

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

**SINARA MESQUITA GUIMARÃES TANNÚS**

**NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSINTETISADAS COM CURCUMINA ASSOCIADAS  
A FOTOBIMODULAÇÃO POTENCIALIZAM O REPARO TECIDUAL DE FERIDAS  
PALATINAS**

**CRICIÚMA (SC)**

**2025**

**SINARA MESQUITA GUIMARÃES TANNÚS**

**NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSINTETISADAS COM CURCUMINA ASSOCIADAS  
COM FOTOBIMODULAÇÃO POTENCIALIZAM O REPARO TECIDUAL DE FERIDAS  
PALATINAS**

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: Professor Doutor Paulo Cesar Lock Silveira.

**CRICIÚMA (SC)**

**2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T167n Tannús, Sinara Mesquita Guimarães.

Nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina associadas a fotobiomodulação potencializam o reparo tecidual de feridas palatinas / Sinara Mesquita Guimarães Tannús. - 2025.  
63 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Feridas palatinas. 2. Cicatrização de feridas. 3. Regeneração tecidual guiada. 4. Nanopartículas de ouro. 5. Fotobiomodulação. 6. Tecidos - Inflamação. 7. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 617.1406

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 Nº 609 de 14.03.2019

### PARECER

No dia 26 (vinte e seis) do mês de fevereiro de 2025, às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos, no bloco R1, sala 108, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: **“NANOPARTÍCULAS DE OURO BISSINTETISADAS COM CURCUMINA ASSOCIADAS A FOTOBIMODULAÇÃO POTENCIALIZAM O REPARO TECIDUAL DE FERIDAS PALATINAS”**, da candidata **Sinara Mesquita Guimarães Tannús**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila** (Membro Relator – UNESC), **Dr. Emilio Luiz Streck** (Membro Interno – UNESC), **Dr. Antônio Augusto Schafer** (Membro Externo – UNESC) e **Dr. Alexandre Marcio Marcolino** (Membro Externo – UFSC). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

**Trabalho aprovado**

**Trabalho não aprovado**

Observações:

---

---

---

Criciúma, SC, 26 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente  
 **RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA**  
Data: 07/03/2025 16:39:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA**  
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **EMILIO LUIZ STRECK**  
Data: 25/03/2025 07:25:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK**  
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **ANTONIO AUGUSTO SCHAFER**  
Data: 25/03/2025 07:59:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. ANTÔNIO AUGUSTO SCHAFER**  
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **ALEXANDRE MARCIO MARCOLINO**  
Data: 25/03/2025 10:03:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. ALEXANDRE MARCIO MARCOLINO**  
Membro Externo – UFSC

Documento assinado digitalmente  
 **PAULO CESAR LOCK SILVEIRA**  
Data: 25/03/2025 10:09:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA**  
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente  
 **JOSIANE BUDNI**  
Data: 03/04/2025 13:59:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dra. JOSIANE BUDNI**  
Coordenadora Titular do PPGCS

## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT 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 UNESC.

Dedico esse trabalho aos meus pais, por serem sempre meus maiores apoiadores e incentivadores, desde muito pequena, me ensinaram que o conhecimento abre portas e horizontes.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me enviar anjos que facilitam minha vida e deixam meus caminhos mais leves.

Aos meus pais, Elton e Josefa, meus maiores incentivadores, a melhor rede de apoio, o colo mais aconchegante.

Ao meu marido, Carlos, por ser meu companheiro de vida, por sempre dizer sim aos meus sonhos e não medir esforços para que eles aconteçam, te amo.

Ao meu trio preferido da vida, Artur, Alice e Amanda, por mesmo muito pequenos, serem minha maior inspiração, são por vocês e pra vocês que durmo e acordo todos os dias tentando ser alguém melhor, amo vocês mais que tudo nessa vida.

À UniRV, na pessoa do nosso magnífico Reitor, do qual posso chamar de amigo, prof<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Alberto Barella Netto, por não medir esforços à profissionalização do nosso corpo docente e viabilizar esse programa de doutorado.

À UNESC, que me recebeu de portas abertas, me mostrou o caminho da ciência e me proporcionou uma experiência inesquecível.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Paulo Silveira Lock, por ter feito desses quatro anos de convivência um aprendizado único, o senhor é um grande incentivador, apoiador da ciência, entusiasta, leve, humilde e sempre disposto a ajudar, muito obrigada por todo ensinamento que dividiu comigo.

Aos meus colegas do laboratório, me faltam palavras pra agradecer tudo o que fizeram por mim, toda ajuda e ensinamento, desde os que me acompanham desde o início como o João, Laura e a querida Ligia, que não mediu esforços para me auxiliar, principalmente na reta final que me acalmava quando achava que não iria conseguir e aos que foram chegando e deixando suas contribuições, Natanael, Camila, Vitória, Gabrielli, Alice que foi incrível no meu experimento, deixando tudo pronto e organizado para que tudo fluísse da melhor forma possível e a além de toda ajuda, , muito obrigada pessoal, vocês são incríveis.

"A ciência é a tentativa de fazer com que a diversidade caótica de nossa experiência sensorial corresponda a um sistema de pensamento logicamente ordenado."

Albert Einstein

## RESUMO

As feridas palatinas representam um desafio significativo para a cicatrização, caracterizando-se por uma resposta inflamatória exacerbada e remodelação tecidual inadequada podendo comprometer o reparo completo. As nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina (GNPs-Cur) e as nanocurcuminas apresentam propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e moduladoras da atividade celular, mostrando ser uma alternativa promissora no tratamento das lesões teciduais orais. Além disso, intervenção de tratamento com fotobiomodulação (FBM) tem sido estudada por seu potencial em modular a inflamação e acelerar a regeneração tecidual. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dessas abordagens terapêuticas, GNPs-Cur, nanocurcumina e FBM em feridas palatinas induzidas experimentalmente. Foram utilizados 72 ratos Wistar, distribuídos randomicamente em seis grupos experimentais (n=12): I. (FP) Ferida Palatina); II. (FP+nanocurcumina); III. (FP+GNPs); IV. (FP+FBM); V (FP+nanocurcumina+FBM) VI (FP+GNPs-Cur+FBM). Os tratamentos foram iniciados no segundo dia pós-lesão e aplicados por 5 dias consecutivos. Avaliaram-se parâmetros de contração da ferida, infiltrado inflamatório, porcentagem da área de colágeno, análise da expressão gênica de CD11, NRF2 e COL III, níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e indicadores de estresse oxidativo. Os resultados indicaram que o grupo FP+GNPs-Cur+FBM apresentou maior porcentagem da contração da ferida e redução significativa do infiltrado inflamatório. Além aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ ), sugerindo uma modulação eficaz da resposta inflamatória. Nos parâmetros de estresse oxidativo, este grupo apresentou redução do nitrito e aumento da atividade antioxidante da SOD. Além disso, o aumento na expressão de NRF2 e COL III confirmou a promoção de um ambiente regenerativo e a formação de uma matriz de colágeno. Conclui-se que a combinação de GNPs-Cur e FBM favoreceu o reparo tecidual em feridas palatinas, mostrando-se promissora para tratamentos regenerativos em lesões complexas.

**Palavras-chave:** Feridas palatinas; reparo tecidual; nanopartículas de ouro; fotobiomodulação; estresse oxidativo; inflamação.

## ABSTRACT

Palatal wounds represent a significant challenge for healing, characterized by an exacerbated inflammatory response and inadequate tissue remodeling, which may compromise complete repair. Biosynthesized gold nanoparticles with curcumin (GNPs-Cur) and nanocurcumin have anti-inflammatory, antioxidant and cellular activity modulating properties, proving to be a promising alternative in the treatment of oral tissue injuries. In addition, photobiomodulation (PBM) treatment intervention has been studied for its potential to modulate inflammation and accelerate tissue regeneration. Thus, this study aimed to evaluate the effects of these therapeutic approaches, GNPs-Cur, nanocurcumin and PBM on experimentally induced palatal wounds. Seventy-two Wistar rats were randomly distributed into six experimental groups (n = 12): I. (FP) Palatal Wound); II. (FP + nanocurcumin); III. (FP + GNPs-Cur); IV. (FP + PBM); V (FP+nanocurcumin+FBM) VI (FP+GNPs-Cur+FBM). Treatments were initiated on the second day post-injury and applied for 5 consecutive days. Wound contraction parameters, inflammatory infiltrate, percentage of collagen area, analysis of CD11, NRF2 and COL III gene expression, levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and indicators of oxidative stress were evaluated. The results indicated that the FP+GNPs-Cur+FBM group presented a higher percentage of wound contraction and a significant reduction in inflammatory infiltrate. In addition, there was an increase in the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) and a reduction in pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ ), suggesting an effective modulation of the inflammatory response. In the oxidative stress parameters, this group presented a reduction in nitrite and an increase in the antioxidant activity of SOD. Furthermore, the increased expression of NRF2 and COL III confirmed the promotion of a regenerative environment and the formation of a collagen matrix. It is concluded that the combination of GNPs-Cur and FBM favored tissue repair in palatal wounds, showing promise for regenerative treatments in complex lesions.

**Keywords:** Palatal wounds; tissue repair; gold nanoparticles; photobiomodulation; oxidative stress; inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Punch dermatológico de aço inox (marca Rhosse®) com 4 mm de diâmetro.....	29
Figura 2 - (a) fotografia da mucosa palatina; (b) ilustração do modelo de ferida palatina no rato Wistar.....	29
Figura 3 - Linha do tempo experimental Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) das partículas Nanocurcumina (A) e GNPs - Cur (B).....	32
Figura 4 - Análise do software de UV-Vis de pico máximo de absorção de Nanocurcumina.....	37
Figura 5 - Análise do software de UV-Vis de pico máximo de absorção de GNPs-Cur.....	38
Figura 6 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM no 6º dias após indução de Ferida Palatina sobre os parâmetros de contração de ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * p<0,05 v.s grupo Ferida Palatina e ** p<0,01 v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey) .....	38
Figura 7 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre a análise histológica de tecido de palato mole no influxo de células inflamatórias através da coloração de HE (A – B) e porcentagem da área de colágeno através da coloração de Tricômio de Gomori (C – D).Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * p<0,05 v.s grupo Ferida Palatina, *** p<0,001 v.s grupo Ferida Palatina e **** p<0,0001 v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).....	39
Figura 8 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre a análise histológica de fígado no influxo de células inflamatórias através da coloração de HE (A – B). Os dados são apresentados em média +EPM. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). .....	40
Figura 9 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre a expressão gênica de CD11 (A), NRF2 (B) e COL III (C) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * p<0,05 v.s grupo Ferida Palatina, ** p<0,01 v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).....	41
Figura 10 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM,	

Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* p<0,05 v.s grupo Ferida Palatina, \*\* p<0,01 v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).....42

Figura 11 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre os níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias IL10 (A), IL4 (B) e fator de crescimento TGF- $\beta$  (C) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* p<0,05 v.s grupo Ferida Palatina, \*\* p<0,01 v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).....43

Figura 12 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre o marcador oxidante Nitrito (A) e o marcador antioxidante SOD (B) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* p<0,05 v.s grupo Ferida Palatina, \*\* p<0,01 v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).....45

Figura 13 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs- Cur+FBM sobre os marcadores de estresse oxidativo, oxidantes Nitrito (A) e DCF (B), marcadores de dano oxidativo Carbonil (C) e Conteúdo de Sulfidrila (D) e marcadores de defesa antioxidante SOD (E) e GSH (F) no tecido fígado. Os dados são apresentados em média +EPM. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).....46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1- Proteína ativada-1

ATF/CREB - Fator de transcrição ativador/ligante do elemento de resposta ao cAMP

ATP - Adenosina Trifosfato

CD11 - Cluster de diferenciação 11

Col III – Colágen tipo III

COL1A1 - Cadeia alfa-1 do colágeno tipo I

COL3A1 - Cadeia alfa-1 do colágeno tipo III

COX-2 - Ciclooxigenase-2

Cys-179 - aminoácido cisteína na posição 179

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

DCF-2',7'- Dichlorodihydrofluorescein

ERK - Quinase Regulada por Sinal extracelular

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FBM - Fotobiomodulação

GNPs- Nanopartículas de Ouro

GNPs-Cur – Nanopartículas de Ouro biossintetizadas com curcumina

GSH - Glutathiona reduzida

GSSG - Glutathiona oxidada

HIF-1 - Fator indutível por hipóxia

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

IKB - Inibidor de  $\kappa$ B

IL1-  $\beta$  - Interleucina 1-  $\beta$ eta

IL-10 - Interleucina 10

Il-4 – Interleucina 4

iNOS - óxido nítrico sintase

LBP - Laser de baixa potência

LOX - Lipooxigenase

LP - Lesão Palatina

M1 - Macrófago tipo 1

M2 - Macrófagotipo 2

MAPK - Quinase Ativada por Mitógenos

MEC - Matriz Extracelular

MMPs -Metaloproteinases de Matriz

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidrogenado

NF- $\kappa$  $\beta$  - Fator Nuclear kappa  $\beta$

NLRP3 - Receptor de domínio de oligomerização e reprodução rica em leucina contendo pirina 3

NO - Óxido Nítrico

NO• - Radical livre óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

NPs – Nanopartículas

NRF2 - Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion superóxido

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

PI3K/AKT - Fosfatidilinositol 3-Quinase/ Proteína Quinase B

PLA2s - Fosfolipases A2

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões

SOD - Superóxido Dismutase

TGF-  $\beta$  - Fator de transformação do crescimento beta

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	LESÕES DE MUCOSA BUCAL.....	16
1.2	INFLAMAÇÃO E REPARO TECIDUAL.....	17
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO PALATINA.....	18
1.4	FOTOBIMODULAÇÃO.....	20
1.5	NANOTECNOLOGIA.....	22
1.6	HEPATOTOXIDADE.....	24
1.7	SÍNTESE VERDE.....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
3.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	28
3.2	ANIMAIS.....	28
3.3	MODELO DE LESÃO PALATINA.....	29
3.4	SÍNTESE VERDE DAS NANOPARTÍCULAS.....	30
3.5	APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	31
3.6	EUTANÁSIA.....	31
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	32
3.8	ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS.....	32
3.9	RT-PCR.....	33
3.10	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CITOCINAS.....	33
3.11	CONTEÚDO DE PROTEÍNAS.....	34
3.12	OXIDANTES.....	34
<b>3.12.1</b>	<b>DCFH-DA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.12.2</b>	<b>Indicador da formação de óxido nítrico (NO).....</b>	<b>35</b>
3.13	MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	35
<b>3.13.1</b>	<b>Grupos sulfidrila.....</b>	<b>35</b>
<b>3.13.2</b>	<b>Carbonilação de proteínas.....</b>	<b>35</b>
3.14	DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	36
<b>3.14.1</b>	<b>Superóxido dismutase (SOD).....</b>	<b>36</b>
<b>3.14.2</b>	<b>Glutathiona (GSH).....</b>	<b>36</b>
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	37
4.2	CONTRAÇÃO DA FERIDA.....	39
4.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA DE PALATO E FÍGADO.....	39
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR DE PALATO.....	41
4.5	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE PALATO.....	43
4.6	CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS DE PALATO.....	44
4.7	MARCADORES DE OXIDANTES E ANTIOXIDANTES DE PALATO.....	45
4.8	MARCADORES DE OXIDANTES, DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES DE FÍGADO.....	46
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 LESÕES DE MUCOSA BUCAL

A mucosa bucal, assim como a pele, tem o importante papel como órgão protetor dos tecidos adjacentes e subjacentes, no entanto, investigações clínicas demonstram que a mucosa bucal é mais susceptível a traumas e inflamações que a pele. Lesões na mucosa do palato são comuns e podem resultar de traumas cirúrgicos, como os procedimentos que utilizam o palato como área doadora para enxertos gengivais, próteses mal adaptadas e alimentos rígidos. Estas lesões geralmente causam desconforto significativo, incluindo dor intensa, sensibilidade exacerbada e dificuldade para se alimentar, falar ou manter a higiene bucal (Scully e Felix, 2005; Bruce e Rogers, 2003).

As patologias bucais são, de certa forma, amplamente prevalentes entre idosos, especialmente devido ao uso prolongado de próteses dentárias e outras condições que aumentam a suscetibilidade a lesões. Enquanto as lesões de palato foi uma das localizações mais comuns, ocupando o segundo lugar com 13,17% das lesões identificadas (Silva e Cabral, 2021).

Além da dor e sensibilidade, estas lesões também podem levar a complicações como infecção e inflamação persistente, principalmente em pacientes que apresentam condições sistêmicas ou que fazem uso de medicamentos imunossupressores. O trauma recorrente ao palato, seja por procedimentos cirúrgicos ou uso de próteses, pode resultar em ulcerações crônicas que dificultam a cicatrização e aumentam o risco de complicações adicionais, incluindo hiperplasia do tecido e formação de cicatrizes que comprometem a função mastigatória e fonatória. Além disso, a ocorrência dessas lesões é frequentemente exacerbada em pacientes submetidos a cirurgias orais ou periodontais, devido ao estresse mecânico e trauma repetitivo nessa região (Lavanya et al., 2022).

Em conjunto, as lesões na cavidade oral causam dificuldade significativa para comer, falar e engolir, impedindo significativamente a capacidade dos pacientes de realizar suas vidas cotidianas. Desta forma, representam um desafio significativo tanto para os pacientes quanto para os profissionais de saúde, devido à sua etiopatogenia variada e ao impacto na qualidade de vida. A compreensão aprofundada dos mecanismos subjacentes ao reparo tecidual, associada ao controle eficaz da inflamação, é crucial para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, visando minimizar os desconfortos, acelerar a cicatrização e melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por lesões palatinas e complicações associadas.

## 1.2 INFLAMAÇÃO E REPARO TECIDUAL

A mucosa oral e as feridas cutâneas seguem um padrão de cicatrização semelhante em termos de sequência temporal dos eventos de cicatrização, embora a mucosa oral pareça cicatrizar mais rápido e com menos tecido cicatricial, segue as fases de hemostasia, inflamação, granulação e maturação. Essas fases podem se sobrepor em feridas complexas, e a eficácia do processo pode ser influenciada por fatores locais e sistêmicos (Tavelliet al., 2023; Baronet al., 2020).

A fase inicial da cicatrização ocorre imediatamente após o dano tecidual, com a formação de um coágulo sanguíneo no local da lesão, atuando como uma barreira que protege a ferida contra desidratação e infecções, além de servir como matriz para a migração celular. Nas primeiras horas após a lesão, células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, são recrutadas para desbridar a área lesionada e impedir a invasão e proliferação microbiana. Durante a fase de coagulação, essa cascata para cicatrização pode ser dividida em uma fase inicial com recrutamento de neutrófilos e uma fase tardia com o aparecimento e transformação de monócitos que se diferenciam macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, liberam fatores de crescimento e citocinas que ativam fibroblastos e outras células, estimulando a produção de tecido conjuntivo (Sculeanet al., 2014; Dellavia et al., 2014; Tavelliet al., 2023).

Um coágulo provisório de fibrina, formado por plaquetas agregadas, neutrófilos e hemácias, cobrem a ferida. Os fibroblastos entram em conformidade, contribuindo para a formação do tecido de granulação e a síntese de componentes da matriz extracelular (MEC), como fibronectina, colágeno e ácido hialurônico. Portanto, próximo à migração de fibroblastos locais ao longo da rede de fibrina e ao início da reepitelização das bordas da ferida, a neovascularização e a angiogênese são ativadas por neoformação capilar (Sculeanet al., 2014; Dellavia et al., 2014; Tavelliet al., 2023).

Durante essa fase, a angiogênese estimulada pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), é marcada pela migração de células endoteliais e pela formação de novos capilares, processos essenciais para uma cicatrização eficiente. Sob a regulação de citocinas como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), os fibroblastos promovem a síntese de colágeno, fibronectina e outros componentes essenciais para a cicatrização. Esses elementos formam a base da nova matriz de tecido conjuntivo, contribuindo para o fechamento de lacunas teciduais e a restauração da resistência mecânica da ferida. Na fase posterior de proliferação, o tecido de granulação é formado na superfície da ferida por meio da interação

entre fibroblastos, células inflamatórias e células epiteliais (Sculean et al., 2014; Dellavia C et al., 2014; Corrêa et al., 2020).

A maturação e remodelação do tecido começa após a formação dos tecidos de granulação e resulta na reorganização do tecido conjuntivo. É caracterizada por uma redução nos vasos sanguíneos e apoptose de fibroblastos, miofibroblastos, células epiteliais e macrófagos. O colágeno tipo III, que é produzido principalmente na fase de proliferação, desempenha um papel fundamental na fibrilogênese e na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno, e durante a fase proliferativa é lentamente degradado e substituído por colágeno mais forte, tipo I (Tavelliet al., 2023; Baronet al., 2020).

A maioria dos miofibroblastos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos sofre apoptose, deixando a matriz extracelular rica em colágeno contendo apenas algumas células. Além das desvantagens estéticas de um tecido cicatricial, também a capacidade biomecânica é menor do que era antes da lesão. A formação de tecido cicatricial, também denominada fibrose, é o principal fator patológico de uma variedade de patologias relacionadas à inflamação (Tavelliet al., 2023).

Em direção aos estágios finais da cicatrização, a ferida sofre uma resposta contrátil através da ação dos miofibroblastos. Resumidamente, como células pró-inflamatórias dominantes durante os estágios iniciais da cicatrização da ferida, os neutrófilos e macrófagos M1 regulam as respostas de defesa local e sistêmica à ferida. Quando a fase de inflamação está completa, os neutrófilos passam por apoptose e tornam-se fagocitados pelos macrófagos M1, também fagocitando detritos e restos bacterianos no local lesado. A transformação de macrófagos M1 para M2 desempenha um papel fundamental na progressão da cicatrização da fase inflamatória para a proliferativa. Os macrófagos M2 facilitam a produção de mediadores anti-inflamatórios, o início da proliferação de fibroblastos e a angiogênese (Corrêa et al., 2020; Krzyszczyk et al., 2019).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO PALATINA

Além das diversas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, as espécies reativas de oxigênio (ERO) também desempenham um papel importante no processo de reparo de feridas. As EROs são radicais livres decorrentes do oxigênio, frequentemente envolvidos na indução de lesões celulares. Elas causam danos celulares por meio de três mecanismos principais: peroxidação lipídica das membranas celulares, formação

de ligações cruzadas e outras alterações nas proteínas, além de lesões no DNA (Sies, 1991; Schäfer e Werner, 2008).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e esses mecanismos podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio. Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases, que são proteínas de membrana que tem a função de transferir elétrons através das membranas celulares (Zahanet al., 2020).

Em mitocôndrias, o processo disfuncional da fosforilação oxidativa gera a redução da molécula de oxigênio ( $O_2$ ). Um elétron é ligado ao orbital da molécula de  $O_2$  transformando-a no radical livre ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Entretanto, esse  $O_2^-$  poderá ser catalisado a partir da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) gerando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  é uma ERO menos agressiva que o  $O_2^-$  e que conseqüentemente poderá ser neutralizada pela ação com glutathione peroxidase (GPX) que catalisa a conversão de glutathione reduzida (GSH) oxidando-a para glutathione oxidada (GSSG) (Biswas, 2016; Zahanet al., 2020; Settiet al., 2021).

Além disso, a partir do dano tecidual do palato há secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que realizarão o recrutamento de mais células fagocíticas. Isto é, neutrófilos e macrófagos capazes de gerar mais ERO e citocinas pró-inflamatórias fortificando um ciclo vicioso.

Em fagócitos, a NADPH oxidase é a principal fonte ERO. Normalmente inativa, essa enzima é ativada em resposta a estímulos antimicrobianos e inflamatórios, quando seus componentes citosólicos se deslocam para a membrana plasmática do fagossoma, formando um complexo enzimático funcional. Nesse estado ativo, a NADPH oxidase gera ERO transferindo elétrons do NADPH intracelular através do complexo na membrana, onde são acoplados ao oxigênio molecular ( $O_2$ ) presente no vacúolo do fagossoma, resultando na formação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (Zahanet al., 2020; Juan et al., 2021).

A enzima óxido nítrico sintase (NOS), em especial sua isoforma induzível (iNOS), catalisa a produção do radical livre óxido nítrico ( $NO\bullet$ ). O  $NO\bullet$ , por sua vez, reage com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), contribuindo para a eliminação do conteúdo do fagossoma. O peroxinitrito integra as espécies reativas de nitrogênio (ERN), uma classe de moléculas derivadas de  $NO\bullet$  e  $O_2^-$ , que desempenham um papel no estresse

nitrosativoe, em conjunto com as ERO, promovem danos celulares associados à ação oxidativa (Zahanet al., 2020; Juan et al., 2021).

Para reduzir os danos oxidativos causados por ERO e ERN, o organismo utiliza sistemas antioxidantes. Entre eles, destacam-se os antioxidantes enzimáticos, como a SOD e a GPX, que oferecem proteção significativa contra o estresse oxidativo, atuando na neutralização ou eliminação dessas espécies reativas (Schäfer e Werner, 2008; Tamakiet al., 2016).

Desta forma, identificar e caracterizar funcionalmente os fatores relacionados à geração e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio é essencial, pois isso serve de base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O controle das ERO representa uma abordagem promissora para acelerar o processo de cicatrização em feridas palatinas (Fan et al., 2019).

#### 1.4 FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação é uma prática terapêutica que utiliza luz não ionizada de maneira não invasiva, sendo aplicada por dispositivos como lasers de baixa potência (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), diodos emissores de luz e outras luzes com um espectro mais amplo que varia de visível a infravermelho (Zaccaronet al., 2022).

A eficácia da FBM está atrelada a fatores específicos, como o comprimento de onda e a dose de luz aplicada, assim como à forma como a luz interage com os sistemas biológicos. Esses efeitos são potencializados quando a luz penetra nos tecidos de maneira eficaz, favorecendo a absorção pelos fotorreceptores. Nos tecidos de mamíferos, os principais cromóforos que absorvem luz no espectro infravermelho próximo incluem hemoglobina, mioglobina, melanina e a citocromo C oxidase, localizadas na mitocôndria ou na membrana plasmática da célula (Lipkoet al., 2022; Courtois et al., 2021).

A proteína citocromo C oxidase, um polipeptídeo pertencente ao complexo IV da cadeia respiratória, atua como um cromóforo com a capacidade de absorver luz em comprimentos de onda específicos. Diversos estudos demonstraram que a irradiação com laser de baixa potência (LBP) aumenta a atividade enzimática dessa proteína, além de estimular a síntese de ATP em mitocôndrias isoladas (Yuet al., 1997; Santana-Blanket al., 2010; Karu., 2010).

Esta ação na cadeia de transporte de elétrons e nas enzimas endógenas, desencadeia o aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e permeabilidade da membrana

mitocondrial, levando à ativação de mensageiros secundários que por sua vez ativam as cascatas de sinalização necessárias (Silveira et al., 2011).

Após a irradiação, a absorção de energia dos fótons pelas células leva o cromóforo a um estado eletronicamente excitado, promovendo o aumento do metabolismo celular. Esse processo resulta em maior produção de ATP e em uma maior permeabilidade da membrana celular, seguido pela ativação de metabólitos secundários que desencadeiam uma cascata de sinais intracelulares. Entre esses sinais, destaca-se a regulação de diversos fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), proteína ativada-1 (AP-1), p53, fator indutível por hipóxia (HIF)-1 e o fator de transcrição ativador/ligante do elemento de resposta ao cAMP (ATF/CREB) (Hourelid, 2014; Evans e Abrahamse, 2009).

Além de seus efeitos na produção de energia, a influência da FBM no citocromo C oxidase gera um aumento na produção de óxido nítrico (NO). Esse aumento, apesar de benéfico, pode trazer desafios, já que o NO compete com o oxigênio pela ligação a citocromo C oxidase, podendo diminuir a transferência de elétrons na cadeia respiratória e, conseqüentemente, a produção de ATP. Por outro lado, a FBM também facilita a liberação de NO livre, cuja ação é benéfica em processos fisiológicos, como a vasodilatação e a modulação da inflamação (Poytonet al., 2011; Hamblinet al., 2017).

A FBM também se destaca por sua ação anti-inflamatória. Alguns estudos demonstram que essa técnica pode inibir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Outro efeito importante é a estimulação da microcirculação, que promove a reabsorção de edemas e a eliminação de produtos metabólicos inflamatórios. Dessa forma, a FBM não só otimiza o reparo tecidual, mas também torna o processo mais suave e menos doloroso, fato importante a ser levado em conta nas feridas palatinas, visto que essas lesões geralmente causam desconforto significativo, incluindo dor intensa, sensibilidade exacerbada e dificuldade para se alimentar, falar ou manter a higiene bucal trazendo novas intervenções para quem busca tratamentos mais eficazes e acolhedores (Pires et al., 2011; Basso et al., 2012; Da Silva et al., 2010).

## 1.5 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia destaca-se como um dos principais focos de pesquisa científica, com aplicações amplamente reconhecidas em diversas áreas do conhecimento. Este campo está em contínua evolução, com um potencial expressivo para promover avanços no sistema de saúde. No setor, suas aplicações já têm sido amplamente empregadas, enquanto as investigações sobre a interação dos nanomateriais com as células e suas repercussões biológicas seguem avançando, ampliando o entendimento científico e tecnológico (Bhattacharya, 2008).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a síntese de NPs com controle preciso de tamanho e morfologia, permitindo tanto o encapsulamento de uma ampla gama de moléculas bioativas quanto sua liberação de forma controlada. Entre esses sistemas, as nanopartículas de ouro (GNPs) destacam-se por seu amplo uso na entrega de moléculas bioativas, aumentando a eficiência terapêutica dos fármacos. Esse desempenho é atribuído à sua capacidade de distribuição direcionada, baixa toxicidade e elevada taxa de captação celular. Além disso, as GNPs são consideradas excelentes transportadoras de proteínas e biomoléculas, apresentando uma ação terapêutica mais eficaz quanto maior for sua distribuição (Ghoshet al., 2017; Malamet al., 2009; Ahnet al., 2013).

As GNPs destacam-se como uma opção promissora, devido à sua biocompatibilidade comprovada, facilidade relativa de síntese e à capacidade do ouro de estabelecer ligações fortes com bases como os tióis. Paralelamente, a utilização de recursos biológicos para a síntese de nanopartículas, como as plantas, representa uma abordagem inovadora e relativamente recente nesse campo (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Arvizoet al., 2012).

Desta forma, os estudos recentes mostraram que as GNPs sintetizadas via síntese verde, como extrato de açaí, sangue de dragão, aloe vera e curcumina, podem suprimir a inflamação, melhorar a angiogênese e promover a regeneração tecidual (Mendes et al., 2022). Isso se deve por conta das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, o que as tornam promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias e lesões teciduais. Os mecanismos pelos quais essas GNPs exercem seus efeitos anti-inflamatórios envolvem a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B e a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Além disso, as GNPs têm sido utilizadas para melhorar a formação de vasos sanguíneos, reduzir o estresse oxidativo e modular a atividade dos fibroblastos (Wang, Chang e Wu, 2018; Akhtaret al., 2020).

Outro estudo mostrou que as GNPs- Cur são capazes de inibir a inflamação em modelos experimentais de lesão oral em camundongos. Os resultados indicaram que as GNPs-

Cur são capazes de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como neutralizar ROS, o que pode contribuir para a redução do estresse oxidativo e da inflamação. Além disso, as GNPs-Cur também foram capazes de reduzir a dor relacionada à lesão oral em um modelo experimental de dor aguda. Esses resultados suportam o uso das GNPs-Cur como uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de lesões teciduais e inflamação na cavidade oral (Thirupathi et al., 2023).

O mecanismo por trás das GNPs-Cur como molécula anti-inflamatória, os autores descrevem através da sua capacidade de bloquear a ativação do NF- $\kappa$ B, por meio da interação com o componente Cys-179, bloqueando a fosforilação da I $\kappa$ B quinase impedindo a translocação do NF $\kappa$ B para o núcleo. A inibição da ativação do NF $\kappa$ B leva à regulação negativa da expressão de iNOS e COX-2, suprimindo a resposta inflamatória exacerbada. Além disso, as GNPs-Cur têm sido relatadas por interagir fisicamente com quimiocinas e citocinas, como por exemplo, a IL-1 $\beta$ , neutralizando assim a ligação de IL-1 $\beta$  ao seu receptor de membrana inibindo a cascata de sinalização pró-inflamatória (Zaccaronet al., 2022; Mendes et al., 2022; Casagrande et al., 2023; Khan et al., 2018).

Como antioxidantes as GNPs possuem alta tendência para aceitar elétrons e interagir com EROs para desativá-los ou eliminá-los, através do efeito *scavenger*. Além disso, as GNPs podem afetar as ligações tiol de Keap1, causando uma mudança conformacional que permite a liberação de NRF2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide) para posterior transcrição de genes citoprotetores, contribuindo assim para a homeostase celular (Mendes et al., 2022; Gao et al., 2019).

Além das GNPs, as nanocurcumina, derivado da *Curcuma longa*, também são reconhecidas por suas propriedades bioativas, visto que a curcumina é uma molécula pleiotrópica capaz de interagir com múltiplos alvos moleculares associados à inflamação. Regula a resposta inflamatória reduzindo a atividade das enzimas óxido nítrico sintase (iNOS), lipooxigenase (LOX), fosfolipases A2 (PLA2s) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Esta inibição dificulta a síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias, leucotrienos e mediadores essenciais da resposta inflamatória. Além disso, a curcumina é conhecida por modular várias cascatas de sinalização celular incluindo PI3K, Akt, ERK5, TGF- $\beta$ , STAT3, inflamassoma NLRP3, p38MAPK, Nrf2, AMPK que são responsáveis por regular várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular, apoptose, genes anti-inflamatórios e antioxidantes. (Karthikeyan, Senthil e Min, 2020).

Na Odontologia e Dermatologia, a curcumina é usada para acelerar o processo de cicatrização de feridas e tratar doenças inflamatórias da pele, como psoríase e dermatite, devido ao seu efeito regenerativo e anti-inflamatório.

As GNPs bioconjugadas por curcumina representa uma inovação terapêutica significativa, especialmente no campo da regeneração tecidual. Devido à sua biocompatibilidade e capacidade de carregar e entregar compostos bioativos de forma direcionada, aumentam a biodisponibilidade e eficácia da curcumina, que possui baixa solubilidade em água e rápida metabolização no corpo. Quando encapsulada em nanopartículas de ouro, a curcumina mantém sua estabilidade e é liberada de forma controlada, potencializando suas propriedades terapêuticas. Essa combinação tem mostrado resultados promissores na regeneração de tecidos danificados, como na cicatrização de feridas crônicas, devido ao efeito sinérgico das GNPs na promoção da angiogênese e da proliferação celular, e à capacidade da curcumina de modular o processo inflamatório e aumentar a produção de colágeno (Fernandes et al., 2021; Anand et al., 2007).

## 1.6 HEPATOTOXIDADE

O fígado, considerado o maior órgão com abundância de macrófagos no organismo, exerce função crucial como uma das principais barreiras biológicas, sendo capaz de reter entre 30% a 99% das nanopartículas administradas na corrente sanguínea (Zhang et al., 2016). Segundo pesquisa de Tsoi e colaboradores, observaram que a taxa de transporte e depuração dos nanomateriais no fígado é cerca de mil vezes mais lenta do que na circulação periférica. Isto se deve a uma interação significativamente maior — aproximadamente 7,5 vezes mais intensa — entre os nanomateriais e as células hepáticas, como as células de Kupffer, células B hepáticas e células endoteliais sinusoidais (MacParland et al., 2017; Tsoi et al., 2016; Zhang et al., 2016). Assim, compreender a interação entre nanopartículas e o fígado, bem como os mecanismos envolvidos na sua eliminação hepática, é fundamental para o desenvolvimento de aplicações clínicas desses materiais, usados tanto no diagnóstico, quanto no tratamento de doenças.

O fígado desempenha um papel essencial no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios provenientes da alimentação, além de ser responsável pela biotransformação de medicamentos e pela eliminação de substâncias tóxicas, tanto internas quanto externas ao organismo (Almazroo et al., 2017). Além disso, os nanomateriais, usados no diagnóstico e terapia de doenças, são geralmente classificados como medicamentos xenobióticos, que são

estranhos ao ser humano.

Li et al., 2020, demonstraram que os GNPs são capazes de se aglomerar principalmente no fígado por meio de interações com hepatócitos, células endoteliais sinusoidais do fígado e células de Kupffer.

Diante da importância das nanopartículas no campo biomédico e dos desafios relacionados à sua biocompatibilidade e eliminação hepática, métodos sustentáveis como a síntese verde de nanopartículas metálicas têm ganho destaque, oferecendo alternativas mais seguras e ecologicamente corretas para sua produção.

## 1.7 SÍNTESE VERDE

A síntese verde pode ser definida como um método de produção que minimiza os impactos ambientais negativos e tem como objetivo garantir a segurança do material produzido para fins biomédicos. A síntese verde utilizando fontes renováveis de energia e materiais, solventes atóxicos e processos de baixo impacto ambiental pode ser considerada uma abordagem promissora para a produção de nanopartículas metálicas seguras e eficientes (Rai et al., 2013; Taurozzi et al., 2011).

As plantas produzem compostos químicos naturais, e os fitoquímicos presentes em seus extratos desempenham um papel fundamental como agentes de redução e de estabilização no processo de síntese de nanopartículas. Partes das plantas, como folhas, flores, caules, raízes e frutos, têm sido amplamente empregadas na síntese de várias nanopartículas, incluindo as GNPs. Esses organismos utilizam metabólitos como flavonoides, terpenoides, saponinas, polifenóis e proteínas em diferentes processos fisiológicos. Essas moléculas permitem que as plantas tenham a capacidade de atuar como biorreatores poderosos e atuarem como fontes de substratos para a síntese verde. Supõe-se que as plantas produzam uma grande quantidade de metabólitos que, possivelmente de forma sinérgica, auxiliam na redução de íons metálicos e/ou na estabilização das nanopartículas metálicas formadas (Zanet al., 2022; Zuhrotun A. et al., 2023).

Além de ser mais seguro, a síntese verde produz nanopartículas com uma biocompatibilidade superior, tornando-as altamente desenvolvidas para uso em áreas como regeneração tecidual e medicina regenerativa. Enquanto a síntese química tradicional pode deixar resíduos tóxicos que comprometem a interação biológica das nanopartículas, a síntese verde utiliza compostos bioativos naturais, como flavonoides, terpenoides e polifenóis. Esses

compostos possuem propriedades terapêuticas adicionais, como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, que são essenciais para o reparo tecidual (Khanet al., 2020).

A capacidade modular de resposta inflamatória é particularmente importante no contexto de cicatrização de feridas, já que uma inflamação descontrolada pode retardar o processo de regeneração tecidual. Além disso, nanopartículas sintetizadas por meio de métodos verdes demonstram uma eficiência aumentada na promoção da terapia celular e da angiogênese, processos essenciais para a cicatrização rápida e eficiente de tecidos lesionados. Portanto, a síntese verde não só melhora a biocompatibilidade, mas também amplia a funcionalidade das nanopartículas, tornando-as ideais para aplicações terapêuticas que requerem uma regeneração tecidual eficaz, com o mínimo de toxicidade e alta eficiência (Sharma et al., 2023).

Thirupathi et al., (2023) trouxe os efeitos das GNPs-Cur, e mostrou que essas partículas são capazes de reduzir a expressão de genes pró-inflamatórios, além disso, as GNPs-Cur, demonstraram ser eficazes na redução do estresse oxidativo e na regulação da atividade de diversas vias de sinalização celular, incluindo a via NF- $\kappa$ B e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Esses resultados sugerem que as GNPs-Cur, são uma estratégia promissora para o tratamento de doenças inflamatórias e lesões teciduais orais.

As lesões palatinas representam um desafio clínico devido à dor, inflamação e risco de infecção, impactando a qualidade de vida dos pacientes. A nanotecnologia e a fotobiomodulação surgem como abordagens promissoras para acelerar o reparo tecidual, modulando processos inflamatórios e oxidativos. Neste contexto, as GNPs-Cur possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que, associadas à fotobiomodulação, potencializam a regeneração do tecido oral. Assim, este estudo busca avaliar os efeitos dessa combinação terapêutica, oferecendo uma alternativa inovadora e eficaz para o tratamento de feridas palatinas e contribuindo para avanços na Biomedicina e Odontologia.

## 2 OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento de nanocurcumina e nanopartícula de ouro biossintetizadas com curcumina associadas a fotobiomodulação no processo de reparo palatino de ratos Wistar.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a taxa de contração da ferida palatina dos ratos Wistar tratados;
- Avaliar a morfologia tecidual do palato e fígado, para quantificação do infiltrado inflamatório e área de colágeno dos ratos Wistar tratados;
- Avaliar a expressão gênica de M1, NFR2 e colágeno tipo III dos ratos Wistar tratados;
- Avaliar os níveis proteicos de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL4, TGF $\beta$ ) dos ratos Wistar tratados;
- Avaliar a produção de oxidantes e sistema de defesa antioxidante no pálato e no fígado dos ratos Wistar tratados.

### 3 METODOLOGIA

#### 2.1 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) e foi aceito sob número de protocolo nº 86/2023 (anexo A). Esta pesquisa também seguiu as Diretrizes ARRIVE 2.0 (PercieduSert et al., 2020).

#### 2.2 ANIMAIS

Foram utilizados 72 ratos Wistar com as seguintes características: 60 dias de vida, com peso entre 250-300 gr, 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 quatro 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 distribuídos randomicamente em seis grupos experimentais (n=12), sendo 4 animais para histologia e 8 animais para análises bioquímicas e moleculares:

- I. Ferida palatina (FP)
- II. FP + Nanocurcumina (1 mg/ml)
- III. FP + GNPs-Cur (1 mg/ml)
- IV. FP + FBM (830 nm – 1 J)
- V. FP + FBM + Nanocurcumina
- VI. FP + FBM + GNPs-Cur

### 2.3 MODELO DE LESÃO PALATINA

Os animais foram anestesiados e mantidos sob anestesia, utilizando cetamina 70 mg/kg e xilazina 15 mg/kg via intramuscular. Ao ser constatado o efeito do anestésico, cada rato foi estabilizado e a boca mantida aberta usando um retrator. A mucosa palatina próxima aos dentes molares foi removida usando um *Punch* dermatológico de aço inox de 4 mm de diâmetro (Figura 1), induzindo uma lesão circular.



Figura 1 - Punch dermatológico de aço inox (marca Rhosse®) com 4 mm de diâmetro.

A mucosa palatina envolvida na incisão circular (Figura 2.a) foi completamente excisionada e o periósteo se manteve exposto dentro do diâmetro de 4mm. Após controle do sangramento a área excisada foi deixada exposta.

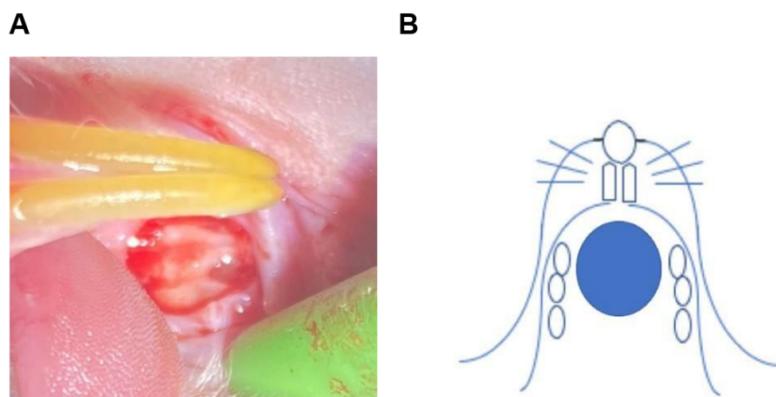


Figura 2 - (a) fotografia da mucosa palatina; (b) ilustração do modelo de ferida palatina no rato Wistar.

## 2.4 SÍNTESE VERDE DAS NANOPARTÍCULAS

A GNP<sub>s</sub>-Cur foi obtida pela redução de Curcumina. Uma solução foi preparada em etanol (3mg/mL). Soluções estoque de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub> 4 mM) foram preparadas em água Milli Q. Na sequência, uma solução pré-definida de extrato foi adicionado em água Milli Q e mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90 °C. O NaOH (0.1 M) foi usado para ajustar o pH entre 10 e 11. Na sequência, uma solução 1 mM de HAuCl<sub>4</sub> foi adicionada gota a gota sob agitação simultânea. A reação foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente e posterior formação das GNP<sub>s</sub>-Cur.

As nanopartículas de curcumina foram obtidas pelo método de inversão de fases (Adena et al., 2021). Na fase aquosa foram adicionados o surfactante tween 80 (1%) e 100 mL de água deionizada. Na fase oleosa foram adicionados a lecitina de Soja (1%) Crodamol GTCC (10%) e curcumina (1%). Ambas as fases foram previamente aquecidas a uma temperatura de 70°C. Logo após a temperatura atingir 70°C, a fase aquosa foi adicionada lentamente sob a fase oleosa utilizando uma agitação de 400rpm até o resfriamento.

A formação dos GNP<sub>s</sub> e Nano curcumina foram determinadas por Ultravioleta-Visível (UV-Vis), utilizando um espectrofotômetro da marca Shimadzu, UV 1800. A solução foi avaliada na região do visível (400nm – 700nm). O tamanho médio e a morfologia dos GNP<sub>s</sub> foram determinados por imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) utilizando um modelo JEM 2100F de 100kV. As GNP<sub>s</sub> e a nano curcumina foram diluídos em água destilada na proporção de 1:20 e adicionados em uma grade contendo carbono (grade de cobre – 300 mesh). Após o tempo de secagem das grades (24h), as imagens foram obtidas.

As soluções foram caracterizadas por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis), em um modelo SpectraMaxPlus. 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 (24h) e posteriormente as imagens foram obtidas. O tamanho hidrodinâmico e a carga superficial em pH 7,4 (25°C) foram investigados por meio 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.

## 2.5 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

No dia 0 foi realizado a indução da ferida palatina em todos os animais e captação das fotos. Após 24 horas iniciou os tratamentos conforme os grupos experimentais. O tratamento de FBM com laser foi realizado utilizando a caneta de 830nm na dose de 1 J com aplicação de 3 pontos, sendo 2 nas bordas e um no centro. A irradiação foi executada sobre a ferida, com a caneta do laser perpendicular ao palato a uma distância de 0,5 cm, conforme é descrito por Morrone et al. (1998) . O tratamento de nanocurcumina foi realizado em uma dose de 1mg/ml diluído 1:1 em gel. O tratamento com GNPs-Cur foi realizado em uma dose 2,5mg/L diluído 1:1 em gel. Os tratamentos associados foram realizados em um primeiro momento a aplicação do gel e posteriormente a aplicação do laser. O tratamento ocorreu por 5 dias consecutivos diariamente. Após 24 horas do último dia de tratamento foram captadas as fotos dos animais e posteriormente foram eutanasiados.

## 2.6 EUTANÁSIA

Após 24 horas do último tratamento, os 72 animais foram anestesiados com isoflurano 4% e levados a eutanásia por uso de um tubo Falcom com isofurano 4%. A seguir, foi realizada as tomadas fotográficas e a região cicatrizante foi removida, assim como parte do fígado para análise de toxicidade. As peças foram, então, armazenadas em frascos individuais para posteriores análises histológicas, bioquímicas e moleculares. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos próprios para descarte de material biológico e armazenados no 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.

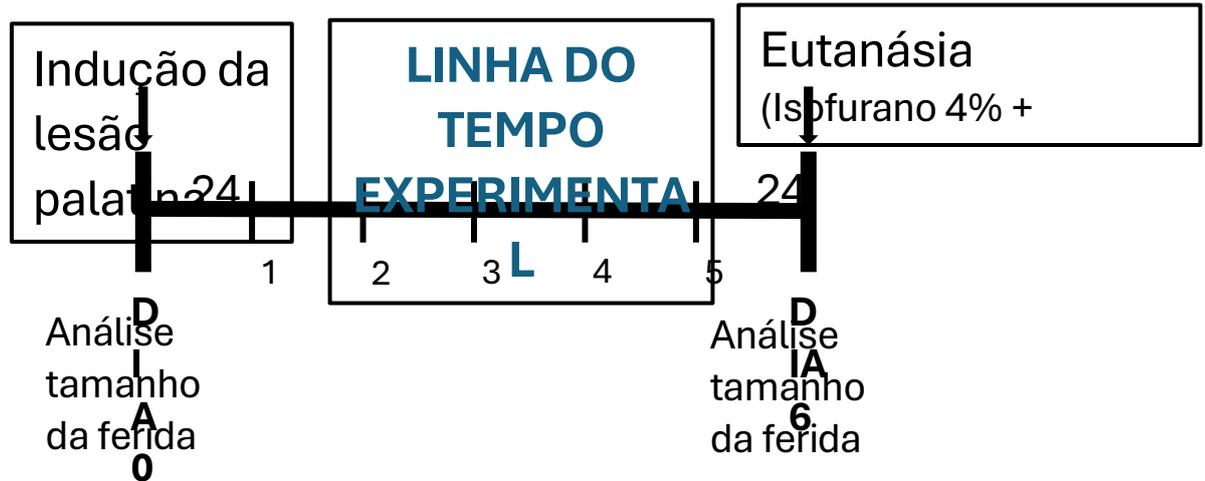


Figura 3- Linha do tempo experimental alterar lista de figuras e todas a figuras

## 2.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras teciduais do palato mole foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 horas. Posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Para avaliação de quantificação de infiltrado inflamatório foi utilizado a coloração de hematoxilina e eosina e, para avaliação e quantificação da colagênese, coloração com tricrômio de Gomori. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 400x, sendo 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). A contagem do infiltrado inflamatório foi realizada através da utilização do Plugin “CellCounter” do software considerando a coloração nuclear de células inflamatórias. Na análise de porcentagem da área de colágeno foi avaliado através da decomposição pelo software imageJ com o plugin "ColourDecovolution" para realizar a quantificação da porcentagem azul na área total da imagem.

## 2.8 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

Imagens digitais das feridas foram feitas na resolução: 3264 x 2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ ® 1.51. Este método fotográfico é uma alternativa precisa para medir a área da ferida, sendo uma técnica apropriada para feridas limpas, contaminadas ou não. As

imagens das lesões foram obtidas no dia da indução da ferida palatina (dia 0) e 24h após o último dia de tratamento anterior a eutanásia (dia 6), para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho (área em mm<sup>2</sup>) calculando a variação das áreas das feridas neste período em %. Essas mensurações foram feitas pelo mesmo pesquisador, sendo realizadas 3 mensurações de cada ferida e utilizado o valor médio.

## 2.9 RT-PCR

As análises de expressão gênica de marcadores de M1, NFR2 e colágeno tipo III 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 DEPC0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20 °C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria e absorvância a 260nm e 280nm. A relação entre as absorvâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280nm estavam 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 reação em cadeia da polimerase (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.

## 2.10 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CITOCINAS

A fim de determinar-se a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de palato mole, foi realizado o imunoensaio de imunoabsorbância enzimática - ELISA sanduiche 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, a fim de remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual se liga 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 microlitros 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 emite uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50  $\mu$  por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ ) e fatores de crescimento como (TGF- $\beta$ ) foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

## 2.11 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS

O teor de proteína a partir de tecido palato mole homogeneizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry et al., (1951). Após o reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (folin fenol) ser adicionado para ligar-se à proteína o reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul e a absorbância foi lida a 750nm.

## 2.12 OXIDANTES

### 2.12.1 DCFH-DA

Os níveis de 2,7-diclorofluoresceína oxidada (DCF) foram monitorados em amostras incubadas com 10 mM diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) a 37 °C por 30 minutos. A formação de derivados fluorescentes oxidados foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência. Uma curva padrão DCF foi medida usando 10 mM DCF como um controle interno no experimento, e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (Wang; Joseph, 1999).

### **2.12.2 Indicador da formação de oxido nítrico (NO)**

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabolito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida em 0,1 mol/L HCl e 0,1 % de dicloridrato de n-(1-naftil)-etilenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplacas. O conteúdo de nitritos foi calculado com base em uma curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio. Os resultados foram calculados em  $\mu\text{mol}$  nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

## **2.13 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS**

### **2.13.1 Grupos sulfidril**

O teor de tiol total foi determinado usando o método com DTNB (reagente de Ellman). Resumidamente, 30 mL de amostra foram misturados com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato/1 mM de EDTA (pH 7,5). A reação foi inicializada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de solução estoque de DTNB 10 mM em solução salina tamponada com fosfato. Amostras de controle, que não incluem DTNB ou proteína, foram executadas simultaneamente. Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorbância em 412 nm e calculada a quantidade de TNB (equivalente à quantidade de grupos sulfidril) (Aksenov; Markesbery, 2001).

### **2.13.2 Carbonilação de proteínas**

O dano oxidativo de proteínas foi determinado mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a 2,4-dinitrofenilhidrazina. As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. As amostras foram então redissolvidas em cloridrato de guanidina 6M e os conteúdos de carbonila foram determinados medindo a absorbância em 370 nm e usando um coeficiente de absorção molar de 22.000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Levine et al., 1990).

## 2.14 DEFESAS ANTIOXIDANTES

### 2.14.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da oxidação da adrenalina. As amostras de tibia foram homogeneizadas em tampão de glicina. Volumes de 5, 10 e 15  $\mu$ l de amostra foram separados após homogeneização e 5 ml de catalase (0,0024 mg/ml em água destilada), 175-185 ml de tampão glicina (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32 °C, pH 10,2), e 5  $\mu$ l de adrenalina (60 mM em água destilada mais 15 ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados, incubados por 180 segundos em intervalos de 10 segundos e medidos em um leitor SpectraMax i3xELISA a 480 nm. Os valores foram expressos como unidade SOD/mg de proteína (U/mg de proteína) (Bannister; Calabrese, 1987).

### 2.14.2 Glutathione (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin&Hilf, com algumas adaptações. GSH foi mensurada nas amostras de tecido após precipitação de proteína com ácido tricloroacético a 10%. Em parte da amostra foi adicionado 800 mM de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 500 mM de o-ftaldialdeído. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o-ftaldialdeído e tióis atingiu o máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras. Os resultados são expressos como U fluorescência/mg de proteína (Hissin; Hilf, 1976).

## 2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 foi de  $P < 0,05$ . Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A Figura 4 e 5 representam a morfologia e distribuição de tamanho das partículas que foram analisadas via Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). A nanocurcumina (Figura 4) apresentou tamanho de partícula de aproximadamente 20nm e morfologia quase esférica. As GNPs-Cur apresentaram tamanho de partícula de aproximadamente 20nm e morfologia esférica. A análise UV-Vis mostrou picos máximos de absorção característicos de nanocurcumina (419nm) (Figura 5) e GNPs (524nm) (Figura 6).

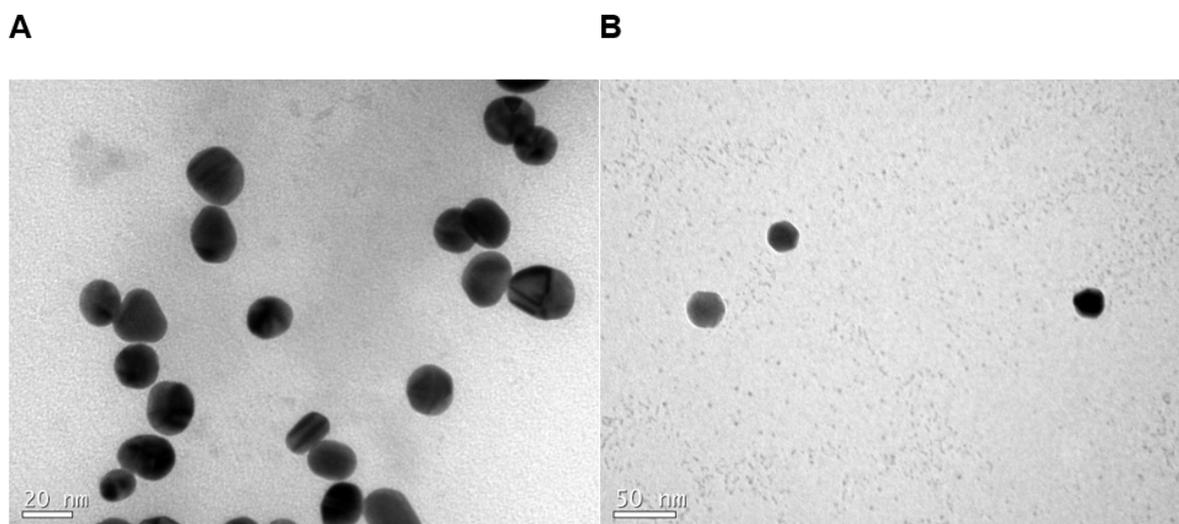


Figura 4 - Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) das partículas Nanocurcumina (A) e GNPs-Cur (B).

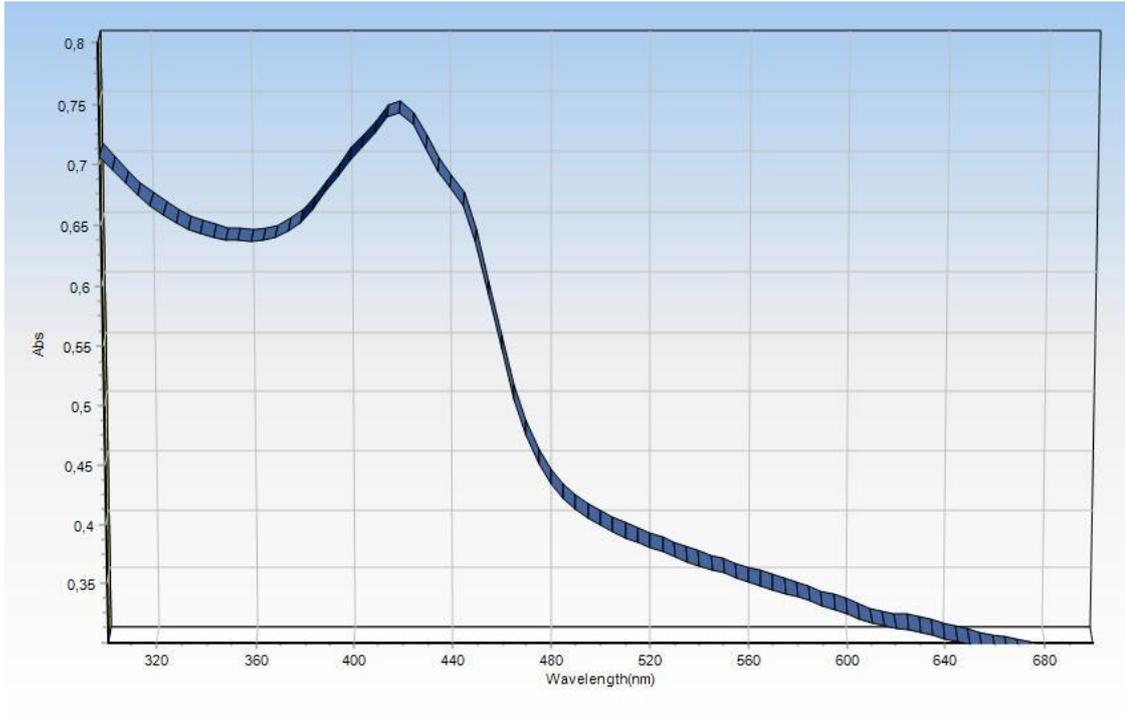


Figura 5 - Análise do software de UV-Vis de pico máximo de absorção de Nanocurcumina.

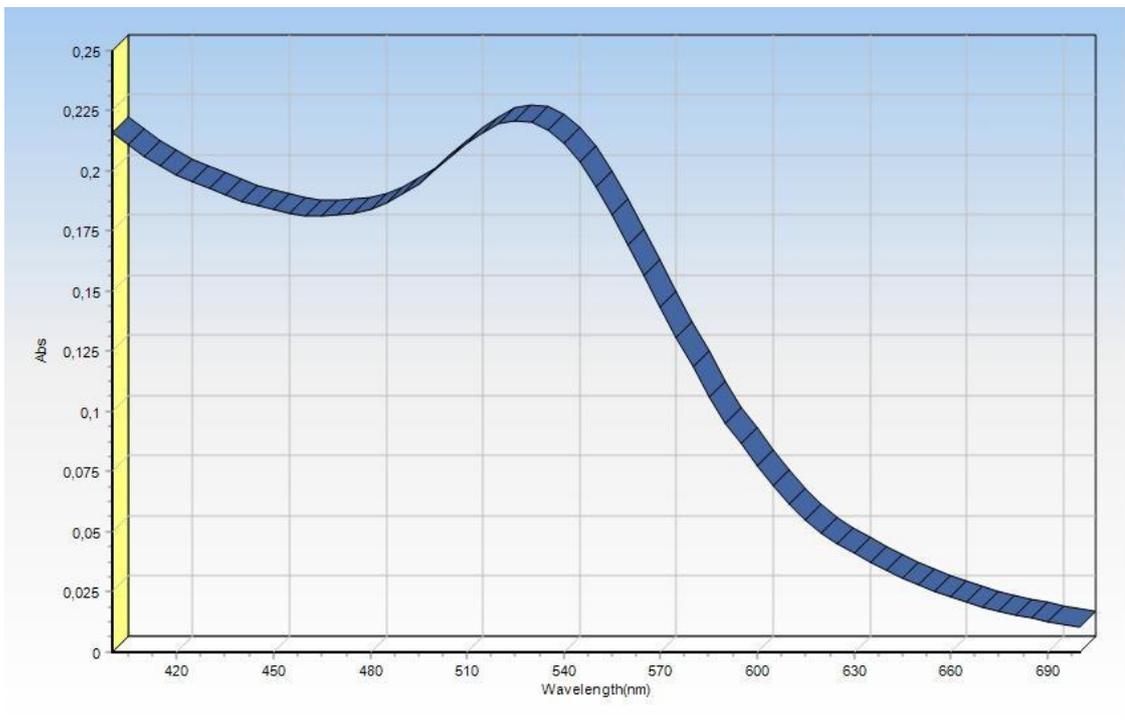


Figura 6 - Análise do software de UV-Vis de pico máximo de absorção de GNPs-Cur.

## 4.2 CONTRAÇÃO DA FERIDA

Em relação à área de contração da ferida em  $\text{cm}^2$  representada na Figura 7 pode-se observar que os grupos tratados apresentaram aumento significativo na área de contração da ferida quando comparados aos grupos FP, sendo os grupos FP+Nanocurcumina, FP+GNPs-Cur, FP+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM com um valor de  $p < 0,05$ , enquanto o grupo FP+Nanocurcumina+FBM apresentou um valor de  $p < 0,01$ .

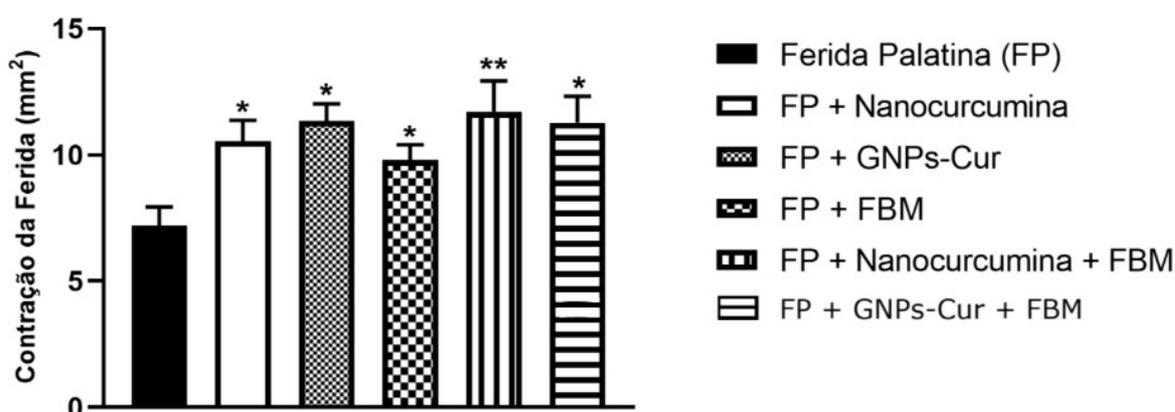


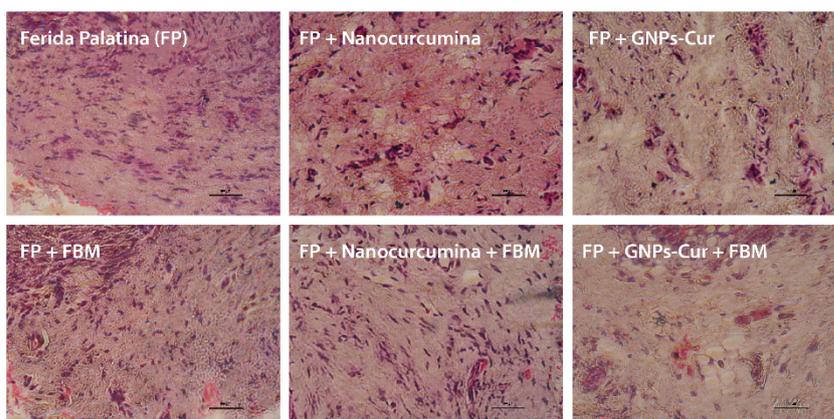
Figura 7 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM no 6º dias após indução de Ferida Palatina sobre os parâmetros de contração de ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*  $p < 0,05$  v.s grupo Ferida Palatina e \*\*  $p < 0,01$  v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

## 4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DE PALATO E FÍGADO

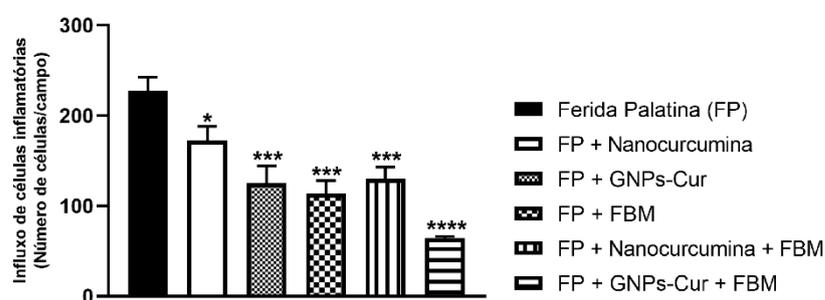
Em relação as análises histológicas de palato, representada na Figura 8, tem-se as imagens representativas de cada grupo experimental referente ao infiltrado inflamatório (Figura 8A) e área de colágeno (Figura 8B), bem como as quantificações do influxo de células inflamatórias (Figura 8C) e a porcentagem da área de colágeno (Figura 8D).

É possível observar no influxo de células inflamatórias uma diminuição significativa nos grupos tratados quando comparados ao grupo FP, sendo o grupo FP+Nanocurcumina com valor de  $p < 0,05$ , os grupos FP+GNPs-Cur, FP+FBM e FP+Nanocurcumina+FBM com valor de  $p < 0,001$  e o grupo FP+GNPs-Cur+FBM uma diminuição com valor de  $p < 0,0001$ . Em relação a porcentagem de colágeno não foi possível identificar diferenças entre os grupos experimentais.

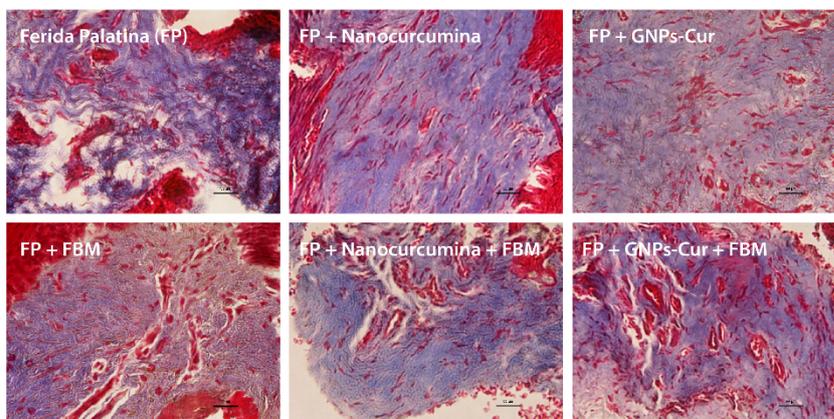
A)



B)



C)



D)

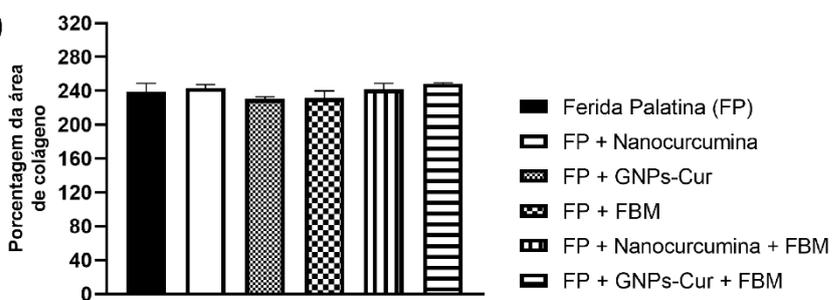
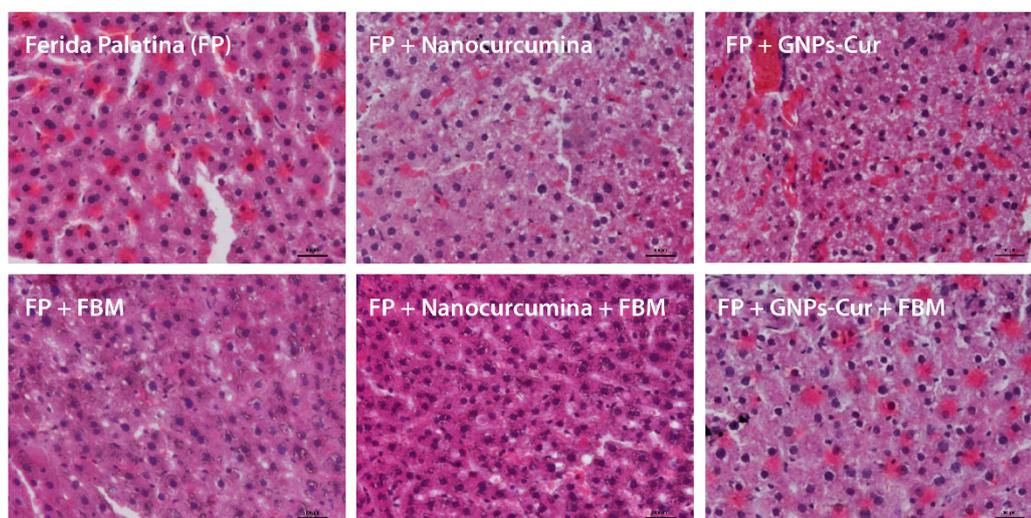


Figura 8 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre a análise histológica de tecido de palato mole no influxo de células inflamatórias através da coloração de HE (A – B) e porcentagem da área de colágeno através da coloração de Tricômio de Gomori (C –

D). Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*  $p < 0,05$  v.s grupo Ferida Palatina, \*\*\*  $p < 0,001$  v.s grupo Ferida Palatina e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

Em relação a análise histológica do fígado, representadas na Figura 9, tem-se as imagens representativas de cada grupo experimental referente ao infiltrado inflamatório (Figura 9A), bem como as quantificações do influxo de células inflamatórias (Figura 9B). Não foi possível identificar diferenças entre os grupos experimentais.

A)



B)

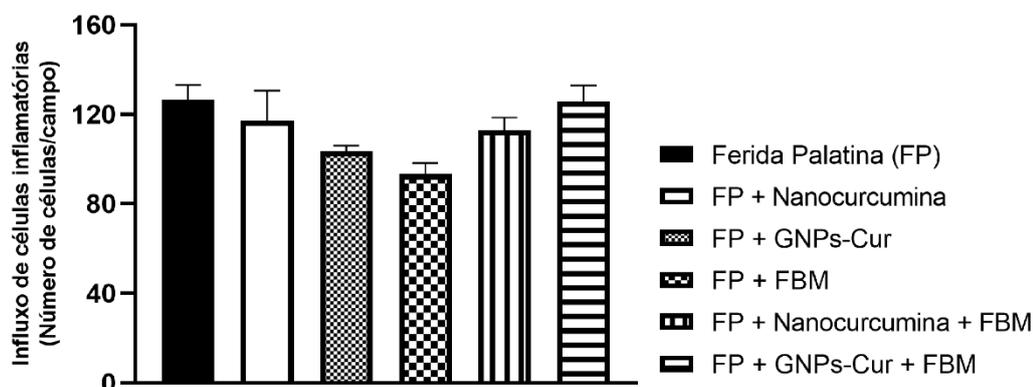


Figura 9 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre a análise histológica de fígado no influxo de células inflamatórias através da coloração de HE (A – B). Os dados são apresentados em média +EPM. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR DE PALATO

Na Figura 10 é possível observar a expressão gênica de CD11 (Figura 10A), NRF2 (Figura 10B) e de COL III (Figura 10C). Em A, é possível observar que o grupo FP+GNPs-

Cur+FBM apresentou uma redução significativa da expressão de CD11 quando comparados ao grupo FP, com um valor de  $p < 0,05$ . Em B, é possível observar que o grupo FP+GNPs-Cur+FBM apresentou um aumento significativo da expressão de NRF2 quando comparados ao grupo FP, com um valor de  $p < 0,05$ . Já em C, é possível observar que todos os grupos experimentais tratados apresentaram um aumento na expressão de COL III quando comparados ao grupo FP, sendo os grupos FP+Nanocurcumina e FP+GNPs-Cur um valor de  $p < 0,05$  e os grupos FP+FBM, FP+Nanocurcumina+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM um valor de  $P < 0,01$ .

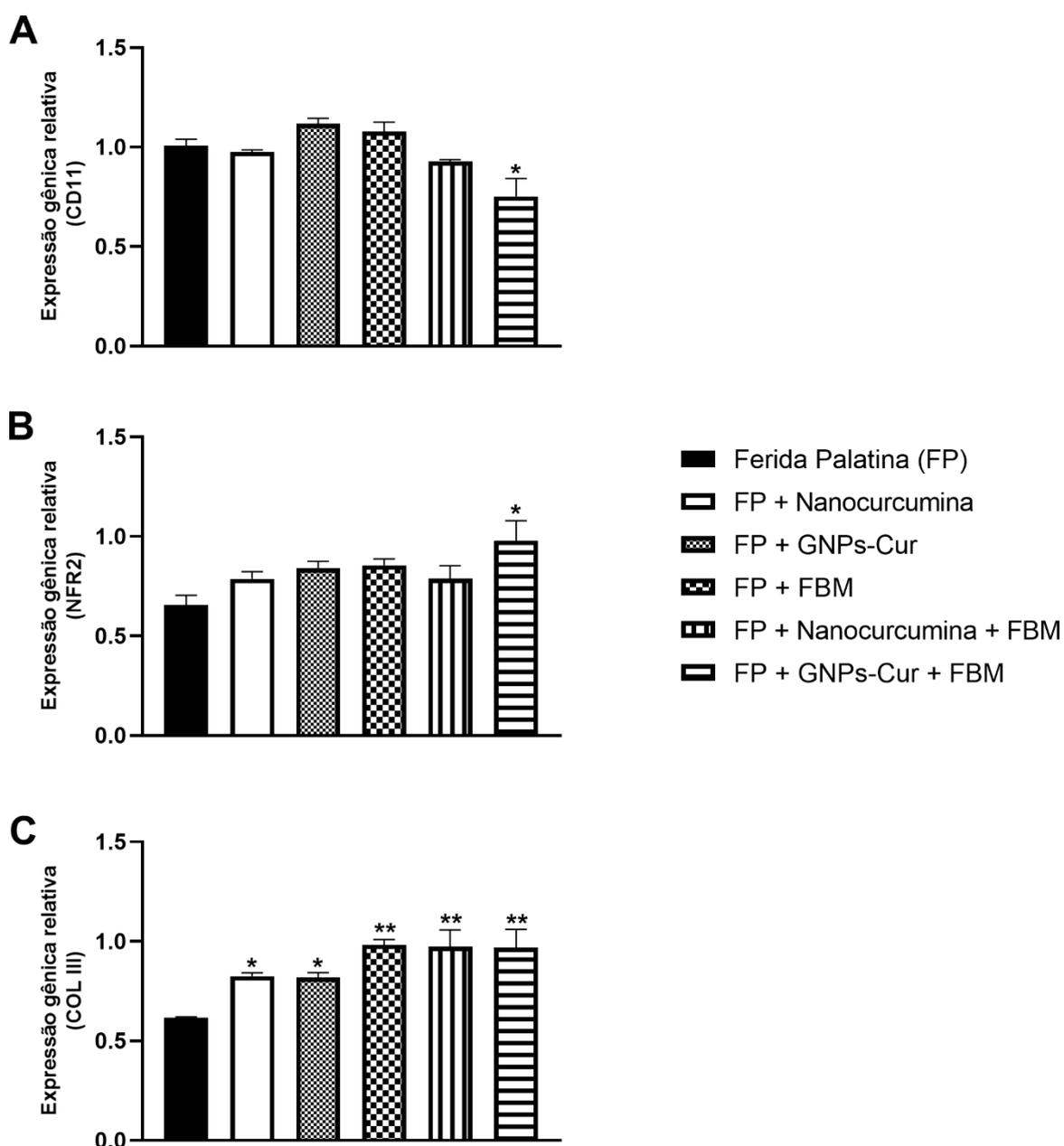


Figura 10 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre a expressão gênica de CD11 (A), NRF2 (B) e COL III (C) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*  $p < 0,05$  v.s grupo Ferida Palatina, \*\*  $p < 0,01$  v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.5 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE PALATO

Na Figura 11 estão representados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (Figura 11A) e IL-1 $\beta$  (Figura 11B).

Em A, não foi possível identificar diferenças entre os grupos experimentais nos níveis proteicos de TNF- $\alpha$ . Em B, é possível observar que todos os grupos experimentais tratados apresentaram diminuição nos níveis proteicos de IL-1 $\beta$  quando comparados ao grupo FP, sendo os grupos experimentais FP+GNPs-Cur e FP+Nanocurcumina+FBM um valor de  $p < 0,05$ , e o grupos experimentais FP+Nanocurcumina, FP+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM com valor de  $p < 0,01$ .

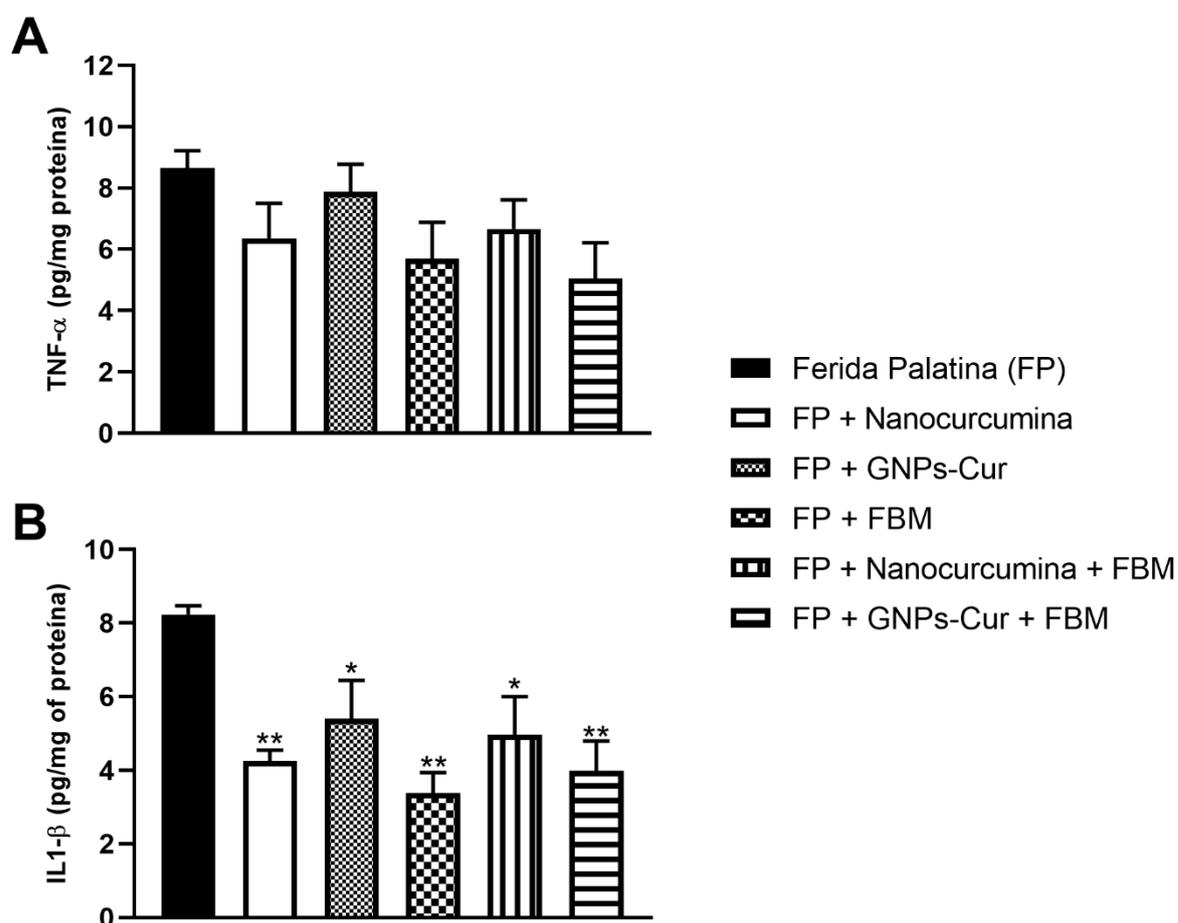


Figura 11 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*  $p < 0,05$  v.s grupo Ferida Palatina, \*\*  $p < 0,01$  v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.6 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS DE PALATO

Na Figura 12 estão representados os níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias IL10 (Figura 12A), IL4 (Figura 12B) e fator de crescimento TGF- $\beta$  (Figura 12C). Em A, o grupo experimental FP+Nanocurcumina apresentou um aumento nos níveis proteicos de IL10 quando comparados ao grupo FP, com um valor de  $p < 0,05$ , e os grupos FP+GNPs-Cur, FP+Nanocurcumina+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM apresentaram um aumento significativamente maior quando comparados ao grupo FB, com valor de  $p < 0,01$ . Em B, o grupo experimental FP+GNPs-Cur apresentou um aumento dos níveis proteicos de IL4, com um valor de  $p < 0,05$ , e o grupo FP+GNPs-Cur+FBM apresentou um aumento significativamente maior quando comparados com o grupo FP, com um valor de  $p < 0,01$ . Em C, os grupos experimentais FP+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM apresentaram um aumento nos níveis de fator de crescimento TGF- $\beta$  quando comparados ao grupo FP, com um valor de  $p < 0,05$ .

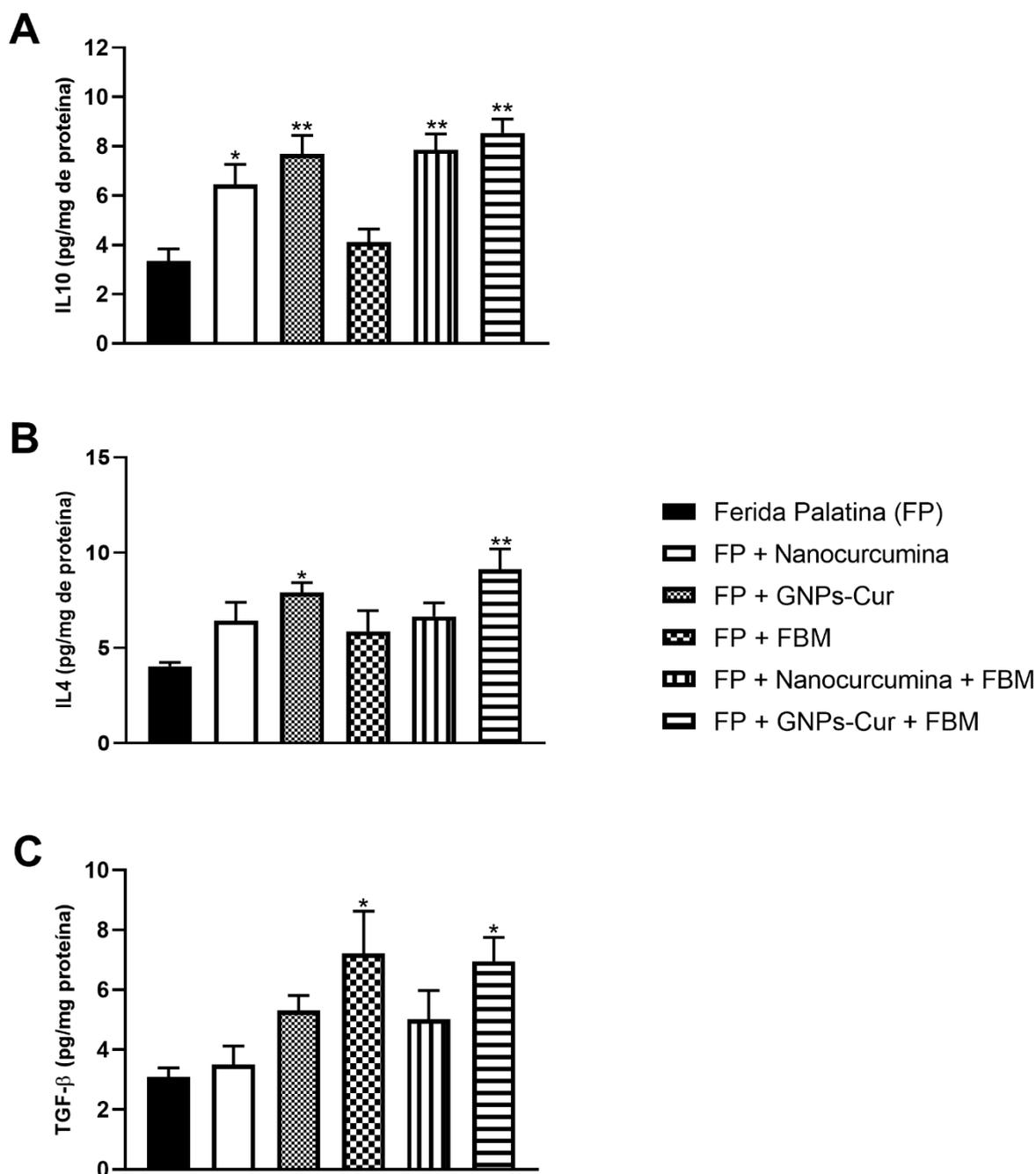


Figura 12 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre os níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias IL10 (A), IL4 (B) e fator de crescimento TGF- $\beta$  (C) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*  $p < 0,05$  v.s grupo Ferida Palatina, \*\*  $p < 0,01$  v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.7 MARCADORES DE OXIDANTES E ANTIOXIDANTES DE PALATO

Na Figura 13 estão representados os gráficos da avaliação em palato de marcador oxidativo com os níveis de Nitrito (Figura 13A) e de níveis de enzima antioxidante SOD (Figura 13B).

Em A, é possível observar que os grupos experimentais FP+FBM, FP+Nanocurcumina+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM apresentaram uma redução nos níveis de Nitrito quando comparados ao grupo FP, com um valor de  $p < 0,05$ . Em B, é possível observar que os grupos experimentais FP+GNPs-Cur, FP+FBM e FP+GNPs-Cur+FBM apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo FP, sendo o FP+GNPs-Cur com valor de  $p < 0,05$ , FP+FBM com valor de  $p < 0,01$  e FP+GNPs-Cur+FBM com valor de  $p < 0,001$ .

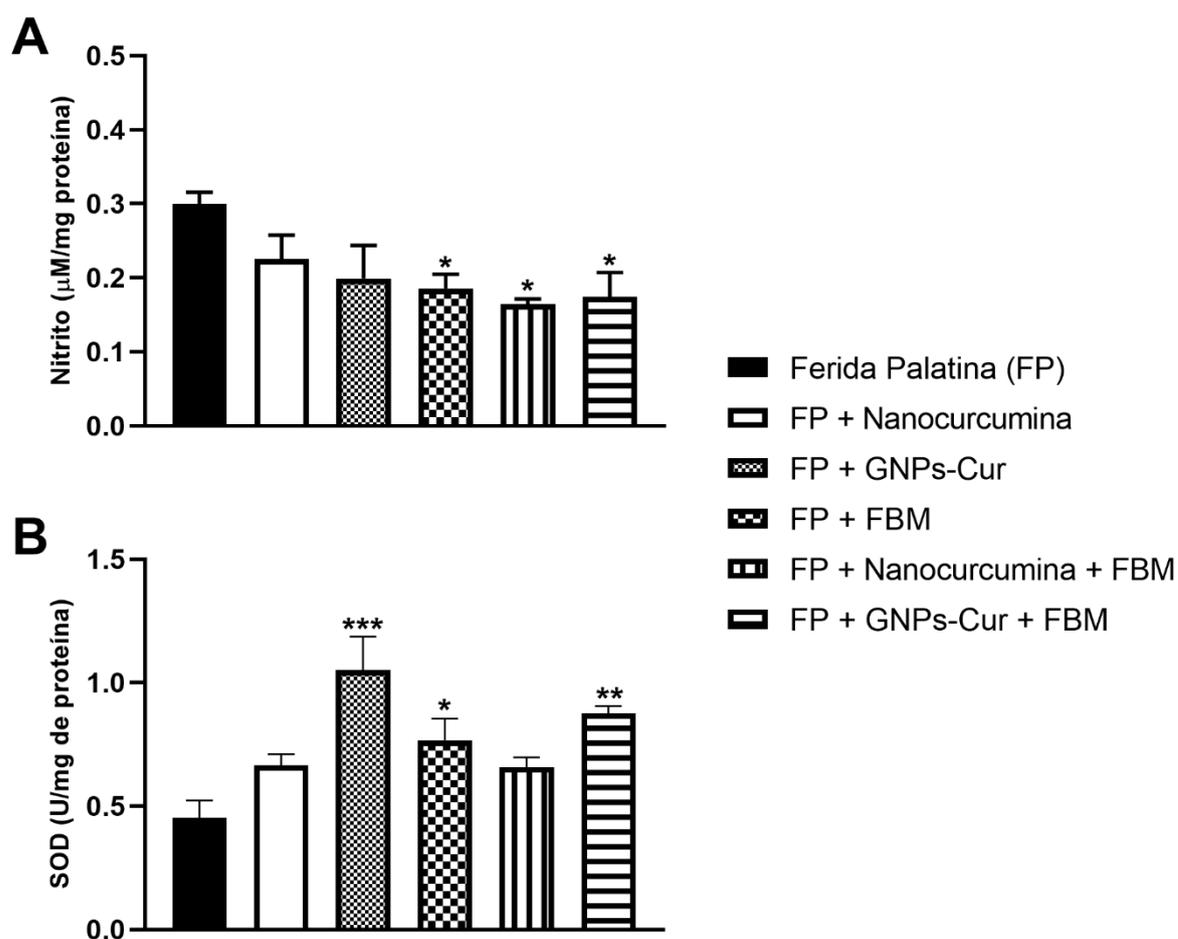


Figura 13 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre o marcador oxidante Nitrito (A) e o marcador antioxidante SOD (B) no tecido de palato mole. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*  $p < 0,05$  v.s grupo Ferida Palatina, \*\*  $p < 0,01$  v.s grupo Ferida Palatina. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.8 MARCADORES DE OXIDANTES, DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES DE FÍGADO

A Figura 14 apresenta os marcadores de oxidantes, dano oxidativo e os níveis de enzimas antioxidantes de fígado. Nas análises de oxidantes DCF (Figura 14A) e Nitrito (Figura

14B) não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos experimentais. Nas análises de dano oxidativo Carbonil (Figura 14C) e Conteúdo de Sulfidrilas (Figura 14D) não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos experimentais. Também, nas análises de dano antioxidantes SOD (Figura 14E) e GSH (Figura 14F) não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos experimentais.

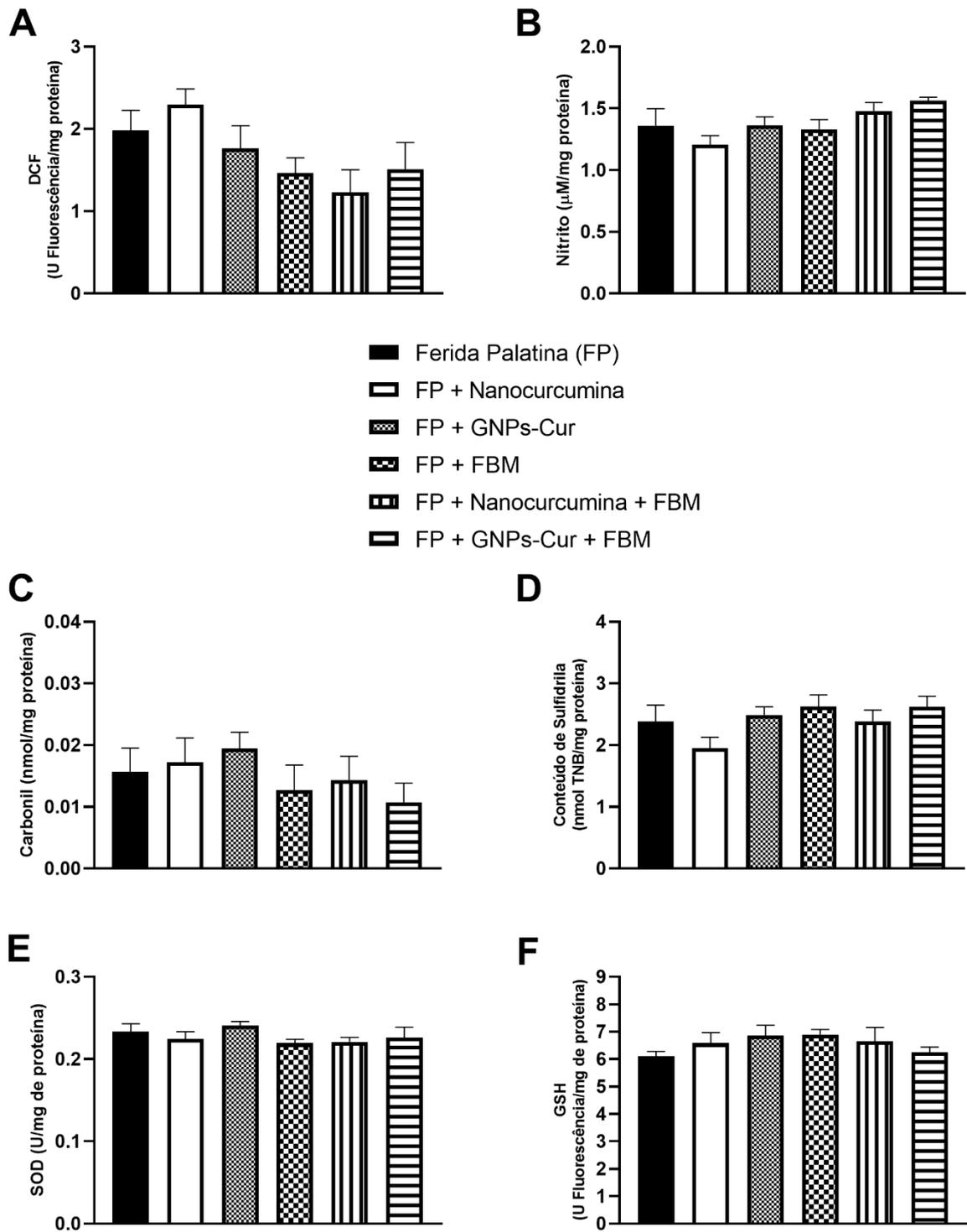


Figura 14 - Efeitos do tratamento com Nanocurcumina, GNPs-Cur, FBM, Nanocurcumina+FBM e GNPs-Cur+FBM sobre os marcadores de estresse oxidativo, oxidantes Nitrito (A) e DCF (B), marcadores de dano oxidativo Carbonil (C) e Conteúdo de Sulfidril (D) e marcadores de defesa antioxidante SOD (E) e GSH (F) no tecido fígado. Os dados são apresentados em média +EPM. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizada uma análise do processo inflamatório presente nas feridas palatinas, utilizando como parâmetro a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias. Em áreas lesionadas, observa-se que as células epiteliais passam a expressar citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). A liberação dessas substâncias promove a ativação de células do sistema imunológico, que migram para o local da inflamação, intensificando ainda mais a produção de citocinas. As respostas inflamatórias iniciais após a lesão tecidual são, em grande parte, mediadas pela IL-1, relacionada à imunidade inata, e pelo TNF- $\alpha$ , que desempenha um papel crucial em praticamente todas as fases da inflamação, provocando vasodilatação, rubor, edema e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (Tetyczka et al., 2021; Sugawara et al., 2002).

O aumento da contração de ferida corrobora com os achados histológicos, além de justificá-los, uma vez que os grupos tratados de forma isolada e combinada demonstraram uma diminuição do infiltrado inflamatório da mucosa oral em relação ao grupo controle. A infiltração leucocitária reduzida por meio das nanopartículas e FBM demonstra o controle do processo inflamatório inicial, sendo capazes de promover a redução significativa da interação dos leucócitos com o endotélio pela redução de moléculas de adesão e, conseqüentemente, diminuição do infiltrado dessas células no espaço intersticial. Em adição, a diminuição de infiltrado inflamatório é responsável pela redução da fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  e inibe a expressão ou atividade de NF $\kappa$ B. Com isso, os leucócitos polimorfonucleares circulantes nos tecidos são reduzidos, a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais é reduzida, suprimindo assim a adesão firme dos neutrófilos à superfície endotelial. Isto promove uma diminuição na resposta inflamatória exacerbada e contribui para um processo de reparo de forma eficiente (Ali et al., 2021).

É evidente que o processo de cicatrização de feridas envolve várias fases regionais, sendo uma das mais críticas a modulação da resposta inflamatória. Os macrófagos, células imunológicas essenciais nesse processo, desempenham um papel central, e sua transição do fenótipo M1, pró-inflamatório, para o fenótipo M2, anti-inflamatório e regenerativo. Dito isso, no presente estudo o grupo LP + GNPs-Cur + FBM apresentou redução na expressão de macrófagos M1 através do marcador de expressão gênica CD11, caracterizando a troca fenotípica para M2 neste grupo experimental.

Esta polarização para macrófagos M2 promove a resolução da inflamação, estimula a produção de colágeno e melhora a regeneração tecidual (Murray&Wynn, 2011). Um dos

mecanismos envolvidos nessa modulação é a via de sinalização NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel central na resposta inflamatória inicial, regulando a expressão de genes pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . No entanto, a supressão controlada da ativação de NF- $\kappa$ B, induzida pelas nanopartículas de ouro e pela FBM, facilita a transição de macrófagos para o fenótipo M2. Isso ocorre porque a inibição de NF- $\kappa$ B reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , promovendo um ambiente mais favorável à cicatrização e à reparação tecidual (Mussbacher et al 2023).

Os marcadores da presença fenotípica de macrófagos M1 se dão em conjunto à produção de citocinas pró-inflamatórias como as IL-1 $\beta$ . Sendo uma das principais citocinas liberadas durante a fase inflamatória inicial da cicatrização, por desempenhar papel crucial na ativação e recrutamento de células imunológicas para o local da lesão, ela atua através da via de sinalização do inflamassoma NLRP3, que, ao ser ativado, promove a maturação e secreção de IL-1 $\beta$ . Esta citocina, ao se ligar aos seus receptores IL-1R, desencadeia uma cascata de sinalização que ativa a via NF- $\kappa$ B, responsável pela expressão de diversos genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Sua ativação é frequentemente associada a respostas inflamatórias crônicas e exageradas, que podem comprometer o processo de cicatrização ao prolongar a inflamação e causar danos teciduais adicionais (Liu et al 2017).

Desta forma o presente estudo trouxe aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  no grupo FP e o controle dos níveis de IL-1 $\beta$  nos grupos tratados com GNPs-Cur e FBM, sugerindo que essas terapias são eficazes em modular a ativação do inflamossoma e reduzir a produção excessiva de IL-1 $\beta$ , facilitando a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 e promovendo um ambiente mais favorável à cicatrização, além de corroborar com a literatura.

Isto posto, a literatura destaca as GNPs-Cur como molécula anti-inflamatória. Os autores descrevem os mecanismos de ação através da sua capacidade de bloquear a ativação do NF- $\kappa$ B, por meio da interação com o aminoácido Cys-179, bloqueando a fosforilação da I $\kappa$ B quinase impedindo a translocação do NF $\kappa$ B para o núcleo (Mendes et al., 2022; Casagrande et al., 2023). A inibição da ativação do NF $\kappa$ B leva à regulação negativa da expressão de iNOS e COX-2, suprimindo a resposta inflamatória exacerbada (Khan et al., 2018). Além disso, as GNPs têm sido relatadas por interagir fisicamente com quimiocinas e citocinas, como por exemplo, a IL-1 $\beta$ , neutralizando assim a ligação de IL-1 $\beta$  ao seu receptor de membrana inibindo a cascata de sinalização pró-inflamatória, efeito esse já demonstrado em trabalhos anteriores do grupo (Hauptenthal et al., 2020; Zaccaroni et al., 2022).

Em adição, estudos indicam que a FBM atua ao estimular a função mitocondrial e

aumentar a produção de ATP, o que promove um ambiente antioxidante e reduz a ativação do inflamossoma NLRP3, levando a uma menor liberação de IL-1 $\beta$ , segundo Hamblin (2017). Esses efeitos combinados não apenas reduzem a inflamação local, mas também facilitam a transição para um estado anti-inflamatório e de reparo, favorecendo a polarização para macrófagos M2 e acelerando o processo de cicatrização.

Concomitante à diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, observou-se aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e no fator de crescimento TGF- $\beta$  nos grupos tratados com GNPs-Cur e FBM. Essas observações estão alinhadas com o papel crucial das GNPs-Cur na modulação inflamatória e na indução da polarização de macrófagos para o fenótipo M2. A inibição do NF- $\kappa$ B pode ter sido um regulador central desta resposta inflamatória. Como já descrito, sua ativação é frequentemente associada a respostas inflamatórias crônicas e exageradas, que podem comprometer o processo de cicatrização ao prolongar a inflamação e causar danos teciduais adicionais. Desta forma, a inibição de NF- $\kappa$ B é, portanto, uma estratégia terapêutica valiosa para mitigar a inflamação excessiva, facilitando a transição para a fase de reparo e regeneração tecidual. Estudos demonstram que a modulação dessa via inflamatória é crucial para promover um ambiente bioquímico que suporte a regeneração celular (Liu, D., Zhong, Z., & Karin, M. 2022).

Pesquisas já propuseram que as GNPs têm a capacidade de inibir a via de sinalização NF- $\kappa$ B, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias enquanto aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento, como IL-10 e TGF- $\beta$ . Essa modulação é essencial para criar um ambiente regenerativo, como evidenciado pelos níveis elevados dessas citocinas em nossos resultados. O aumento de IL-10 e IL-4 no grupo FP + GNPs-Cur + FBM confirma a eficácia das GNPs-Cur em promover uma rápida resolução inflamatória. Essas citocinas anti-inflamatórias desempenham um papel central na supressão da inflamação, facilitando a transição para a fase de reparo. Este ambiente anti-inflamatório, gerado pela polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, é crucial para evitar complicações inflamatórias crônicas e para acelerar a regeneração tecidual (Pérez, S., & Rius-Pérez, S. 2022).

A FBM complementa os efeitos das GNPs-Cur ao estimular diretamente a atividade celular, promovendo a transição fenotípica dos macrófagos e aumentando a produção de ATP. Zaccaronet al., (2024) enfatizam que a FBM, através da estimulação das mitocôndrias, fornece energia necessária para os processos celulares, incluindo a modulação inflamatória. Esse efeito sinérgico é evidente no aumento de IL-4 e TGF- $\beta$ , que são fundamentais para a formação de uma matriz extracelular organizada e funcional.

Adicionalmente, estudos demonstram que as nanopartículas são capazes de reduzir os

níveis de citocinas pró-inflamatórias a partir da inibição de respostas inflamatórias por meio da troca de fenótipos de macrófagos, mudando-as do fenótipo M1 para o M2, por meio de vias de sinalização, como STAT1/STAT6 e PPAR $\gamma$ . As nanopartículas foram capazes de atenuar a fosforilação de STAT1 e promover a fosforilação de STAT6, indicando que as nanopartículas são capazes de induzir uma mudança de fenótipo M1 para M2 mais rapidamente e consequentemente capaz de liberar mediadores benéficos através do fenótipo de M2, incluindo IL-10, IL-4 (Miao et al., 2017).

O aumento de TGF- $\beta$  no grupo FP + GNPs-Cur + FBM, reforça a capacidade dessas terapias em promover a deposição de colágeno e a remodelação da matriz. TGF- $\beta$  é essencial para a síntese de colágeno, uma das principais proteínas estruturais do corpo, essencial para a integridade e força da MEC, especialmente durante a cicatrização de feridas. A síntese de colágeno é fundamental para a cicatrização de feridas, proporcionando suporte estrutural ao tecido em regeneração. Inicialmente, fibroblastos produzem colágeno tipo III, formando uma matriz provisória que posteriormente é substituída por colágeno tipo I, mais resistente (Kularet al., 2014).

O TGF- $\beta$  é um regulador chave desse processo, ativando a via Smad para estimular a expressão dos genes COL1A1 e COL3A1, responsáveis pela produção de colágeno (Jerome et al., 2023; Sonsoles et al., 2024). Além da via TGF- $\beta$ /Smad, outras vias de sinalização são críticas na regulação do colágeno, como a via PI3K/AKT, que promove a sobrevivência e proliferação de fibroblastos, e a via MAPK/ERK, que responde ao estresse mecânico e fatores de crescimento, aumentando a produção de colágeno (Gurtner et al., 2008). No presente estudo os grupos que receberam intervenções isoladas e combinadas apresentaram aumento na expressão genica de COL III. Durante a fase de remodelação, a substituição do colágeno tipo III pelo tipo I melhora a estabilidade e organização da matriz extracelular, promovendo uma cicatrização eficiente e de alta qualidade. Este aumento está alinhado com os achados histológicos anteriores, onde uma matriz mais estruturada foi observada nos grupos tratados, contribuindo para uma cicatrização eficiente e de qualidade.

A transição do colágeno tipo III para o colágeno tipo I é um processo crucial durante a fase de remodelação tecidual na cicatrização. Inicialmente, o colágeno tipo III forma uma matriz provisória mais flexível, que é gradualmente substituída pelo colágeno tipo I, mais resistente e estruturado. Como descrito, esse processo é regulado por TGF- $\beta$  que ativa a via de sinalização Smad, promovendo a síntese de colágeno tipo I e reduzindo a expressão do colágeno tipo III (Jerome et al., 2023). As metaloproteinases de matriz (MMPs), como a MMP-1, desempenham um papel essencial ao degradar o colágeno tipo III, facilitando sua substituição

pelo tipo I (Gurtner et al., 2008). Além disso, a tensão mecânica no tecido estimula fibroblastos e miofibroblastos a sintetizarem colágeno tipo I, contribuindo para uma matriz extracelular mais organizada e resistente (Kularet al., 2014).

Em conjunto, pesquisas anteriores destacam a utilização da curcumina para melhorar a cicatrização de feridas cutâneas por meio do envolvimento na remodelação do tecido, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (Akbiket al., 2014). No estudo de Panchatcharam et al., (2006) foi possível observar que a curcumina aumentou a proliferação celular e a síntese de colágeno no local da ferida, conforme evidenciado pelo aumento do DNA, proteína total e conteúdo de colágeno tipo III dos tecidos da ferida. Descobriu-se que as feridas tratadas com curcumina cicatrizaram muito mais rápido, conforme indicado pelas taxas melhoradas de epitelização, contração da ferida e aumento da resistência à tração, que também foram confirmadas por exames histopatológicos. Isso acontece devido ao aumento do colágeno tipo III que é derivado de fibroblastos locais, esses são ativados pelo processo de cicatrização da ferida. O aparecimento precoce do colágeno tipo III está associado a um aumento precoce da síntese de colágeno podendo funcionar fornecendo estrutura à ferida e suporte para promover uma contração mais eficiente.

Por outro lado, a resposta inflamatória também está envolvida na produção de EROs, sendo evidente que o comportamento das células residentes no tecido epitelial, bem como na matriz extracelular é influenciado na presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (Cerqueniet al., 2021). Diante disso o presente estudo também avaliou se as intervenções as Nanocurcuminas, GNPs-Cur e FBM combinados ou isolados são capazes de controlar a produção desses oxidantes. No entanto, a diferenciação celular no processo de reparo é dependente da respiração mitocondrial para produção de ATP e assegurar fornecimento de energia adequado, e esse processo é acompanhado pela formação controlada de ERO/ERN (Zhuet al., 2022).

O resultado de marcador oxidante no palato mostra uma significativa redução dos níveis de nitrito nos grupos tratados com FP + FBM, FP + Nanocurcumina + FBM e FP + GNPs-Cur + FBM. Os macrófagos M1 são responsáveis pela produção de nitrito, fato que corrobora com a não mudança fenotípica para M2 no grupo experimental FP, sem tratamento. Por outro lado, os tratamentos atenuaram a expressão de iNOS mediante redução dos níveis de nitrito, especialmente no grupo combinado. Cenário que permite certificar o controle da atividade catabólica gerada pela presença de ERN, como danos teciduais adicionais, e promover um ambiente mais propício para a regeneração (Sui, Y., Tian, R., & Lu, N. 2019).

As GNPs desempenham um papel crucial nesse contexto, interagindo diretamente com

ERN para neutralizá-los e prevenir o acúmulo de nitrito, que poderia levar a danos celulares e teciduais (Taibet al., 2019). O mecanismo de ação das GNPs na diminuição do nitrito está relacionado à sua capacidade antioxidante, que permite neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS). Conforme descrito por Shcherbakov, V., Denisov, S., & Mostafavi, M. (2023) as GNPs interagem diretamente com as EROS, reduzindo sua concentração e, assim, limitando a formação de nitrito, que poderia causar danos celulares e teciduais. A fotobiomodulação complementa esse efeito ao melhorar a função mitocondrial e aumentar a produção de ATP, o que ajuda a controlar o estresse oxidativo, como destacado por Hamblin (2017). Dessa forma, o tratamento combinado com GNPs-Cur e FBM modula o estresse oxidativo, facilitando o processo de cicatrização sem os entraves associados ao excesso de ERN.

A SOD é uma enzima antioxidante crucial que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, reduzindo os níveis de superóxido (Calvaniet al., 2022). No presente estudo houve aumento significativo da atividade da SOD nos grupos FP + GNPs-Cur, FP + FBM e FP + GNPs-Cur + FBM. Essa elevação da atividade da SOD destaca a capacidade das terapias combinadas de GNPs-Cur e FBM de fortalecer o sistema antioxidante endógeno. Além disso, em conjunto ao resultado de aumento significativo na expressão de NRF2 no grupo FP + GNPs-Cur + FBM evidencia o efeito antioxidante potencializado dessa combinação terapêutica.

Ainda mediante as características antioxidantes das GNPs, um estudo de Casagrande et al., (2023) mostrou que culturas de macrófagos estimuladas com LPS e tratadas com GNPs, apresentaram inibição da produção de óxido nítrico e supressão da via NFκB com diminuição nos níveis de AKT. Além disso, as GNPs podem afetar as ligações tiol de Keap1, causando uma mudança conformacional que permite a liberação de NRF2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide) para posterior transcrição de genes citoprotetores, contribuindo assim para a homeostase celular (Mendes et al., 2022). Sabendo que o NRF2 é um regulador mestre das defesas antioxidantes celulares, quando ativado, transloca-se para o núcleo e induz a expressão de genes antioxidantes, como SOD e catalase, fortalecendo a capacidade da célula de combater o estresse oxidativo (Bardallo et al., 2021). A ativação de NRF2 observada em nossos resultados indica que as GNPs-Cur, em sinergia com a FBM, estimularam esta via de sinalização, aumentando a expressão de enzimas protetoras e promovendo um microambiente favorável para a cicatrização eficiente do tecido. Esta resposta antioxidante coordenada não apenas protege o tecido contra danos oxidativos, mas também apoia os processos de reparo celular, contribuindo para uma regeneração de alta qualidade.

No presente estudo, observou-se que as intervenções de tratamento combinadas com laser potencializaram o reparo tecidual, esses efeitos foram justificados pelos mecanismos de fotobiomodulação, como também podem ser atribuídos em conjunto a terapia fotodinâmica. Isso porque esta combinação torna as nanopartículas sensibilizadores nanodimensionados mediadores e versáteis, que foram projetados para permitir as terapias dinâmicas e aumentar a sua eficácia terapêutica, que depende de suas propriedades físico-químicas específicas ou efeitos biológicos. A literatura traz em primeiro, que a construção do nanocarreador pode aumentar a biodisponibilidade de moléculas orgânicas convencionais. Em segundo, alguns nanosensibilizadores são caracterizados com propriedades sensibilizantes intrínsecas para permitir e/ou aumentar a eficiência terapêutica de modalidades terapêuticas dinâmicas versáteis. Terceiro, os parâmetros estruturais/composicionais controláveis dos nanosensibilizadores podem alterar a farmacocinética e os efeitos biológicos dos medicamentos, permitindo os resultados terapêuticos desejáveis. Por último, mas não menos importante, os nanosensibilizadores projetados são altamente biocompatíveis para garantir suas traduções clínicas posteriores (Konopka et al., 2007; Overchuk et al., 2023; Hu et al., 2021).

A toxicidade das nanopartículas depende da dose, tamanho, forma e/ou carga de superfície da molécula, mas em regra, apresentam baixa citotoxicidade e alta capacidade de interação com as células (Silveira et al., 2014). Desta forma, para avaliar a se a presença de citotoxicidade o presente estudo realizou análise dos marcadores oxidantes, de dano oxidativo e antioxidantes, como também a análise histológica no fígado, no qual revelou a ausência de alterações significativas nos níveis de DCF, nitrito, carbonil e sulfidrila bem como influxo de células inflamatórias em fígado entre os grupos experimentais, destacando a segurança dos tratamentos.

A análise dos marcadores oxidativos e das enzimas antioxidantes no fígado fornece uma importante perspectiva sobre os efeitos sistêmicos dos tratamentos com Nanopartículas e FBM. Embora o foco principal de muitos estudos esteja no impacto local desses tratamentos, especialmente no local da lesão, é crucial compreender os efeitos que eles podem ter em órgãos vitais como o fígado, responsável pela desintoxicação e metabolismo de substâncias exógenas. A ausência de alterações significativas nos níveis de oxidantes, como o DCF e o nitrito, sugere que os tratamentos não desencadearam um aumento no estresse oxidativo hepático. Esse é um achado fundamental, uma vez que terapias baseadas em Nanopartículas podem, em alguns casos, causar toxicidade hepática. Em contraste, outros estudos, mostram que GNPs podem induzir hepatotoxicidade, aumentando os níveis de enzimas hepáticas, marcadores de estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Nesse sentido, os resultados

corroboram aos estudos que indicam que, quando usadas em concentrações terapêuticas apropriadas, as nanopartículas não induzem toxicidade significativa em tecidos hepáticos (Ghonimiet al., 2023).

Em resumo, a combinação terapêutica de nanopartículas de ouro ou nanocurcuminacomfotobiomodulação demonstrou efeitos sinérgicos significativos na cicatrização de feridas palatinas, com maior destaque na combinação com nanopartículas de ouro, promovendo uma resposta anti-inflamatória eficaz, aumento da atividade antioxidante e estimulação da síntese de colágeno. Os tratamentos favoreceram a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, elevando os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ ), essenciais para a deposição de colágeno tipo III e possivelmente remodelação do colágeno tipo I. Esses achados destacam o potencial dessa abordagem terapêutica na promoção de uma cicatrização eficiente e de alta qualidade, minimizando complicações inflamatórias e danos oxidativos.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que as terapias propostas como as GNPs-Cur, sintetizadas de forma verde a partir de extrato vegetal de curcumina, combinadas com FBM favoreceram o processo de reparo tecidual na mucosa oral palatina.

Os achados sugerem uma opção mais eficaz do que os tratamentos padrões utilizados na prática clínica. Indicando que as terapias como as GNPs-Cur e FBM de forma isolada e combinada podem estimular uma variedade de processos celulares e moleculares que auxiliam no microambiente da ferida por meio da redução de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias, antioxidantes, aumento da expressão de colágeno e aumento da área de contração da ferida. Além disso, a combinação terapêutica das GNPs-Cur e FBM através da fotodinâmica também demonstrou potencial terapêutico.

Embora os resultados deste estudo apontem para efeitos benéficos da combinação de nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina (GNPs-Cur) e fotobiomodulação (FBM) na cicatrização de feridas palatinas em ratos, uma limitação importante é a utilização exclusiva de um modelo animal. As diferenças fisiológicas e imunológicas entre roedores e seres humanos podem impactar significativamente a translação dos resultados para aplicações clínicas em pacientes humanos. Além disso, o tempo de acompanhamento foi restrito ao período inicial de cicatrização (5 dias de tratamento), não permitindo avaliar os efeitos a longo prazo ou possíveis reações adversas decorrentes do uso contínuo dessas terapias. Estudos adicionais, incluindo modelos clínicos e um acompanhamento prolongado, são necessários para validar a segurança e eficácia do tratamento em contextos mais amplos.

## REFERÊNCIAS

- Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014.
- Akhtar MS, Panwar J, Yun YS. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2013.
- Aksenov, M. Y.; Markesbery, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters.* 2001.
- Ali HR, Selim SA, Aili D. Effects of macrophage polarization on gold nanoparticle-assisted plasmonic photothermal therapy. *RSC Adv.* 2021.
- Almazroo, O. A , Miah, M.K , Venkataramanan , R. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease.* Volume 21, Issue 1, February 2017, Pages 1-20
- Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus RA, Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee PJCSR. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem Soc Rev.* 2012.
- Bannister, J. V.; Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods of biochemical analysis.* 1987.
- Bardallo, R., Panisello-Roselló, A., Sánchez-Nuño, S., Alva, N., Roselló-Catafau, J., & Carbonell, T. Nrf2 e estresse oxidativo na lesão de isquemia/reperfusão hepática. *Revista FEBS.* 2021.
- Baron J, M, Glatz M, Proksch E. Optimal Support of Wound Healing: New Insights. *Dermatology.* 2020.
- Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of lowlevel laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2012.
- Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008.
- Bhattacharya R, Mukherjee PJAddr. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. 2008.
- Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2016.
- Bruce AJ, Rogers RS 3rd. Acute oral ulcers. *Dermatol Clin.* 2003.
- Calvani, N., De Marco Verissimo, C., Jewhurst, H., Cwiklinski, K., Flaus, A., & Dalton, J. Two Distinct Superoxidase Dismutases (SOD) Secreted by the Helminth Parasite *Fasciola*

hepatica Play Roles in Defence against Metabolic and Host Immune Cell-Derived Reactive Oxygen Species (ROS) during Growth and Development. *Antioxidantes*. 2022.

Casagrande LR, Porto GD, Colares MC, et al. Green synthesis of gold nanoparticles modulates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in Wistar rats. *Basic Clin PharmacolToxicol*. 2023.

Cerqueni, G. et al. Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. *Materials Science and Engineering*. 2021.

Chae, S. Y. et al. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004.

Corrêa MEAB, Dos Santos Haupenthal DP, Mendes C, Zaccaron RP, de RochCasagrande L, Venturini LM, Porto GD, Bittencourt JVS, de Souza Silva JI, de Sousa Mariano S, de Andrade TAM, Silveira PCL. Effects of Percutaneous Collagen Induction Therapy Associated with Hyaluronic Acid on Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Collagen Production. *Inflammation*. 2020.

Courtois E, Boulefour W, Guy JB, Louati S, Bensadoun RJ, Rodriguez-Lafrasse C, Magné N. Mechanisms of PhotoBioModulation (PBM) focused on oral mucositis prevention and treatment: a scoping review. *BMC Oral Health*. 2021.

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.

Dellavia C, Ricci G, Pettinari L, Allievi C, Grizzi F, Gagliano N. Human palatal and tuberosity mucosa as donor sites for ridge augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014.

Evans DH, Abrahamse H. A review of laboratory-based methods to investigate second messengers in low-level laser therapy (LLLT). *Med Laser App*. 2009.

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

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

Ghonimi, W., Abdelrahman, F., Salem, G., Dahran, N., & Sayed, S. The apoptotic, oxidative and histological changes induced by different diameters of gold sphere nanoparticles (GNPs) with special emphasis on the hepatoprotective role of quercetin. *Advanced*

Pharmaceutical Bulletin. 2023.

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008.

Hamblin MR. Chapter 10 molecular basis for photobiomodulation: light-induced nitric oxide synthesis by cytochrome c oxidase in low-level laser therapy. In: *Handbook of low-level laser therapy*. Pan Stanford Publishing. 2017.

Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017.

Hissin, P. J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*. 1976.

Hourelid NN. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. *Sci World J*. 2014.

Hu H, Feng W, Qian X, Yu L, Chen Y, Li Y. Emerging Nanomedicine-Enabled/Enhanced Nanodynamic Therapies beyond Traditional Photodynamics. *AdvMater*. 2021.

Jerome, Zoidakis., Maria, G., Roubelakis., Agnieszka, Latosinska., Antonia, Vlahou. Revisando os reguladores de COL1A1. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023.

Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International journal of molecular sciences*. 2021.

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

Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010.

Khan SA, Shahid S, Lee CS. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Clerodendrum inerme*; Characterization, Antimicrobial, and Antioxidant Activities. *Biomolecules*. 2020.

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

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry [published correction appears in *J Dent Res*. 2007.

Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes.

Front Physiol. 2018.

Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*. 2014.

Kumari, A., Raina, N., Wahi, A., Goh, K., Sharma, P., Nagpal, R., Jain, A., Ming, L., & Gupta, M. Efeitos da Curcumina e suas Nanoformulações na Cicatrização de Feridas: Uma Revisão Abrangente. *Pharmaceutics*. 2022.

Levine, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990.

Lipko NB. Photobiomodulation: Evolution and Adaptation. *Photobiomodulation and Laser Surg*. 2022.

Liu, D., Zhong, Z., & Karin, M. NF- $\kappa$ B: A Double-Edged Sword Controlling Inflammation. *Biomedicine*. 2022.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. 2017.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951.

MacParland, S.A., Liu, J.C., Ma, XZ, Innes, B.T., Bartczak, A.M., Gage, B.K., Manuel, J., Khuu, N., Echeverri, J., Linares, I., Gupta, R., Cheng, M.L., Liu, L.Y., Camat, D., Chung, S.W., Seliga, R.K., Shao, Z., Lee, E., Owaga, S., Wilson, M.O., Fish, J.E., Selzner, M., Ghanekar, A., Grant, D., Greig, P., Sapisonchin, G., Selzner, N., Winegarden, N., Adeyi, O., Keller, G., Bader, G.D., McGilvray, I.D., Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun* 9, 4383 (2018).

Malam Y, Loizidou M, Seifalian, AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol. Sci*. 2009.

Mendes C, Dos Santos Haupenthal DP, Zaccaron RP, de Bem Silveira G, Corrêa MEAB, de Roch Casagrande L, de Sousa Mariano S, de Souza Silva JI, de Andrade TAM, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. Effects of the Association between Photobiomodulation and Hyaluronic Acid Linked Gold Nanoparticles in Wound Healing. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022.

Miao X, Leng X, Zhang Q. The Current State of Nanoparticle-Induced Macrophage Polarization and Reprogramming Research. *Int J Mol Sci*. 2017.

Murray, P. J., & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 2011.

Mussbacher, M., Derler, M., Basilio, J., & Schmid, J. NF- $\kappa$ B in monocytes and

macrophages - an inflammatory master regulator in multitalented immune cells. *Frontiers in Immunology*. 2023.

Overchuk M, Weersink RA, Wilson BC, Zheng G. Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine. *ACS Nano*. 2023.

Panchatcharam M, Miriyala S, Gayathri VS, Suguna L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem*. 2006.

Pérez, S., & Rius-Pérez, S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation: A Redox Perspective. *Antioxidantes*. 2022.

Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva Ja JR, Aimbire F, Albertini r. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci*. 2011.

Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov Med*. 2011.

Santana-Blank L, Rodríguez-Santana E, Santana-Rodríguez K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 2010.

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

Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res*. 2008.

Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol*. 2014.

Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner. Aphthous and other common ulcers. *Br Dent J*. 2005.

Setti T, Arab MGL, Santos GS, Alkass N, Andrade MAP, Lana J. The protective role of glutathione in osteoarthritis. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*. 2021.

Shcherbakov, V., Denisov, S., & Mostafavi, M. A mechanistic study of gold nanoparticles catalysis of O<sub>2</sub> reduction by ascorbate and hydroethidine, investigating reactive oxygen species reactivity. *RSC Advances*. 2023.

Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991.

Silva, A. L. C. e, & Nobre Cabral, L. Prevalência de lesões bucais em tecidos mole e duro diagnosticadas em idosos em um serviço histopatológico de referência. *Archives Of Health Investigation*. 2021.

Silveira PC, 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.

Sindhu K, Rajaram A, Sreeram KJ, Rajaram R. Curcumin conjugated gold nanoparticle synthesis and its biocompatibility. *RSC Adv.* 2014.

Sonsoles, Piera-Velázquez., Gonzalo, Huaman-Vargas., Natalia, Louneva., Jolanta, Fertala., Sergio, A., Jiménez. Simvastatin Abrogates TGF- $\beta$  Induced Stimulation of Normal Human Dermal Fibroblast Collagen Gene Expression in Culture *Biologia e Pesquisa do Câncer.* 2024.

Sui, Y., Tian, R., & Lu, N. NADPH oxidase is a primary target for antioxidant effects by inorganic nitrite in lipopolysaccharide-induced oxidative stress in mice and in macrophage cells. *Nitric Oxide.* 2019.

Taib, S., Shameli, K., Nia, P., Etesami, M., Miyake, M., Ali, R., Abouzari-Lotf, E., & Izadiyan, Z. Electrooxidation of nitrite based on green synthesis of gold nanoparticles using *Hibiscus sabdariffa* leaves, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2019.

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

Tavelli L, Barootchi S, Stefanini M, Zucchelli G, Giannobile WV, Wang HL. Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting. *Periodontol* 2000. 2023.

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

Thirupathi A, Guzzatti MFM, Corrêa MEAB, et al. Green Synthesis of Gold Nanoparticles with Curcumin or Açai in the Tissue Repair of Palatal Wounds. *Antioxidants (Basel).* 2023.

Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X, Braas D, Grasso CS, Palaskas N, Ribas A, Graeber TG. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell.* 2018 May 14;33(5):890-904.e5.

Wang X, Chang J, Wu CJAMT. Bioactive inorganic/organic nanocomposites for wound healing. 2018.

Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay

using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999.

Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *PhotochemPhotobiol*. 1997.

Zaccaron RP, Barbieri RT, Mendes C, et al. Photobiomodulation associated with lipid nanoparticles and hyaluronic acid accelerate the healing of excisional wounds. *J BiomaterAppl*. 2022.

Zaccaron RP, de Roch Casagrande L, Venturini LM, Bittencourt JVS, da Costa C, de Pieri E, Thirupathi A, Rezin GT, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. IL-1 $\beta$  Antagonist Receptor Peptide Associated with Photobiomodulation Accelerates Diabetic Wound Tissue Repair. *Inflammation*. 2024.

Zahan OM, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Medicine and pharmacy reports*. 2020.

Zan, R. A., & Zan, A. S. H. de S. Metallic nanoparticles of gold (AU) and silver (AG) associated with natural substances, a proposal for a little explored Biogenic synthesis. *Brazilian Journal of Development*. 2022.

Zhang , Yi-N ., Poon, W., Tavares, A, J., Ian D. McGilvray,I,D., Chan, W,CW.

Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*.

Zhu, C. et al. Autophagy in Bone Remodeling: A Regulator of Oxidative Stress. *Frontiers in Endocrinology*. 2022.

Zuhrotun A, Oktaviani DJ, Hasanah AN. Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Phytochemical Compounds. *Molecules*. 2023.

## ANEXO A



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 **18/06/2024**.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação da aplicação tópica de nanopartículas de ouro mesoporosas obtidas por síntese verde incorporadas com colágeno do tipo I em um modelo de ferida palatina em ratos Wistar
<b>Project title</b>	Evaluation of the topical application of mesoporous gold nanoparticles obtained by green synthesis incorporated with type I collagen in a palatal wound model in Wistar rats.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	86/23
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Morgana Francisco Machado Guzzatti, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Laura de Roch Casagrande, Carolini Mendes, João Vitor Silvano Bittencourt, Ligia Milanez Venturini, Rubya Pereira Zaccaron, Sinara Mesquita Guimarães Tannús, Igor Ramos Lima, Gabrielli Martins, Camila da Costa, Lucas de Oliveira Pacagnan, Alice Machado Clemencia, Vitória Oliveira Silva da Silva, Natanael Junior Lopes Specht,
<b>Finalidade</b>	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	04/03/2024 a 04/03/2025
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico / Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250-300g
<b>Número de animais</b>	Masculino 72 / Feminino 0
<b>Procedência</b>	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](mailto:ceua@unesc.net).

*Josiane Budni*  
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 18 de junho de 2024