos. Apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e promove a proliferação de fibroblastos (Felin et al., 2022). Kang e Kim (2018) apontam que o açaí pode prevenir a inflamação, promover a reepitelização e agir na síntese de colágeno. No estudo de Kang et al. (2017) foi relatado que os grupos tratados com açaí tinham números minimamente

reduzidos de mastócitos em comparação com o grupo tratado com controle de veículo. Mastócitos controlam a reação inflamatória inicial infiltrando-se nos glóbulos brancos, aumentando a permeabilidade vascular. O açaí pode estar relacionado aos mastócitos no momento da cicatrização de feridas, pois os mastócitos estão envolvidos no controle da reação inflamatória inicial. Além disso, os mastócitos podem liberar muitos mediadores inflamatórios, envolvidos em reações inflamatórias crônicas (Kang et al., 2017).

Os resultados do tratamento com GNPs-AV em relação a área de contração da ferida são parecidos com os da FBM (padrão ouro). Estudos anteriores já demonstraram o efeito do tratamento do laser e GNPs na área de contração da ferida (Mendes et al., 2020). Contudo, são escassos os estudos de GNPs reduzidas com AV. Essa planta é conhecida como “a planta curativa” e tem sido tradicionalmente usada para tratar feridas e queimaduras (Choi et al., 2001). Contém várias propriedades medicinais, como cicatrização de feridas, promoção do reparo de danos causados pela radiação, efeitos anti-inflamatórios, atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, estímulo da hematopoiese e efeitos antioxidantes (Vijayalakshmi et al., 2012). Estudos sugerem que o tratamento com AV resultou em cicatrização mais rápida através da estimulação da produção de fator de crescimento, angiogênese, proliferação de fibroblastos e

deposição de colágeno e produção de fatores de crescimento (Boudreau et al., 2006).

Estudos anteriores sugerem que os componentes ativos de AV, como o acemanano, podem induzir ligantes especiais a receptores de manose presentes na superfície celular de fibroblastos e macrófagos, essa ligação resulta em células que desencadeiam os fatores de crescimento e proliferação. No estudo *in vitro* de Jettanacheawchankit et al. (2009) com acemanano (polissacarídeo de AV), demonstrou seu efeito sobre a expressão de colágeno tipo I, fator de crescimento de queratinócitos-1 (KGF-1) e produção de VEGF.

No presente estudo, quando avaliado na análise histológica o número de infiltrado inflamatório, os grupos tratados com GNPs-Acaí e GNPs-AV apresentaram resultado significativamente menor quando comparados com o grupo FC. Além disso, ainda referente à análise histológica, quando avaliados os resultados de colágeno total não foi observado diferença significativa entre os grupos.

Na fase de maturação ou remodelamento, ocorre a deposição de colágeno de forma organizada. O colágeno que é produzido inicialmente apresenta espessura com menor diâmetro do que o colágeno existente na pele normal. Durante a fase de remodelação, a formação de tecido de granulação cessa, devido a apoptose das células responsáveis (Mandelbaum et al., 2003; Profyris et al., 2012). Com a maturação da ferida, a composição

da matriz extracelular sofre alterações. O colágeno tipo III depositado durante a fase proliferativa é lentamente degradado e substituído por colágeno mais forte, tipo I. Este tipo de colágeno é orientado como pequenos feixes paralelos, que diferem drasticamente da orientação tecidual do colágeno presente na derme normal. A taxa de síntese declina por volta de quatro semanas e se equilibra com a taxa de destruição e, então, se inicia a fase de maturação do colágeno, que se caracteriza por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade (Tazima et al., 2008; Mendes et al., 2020, Miyab et al., 2020).

Apesar de a análise histológica de colágeno total não apresentar diferença significativa, quando observados os resultados de PCR, observa-se que o tratamento com GNPs-AV foi eficiente tanto no aumento da expressão gênica de fibronectina, como no aumento da expressão gênica de colágeno tipo III. A fibronectina está envolvida na coagulação, movimento celular epitelial, diferenciação celular, montagem da matriz de colágeno e contração da ferida no processo de cicatrização (Kang et al., 2017). Expressão significativamente maior de fibronectina foi observada no grupo tratado com GNPs-AV, Safgel e FBM em relação ao Resiquimod. Esta é uma proteína adesiva que ajuda as células a aderirem à matriz, isso significa que o tratamento com GNPs-AV pode promover a migração celular influenciando assim a síntese de colágeno.

Já foi demonstrado que o tratamento com GNPs contribui para o aumento significativo na expressão de colágeno, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na cicatrização de feridas (Kim et al., 2015; Lau et al., 2017). Assim, sugere-se que os efeitos dessas nanopartículas podem ter sido potencializados com os efeitos da AV.

O polissacarídeo de AV regula a expressão dos genes MMP-3 e inibidor de tecido da metaloproteinase de matriz 2 (TIMP-2) no reparo de feridas dérmicas no nível transcricional e afeta a formação de tecido de granulação e cicatrização de feridas, aumentando a produção de glicosaminoglicano e colágeno (Tabandeh et al., 2014). O acemanano pode promover a expressão da ciclina D1 através da via de sinalização AKT/mTOR, de modo que não apenas promove a proliferação de fibroblastos da pele, mas também altera o processo do ciclo celular da fase G1 para a fase S através da tradução da ciclina D1. O VEGF desempenha um papel importante na neovascularização e na indução da proliferação e migração de células endoteliais, e a acemana pode promover a cicatrização de feridas estimulando a síntese de VEGF e colágeno tipo III (Xing et al., 2015; Chokboribal et al., 2015; Liu et al., 2019).

A manose-6-fosfato é um polissacarídeo de AV que desempenha um papel fundamental na epitelização. A manose-6-fosfato se liga aos receptores de fibroblastos e leva à proliferação dessas células, o que ajuda a promover a deposição de colágeno e

a regeneração da pele. Também inibe a ativação de TGF-1 e TGF-2, levando a uma redução da fibrose, o que ajuda a reduzir a cicatrização e promover a epitelização (Boudreau et al., 2006; Priya et al., 2016).

A maior expressão gênica de fibronectina e colágeno tipo III nos grupos tratados com GNPs-AV, Safgel e FBM pode ser explicada com a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias demonstrada na figura 10A e 10B. Na fase inflamatória, os neutrófilos secretam enzimas proteolíticas que degradam o colágeno e liberam fragmentos de material da MEC que atuam como fatores quimiotáticos para o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e outros mediadores inflamatórios (Kallis et al., 2018). Macrófagos liberam TNF- α , que causa indução da produção de IL-1 β . O TNF- α e IL-1 β são mitógenos para fibroblastos e deposição de colágeno, e causam regulação positiva de metaloproteinases de matriz (MMPs) que degradam as proteínas da MEC e permitem a migração celular. Essa regulação positiva leva a um aumento nas reações inflamatórias que causam dor (Kallis et al., 2018). Dessa maneira, reduzir os níveis circulantes dessas citocinas, controla o processo de inflamação.

Uma fase inflamatória prolongada retarda o processo de cicatrização da ferida (Shukla et al., 2019). No presente estudo, o grupo FC induzida com Resiquimod apresentou aumento nos níveis de IL-1- β e TNF- α , já o tratamento com GNPs-AV diminuiu

significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, induzindo assim efeitos anti-inflamatórios.

O tratamento de feridas deve incluir uma formulação anti-inflamatória eficaz para acelerar a cicatrização. Os compostos ativos presentes nas formulações à base de plantas, como flavonoides e fenóis, são frequentemente úteis para suprimir a produção de citocinas inflamatórias e, assim, bloquear a cascata de transdução inflamatória (Dev et al., 2019).

A sinalização celular e a atividade da matriz extracelular durante a cicatrização de feridas são controladas por uma variedade de fatores de crescimento, incluindo FGF, TGF e VEGF. O fator básico de crescimento de fibroblastos regula a replicação e a migração de fibroblastos epiteliais, endoteliais e fibroblásticos. O fator transformador de crescimento $\beta 1$ pode inibir a degradação da MEC, regular a proliferação de fibroblastos e estimular a produção de colágeno, elastina e fibronectina (Mesquita-Ferrari et al., 2011).

Na figura 11 observa-se níveis de citocinas anti-inflamatórias, em que os tratamentos propostos com GNPs sintetizadas a partir dos extratos das plantas tiveram melhores resultados que os tratamentos padrões (Safgel e FBM) quando comparados ao grupo FC, ganhando destaque ainda, o grupo tratado com GNPs-Açaí.

É claro e bem evidenciado na literatura que as GNPs possuem ação anti-inflamatória, ligada à sua capacidade de

supressão do NF- κ B (Wang et al., 2018), já que se sabe que a inibição da ativação de NF- κ B leva à regulação negativa da expressão de COX-2 e iNOS, suprimindo a resposta inflamatória (Karthikeyan et al, 2020). Outro mecanismo sugerido é a ligação direta de GNPs a IL1- β inibindo a ligação desta citocina ao seu receptor, efeito esse já demonstrado em trabalhos anteriores do grupo (Mendes et al., 2020). 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).

Quando observados os efeitos anti-inflamatórios do açaí, estudos *in vitro* mostraram que este extrato causa *downregulation* no NF- κ B e em seus genes-alvo, como TNF- α , IL6, IL8 e IL1- β , 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). Poucos mecanismos ainda são propostos na literatura quanto a ação anti-inflamatório do extrato do açaí. No estudo de Xiong et al. (2020) foi relatado que as antocianinas potencializam os padrões de migração celular de fibroblastos e queratinócitos, promovendo a produção de fator de crescimento endotelial vascular para aumentar a angiogênese, além de suprimir a geração de EROs, a resposta inflamatória (Kang et al., 2017) e

suprimir a ativação da COX-2 e TNF- α *in vitro* (Fragoso et al., 2012).

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 estresse oxidativo. Todos os grupos tratados com GNPs associados aos extratos das plantas de açaí, SD e AV foram capazes de reduzir ambos os marcadores oxidantes, DCF e nitrito, quando comparados ao grupo FC. Na sequência, também foram capazes de diminuir o dano oxidativo, avaliado através das análises de carbonil e sulfidril (Figura 13 A e 13 B), e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes SOD e GSH quando comparados ao grupo FC, ganhando destaque novamente o grupo tratado com GNPS-Açaí e GNPs-AV.

Os efeitos das plantas somam-se aos efeitos das GNPs, as quais vários estudos demonstram o papel efetivo dessas nanopartículas 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. (2015) 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.

As GNPs também têm propriedades antioxidantes substanciais na extinção de radicais livres, como OH (hidroxila), H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e NO (óxido nítrico), dependendo da superfície. Além disso, pelo motivo de as nanopartículas esféricas de ouro terem uma vasta área de superfície, elas têm uma alta propensão a receber elétrons e interagir com EROs para removê-las ou desativá-las e, conseqüentemente, tornam-se um potente agente antioxidante e são cruciais para a cicatrização de feridas (Mendes et al., 2022).

Segundo Shcherbakov, Denisov e Mostafavi (2023), o principal efeito das GNPs é a catálise das reações redox, que incluem a redução de O₂, levando à oxidação de doadores de elétrons, como antioxidantes. Ou seja, quando as GNPs catalisam a redução de O₂, as EROs são formadas apenas como intermediárias na superfície das nanopartículas, e são inevitavelmente reduzidas a água, catalisadas pelas GNPs.

A síntese verde de nanopartículas foi desenvolvida para superar as desvantagens do método químico convencional que utilizava agentes redutores e de cobertura tóxicos. 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 45 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 (Muller et al., 2017).

Um benefício da *E. 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 de cicatrização de feridas *in vivo* realizados em ratos. As proteínas carboniladas e as concentrações séricas dos grupos sulfidril 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). Esses

resultados confirmaram que o açaí é eficaz no controle da oxidação e das reações inflamatórias.

Além disso, a aloína (polissacarídeo da AV) protege a pele reduzindo a produção de peroxidação lipídica e ROS e aumentando a GSH e atividade de SOD (Silva et al., 2017; Liang et al., 2021). Estudos demonstraram que a componentes da AV inibem a ativação da caspase-3 induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e a morte celular apoptótica. Em resumo, a AV inibe a resposta inflamatória ao inibir a sinalização de NF- κ B (Du et al., 2019; Luo et al., 2018), inibe a inflamação bloqueando a expressão de iNOS e COX-2 (Sánchez et al., 2020; Park et al., 2009) e regula vias de sinalização da MAPK e PI3K-AKT, regulando assim o ciclo celular e a apoptose (Sun et al., 2016).

Portanto, formulações com alto potencial antioxidante são bons agentes cicatrizantes (Qu et al., 2019). Isso pode ser devido ao fato de que os antioxidantes eliminam os radicais livres, controlando assim o estresse oxidativo e acelerando o processo de cicatrização (Xiong et al., 2020).

Levando em consideração todos os resultados, propõe-se que o modelo de inflamação prolongada com Resiquimod funcionou como o esperado, onde os parâmetros inflamatórios analisados estavam superiores quando comparados ao grupo Lesão Aguda. Em complemento, as GNPs sintetizadas a partir da síntese verde, com destaque ao *A. vera* e o açaí, se provam promissoras e eficazes para tratamentos de feridas crônicas.

Sugere-se ainda que os efeitos das GNPs se somam aos efeitos dos extratos das plantas, sendo capazes de reduzir a inflamação causada pelo Resiquimod. Foi demonstrado que essas substâncias associadas apresentaram resultados anti-inflamatórios, antioxidantes e de reepitelização, semelhantes ou mais eficazes que as terapias padrões.

6 CONCLUSÃO

Levando em consideração os aspectos indicados nesse estudo, o modelo de inflamação crônica induzido com Resiquimod apresentou resultados inflamatórios significativamente superior a todos os grupos tratados. O que pode contribuir para a padronização de trabalhos futuros, haja vista a atual carência de dados na literatura com modelos estabelecidos de inflamação crônica.

Os tratamentos propostos, com destaque ao GNPs-Açaí e GNPs-AV, tiveram resultados semelhantes aos padrões utilizados na prática clínica. Indicando que as GNPs reduzidas pelo método de síntese verde podem estimular uma variedade de processos celulares e moleculares que auxiliam no microambiente da ferida por meio de efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, aumento da expressão de colágeno e aumento da área de contração da ferida, além de uma melhora do grau de inflamação de forma visual.

Assim, os efeitos das GNPs associados aos das plantas, favorece o processo de reparo tecidual em feridas crônicas. Porém, mais estudos devem ser realizados afim avaliar outros mecanismos envolvidos no reparo do tecido. Trabalhos futuros podem explorar o uso da síntese verde de GNPs associadas com diferentes biomateriais, peptídeos ou com bioengenharia tecidual para aplicações na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos.

REFERÊNCIAS

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):141-145.

Akturk O, Kismet K, Yasti AC, Kuru S, Duymus ME, Kaya F, Keskin D. Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: a potential skin wound healing biomaterial. *Journal of biomaterials applications*. 2016; 31(2): 283-301.

Alven S, AderibigbeBA. Quitosana e hidrogéis à base de celulose para tratamento de feridas. *Jornal internacional de ciências moleculares*. 2020; 21(24): 9656.

Ahmad F, Raziq F, Ullah N, Khan H, Din N. In vitro and in vivo bio-assay of phytobiocidal effect of plant extracts on *Alternaria solani* causing agent of early blight disease in tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2017; 50(11-12): 568-583.

Amjed S, Junaid K, Jafar J, Amjad T, Maqsood W, Mukhtar N, Ansari F. Detection of antibacterial activities of Miswak, Kalonji and Aloe vera against oral pathogens & anti-proliferative activity against cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17(1): 1-10.

Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biological research*. 2007; 40(2): 97-112.

Ayaz M, Junaid M, Ullah F, Sadiq A, Subhan F, Khan MA, Ahmad S. Molecularly characterized solvent extracts and saponins from *Polygonum hydropiper* L. show high anti-angiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity. *Frontiers in pharmacology*. 2016; 7: 74.

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

Baptista J, Martins MD, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP, Pinto Júnior DDOS S, Ferrari RA. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(1):11-7.

BarathManiKanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SRK, Youn HS, Eom S, Gurunathan S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Nanobiotechnology.* 2010; 8 (1):16.

Barkat MA, Ahmad I, Ali R, Singh SP, Pottoo FH, Beg S, Ahmad FJ. Nanosuspension-based aloe vera gel of silver sulfadiazine with improved wound healing activity. *AAPS PharmSciTech.* 2017; 18: 3274-3285.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; 60: 1289–1306.

BinShabaib MS, ALHarthi SS, Helaby BS, AlHefdhhi 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. *Frontiers in Oral Health.* 2022; 66.

Boudreau MD, Beland FA. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (miller), *Aloe vera*. *Journal of Environmental Science and Health Part C.* 2006; 24(1): 103-154.

Breitkreutz D, Mirancea N, Nischt R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem. Cell Biol.* 2009; 132: 1–10.

Budai MM, Varga A, Miliesz S, Tózsér J, Benkő S. Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Molecular immunology.* 2013/ 56(4): 471-479.

Budai MM, Varga A, Miliesz S. Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Mol Immunol.* 2013; 56: 471.

Burusapat C, Supawan M, Pruksapong C, Pitiseree A, Suwantemee C. Topical Aloe vera gel for accelerated wound healing of split-thickness skin graft donor sites: A double-blind, randomized, controlled trial and systematic review. *Plastic and reconstructive surgery.* 2018; 142(1): 217-226.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29(1): 23-39.

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); 843-850.

Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PloS ONE.* 2011; 6(7):22453.

Chen B, Lu Y, Chen Y, Cheng J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol.* 2015; 225(3): R83-99.

Chen ZP, Cai Y, Phillipson JD. Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood1. *Planta medica.* 1994; 60(06): 541-545.

Chowdhury A, Kunjiappan S, Panneerselvam T, Somasundaram B, Bhattacharjee C. Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. *International nano letters.* 2017; 7: 91-122.

Choi SW, Son BW, Son YS, Park YI, Lee SK, Chung MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera, *Br. J. Dermatol.* 2001; 145 (4): 535–5545.

Chokboribal J, Tachaboonyakiat W, Sangvanich P, Ruangpornvisuti V, Jettanacheawchankit S, Thunyakitpisal P. Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan, an extracted polysaccharide from *Aloe vera*. *Carbohydrate polymers.* 2015; 133: 556-566.

Clark RA. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol.* 1990; 128S–134.

Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF (ed) *The molecular and cellular biology of wound repair.* Plenum Press. 1996; 3–35.

Cupp CL, Bloom DC. Gene therapy, electroporation, and the future of wound-healing therapies. *Facial plastic surgery.* 2002; 18(01): 053-058.

Cutolo M, Campitiello R, Gotelli E, Soldano S. The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Front Immunol.* 2022; 19(13): 867260.

Da Silva JP, Da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1):17-21.

Dada, A.O., Adekola, F.A., Dada, F.E., Adelani-Akande, A.T., Bello, M.O., Okonkwo, C.R., D'Arpa P, Leung KP. Toll-like receptor signaling in burn wound healing and scarring. *Advances in wound care.* 2017; 6(10): 330-343.

Dasu MR, Isseroff RR. Toll-like receptors in wound healing: Location, accessibility, and timing. *J. Investig. Dermatol.* 2012; 132: 1955–1958.

Dasu MR, Isseroff RR. Toll-like receptors in wound healing: location, accessibility, and timing. *Journal of Investigative Dermatology.* 2012; 132(8): 1955-1958.

Davidson JR. Current concepts in wound management and wound healing products. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2015; 45(3), 537–564.

de Brito Vieira CP, Furtado AS, de Almeida PCD, Luz MHBA, Pereira AFMJ. Prevalência e caracterização de feridas crônicas em idosos assistidos na atenção básica. 2017; 31 (3).

Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011; 216(7): 753-762.

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 Marino S, Gala F, Zollo F, Vitalini S, Fico G, Visioli F, Iorizzi M. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. Molecules. 2008; 13(6): 1219-1229.

Dembitsky VM, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Vearasilp S, Trakhtenberg S, Gorinstein S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. Food research international. 2011; 44(7): 1671-1701.

Dev SK, Choudhury PK, Srivastava R, Sharma M. Antimicrobial, antiinflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation. Biomed Pharmacother 2019; 111: 555e67.

Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. J Invest Dermatol. 2000; 115: 234–244.

Diligence M. Worldwide Wound Management, forecast to 2021: established and emerging products, technologies and markets in the americas, europe, asia/pacific and rest of world. Pacific and rest of world. 2015.

Diligence M. Worldwide surgical sealants, glues, wound closure, and anti-adhesion markets. 2013; 2010-2017.

Dockrell DH, Kinghorn GR. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001; 48(6): 751-755.

Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines

expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:1651-7.

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. Açai (Euterpe oleracea Mart.) Attenuates Oxidative Stress and Alveolar Bone Damage in Experimental Periodontitis in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10):1902.

Dovi JV, He LK, Dipietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol*. 2003; 73: 448–455.

Du Y, Qian B, Gao L, Tan P, Chen H, Wang A, Fu W. Aloin preconditioning attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway in vivo and in vitro. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019

Dubey S, Dixit AK. Preclinical evidence of polyherbal formulations on wound healing: A systematic review on research trends and perspectives. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2023; 14(2): 100688.

Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci*. 2003; 104: 27–38.

Eming AS, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 514–525.

Esumi K, Takei N, Yoshimura T. Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites. *Colloid Surf B Biointerface*. 2003; 32(2): 117–123.

Falanga VJTL. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. 2005; 366 (9498): 1736-1743.

Felin FD, Maia-Ribeiro EA, Felin CD, Bonotto NA, Turra BO, Roggia I, Ribeiro TA. Amazonian Guarana-and Açai-Conjugated Extracts Improve Scratched Fibroblast Healing and *Eisenia fetida* Surgical Tail Amputation by Modulating Oxidative Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022.

Flohé L, Gunzler W. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*.1984; 105: 114-21.

Folkman, J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med*. 2006; 57: 1-18.

Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012; 67: 235-241.

Freitas MCD, Medeiros ABF, Guedes MVC, Almeida PCD, Galiza FTD, Nogueira JDM. Úlcera por pressão em idosos institucionalizados: análise da prevalência e fatores de risco. *Revista Gaúcha de Enfermagem*. 2011; 32(1), 143-150.

Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in wound care*. 2015; 4(9): 560-582.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(11):1307-15.

Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 1999; 10: 137–142.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3:

Gordon WC, López VG, Bhattacharjee S, Gil DR, Díaz JA, de la Losa FP, Bazan NG. A nonsteroidal novel formulation targeting

inflammatory and pruritus-related mediators modulates experimental allergic contact dermatitis. *Dermatology and Therapy*. 2018; 8: 111-126.

Gould L, Abadir P, Brem H, Carter M, Conner- Kerr T, Davidson J, DiPietro L, Falanga V, Fife C, Gardner SJWR. Regeneration, Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. 2015; 23 (1): 1-13.

Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89(3):219–229.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 2007 (453): 314–321.

He S, Blomback M, Bark N, Johnsson H, Wallen NH. The direct thrombin inhibitors (argatroban, bivalirudin and lepirudin) and the indirect Xa-inhibitor (danaparoid) increase fibrin network porosity and thus facilitate fibrinolysis.

Hennessy EJ, Parker AE, & O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(4): 293-307.

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

Holzer-Geissler JC, Schwingenschuh S, Zacharias M, Einsiedler J, Kainz S, Reisenegger P, Kotzbeck P. The impact of prolonged inflammation on wound healing. *Biomedicines*. 2022; 10(4): 856.

Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*. 1996; 8: 548–556.

Huet E, Vallee B, Szul D, Verrecchia F, Mourah S, Jester JV, Hoang-Xuan T, Menashi S, Gabison EE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing α -smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling. *FASEB J*. 2008; 22: 1144–1154.

Interdonato L, Marino Y, Franco GA, Arangia A, D’Amico R, Siracusa R, Paola, R. D. Açai Berry Administration Promotes Wound Healing through Wnt/ β -Catenin Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1): 834.

Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol*. 2008; 180: 569–579.

Jales STL, Barbosa RdM, de Albuquerque AC, Duarte LHV, da Silva GR, Meirelles LMA, da Silva TMS, Alves AF, Viseras C, Raffin FN, Moura TFAdL. Development and Characterization of Aloe vera Mucilaginous-Based Hydrogels for Psoriasis Treatment. *J. Compos. Sci*. 2022; 6(8):231.

Jiang M, Su X, Liu J, Zheng C, Li X. Systems pharmacology-dissection of the molecular mechanisms of dragon’s blood in improving ischemic stroke prognosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020.

Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J. Pharmacol. Sci*. 2009; 109(4): 525-531.

Kasithevar M, Saravanan M, Prakash P, Kumar H, Ovais M, Barabadi H, Shinwari ZK. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alysicarpus monilifer* leaf extract and its antibacterial

activity against MRSA and CoNS isolates in HIV patients. *J. Interdiscip. Nanomed.* 2017; 2(2): 131-141.

Kallis MP, Maloney C, Lipskar AM. Management of pilonidal disease. *Current opinion in pediatrics.* 2018; 30(3): 411-416.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1776–1784.

Kang J, Li Z, Wu T, Jensen GS, Schauss AG, Wu X. Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry.* 2010; 122(3): 610-617.

Kang MH, Choi S, Kim BH. Skin wound healing effects and action mechanism of acai berry water extracts. *Toxicol. Res.* 2017; 33: 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

Kazemzadeh-Narbat M, Annabi N, Khademhosseini AJMT. Surgical sealants and high strength adhesives. 2015; 18 (4): 176-177

Kim JE, Lee J, Jang M, Kwak MH, Go J, Kho EK. Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. *BiomaterSci.* 2015; 3(3):509–519.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(4):621-5.

Lau P, Bidin N, Islam S, Shukri WNBWM, Zakaria N, Musa N, Krishnan G. Influence of gold nanoparticles on wound healing treatment in rat model: photobiomodulation therapy. *Lasers Surg Med.* 2017; 49(4): 380-386.

Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 1975; 78: 71–100.

Leu JG, Chen SA, Chen HM, Wu WM, Hung CF, Yao YD, Tu CS, Liang YJ. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. *Nanomedicine: Nanotechnology. Biol Med.* 2012; 8(5): 767–775.

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: 464-478.

Li G, Feng X, Wang S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res.* 2005; 54:193–99.

Li X, Wang H, Rong H, Li W, Luo Y, Tian K. Effect of composite SiO₂@ AuNPs on wound healing: In vitro and vivo studies. *J Colloid Interface Sci.* 2015; 445:312–319.

Liang J, Cui L, Li J, Guan S, Zhang K, Li J. Aloe vera: a medicinal plant used in skin wound healing. *Tissue Eng. Part B: Rev.* 2021; 27(5): 455-474.

Lin LX, Wang P, Wang YT. Aloe vera and Vitis vinifera improve wound healing in an in vivo rat burn wound model. *Mol Med Rep.* 2016; 13: 1070.

Lindholm C, Searle RJ. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. 2016; 13: 5-15

Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *AnBrasDermatol*. 2010; 85(6): 849-55.

Liu C, Cui Y, Pi F, Cheng Y, Guo Y, Qian H. Extraction, purification, structural characteristics, biological activities and pharmacological applications of acemannan, a polysaccharide from aloe vera: A review. *Molecules*. 2019; 24(8): 1554.

Lopes MIL, Saffi J, Echeverrigaray S, Henriques JAP, Salvador M. Mutagenic and antioxidant activities of Croton lechleri sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 95(2-3): 437-45.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.

Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Muller W, Roers A, Eming, SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*. 2010; 184: 3964–3977.

Luo X, Zhang H, Wei X, Shi M, Fan P, Xie W, Xu N. Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory response and apoptosis by inhibiting the activation of NF- κ B. *Molecules*. 2018; 23(3): 517.

Luz SR, Lopacinski AC, Fraga R, Urban CA. Úlcers de pressão. *Geriatr Gerontol*. 2010; 4(1): 36-43

Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- γ /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide*. 2010; 23(3):214–219.

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. 2014.

Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011; 216(7):753–762.

Malam Y, Loizidou M, Seifalian, AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol. Sci*. 2009; 30(11): 592-599.

Mandelbaum SH, Di Santis ÉP, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2003; 78: 393-408.

Martinez-Ferrer M, Afshar-Sherif AR, Uwamariya C, de Crombrughe B, Davidson JM, Bhowmick NA. Dermal transforming growth factor- β responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. *Am. J. Clin. Pathol*. 2010; 176(1): 98-107.

Mat Saad AZ, Khoo TL, Halim AS. Wound bed preparation for chronic diabetic foot ulcers. *ISRN Endocrinol*. 2013, 608313.

Medeiros JL, Nicolau RA, Nicola EM, Santos JN, Pinheiro AL. Healing of Surgical Wounds Made with lambda970-nm Diode Laser Associated or Not with Laser Phototherapy (lambda 655 nm) or Polarized Light (lambda 400-2000 nm). *Photomed Laser Surg*. 2010; 28: 489-96.

Medhe S, Bansal P, Srivastava MM. Enhanced antioxidant activity of gold nanoparticle embedded 3, 6-dihydroxyflavone: A combinational study. *Appl Nanosci*. 2014; 4(2): 153– 161.

Meirelles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third-degree burns: a histological study in rats. *Photomed. Laser Surg.* 2008; 26(2): 159–166.

Mendes C, dos Santos Haupenthal DP, Zaccaron RP, de Bem Silveira G, Corrêa MEAB, de Roch Casagrande L, Silveira PCL. Effects of the association between photobiomodulation and hyaluronic acid linked gold nanoparticles in wound healing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020; 6(9): 5132-5144.

Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA JR, DA Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3):335-40.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985; 5:31–39

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971; 122: 532-535.

Midwood KS, Williams N, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1031–1037.

Mirza R, Dipietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol.* 2009; 175: 2454–2462.

Miyab KB, Alipoor E, Vaghardoost R, Isfeedvajani MS, Yaseri M, Djafarian K, Hosseinzadeh-Attar MJ. The effect of a hydrolyzed collagen-based supplement on wound healing in patients with burn: A randomized double-blind pilot clinical trial. *Burns.* 2020; 46(1): 156-163.

Morais GFDC, Oliveira SHDS, Soares MJGOJT. Contexto-Enfermagem, Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. 2008; 17 (1): 98-105.

Morrone G, Guzzardella G, Orienti L, Giavaresi G, Fini M, Rocca M, Torricelli P, Martini L, Giardino RJLIMS. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. 1998; 13 (4): 293-298.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003; 73: 209–212.

Muthuvel A, Adavallan K, Balamurugan K, Krishnakumar N. Biosynthesis of gold nanoparticles using Solanum nigrum leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. Biomed PrevNutr. 2014; 4(2): 325– 332.

Namjoyan F, Kiashi F, Moosavi ZB, Saffari F, Makhmalzadeh BS. Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Journal of traditional and complementary medicine. 2016; 6(1): 37-40.

Neshich G, Rocchia W, Mancini AL, Yamagishi ME, Kuser PR., Fileto R, Baudet C, Pinto IP, Montagner AJ, Palandrani JFJNAR. 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. Frontiers Pharmacol. 2022;13.

Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NH, Artilheiro PP, Albertini R, Bussadori SK, Fernandes KP. Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers MedSci*. 2011.

Ovais M, Khalil AT, Raza A, Khan MA, Ahmad I, Islam NU, Shinwari ZK. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine*. 2016; 12(23): 3157-3177.

Oyazun-Ampuero F, Vidal A, Concha M, Morales J, Orellana S, Moreno-Villoslada I. Nanoparticles for the treatment of wounds. *Curr. Pharm. Des*. 2015; 21(29): 4329-4341.

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 dermatopharmaceutical and cosmetic applications. *Int J Pharm*. 2021; 597: 120311.

Pala D, Barbosa PO, Silva CT, de Souza MO, Freitas FR, Volp ACP, de 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. *Clinical Nutrition*. 2018; 37(2): 618-623.

Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Evaluation of aloin and aloe-emodin as antiinflammatory agents in aloe by using murine macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 73: 828.

Pawłowicz, K.; Paczkowska-Walendowska, M.; Osmalek, T.; Cielecka-Piontek, J. Towards the Preparation of a Hydrogel from Lyophilisates of the *Aloe arborescens* Aqueous Extract. *Pharmaceutics*. 2022;14: 1489.

Pedro AC, Maurer JBB, Zawadzki-Baggio SF, Avila S, Maciel GM, Haminiuk CWI. Bioactive compounds of organic goji berry

(*Lycium barbarum* L.) prevents oxidative deterioration of soybean oil. *Ind. Crops Prod.* 2018; 11: 90–97.

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.

Pereira RF, Barrias CC, Granja PL, and Bartolo PJ: Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine.* 2013; 8: 603.

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

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, reuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005; 142: 481–489.

Priya SG, Gupta A, Jain E, Sarkar J, Damania A, Jagdale PR, Kumar A. Bilayer cryogel wound dressing and skin regeneration grafts for the treatment of acute skin wounds. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2016; 8(24): 15145-15159.

Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012; 66(1): 1-10.

Qian LW, Fourcaudot AB, Yamane K, You T, Chan RK, Leung KP. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. *Wound Repair Regen.* 2016; 24(1): 26-34.

Qu J, Zhao X, Liang Y, Xu Y, Ma PX, Guo B. Degradable conductive injectable hydrogels as novel antibacterial, anti-

oxidant wound dressings for wound healing. *Chemical Engineering Journal*. 2019; 362: 548-560.

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.

Razia, S.; Park, H.; Shin, E.; Shim, K.S.; Cho, E.; Kang, M.C.; Kim, S.Y. Synergistic effect of Aloe vera flower and Aloe gel on cutaneous wound healing targeting MFAP4 and its associated signaling pathway: In-vitro study. *J. Ethnopharmacol*. 2022, 290, 115096.

Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*. 2021; 11(5): 700.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2011; 9(3): 248–255

Ross R, Everett NB, Tyler R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol*. 1970; 44: 645–

Šali A, Blundell TLJOMB. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. 1993; 234 (3): 779-815.

Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I, Gómez-Serranillos MP. Pharmacological update properties of Aloe vera and its major active constituents. *Molecules*. 2020; 25(6): 1324.

Sauder DN, Smith MH, Senta-McMillian T, Soria I, Meng TC. Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in

healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3846-3852.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Shanbrom E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart.(acai). *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54(22): 8604-8610.

Schauss AG. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.): A macro and nutrient rich palm fruit from the Amazon rain forest with demonstrated bioactivities in vitro and in vivo. In *Bioactive foods in promoting health*. 2010; 479-490.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity therapy: a review. *J Investig Med.* 2000; 48(5):312–326

Schindl A, Schindl M, Schon H, Knobler R, Havelec L, Schindl L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 1998; 21:580–584

Shah T, Bule M, Niaz K. Goji Berry (*Lycium barbarum*) — A superfood. In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. 2019; 257-264).

Sharma, P.; Kharkwal, A.C.; Kharkwal, H.; Abdin, M.Z.; Varma, A. A review on pharmacological properties of Aloe vera. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2014, 29, 31–37.

Shcherbakov V, Denisov SA, Mostafavi M. A mechanistic study of gold nanoparticles catalysis of O₂ reduction by ascorbate and hydroethidine, investigating reactive oxygen species reactivity. *RSC Adv.* 2023 Mar 15;13(13):8557-8563.

Shukla R, Bansal B, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic

fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir* 21. 2005; 10644–10654.

Shuklab SK, Sharma AK, Gupta V, Yashavarddhan MH. Pharmacological control of inflammation in wound healing. *J. Tissue Viability*. 2019; 28(4): 218-222.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci*. 2011, in press.

Silva MA, Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Boligon AA, Walker CIB, Ferreira J. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol*. 2014; 133: 47-54.

Silveira PC, Ferreira KB, da Rocha FR, Pieri BL, Pedroso GS, De Souza CT, Pinho RA. Effect of low-power laser (LPL) and light-emitting diode (LED) on inflammatory response in burn wound healing. *Inflammation*. 2016; 39(4): 1395-1404.

Silveira PCL, Scheffer DDL, Glaser V, Remor AP, Pinho RA, Aguiar Junior AS, Latini A. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radic. Res*. 2016; 50(5): 503-513.

Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*. 2011; 26: 125-131.

Silveira PCL, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *Photochem Photobio* 2007; (6):279–82.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341(10):738–746.

Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Mohan G, Chaturvedi S, Singh K. Increased expression of endosomal members of toll-like receptor family abrogates wound healing in patients with type 2 diabetes mellitus. *International Wound Journal*. 2016; 13(5): 927-935.

Souza DM, De Gouveia Santos VL. Incidence of pressure ulcers in the institutionalized elderly. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2010; 37(3): 272-6.

Stockfleth E, Hofbauer GFL, Reinhold U, Popp G, Hengge UR, Szeimies RM, French LE. Topical resiquimod dosing regimens in patients with multiple actinic keratoses: a multicentre, partly placebo- controlled, double- blind clinical trial. *Br. J. Dermat*. 2019; 180(2): 297-305.

Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, Calzolari L. Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin- 1 β - Induced Pro- Inflammatory Responses. *Small*. 2013; 9(3):472-477.

Sun H, Luo G, Chen D. A Comprehensive and System Review for the Pharmacological Mechanism of Action of Rhein, an Active Anthraquinone Ingredient. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 247.

Tabandeh MR, Oryan A, Mohammadalipour A. Polysaccharides of Aloe vera induce MMP-3 and TIMP-2 gene expression during the skin wound repair of rat. *Int. J. Biol. Macromol.*. 2014; 65: 424-430.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 2009; 37(5): 1528-1542.

Victor EG, Silveira PC, Possato JC, Rosa GL, Munari UB, Souza CT, Paula MM. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology.* 2012; 10(1): 11.

Vieira CPDB, Araújo TMED. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. *Revista da Escola de Enfermagem da USP.* 2018; 52.

Vijayalakshmi D, Dhandapani R, Jayaveni S, Jithendra PS, Rose C, Mandal AB. In vitro anti inflammatory activity of Aloe vera by down regulation of MMP-9 in peripheral blood mononuclear cells. *J. Ethnopharmacol.* 2012; 141(1): 542-546.

Vogler R, Sauer B, Kim DS, Schafer-Korting M, Kleuser B. Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* 2003; 120: 693–700.

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

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83:835-70.

Williams M. Wound infections: an overview. *Br J Community Nurs.* 2021;1(26): S22-S25.

Wilson HM, Chettibi S, Jobin C, Walbaum D, Rees AJ, Kluth DC. Inhibition of macrophage nuclear factor-kappaB leads to a

dominant antiinflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo. *Am J Pathol.* 2005; 167: 27–37.

Xing W, Guo W, Zou CH, Fu TT, Li XY, Zhu M, Xu X. Acemannan accelerates cell proliferation and skin wound healing through AKT/mTOR signaling pathway. *Journal of dermatological science.* 2015; 79(2): 101-109.

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 & function.* 2020; 11(6): 4903-4914.

Yakimovich N, Ezhevskii A, Guseinov D, Smirnova L, Gracheva T, Klychkov K. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Russ Chem Bull.* 2008; 57(3): 520– 523.

Zaccaron RP, Barbieri RT, Mendes C, Venturini LM, Alves N, Mariano SDS, Silveira PCL. Photobiomodulation associated with lipid nanoparticles and hyaluronic acid accelerate the healing of excisional wounds. *J. Biomater. Appl.* 2022; 37(4): 668-682.

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

Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue MJ. Inflammation in chronic wounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17:(12): 2085.

Zohra T, Ovais M, Khalil AT, Qasim M, Ayaz M, Shinwari ZK. Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Nat. Prod. Res.* 2019; 33(1): 136-142.

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 **01/11/2022**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM MODELO ANIMAL DE FERIDA CRÔNICA INDUZIDA COM RESIQUIMOD.
Project title	EVALUATION OF THE GREEN SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES IN AN ANIMAL MODEL OF CHRONIC WOUND INDUCED WITH RESIQUIMOD.
Número do protocolo Protocol number	75/2022
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Carolini Mendes, Gustavo de Bem Silveira, João Vitor Silvano Bittencourt, Laura de Roch Casagrande, Ligia Milanez Venturini, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Rubya Pereira Zaccaron, Mateus Cardoso Colares, Igor Ramos Lima, Gabrielli Martins, Camila da Costa.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/02/2023 a 06/08/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250 – 300g
Número de animais	Masculino 84
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.

Josiane Budni
Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 01 de novembro de 2022

**ANEXO B – ARTIGO PERSPECTIVA PUBLICADO PELO
GRUPO DE PESQUISA**



Perspective

The Use of Metallic Nanoparticles in Wound Healing: New Perspectives

Carolini Mendes ^{1,2}, Anand Thirupathi ¹ , Maria E. A. B. Corrêa ², Yaodong Gu ¹ and Paulo C. L. Silveira ^{1,2,*}¹ Faculty of Sports Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China² Laboratory of Experimental Physiopathology, Program of Postgraduate in Science of Health, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma 88806-000, Brazil

* Correspondence: psilveira@unesc.net; Tel.: +55-48-3431-2773

Abstract: Chronic wounds represent a challenge for the health area, as they directly impact patients' quality of life and represent a threat to public health and the global economy due to their high cost of treatment. Alternative strategies must be developed for cost-effective and targeted treatment. In this scenario, the emerging field of nanobiotechnology may provide an alternative platform to develop new therapeutic agents for the chronic wound healing process. This manuscript aims to demonstrate that the application of metallic nanoparticles (gold, silver, copper, and zinc oxide) opened a new chapter in the treatment of wounds, as they have different properties such as drug delivery, antimicrobial activity, and healing acceleration. Furthermore, metallic nanoparticles (NPs) produced through green synthesis ensure less toxicity in biological tissues, and greater safety of applicability, other than adding the effects of NPs with those of extracts.

Keywords: wound healing; metallic nanoparticles; drug delivery; nanocomposites; scaffolds; green synthesis



Citation: Mendes, C.; Thirupathi, A.; Corrêa, M.E.A.B.; Gu, Y.; Silveira, P.C.L. The Use of Metallic Nanoparticles in Wound Healing: New Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15376. <https://doi.org/10.3390/ijms232315376>

Academic Editor: Sergio Acín Martínez

Received: 27 October 2022

Accepted: 2 December 2022

Published: 6 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Over the last few years, there has been a significant increase in patients with wounds around the world, especially pressure, venous and diabetic injuries, as they often occur in growing populations, such as the elderly, obese, and diabetics [1]. However, this problem, in addition to the elderly, affects the population in general and constitutes a public health problem, due to high treatment rates and costs [2]. Chronic wounds are widely regarded as a silent epidemic that endangers global health and the world's economy. These wounds that do not heal with standard therapy in an orderly and timely manner cause further deterioration in these patients' quality of life and increase the burden on the healthcare system over an extended period [3].

In chronic wounds, such as diabetic wounds, the inflammatory response, which is initially so vital, has a tendency to become exacerbated. Increased inflammatory cell infiltration, pro-inflammatory cytokine secretion, reactive oxygen species formation, and proteolytic enzyme synthesis are paired with decreased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases [4,5].

Increased expression of cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)-, interleukin (IL)-1, and IL-6, increases the manufacture of various matrix metalloproteinases, that, in excess, not only destroy the extracellular matrix (ECM) but also inactivate growth factors [4,6–8]. As a result, the chronic wound environment includes persistent matrix breakdown, decreased growth factor bioavailability, and enhanced fibroblast senescence, all of which work together to limit cell proliferation, angiogenesis, and tissue repair.

Alternative solutions for cost-effective and focused treatment must be explored. According to global research of the wound care management market, patients with chronic wounds are receiving better care as a result of newly developed solutions that are secure,

effective, and beneficial for faster recovery [9]. In this context, the burgeoning field of nanobiotechnology could provide an alternate platform for developing new therapeutic medicines for wound infections.

The purpose of this paper is to show how nanotechnology, through the use of nanomaterials, has introduced a new era in wound healing, providing methods for faster healing and displaying differentiated capabilities as bactericidal agents [10,11].

Metallic nanoparticles have been considered for clinical application in this field because of their economical rate, high surface-to-volume ratio, stability, and safeness. Important applications of nanotechnology are being employed in healthcare and basic knowledge of the interaction of nanomaterials with cells and its biological effects is only being started [12,13].

There are three main criteria for nanoparticles used in wound healing: those that act as delivery vehicles; in the repair process; and antimicrobial activity. Due to these properties, NPs of metals such as gold, silver, copper, and zinc represent ideal candidates for application in the wound bed as well as for integration into dressings [14].

2. Gold Nanoparticles (GNPs)

Due to their focused delivery, safety, and increased uptake, gold nanoparticles are frequently employed for the administration of diverse bioactive compounds, enhancing drug efficiency. They are recognized as efficient transporters, and the more widely disseminated they are, the more effective their therapeutic function [15].

Due to their antioxidant and anti-inflammatory properties, these nanoparticles are utilized in the treatment of several disorders, including tissue repair [16,17]. They have substantial antioxidant properties in quenching free radicals such as OH (hydroxyl), H₂O₂ (hydrogen peroxide), and NO (nitric oxide) [18–20], depending on the surface [21]. Furthermore, for the motive that spherical gold nanoparticles have a vast surface area, they have a high proclivity to receive electrons and interact with (reactive oxygen species) ROS to remove or deactivate them [22], and so they consequently become a potent antioxidant agent and are crucial for wound healing [23]. They have strong catalytic activity in free radical scavenging processes and can also increase levels of NRF2, a factor that causes antioxidant gene activation. Keap1's conformation is altered by GNPs' effects on its thiol linkages, which frees NRF2 to continue the transcription of cytoprotective genes [24–26].

It has been observed that the topical application of GNPs, in rats, significantly accelerates the healing processes, performing a significant increase in the expression of collagen, and VEGF, in addition to cytokines (IL10 and IL4) and growth factors (FGF and TGFβ). wound closure four times faster than in the other groups [27,28]. In another study, Akturk et al., (2016) [29] evaluated its structural and morphological properties, in vitro biocompatibility, and in vivo effects such as induction or inhibition of inflammatory responses, influencing wound closure and its possible contribution to increased re-epithelialization, neovascularization, and granulation tissue formation. It was observed that these particles are associated with the secretion of cytokines (IL-8, IL-12, VEGF, and TNF-α), showing angiogenic capacity capable of increasing fibroblast proliferation and decreasing cellular apoptosis [30].

Despite their positive effects on the treatment of wounds, studies have already shown that the potential toxicity of GNPs is closely related to the dose, size, concentration, and time of exposure. GNPs have the potential to interact with the biological system and cause a natural imbalance between oxidative stress and antioxidant defense indices, which in turn can lead to various pathological effects [31,32]. The smaller its size, the greater the interaction area and the greater toxicity. In the study by Muller et al., (2017) [33] the authors demonstrated that GNPs with a size of 20 nm, at a concentration of 2.5 mg/mL for 21 days, showed potential therapeutic benefits without toxicity.

Another issue that should be taken into account is the reducing agent of the NPs. GNPs reduced with citrate tend to cause greater tissue toxicity [34]. Therefore, there was a need to study ways of synthesizing metallic NPs that would reduce their cytotoxic

effects. Aloe vera leaves, *Citrullus colocynthis*, *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum camphora*, and curcumin are just a few examples of plant extracts that have been employed to create metallic nanoparticles recently [9,35,36]. This form of synthesis guarantees a significant reduction of toxicity in biological tissues, ensuring greater safety and applicability [37].

In albino Wistar rats, gold nanoparticles produced from diverse medicinal herbs displayed extraordinary wound healing capability as well as antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activity [38,39]. Aloe vera preparations containing gold and silver nanoparticles have been shown to help reduce wound infections [40,41]. The use of curcumin-based GNPs is another method that has been studied. Its biological efficacy has already been evaluated in studies with tumor cells and interaction with anticancer drugs [42], and cardiovascular studies, revealing that cardiac protection by Cur-GNPs is more effective than curcumin alone [43]. Likewise, the use of silver nanoparticles (AgNPs) stabilized with curcumin appears to be an effective strategy for wound care, as, in fact, silver nitrates have been safely used for the treatment of many ophthalmic and dental conditions and diseases, apart from wound healing.

3. Silver Nanoparticles (AgNPs)

Due to their low cost, chemical stability, high conductivity, catalytic activity, and broad-spectrum resistance to many pathogens, AgNPs play an important role in wound healing [26,44]. Silver has long been known as a highly antibacterial metal [45], with great efficiency towards multidrug-resistant microorganisms and biofilm-producing bacteria typically observed in chronic wounds. Size, shape, dosage, and stabilizer are all factors that influence antibacterial activity [46–48]. In general, the antibacterial activity of AgNPs increases dramatically as the particle size is reduced [49–51].

Bacterial growth can be inhibited by AgNPs through mechanisms such as the destruction of the bacterial cell membrane, and through the generation of free radicals, which induce the bacterial cell to release lipopolysaccharides and membrane proteins, resulting in cell death [52,53]. Disruption of the mitochondrial respiratory chain by AgNPs increases ROS generation and stops ATP synthesis, resulting in DNA damage [54,55]. Silver ion oxidation interactions involving oxygen and hydrogen atoms of thiol groups form disulfide bonds, which interfere with DNA replication and impede bacterial development, resulting in cell death [56–58]. AgNPs can also induce cell apoptosis by regulating the expression of genes such as p53 [59,60]. AgNPs are thus a viable option for applying novel biological procedures such as catheter modification, dental application, wound healing, and bone repair.

Despite being particularly powerful against a variety of germs, silver's application is restricted due to the related tissue toxicity. AgNPs induce dose-, size- and time-dependent cytotoxicity, particularly for those with sizes ≤ 10 nm [46,61,62]. AgNPs of smaller sizes and large surface area tend to accumulate in mouse organs such as the liver, spleen, kidney, and brain, following intravenous, intraperitoneal, and intratracheal administration routes [63–65], unlike topical applications that tend to be less toxic to these organs [66]. AgNPs can eliminate microorganisms, but induce cytotoxicity in mammalian cells. In that respect, green synthesis is a safer alternative for the production of AgNPs, which use less harmful reagents from renewable sources as a reducing and stabilizing agent [67]. AuNPs coated via green synthesis have been observed to be even smaller in size, which exposes reactive and catalytic sites to rapid counterattacks during inflammation, proliferation, and remodeling [68].

The healing time of the damaged area depends on the size, dose, and morphology of the silver nanoparticles. Recently, human skin fibroblasts and keratinocytes treated with collagen-coated AgNPs encapsulated in collagen hydrogels demonstrated encouraging safety and efficacy results, maintaining their antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *Staphylococcus epidermis* [69]. Additionally, a higher quantity of VEGF mRNA found in keratinocytes around the edge of the wound suggested that AgNPs

might aid in wound healing by promoting angiogenesis and controlling inflammatory cytokines [56].

In skin biopsies, AgNPs can persist in the cytoplasm of fibroblasts and encourage dermal and epidermis regeneration [56,70], induce keratinocyte proliferation and migration and promote fibroblast differentiation in myofibroblasts, which may aid adhesion, contraction, and early wound closure [51,70]. In addition, they regulate the production of inflammatory cytokines and proteins, such as VEGF and matrix metalloproteinases (MMPs) [30,71], which highlights the positive role of AgNPs in wound repair for the clinical treatment of wounds and postoperative results.

Metal nanoparticles can be used in gel form [72] or incorporated into scaffolds [73] to treat wounds, as a new strategy. AgNPs have properties that make them promising candidates for applications in dressings, hydrogels, and tissue engineering, which can be cited: greater mechanical stability and resistance to enzymatic degradation when incorporated into tissue structures [74,75], easy incorporation of antibodies [76], growth factors [77], peptides [78], biocompatibility [79,80], anti-inflammatory effects [81], and mainly antimicrobial properties [82–84].

4. Copper Nanoparticles (CuNPs)

The major problem of chronic wounds is due to infections and vascular problems, and just like gold and silver nanoparticles, CuNPs also have antimicrobial activities, mainly by reducing the fungal load at the wound site and increasing the healing process [85,86]. Copper was recognized in 2008 by the United States Environmental Protection Agency (EPA) as the first metallic antimicrobial agent [87]. This metal serves as a cofactor for enzymes such as superoxide dismutase and cytochrome oxidase and enhances immunity by stimulating the production of interleukin-2 [88]. Copper-based nanoparticles become engaged in all stages of wound healing because they have a complex role in numerous cells besides influencing multiple cytokine and growth factor methods of action [89].

It is a necessary metal that is needed at low levels in various metabolic activities. Copper, in fact, stimulates the synthesis of ECM components such as fibrinogen under regulated settings, stimulates the activity of MMPs in fibroblasts, and contributes to the formation of collagen and integrins, the main mediators of cellular binding to the extracellular matrix [90,91]. However, excessive copper consumption is harmful because it produces free radicals, which can cause lipid peroxidation and cell death [92,93]. The Fenton-type reaction, which produces ROS in the vicinity of copper ions and causes lipid and protein damage, has been implicated as the cause of copper toxicity mammalian cells, on the other hand, are somewhat protected by cytoplasmic metallothioneins, glutathione, and Cu/Zn superoxide dismutase [94,95]. Other studies have shown that low concentrations of copper do not cause adverse reactions when applied to human skin [96].

CuNPs have been used to speed the recovery process in animal models by inducing VEGF and angiogenesis [97–99] via factor-1- α generated by hypoxia (HIF-1), where CuNP enhances HIF-1 expression [100]. HIF-, a copper-induced auxiliary factor [101], plays a crucial role in the healing of wounds by assisting those whose peripheral blood supply is compromised (for instance, those with vascular diseases or diabetes), which prevents wounds from healing properly due to low copper levels at the wound site [102].

Several case reports have shown that dressings and hydrogels containing CuNPs provide wound protection due to their antimicrobial and fungicidal activity, in addition to stimulating the tissue repair process of the most varied types of wounds [103–105].

5. Zinc Oxide Nanoparticles (ZnONPs)

Other nanoparticles with promising characteristics for healing are those of zinc oxide (ZnONPs). These NPs are biocompatible, permeable to the dermis and epidermis, and have exhibited remarkable regenerative abilities *in vivo* (rat model) through re-epithelialization, keratinocyte migration along with collagen fiber deposition, and tissue granulation [106]. MMPs, a class of zinc-dependent proteins, are crucial in wound healing, as their ability

to enzymatically break down collagen fragments is enhanced by the application of zinc oxide [107]. A series of experiments in which the rate of surgical wound repair was examined in rats with induced or hereditary zinc deficiency demonstrated that rats that received supplemental zinc had better surgical wound repair compared to those with zinc deficiency [108].

Modification of ZnO NPs with chitosan (CS) increased their average size, and reduced their aggregation tendency and cytotoxicity without impairing their unique properties. ZnONPs increased the degree of porosity, hydrophilicity and water absorption, oxygen permeability, and biodegradability of scaffolds. The preparation of ZnONPs scaffolds exhibits antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria in the presence and absence of UV light [109]. Overall, zinc-based NPs associated with biofilms, amniotic membranes, growth factors, and collagen show great promise for applications in chronic wounds.

One of the main mechanisms of action of ZnONPs is the small increase in the production of ROS (especially H_2O_2), which stimulates the migration and proliferation of fibroblasts [110,111], in addition to being the main reason for the antibacterial activity of ZnONPs [112]. When the particle size decreases, the number of ZnO atoms on the surface increases, increasing H_2O_2 generation, which causes greater antibacterial activity.

As with other NPs, the toxicity of ZnONPs is dose-, size-, and concentration-dependent [113]. Numerous studies have demonstrated that ZnONPs are disintegrated in the external environment in the form of Zn^{2+} ions and subsequently taken up by the cell through passive dissemination over the plasma membrane, which is the critical step for cellular toxicity [114,115]. In contrast, as the particle size increases, the compatibility of ZnO nanoparticles with fibroblastic cells also increases. In the study by Kaushik Kaushik, Niranjana, Thangam, Madhan, Pandiyarasan, Ramachandran, Oh and Venkatasubbu [112], cell proliferation analysis (MTT) confirms that ZnONPs are not toxic to HDF cells. These cells showed a higher proliferation rate in the presence of larger-sized ZnONPs (55 nm) when compared to smaller-sized ZnONPs (15 nm), do not cause toxicity, and do not inhibit fibroblastic cell proliferation [112]. When in ideal doses and size, ZnONPs demonstrated anti-inflammatory and antioxidant properties [116]. ZnO nanoparticles are highly compatible with fibroblast cells and enhance the growth of these cells, promoting cell adhesion and migration [112].

In addition to the metallic NPs presented in this perspective, new NPs are already being studied in the biomedical field. Nanoparticles made of iron oxide and cobalt ferrite ($CoFe_2O_4$) have gained a lot of attention in the last decade due to their elemental properties, which make them non-toxic and biodegradable. $CoFe_2O_4$ NPs are being increasingly modified in terms of synthesis methods and nanocomposites to improve their biocompatibility and avoid potential toxicity [117].

Table 1 states the main functions and applications of metallic nanoparticles used for wound healing.

Table 1. Main functions and applications of metallic nanoparticles used for wound healing.

Metallic Nanoparticles	Main Functions/Applications	Safe Dose and Concentration for Topical Application	References
GNPs	Improves efficiency of drugs, molecules (AH), and peptides /excellent carriers/anti-inflammatory and antioxidant capacity /antimicrobial action/scaffolds	≈ 20 nm ≤ 5.0 mL/L	[33]
			[66]
			[118]
AgNPs	Antimicrobial/cell adhesion/cell proliferation/anti-inflammatory effects	≥ 10 nm 1.0 mg/mL–3 mg/mL	[63]
			[64]
			[65]
			[66]
			[112]

Table 1. Cont.

Metallic Nanoparticles	Main Functions/Applications	Safe Dose and Concentration for Topical Application	References
CuNPs	Antimicrobial/antifungal/improves property of MMPs in fibroblasts/angiogenesis	40 nm–80 nm ≤2 mL/mL	[66] [112]
ZnONPs	Biocompatibility/antimicrobial/proliferation of fibroblasts and keratinocytes/deposition of collagen fibers	15 nm–55 nm 1.0 mg/mL–10 mg/mL	[112] [119] [108] [112]

6. Perspectives

Given all the above, it is evident that the use of these metallic NPs is capable of developing a new therapeutic modality in the treatment of wounds, demonstrating potent effects in reducing infections caused by microorganisms and in reducing healing time, reducing the damage caused by the inflammatory process chronic. The key benefits of employing NPs include the ability to deliver medicines, genes, and peptides at elevated amounts with very few adverse effects as compared to conventional drug delivery methods, increasing the efficacy of the therapy [120–122]. The binding of metallic NPs with biological molecules, such as hyaluronic acid (HA), optimizes the secretion of anti-inflammatory cytokines, proliferation, and growth factors of cell differentiation and makes an earlier transition to the chronic phase, contributing to the process of repair [28,123].

Peptides and proteins have played an important role in many biological processes, functioning as enzymes, hormones, ligands, receptors, cell mediators, and structural components of cells. As intrinsic molecules in signaling pathways, peptides allow for therapeutic interventions that closely mimic natural signaling cascades. However, the short chain of amino acids in free peptides is susceptible to proteolysis in vivo. As a strategy for its use, a perspective is employed in the conjugation of peptides to metallic NPs to extend the half-life of the peptides, preventing proteolytic enzymes from degrading them [124,125].

Tissue engineering is an area on the rise, and metallic NPs can act as nanocarriers, releasing bioactive molecules in a precise and sustainable way. Nanomaterials have a high surface area to volume ratio, which allows greater penetration into the wound area to provide sustained and controlled release of therapeutic agents [126]. NPs can be integrated with various hydrogel materials such as alginate, gelatin, gelatin methacrylate, and chitosan [106,127,128]. There are several approaches to integrating NPs into hydrogels, including hydrogel formation on a preformed nanoparticle suspension or gelation of the hydrogel followed by physical incorporation of the NPs within it [129,130]. As well as the incorporation of collagen nanofibers with metallic NPs, in vivo studies already demonstrate that the healing rate of wounds treated with collagen nanofibers and metallic NPs was accelerated compared to simple collagen nanofibers, with accelerated re-epithelialization, collagen production and better wound contraction [131,132].

In addition to these hydrogels, a perspective on the use of metallic NPs with decellularized natural matrices is employed. Decellularized natural matrices (such as amniotic membranes and umbilical cords) are promising materials for tissue engineering due to their biochemical content, micro- and nanotopography, and presence of signaling molecules and growth factors [106,133]. These scaffolds can also be processed from the same patient to reduce immunogenicity. Several studies demonstrate the wide range of applications of NPs to improve structurally and functionally decellularized matrices [134–136]. GNPs, for example, can bind to matrices through electrostatic or covalent interactions, depending on the chemistry of the surface of the particles [136].

Stem cells are key players in the fields of tissue engineering and regenerative medicine due to their ability to differentiate into different cell lineages and types. It has already been demonstrated that conductive hybrid materials with inorganic nanostructures increase

the proliferation and differentiation of adhered cells. In particular, NPs have been widely employed to produce hybrid materials to support stem cell differentiation due to their inertness, ease of surface modifications, and ability to transmit electrical signals [137,138].

Several drugs, growth factors, genes, and even the nanoparticles themselves can play different roles in tissue recovery. Furthermore, as an enhancement to scaffolds, nanoparticles can increase cell proliferation and growth factors, contributing to the regenerative healing process. The constant release of growth factors through a delivery system based on nanomaterials is an important strategy for tissue engineering [139]. These wound healing nanoscale delivery systems have better delivery of poorly water-soluble drugs, protect the therapeutic against temperature, light, pH, or enzyme degradation at the site of administration, and further stimulate fibroblast proliferation, reduce inflammation and reduce cytotoxicity of certain drugs [140]. Therefore, the involvement of nanotechnology through the therapeutically active dressing in the delivery of growth factors and pro-angiogenesis compounds along with other therapeutic agents (e.g., antimicrobials) serves as a potential revolution in wound care [141].

Furthermore, we envision that AuNPs can be used as multimodal tools, in which they not only enhance the properties of scaffolds to enhance tissue formation but also act as nanosensors. In this way, they can provide feedback on tissue function and at the same time allow for the controlled release of drugs within the dressings.

Another perspective of the use of metallic NPs is those produced through plant extracts, a method known as green synthesis, which guarantees less toxicity of these particles in biological tissues, and greater safety of applicability, in addition to adding the effects of NPs with the effects of extracts. In this way, it is suggested that these hydrogels are capable of acting as an important adjuvant with the multidisciplinary team in the treatment of wounds, accelerating the healing process, thus reducing complications such as infections, necrosis of tissues adjacent to the wounds, and also amputations of segments or even entire members. In this way, it also manages to have an economic impact by reducing costs with dressings, medicines, consultations, and other procedures, in public and private health institutions.

Author Contributions: Conceptualization, C.M. and P.C.L.S.; validation, C.M., A.T., M.E.A.B.C. and Y.G.; formal analysis, C.M.; investigation, C.M.; resources, C.M. and P.C.L.S.; data curation, C.M. and M.E.A.B.C.; writing—C.M.; writing—review and editing, C.M. and M.E.A.B.C.; visualization, P.C.L.S.; supervision, P.C.L.S.; project administration, P.C.L.S.; funding acquisition, Y.G.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number [Call CNPq 06/2019—Research Productivity Scholarships], Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) grant number [Support for research groups—2021TR001251] and Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) [Research Groups Program 2020].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors state that this study has no patent licensing arrangements, consultations, stock or other equity ownership, advisory board memberships, or payments for conducting or publicizing the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kazemzadeh-Narbat, M.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. Surgical sealants and high strength adhesives. *Mater. Today* **2015**, *18*, 176–177. [\[CrossRef\]](#)
2. Morais, G.F.d.C.; Oliveira, S.H.d.S.; Soares, M.J.G.O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. *Texto Contexto-Enferm.* **2008**, *17*, 98–105. [\[CrossRef\]](#)
3. Troxler, M.; Vowden, K.; Vowden, P. Integrating adjunctive therapy into practice: The importance of recognising ‘hard-to-heal’ wounds. *World Wide Wounds* **2006**, *32*, 99–105.

4. Medina, A.; Scott, P.G.; Ghahary, A.; Tredget, E.E. Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds. *J. Burn. Care Rehabil.* **2005**, *26*, 306–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Trengove, N.J.; Stacey, M.C.; MacAuley, S.; Bennett, N.; Gibson, J.; Burslem, F.; Murphy, G.; Schultz, G. Analysis of the acute and chronic wound environments: The role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen.* **1999**, *7*, 442–452. [\[CrossRef\]](#)
6. Harding, K.G.; Morris, H.L.; Patel, G.K. Science, medicine, and the future: Healing chronic wounds. *BMJ* **2002**, *324*, 160–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Lauer, G.; Sollberg, S.; Cole, M.; Krieg, T.; Eming, S.A.; Flamme, I.; Stürzebecher, J.; Mann, K. Expression and Proteolysis of Vascular Endothelial Growth Factor is Increased in Chronic Wounds. *J. Investig. Dermatol.* **2000**, *115*, 12–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Yager, D.R.; Chen, S.M.; Ward, S.I.; Olutoye, O.O.; Diegelmann, R.F.; Cohen, I.K. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen.* **1997**, *5*, 23–32. [\[CrossRef\]](#)
9. Ovais, M.; Ahmad, I.; Khalil, A.T.; Mukherjee, S.; Javed, R.; Ayaz, M.; Raza, A.; Shinwari, Z.K. Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles: Recent trends and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 4305–4318. [\[CrossRef\]](#)
10. Kalashnikova, I.; Das, S.; Seal, S. Nanomaterials for wound healing: Scope and advancement. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 2593–2612. [\[CrossRef\]](#)
11. Barroso, A.; Mestre, H.; Ascenso, A.; Simões, S.; Reis, C. Nanomaterials in wound healing: From material sciences to wound healing applications. *Nano Sel.* **2020**, *1*, 443–460. [\[CrossRef\]](#)
12. Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1289–1306. [\[CrossRef\]](#)
13. Arvizo, R.R.; Bhattacharyya, S.; Kudgus, R.A.; Giri, K.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2943–2970. [\[CrossRef\]](#)
14. Negut, I.; Grumezescu, V.; Grumezescu, A.M. Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules* **2018**, *23*, 2392. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C.K.; Rotello, V.M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1307–1315. [\[CrossRef\]](#)
16. Victor, E.G.; Silveira, P.C.; Possato, J.C.; da Rosa, G.L.; Munari, U.B.; de Souza, C.T.; A Pinho, R.; da Silva, L.; Streck, E.L.; Paula, M.M. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J. Nanobiotechnol.* **2012**, *10*, 11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Li, X.; Wang, H.; Rong, H.; Li, W.; Luo, Y.; Tian, K.; Quan, D.; Wang, Y.; Jiang, L. Effect of composite SiO₂@AuNPs on wound healing: In vitro and vivo studies. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *445*, 312–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Esumi, K.; Houdatsu, H.; Yoshimura, T. Antioxidant action by gold-PAMAM dendrimer nanocomposites. *Langmuir* **2004**, *20*, 2536–2538. [\[CrossRef\]](#)
19. Leu, J.-G.; Chen, S.-A.; Chen, H.-M.; Wu, W.-M.; Hung, C.-F.; Yao, Y.-D.; Tu, C.-S.; Liang, Y.-J. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 767–775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Medhe, S.; Bansal, P.; Srivastava, M.M. Enhanced antioxidant activity of gold nanoparticle embedded 3,6-dihydroxyflavone: A combinational study. *Appl. Nanosci.* **2014**, *4*, 153–161. [\[CrossRef\]](#)
21. Yakimovich, N.O.; Ezhevskii, A.A.; Guseinov, D.V.; Smirnova, L.A.; Gracheva, T.A.; Klychkov, K.S. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **2008**, *57*, 520–523. [\[CrossRef\]](#)
22. BarathManiKanth, S.; Kalishwaralak, K.; Sriram, M.; Pandian, S.R.K.; Youn, H.-S.; Eom, S.; Gurunathan, S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J. Nanobiotechnol.* **2010**, *8*, 16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Muthuvel, A.; Adavallan, K.; Balamurugan, K.; Krishnakumar, N. Biosynthesis of gold nanoparticles using Solanum nigrum leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomed. Prev. Nutr.* **2014**, *4*, 325–332. [\[CrossRef\]](#)
24. Rattanata, N.; Daduang, S.; Wongwattanukul, M.; Leelayuwat, C.; Limpaboon, T.; Lekphrom, R.; Sandee, A.; Boonsiri, P.; Chio-Srichan, S.; Daduang, J. Gold Nanoparticles Enhance the Anticancer Activity of Gallic Acid against Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2015**, *16*, 7143–7147. [\[CrossRef\]](#)
25. Cheng, H.; Lai, G.; Fu, L.; Zhang, H.; Yu, A. Enzymatically catalytic deposition of gold nanoparticles by glucose oxidase-functionalized gold nanoprobe for ultrasensitive electrochemical immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 353–358. [\[CrossRef\]](#)
26. Wang, X.; Chang, J.; Wu, C. Bioactive inorganic/organic nanocomposites for wound healing. *Appl. Mater. Today* **2018**, *11*, 308–319. [\[CrossRef\]](#)
27. Kim, J.E.; Lee, J.; Jang, M.; Kwak, M.H.; Go, J.; Kho, E.K.; Song, J.E.; Lee, J.; Hwang, D.Y. Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 509–519. [\[CrossRef\]](#)
28. Mendes, C.; Haupenthal, D.P.D.S.; Zaccaron, R.P.; Silveira, G.D.B.; Corrêa, M.E.A.B.; Casagrande, L.D.R.; Mariano, S.D.S.; Silva, J.I.D.S.; de Andrade, T.A.M.; Feuser, P.E.; et al. Effects of the Association between Photobiomodulation and Hyaluronic Acid Linked Gold Nanoparticles in Wound Healing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 5132–5144. [\[CrossRef\]](#)
29. Akturk, O.; Kismet, K.; Yasti, A.C.; Kuru, S.; E Duymus, M.; Kaya, F.; Caydere, M.; Hucumenoglu, S.; Keskin, D. Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: A potential skin wound healing biomaterial. *J. Biomater. Appl.* **2016**, *31*, 283–301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

30. Franková, J.; Pivodová, V.; Vágnerová, H.; Juránová, J.; Ulrichová, J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2016**, *14*, 137–142. [\[CrossRef\]](#)
31. Abdelhalim, M.A.A.-K.; Al-Ayed, M.S.; Moussa, S. The effects of intraperitoneal administration of gold nanoparticles size and exposure duration on oxidative and antioxidants levels in various rat organs. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2015**, *28*, 705–712. [\[PubMed\]](#)
32. Ferreira, G.K.; Cardoso, E.; Vuolo, F.S.; Michels, M.; Zannoni, E.T.; Carvalho-Silva, M.; Gomes, L.M.; Dal-Pizzol, F.; Rezin, G.T.; Streck, E.L.; et al. Gold nanoparticles alter parameters of oxidative stress and energy metabolism in organs of adult rats. *Biochem. Cell Biol.* **2015**, *93*, 548–557. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Muller, A.P.; Ferreira, G.K.; Pires, A.J.; de Bem Silveira, G.; de Souza, D.L.; de Abreu Brandolfi, J.; de Souza, C.T.; Paula, M.M.; Silveira, P.C.L. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Mater. Sci. Eng.* **2017**, *77*, 476–483. [\[CrossRef\]](#)
34. Rónavári, A.; Igaz, N.; Adamec, D.I.; Szerencsés, B.; Molnar, C.; Kónya, Z.; Pfeiffer, I.; Kiricsi, M. Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications. *Molecules* **2021**, *26*, 844. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Gupta, A.; Briffa, S.M.; Swinger, S.; Gibson, H.; Kannappan, V.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.M.; Martin, C.; Radecka, I. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcumin-Cyclodextrins Loaded into Bacterial Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressing Applications. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 1802–1811. [\[CrossRef\]](#)
36. Mittal, A.K.; Bhaumik, J.; Kumar, S.; Banerjee, U.C. Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *415*, 39–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1534. [\[CrossRef\]](#)
38. Avan, U.A.; Ali, S.; Rehman, M.; Zia, N.; Naz, S.S.; Ovais, M.; Raza, A. Stable and reproducible synthesis of gold nanorods for biomedical applications: A comprehensive study. *IET Nanobiotechnol.* **2018**, *12*, 182–190. [\[CrossRef\]](#)
39. Milaneze, B.; Keijok, W.; Jairo, O.; Brunelli, P.; Janine, B.; Larissa, L.; Adilson, P.; Denise, E.; Maria, P.; Moises, R. The green synthesis of gold nanoparticle using extract of *Virola oleifera*. *BMC Proc.* **2014**, *8*, P29. [\[CrossRef\]](#)
40. Chandran, S.P.; Chaudhary, M.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Sastry, M.J.B. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 577–583. [\[CrossRef\]](#)
41. Naraginti, S.; Kumari, P.L.; Das, R.K.; Sivakumar, A.; Patil, S.H.; Andhalkar, V.V. Amelioration of excision wounds by topical application of green synthesized, formulated silver and gold nanoparticles in albino Wistar rats. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *62*, 293–300. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Waghmare, M.N.; Qureshi, T.S.; Krishna, C.M.; Pansare, K.; Gadewal, N.; Hole, A.; Dongre, P.M. β -Lactoglobulin-gold nanoparticles interface and its interaction with some anticancer drugs—An approach for targeted drug delivery. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *40*, 6193–6210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Sharifiaghdam, Z.; Dalouchi, F.; Sharifiaghdam, M.; Shaabani, E.; Ramezani, F.; Nikbakht, F.; Azizi, Y. Curcumin-coated gold nanoparticles attenuate doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating apoptosis in a mouse model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2022**, *49*, 70–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Yah, C.S.; Simate, G.S.J.D.J.o.P.S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *DARU J. Pharm. Sci.* **2015**, *23*, 43. [\[CrossRef\]](#)
45. Konop, M.; Damps, T.; Misicka, A.; Rudnicka, L. Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. *J. Nanomater.* **2016**, *2016*, 43. [\[CrossRef\]](#)
46. Jeong, Y.; Lim, D.W.; Choi, J. Assessment of Size-Dependent Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2014**, *2014*, 763807. [\[CrossRef\]](#)
47. Burkowski-But, A.; Sionkowski, G.; Walczak, M. Influence of stabilizers on the antimicrobial properties of silver nanoparticles introduced into natural water. *J. Environ. Sci.* **2014**, *26*, 542–549. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Oei, J.D.; Zhao, W.W.; Chu, L.; DeSilva, M.N.; Ghimire, A.; Rawls, H.R.; Whang, K. Antimicrobial acrylic materials with in situ generated silver nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2012**, *100B*, 409–415. [\[CrossRef\]](#)
49. Raza, M.A.; Kanwal, Z.; Rauf, A.; Sabri, A.N.; Riaz, S.; Naseem, S. Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 74. [\[CrossRef\]](#)
50. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S.J.R.A. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Rsc Adv.* **2014**, *4*, 3974–3983. [\[CrossRef\]](#)
51. Gunasekaran, T.; Nigussu, T.; Dhanaraju, M.D. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. *J. Am. Coll. Clin. Wound Spec.* **2011**, *3*, 82–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Mijakovic, L.; Petranovic, D.; Bottini, N.; Deutscher, J.; Jensen, P.R. Protein-Tyrosine Phosphorylation in *Bacillus subtilis*. *Microb. Physiol.* **2005**, *9*, 189–197. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 225103. [\[CrossRef\]](#)
54. Grzelak, A.; Wojewódzka, M.; Meczyska-Wielgosz, S.; Zuberek, M.; Wojciechowska, D.; Kruszewski, M. Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 435–440. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. AshaRani, P.; Hande, M.P.; Valiyaveetil, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* **2009**, *10*, 65. [\[CrossRef\]](#)

56. Rigo, C.; Ferroni, L.; Tocco, I.; Roman, M.; Munivrana, I.; Gardin, C.; Cairns, W.R.L.; Vindigni, V.; Azzena, B.; Barbante, C.; et al. Active Silver Nanoparticles for Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 4817–4840. [\[CrossRef\]](#)
57. Vijayakumar, V.; Samal, S.K.; Mohanty, S.; Nayak, S.K. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *122*, 137–148. [\[CrossRef\]](#)
58. Singla, R.; Soni, S.; Patial, V.; Kulurkar, P.M.; Kumari, A.; Mahesh, S.; Padwad, Y.S.; Yadav, S.K. Cytocompatible Anti-microbial Dressings of Syzygium cumini Cellulose Nanocrystals Decorated with Silver Nanoparticles Accelerate Acute and Diabetic Wound Healing. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Wang, Z.; Chen, C.; Wang, Y.; Li, F.; Huang, J.; Luo, Z.; Rao, S.; Tan, Y.; Liu, Y.; Yin, H.; et al. Ångstrom-Scale Silver Particles as a Promising Agent for Low-Toxicity Broad-Spectrum Potent Anticancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1808556. [\[CrossRef\]](#)
60. Farah, M.A.; Ali, M.A.; Chen, S.-M.; Li, Y.; Al-Hemaid, F.M.; Abou-Tarboush, F.M.; Al-Anazi, K.M.; Lee, J. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *141*, 158–169. [\[CrossRef\]](#)
61. Butler, K.S.; Peeler, D.J.; Dair, B.J.; Elespuru, R.K. Silver nanoparticles: Correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis* **2015**, *30*, 577–591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Dayem, A.A.; Hossain, M.K.; Lee, S.B.; Kim, K.; Saha, S.K.; Yang, G.-M.; Choi, H.Y.; Cho, S.-G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Jiang, X.; Lu, C.; Tang, M.; Yang, Z.; Jia, W.; Ma, Y.; Jia, P.; Pei, D.; Wang, H. Nanotoxicity of Silver Nanoparticles on HEK293T Cells: A Combined Study Using Biomechanical and Biological Techniques. *ACS Omega* **2018**, *3*, 6770–6778. [\[CrossRef\]](#)
64. Tricker, W.J.; Lantz, S.M.; Murdock, R.C.; Schrand, A.M.; Robinson, B.L.; Newport, G.D.; Schlager, J.J.; Oldenburg, S.J.; Paule, M.G.; Sikker, W.J.T.S., Jr. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicol. Sci.* **2010**, *118*, 160–170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Sokolowska, P.; Białkowska, K.; Siatkowska, M.; Rosowski, M.; Kucińska, M.; Komorowski, P.; Makowski, K.; Walkowiak, B. Human brain endothelial barrier cells are distinctly less vulnerable to silver nanoparticles toxicity than human blood vessel cells: A cell-specific mechanism of the brain barrier? *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2017**, *13*, 2127–2130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Xu, C.; Akakuru, O.U.; Ma, X.; Zheng, J.; Zheng, J.; Wu, A. Nanoparticle-Based Wound Dressing: Recent Progress in the Detection and Therapy of Bacterial Infections. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 1708–1723. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Montaser, A.; Abdel-Mohsen, A.; Ramadan, M.; Sleem, A.; Sahfie, N.; Jancar, J.; Hebeish, A. Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *92*, 739–747. [\[CrossRef\]](#)
68. Tian, J.; Wong, K.K.; Ho, C.M.; Lok, C.N.C.; Yu, W.Y.; Che, C.M.; Clui, J.F.; Tam, P.K. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 129–136. [\[CrossRef\]](#)
69. Das, S.; Baker, A.B. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 82. [\[CrossRef\]](#)
70. Liu, X.; Lee, P.-Y.; Ho, C.-M.; Lui, V.C.H.; Chen, Y.; Che, C.-M.; Tam, P.K.H.; Wong, K.K.Y. Silver Nanoparticles Mediate Differential Responses in Keratinocytes and Fibroblasts during Skin Wound Healing. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 468–475. [\[CrossRef\]](#)
71. Chowdhury, S.; De, M.; Guha, R.; Batabyal, S.; Samanta, I.; Hazra, S.K.; Ghosh, T.K.; Konar, A.; Hazra, S. Influence of silver nanoparticles on post-surgical wound healing following topical application. *Eur. J. Nanomed.* **2014**, *6*, 237–247. [\[CrossRef\]](#)
72. Silveira, P.C.; Venâncio, M.; Souza, P.S.; Victor, E.G.; Notoya, F.D.S.; Paganini, C.S.; Streck, E.L.; da Silva, L.; Pinho, R.A.; Paula, M.M. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers in wound burns. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *44*, 380–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Cozad, M.J.; Bachman, S.L.; Grant, S.A. Assessment of decellularized porcine diaphragm conjugated with gold nanomaterials as a tissue scaffold for wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *99A*, 426–434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Grant, S.A.; Spradling, C.S.; Grant, D.N.; Fox, D.B.; Jimenez, L.; Grant, D.A.; Rone, R.J. Assessment of the biocompatibility and stability of a gold nanoparticle collagen bioscaffold. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 332–339. [\[CrossRef\]](#)
75. Deeken, C.R.; Fox, D.B.; Bachman, S.L.; Ramshaw, B.J.; Grant, S.A. Characterization of bioanocomposite scaffolds comprised of amine-functionalized gold nanoparticles and silicon carbide nanowires crosslinked to an acellular porcine tendon. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2011**, *97*, 334–344. [\[CrossRef\]](#)
76. Obaid, G.; Chambrier, I.; Cook, M.J.; Russell, D.A. Cancer targeting with biomolecules: A comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 737–747. [\[CrossRef\]](#)
77. Paviolo, C.; Chon, J.W.M.; Clayton, A.H.A. Inhibiting EGFR Clustering and Cell Proliferation with Gold Nanoparticles. *Small* **2015**, *11*, 1638–1643. [\[CrossRef\]](#)
78. Gopalakrishnan, R.; Singam, E.R.A.; Sundar, J.V.; Subramanian, V. Interaction of collagen like peptides with gold nanosurfaces: A molecular dynamics investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 5172–5186. [\[CrossRef\]](#)
79. Cui, Q.; Yashchenok, A.; Zhang, L.; Li, L.; Masic, A.; Wienskol, G.; Möhwald, H.; Bargheer, M. Fabrication of Bifunctional Gold/Gelatin Hybrid Nanocomposites and Their Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 1999–2002. [\[CrossRef\]](#)
80. Hung, H.-S.; Chang, C.-H.; Chang, C.-J.; Tang, C.-M.; Kao, W.-C.; Lin, S.-Z.; Hsieh, H.-H.; Chu, M.-Y.; Sun, W.-S.; Hsu, S.-H. In Vitro Study of a Novel Nanogold-Collagen Composite to Enhance the Mesenchymal Stem Cell Behavior for Vascular Regeneration. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104019. [\[CrossRef\]](#)

81. Chen, H.; Dorrigan, A.; Saad, S.; Hare, D.J.; Cortie, M.B.; Valenzuela, S.M. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58208. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Regiel-Futryra, A.; Kus-Lisiewicz, M.; Sebastian, V.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Stochel, G.; Kyzioł, A. Development of Nontoxic Chitosan–Gold Nanocomposites as Efficient Antibacterial Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 1087–1099. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Ehmann, H.M.; Breitwieser, D.; Winter, S.; Gspan, C.; Koraimann, G.; Maver, U.; Segal, M.; Köstler, S.; Stana-Kleinschek, K.; Spirk, S.; et al. Gold nanoparticles in the engineering of antibacterial and anticoagulant surfaces. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 34–42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Li, X.; Robinson, S.M.; Gupta, A.; Saha, K.; Jiang, Z.; Moyano, D.F.; Sahar, A.; Riley, M.A.; Rotello, V.M. Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *ACS Nano* **2014**, *8*, 10682–10686. [\[CrossRef\]](#)
85. El-Abeid, S.E.; Ahmed, Y.; Daròs, J.-A.; Mohamed, M.A. Reduced Graphene Oxide Nanosheet-Decorated Copper Oxide Nanoparticles: A Potent Antifungal Nanocomposite against Fusarium Root Rot and Wilt Diseases of Tomato and Pepper Plants. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1001. [\[CrossRef\]](#)
86. Shende, S.; Bhagat, R.; Raut, R.; Rai, M.; Gade, A. Myco-Fabrication of Copper Nanoparticles and Its Effect on Crop Pathogenic Fungi. *IEEE Trans. NanoBiosci.* **2021**, *20*, 146–153. [\[CrossRef\]](#)
87. Vincent, M.; Duval, R.E.; Hartemann, P.; Engels-Deutsch, M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 1032–1046. [\[CrossRef\]](#)
88. Hopkins, R.G.; Failla, M.L. Copper Deficiency Reduces Interleukin-2 (IL-2) Production and IL-2 mRNA in Human T-Lymphocytes. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 257–262. [\[CrossRef\]](#)
89. Kornblatt, A.P.; Nicoletti, V.G.; Travaglia, A. The neglected role of copper ions in wound healing. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *161*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
90. Borkow, G.; Gabbay, J.; Dardik, R.; Eidelman, A.I.; Lavie, Y.; Grunfeld, Y.; Ikher, S.; Huszar, M.; Zatcoff, R.C.; Marikovsky, M. Molecular mechanisms of enhanced wound healing by copper oxide-impregnated dressings. *Wound Repair Regen.* **2010**, *18*, 266–275. [\[CrossRef\]](#)
91. Uauy, R.; Olivares, M.; Gonzalez, M. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 952S–959S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Quaranta, D.; Krans, T.; Santo, C.E.; Elowsky, C.G.; Domaille, D.W.; Chang, C.J.; Grass, G. Mechanisms of Contact-Mediated Killing of Yeast Cells on Dry Metallic Copper Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 416–426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Palza, H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 2099–2116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Hatori, Y.; Clasen, S.; Hasan, N.M.; Barry, A.; Lutsenko, S. Functional Partnership of the Copper Export Machinery and Glutathione Balance in Human Cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 26678–26687. [\[CrossRef\]](#)
95. Babula, P.; Masarik, M.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Trnkova, L.; Skutkova, H.; Provaznik, I.; Hubalek, J.; Kizek, R. Mammalian metallothioneins: Properties and functions. *Metallomics* **2012**, *4*, 739–750. [\[CrossRef\]](#)
96. Hostynek, J.J.; Maibach, H.I. Copper Hypersensitivity: Dermatologic Aspects. *Rev. Environ. Health* **2003**, *18*, 153–184. [\[CrossRef\]](#)
97. Das, A.; Sudhakar, V.; Chen, G.-F.; Kim, H.W.; Youn, S.-W.; Finney, L.; Vogt, S.; Yang, J.; Kweon, J.; Surenkhua, B.; et al. Endothelial Antioxidant-1: A Key Mediator of Copper-dependent Wound Healing in vivo. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33783. [\[CrossRef\]](#)
98. Alizadeh, S.; Seyedalipour, B.; Shafieyan, S.; Kheime, A.; Mohammadi, P.; Aghdami, N. Copper nanoparticles promote rapid wound healing in acute full thickness defect via acceleration of skin cell migration, proliferation, and neovascularization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *517*, 684–690. [\[CrossRef\]](#)
99. Chen, M.; Li, R.; Yin, W.; Wang, T.; Kang, Y.J. Copper promotes migration of adipose-derived stem cells by enhancing vimentin-Ser39 phosphorylation. *Exp. Cell Res.* **2020**, *388*, 111859. [\[CrossRef\]](#)
100. Abdollahi, Z.; Zare, E.; Salimi, F.; Goudarzi, I.; Tay, F.; Makvandi, P. Bioactive Carboxymethyl Starch-Based Hydrogels Decorated with CuO Nanoparticles: Antioxidant and Antimicrobial Properties and Accelerated Wound Healing In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2531. [\[CrossRef\]](#)
101. Ruthenberg, R.J.; Ban, J.-J.; Wazir, A.; Takeda, N.; Kim, A.J.-W. Regulation of Wound Healing and Fibrosis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1. *Mol. Cells* **2014**, *37*, 637–643. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Borkow, G.; Zatcoff, R.C.; Gabbay, J. Reducing the risk of skin pathologies in diabetics by using copper impregnated socks. *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 883–886. [\[CrossRef\]](#)
103. Baek, J.H.; Yoo, M.A.; Koh, J.S.; Borkow, G. Reduction of facial wrinkles depth by sleeping on copper oxide-containing pillowcases: A double blind, placebo controlled, parallel, randomized clinical study. *J. Cosmet. Dermatol.* **2012**, *11*, 193–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Dykes, P. Increase in skin surface elasticity in normal volunteer subjects following the use of copper oxide impregnated socks. *Ski. Res. Technol.* **2015**, *21*, 272–277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Melamed, E.; Kiambi, P.; Okoth, D.; Honigber, L.; Tamir, E.; Borkow, G. Healing of Chronic Wounds by Copper Oxide-Impregnated Wound Dressings—Case Series. *Medicina* **2021**, *57*, 296. [\[CrossRef\]](#)
106. Yadiid, M.; Feiner, R.; Dvir, T. Gold Nanoparticle-Integrated Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Nano Lett.* **2019**, *19*, 2198–2206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Khalid, A.; Khan, R.; Ul-Islam, M.; Khan, T.; Wahid, F. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *164*, 214–221. [\[CrossRef\]](#)

108. Kogan, S.; Sood, A.; Garnick, M.S. Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. *Wounds* **2017**, *29*, 102–106.
109. Diez-Pascual, A.M.; Diez-Vicente, A.L.J.B. Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2631–2644. [\[CrossRef\]](#)
110. Sharma, D.K.; Sharma, K.K.; Kumar, V.; Sharma, A. Effect of Ce doping on the structural, optical and magnetic properties of ZnO nanoparticles. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2016**, *27*, 10330–10335. [\[CrossRef\]](#)
111. Augustine, R.; Dominic, E.A.; Reju, I.; Kaimal, B.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 51528–51536. [\[CrossRef\]](#)
112. Kaushik, M.; Niranjana, R.; Thangam, R.; Madhan, B.; Pandiyarasan, V.; Ramachandran, C.; Oh, D.-H.; Venkatasubbu, G.D. Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *479*, 1169–1177. [\[CrossRef\]](#)
113. Czyżowska, A.; Barbasz, A. A review: Zinc oxide nanoparticles—friends or enemies? *Int. J. Environ. Health Res.* **2022**, *32*, 885–901. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Osmond, M.J.; McCall, M.J. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 15–41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Muller, E.B.; Hanna, S.K.; Lenihan, H.S.; Miller, R.J.; Nisbet, R.M. Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the energy budgets of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Sea Res.* **2014**, *94*, 29–36. [\[CrossRef\]](#)
116. Manuja, A.; Raguvaran, R.; Kumar, B.; Kalia, A.; Tripathi, B. Accelerated healing of full thickness excised skin wound in rabbits using single application of alginate/acacia based nanocomposites of ZnO nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *155*, 823–833. [\[CrossRef\]](#)
117. Barani, M.; Rahdar, A.; Mukhtar, M.; Razaq, S.; Qindeel, M.; Olam, S.A.H.; Paiva-Santos, A.C.; Ajalli, N.; Sargazi, S.; Balakrishnan, D.; et al. Recent application of cobalt ferrite nanoparticles as a theranostic agent. *Mater. Today Chem.* **2022**, *26*, 101131. [\[CrossRef\]](#)
118. Kushwaha, A.; Goswami, L.; Kim, B.S. Nanomaterial-Based Therapy for Wound Healing. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
119. Melnikova, N.; Balakireva, A.; Orekhov, D.; Kamorin, D.; Didenko, N.; Malygina, D.; Knyazev, A.; Novopoltsev, D.; Solovyeva, A. Zinc Oxide Nanoparticles Protected with Terpenoids as a Substance in Redox Imbalance Normalization in Burns. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 492. [\[CrossRef\]](#)
120. Singh, R.; Pantarotto, D.; McCarthy, D.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Partidos, C.D.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Binding and Condensation of Plasmid DNA onto Functionalized Carbon Nanotubes: Toward the Construction of Nanotube-Based Gene Delivery Vectors. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4388–4396. [\[CrossRef\]](#)
121. Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science* **1998**, *281*, 2013–2016. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Wang, S.; Mamedova, N.; Kotov, N.A.; Chen, W.; Studer, J. Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 817–822. [\[CrossRef\]](#)
123. El-Aassar, M.R.; Ibrahim, O.M.; Fouda, M.M.G.; El-Beheri, N.G.; Agwa, M.M. Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/Hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: In-vitro and in-vivo studies. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *238*, 116175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Moretta, R.; Terracciano, M.; Rea, I.; Stefano, L.D. Bioconjugation of Peptides to Hybrid Gold Nanoparticles. In *Peptide Conjugation*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; pp. 105–115. [\[CrossRef\]](#)
125. Maraming, P.; Kah, J.C.Y. Conjugation of peptides to gold nanoparticles. In *Peptide Conjugation*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; pp. 9–16. [\[CrossRef\]](#)
126. 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 Central Sci.* **2017**, *3*, 163–175. [\[CrossRef\]](#)
127. Yoo, J.; Lee, E.; Kim, H.Y.; Young, K.H.; Jung, J.; Kim, H.; Chang, Y.; Lee, W.; Shin, J.; Baek, S.; et al. Electromagnetized gold nanoparticles mediate direct lineage reprogramming into induced dopamine neurons in vivo for Parkinson's disease therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 1006–1014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
128. Baei, P.; Jalili-Firoozinezhad, S.; Rajabi-Zeleti, S.; Tafazzoli-Shadpour, M.; Baharvand, H.; Aghdami, N. Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *63*, 131–141. [\[CrossRef\]](#)
129. Lu, J.; Chen, Y.; Ding, M.; Fan, X.; Hu, J.; Chen, Y.; Li, J.; Li, Z.; Liu, W. A 4arm-PEG macromolecule crosslinked chitosan hydrogels as antibacterial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *277*, 118871. [\[CrossRef\]](#)
130. Lai, W.-F.; Wong, W.-T. Property-Tuneable Microgels Fabricated by Using Flow-Focusing Microfluidic Geometry for Bioactive Agent Delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 787. [\[CrossRef\]](#)
131. Rath, G.; Hussain, T.; Chauhan, G.; Garg, T.; Goyal, A.K. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *J. Drug Target.* **2016**, *24*, 520–529. [\[CrossRef\]](#)
132. Ragothaman, M.; Villalan, A.K.; Dhanasekaran, A.; Palanisamy, T. Bio-hybrid hydrogel comprising collagen-capped silver nanoparticles and melatonin for accelerated tissue regeneration in skin defects. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112328. [\[CrossRef\]](#)

133. Corrêa, M.E.A.B.; Mendes, C.; Bittencourt, J.V.S.; Takejima, A.; de Souza, I.C.; de Carvalho, S.C.D.; Orlandini, I.G.; de Andrade, T.A.M.; Guarita-Souza, L.C.; Silveira, P.C.L. Effects of the Application of Decellularized Amniotic Membrane Solubilized with Hyaluronic Acid on Wound Healing. *Ann. Biomed. Eng.* **2022**, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Londono, R.; Badylak, S.F. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. *Ann. Biomed. Eng.* **2015**, *43*, 577–592. [[CrossRef](#)]
135. Edri, R.; Gal, I.; Noor, N.; Harel, T.; Fleischer, S.; Adadi, N.; Green, O.; Shabat, D.; Heller, L.; Shapira, A.; et al. Personalized Hydrogels for Engineering Diverse Fully Autologous Tissue Implants. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, e1803895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Wali, N.; Shabbir, A.; Wajid, N.; Abbas, N.; Naqvi, S.Z.H. Synergistic efficacy of colistin and silver nanoparticles impregnated human amniotic membrane in a burn wound infected rat model. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 6414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Baranes, K.; Shevach, M.; Shefi, O.; Dvir, T. Gold Nanoparticle-Decorated Scaffolds Promote Neuronal Differentiation and Maturation. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 2916–2920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Heo, D.N.; Castro, N.; Lee, S.-J.; Noh, H.; Zhu, W.; Zhang, L.G. Enhanced bone tissue regeneration using a 3D printed microstructure incorporated with a hybrid nano hydrogel. *Nanoscale* **2017**, *9*, 5055–5062. [[CrossRef](#)]
139. Alavi, M.; Rai, M. Topical delivery of growth factors and metal/metal oxide nanoparticles to infected wounds by polymeric nanoparticles: An overview. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2020**, *18*, 1021–1032. [[CrossRef](#)]
140. Alberti, T.; Coelho, D.S.; Voytena, A.; Pitz, H.; De Pra, M.; Mazzarino, L.; Kuhnen, S.; Ribeiro-Do-Valle, R.M.; Maraschin, M.; Veleirinho, B. Nanotechnology: A Promising Tool Towards Wound Healing. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 3515–3528. [[CrossRef](#)]
141. Seifalian, A.M.; Naderi, N.; Karponis, D.; Mosahebi, A. Nanoparticles in wound healing from hope to promise from promise to routine. *Front. Biosci.* **2018**, *23*, 1038–1059. [[CrossRef](#)]