

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

JOÃO VITOR SILVANO BITTENCOURT

**NANOEMULSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM EXTRATO DE
CANNABIS SATIVA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS EM
CAMUNDONGOS SWISS**

CRICIÚMA

DEZEMBRO DE 2024

JOÃO VITOR SILVANO BITTENCOURT

**NANOEMULSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM EXTRATO DE
CANNABIS SATIVA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Profº. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA

DEZEMBRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B624n Bittencourt, João Vitor Silvano.

Nanoemulsão de nanopartículas de ouro com extrato de *cannabis sativa* na cicatrização de feridas crônicas em camundongos Swiss / João Vitor Silvano Bittencourt. - 2024.

56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Cicatrização de feridas. 2. Feridas crônicas. 3. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 4. Cannabis - Uso terapêutico. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD. 22. ed. 617.1406

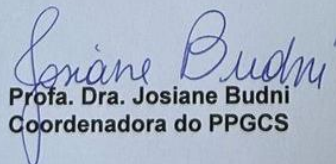
Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

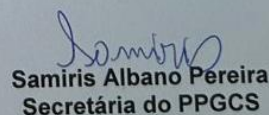


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 460

Com início às 15 (quinze) horas do dia 11 (onze) de fevereiro de 2025 (dois mil e vinte e cinco), realizou-se, na Sala 227/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **JOÃO VITOR SILVANO BITTENCOURT**, sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**, intitulada **“NANOEMULSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM EXTRATO DE CANNABIS SATIVA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS EM CAMUNDONGOS SWISS”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Prof. Dr. Rafael Mariano de Bitencourt (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 17h (dezesete) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 11 (onze) de fevereiro de 2025 (dois mil e vinte e cinco).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Samiris Albano Pereira
Secretária do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

Dissertação elaborada seguindo o estilo ABNT com adaptações descritas na resolução n. 7/2015 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Este trabalho é apresentado no formato tradicional e foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos e a todas que estiveram comigo e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja direta ou indiretamente.

Um agradecimento especial a minha esposa Camila que, dotada da maior paciência, me incentivou e apoiou em todos os momentos. Aos meus pais, Rosânia e Cunha, que, sabendo da importância do estudo, me deram força e exemplo para continuar nesse caminho. Aos meus irmãos, Júlio Cesar e Juliana, pelo carinho e por sempre acreditarem no meu potencial. Sou muito feliz por ter vocês perto de mim, pela oportunidade de ter vocês como família e espero poder compartilhar todas as minhas conquistas com vocês ao meu lado. Amo vocês!

À família acadêmica que Deus me deu, os meus queridos amigos do Grupo Proteção e Reparo Tecidual, que me receberam tão bem e me permitiram crescer nesse caminho científico. Agradeço aos que passaram pelo grupo, mas que foram importantíssimos para a trajetória: Gustavo, Maria Eduarda, Carolini, Dani e Igor. E aos que continuam no grupo e foram fundamentais pro desenvolvimento desse trabalho: Laura, Lígia, Rubya, Camila, Alice, Gabrieli. Agradeço também todos os ensinamentos e toda a ajuda que recebi do meu orientador, Professor Paulo.

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

RESUMO

As lesões cutâneas, divididas em agudas e crônicas, demandam diferentes abordagens terapêuticas devido às suas causas e processos de cicatrização distintos. Recentemente, tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de curativos inovadores que utilizam materiais diferenciados. Alguns desses materiais em destaque são o extrato full spectrum de *Cannabis sativa* e a utilização de nanopartículas metálicas, materiais reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento de uma nanoemulsão de nanopartículas de ouro (GNPs) com extrato de *Cannabis sativa* em um modelo de ferida crônica induzida com Resiquimod, em camundongos Swiss. Foram empregados 96 camundongos Swiss machos, distribuídos aleatoriamente em oito grupos experimentais (n=12): **I.** Ferida Aguda (FA) – sem tratamento local ou sistêmico; **II.** Ferida Crônica induzida com Resiquimod (FC) – sem tratamento local ou sistêmico; **III.** FC+C50mg (FC + tratamento com extrato de *Cannabis sativa* (50mg/kg); **IV.** FC+C100mg (FC + tratamento com extrato de *Cannabis sativa* (100mg/kg); **V.** FC+C200mg (FC + tratamento com extrato de *Cannabis sativa* (200mg/kg); **VI.** FC+NanoC50mg (FC + tratamento com nanoemulsão de GNP com extrato de *Cannabis sativa* (50mg/Kg); **VII.** FC+NanoC100mg (FC + tratamento com nanoemulsão de GNP com extrato de *Cannabis sativa* (100mg/kg); **VIII.** FC+NanoC200mg (FC + tratamento com nanoemulsão de GNP com extrato de *Cannabis sativa* (200mg/kg). Os animais foram anestesiados com isoflurano a 4%. O modelo de ferida crônica foi estabelecido através da aplicação tópica de Resiquimod por 4 dias consecutivos. Os tratamentos com GNP iniciaram-se no sexto dia após a última aplicação de Resiquimod e foram administrados diariamente até o sétimo dia. Foram conduzidas análises sobre a medição do tamanho das feridas. Após 12 horas da última aplicação, os animais foram submetidos à eutanásia, e os tecidos (pele/lesão) foram coletados para análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Os resultados indicaram que os tratamentos com nanoemulsão de GNP com extrato de *C. sativa* aceleraram a contração das feridas. A análise histológica revelou uma diminuição no infiltrado inflamatório. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) demonstrou aumento na expressão gênica de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) e colágeno tipo III, especialmente no grupo tratado com nanoemulsão de GNP com extrato de *C. sativa*. As terapias também diminuíram as citocinas pró-inflamatórias, aumentaram as citocinas anti-inflamatórias e reduziram os marcadores oxidantes no local lesionado. Assim, este estudo evidenciou que as GNP somadas ao extrato de *C. sativa* promovem o processo de reparo tecidual em feridas epiteliais crônicas.

Palavras-chave: Ferida crônica; nanopartículas de ouro; reparo tecidual; estresse oxidativo; *Cannabis sativa*.

ABSTRACT

Skin injuries, divided into acute and chronic, require different therapeutic approaches due to their distinct causes and healing processes. Recently, there has been a growing interest in the development of innovative dressings that use differentiated materials. Some of these highlighted materials are the full spectrum extract of *Cannabis sativa* and the use of metallic nanoparticles, materials recognized for their antioxidant and anti-inflammatory properties. The present study aimed to investigate the effects of treatment with a gold nanoparticles (GNPs) nanoemulsion with *Cannabis sativa* extract in a chronic wound model induced with Resiquimod, in Swiss mice. 96 male Swiss mice were randomly distributed into eight experimental groups (n = 12): I. Acute Wound (FA) – without local or systemic treatment; II. Chronic Wound induced with Resiquimod (FC) – without local or systemic treatment; III. FC+C50mg (FC + treatment with *Cannabis sativa* extract (50mg/kg); IV. FC+C100mg (FC + treatment with *Cannabis sativa* extract (100mg/kg); V. FC+C200mg (FC + treatment with *Cannabis sativa* extract (200mg/kg); VI. FC+NanoC50mg (FC + treatment with GNPs nanoemulsion with *Cannabis sativa* extract (50mg/kg); VII. FC+NanoC100mg (FC + treatment with GNPs nanoemulsion with *Cannabis sativa* extract (100mg/kg); VIII. FC+NanoC200mg (FC + treatment with GNPs nanoemulsion with *C. sativa* extract (200mg/kg). The animals were anesthetized with 4% isoflurane. The chronic wound model was established through the topical application of Resiquimod for 4 consecutive days. Treatments with GNPs began on the sixth day after the last application of Resiquimod and were administered daily until the seventh day. Analyses of measurement of wound size were performed. Twelve hours after the last application, the animals were euthanized, and the tissues (skin/lesion) were collected for histological, biochemical and molecular analyses. The results indicated that treatments with GNPs nanoemulsion with *C. sativa* extract accelerated wound contraction. Histological analysis revealed a decrease in inflammatory infiltrate. Polymerase Chain Reaction (PCR) demonstrated an increase in the gene expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and collagen type III, especially in the group treated with GNPs nanoemulsion with *C. sativa* extract. The therapies also decreased pro-inflammatory cytokines, increased anti-inflammatory cytokines and reduced oxidant markers injured site. Thus, this study showed that GNPs added to *Cannabis sativa* extract promote the tissue repair process in chronic epithelial wounds.

Keywords: Chronic wound; gold nanoparticles; tissue repair; oxidative stress; *Cannabis sativa*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Feridas	11
1.2	Reparo tecidual	12
1.3	Modelo animal	16
1.4	Nanotecnologia em feridas	17
1.5	<i>Cannabis sativa</i> no tratamento de feridas	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	Procedimentos Éticos	22
3.2	Síntese Das Nanopartículas	22
3.3	Extrato de <i>Cannabis sativa</i>	23
3.4	Animais	23
3.5	Lesão Epitelial	24
3.6	Tratamento	24
3.7	Eutanásia	25
3.8	Análise Do Tamanho Das Feridas	26
3.9	Análise Histológica	26
3.10	Testes Moleculares e Bioquímicos	26
3.10.1	RT-PCR	26
3.10.2	Marcadores Inflamatórios	27
3.10.3	Parâmetros de Estresse Oxidativo	28
3.11	Procedimento Para Análise De Dados	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Caracterização das GNPs	30
4.2	Análise da contração da ferida	31
4.3	Análise Histológica	32
4.4	Análise de expressão gênica por PCR	34
4.5	Análise de citocinas pró-inflamatórias	35
4.6	Análise de citocinas anti-inflamatórias	36
4.7	Análise do nível de oxidantes	37
4.8	Marcadores de dano oxidativo e antioxidantes	38

5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Feridas

Com os avanços da cirurgia minimamente invasiva, as lesões cirúrgicas têm se tornado menos problemáticas, enquanto as feridas crônicas estão em ascensão, especialmente em populações crescentes como idosos, obesos e diabéticos (Kazemzadeh-Narbat et al., 2015). O ônus global nos sistemas de saúde devido a distúrbios cutâneos e dificuldades de cicatrização tem aumentado significativamente em uma década. Dados da *Global of Disease Study* (GBD) de mais de 195 países indicam que a prevalência de distúrbios cutâneos aumentou de cerca de 400 milhões em 2005 para aproximadamente 600 milhões em 2015 (Alven et al., 2020; Vos et al., 2016).

Recentemente, tem havido um incremento notável na incidência de úlceras por pressão, úlceras venosas e úlceras diabéticas em todo o mundo, especialmente entre os idosos (Kazemzadeh-Narbat et al., 2015). Um estudo realizado na Austrália constatou que 49% dos pacientes hospitalizados desenvolveram lesões epiteliais, com 31% apresentando feridas agudas, 9% úlceras por pressão e 8% escoriações na pele com ruptura do tecido. Em ambientes hospitalares, estudos indicam que até 50% dos pacientes internados adquirem lesões epiteliais (Williams et al., 2021; Lindholm et al., 2016; Zhao et al., 2016).

No Brasil, estudos apontam para uma alta prevalência (Freitas et al., 2011) e incidência (Luz et al., 2010; Souza et al., 2010) de feridas em idosos residentes em instituições e durante a hospitalização (Vieira et al., 2018). Essa problemática não se restringe apenas aos idosos, mas afeta a população em geral, representando um desafio de saúde pública devido aos elevados índices e custos de tratamento (Morais et al., 2008). Prevê-se que essas taxas aumentem devido ao envelhecimento populacional e à ampliação dos fatores de risco, como doenças metabólicas, insuficiência venosa, hipertensão e diabetes mellitus (de Brito et al., 2017; Gould et al., 2015).

Apesar da ampla variedade de fatores etiológicos, as principais causas de feridas crônicas são doença vascular periférica e principalmente a insuficiência venosa crônica (IVC) responsável por cerca de 70% a 80% dos casos, seguida de

insuficiência arterial (8%), diabética (3%), trauma (2%), e outras causas (14%) (Loftus S, 2001).

As principais consequências para os portadores de feridas crônicas são justamente o fato da lesão não ser apenas a questão física, mas significar o isolamento social, constrangimento, efeito emocional negativo, custos de tratamento, entre outros (Morgan, 2000). Enquanto as incisões cirúrgicas e as lacerações são geralmente consideradas feridas agudas e tendem a cicatrizar com poucas complicações, as úlceras são persistentes e exigem tratamentos onerosos (Mendes, et al. 2024).

1.2 Reparo tecidual

A reparação aguda de feridas representa uma complexa cascata de eventos celulares e necessita de uma resposta metabólica, que visa garantir o rápido fechamento da barreira cutânea. Esta resposta é caracterizada por uma notável redundância e mecanismos compensatórios, minimizando os efeitos adversos de pequenas perturbações (Werner, 2003). Perturbações substanciais, como a inflamação exacerbada, desequilíbrio na deposição e degradação do colágeno tipo I e III, podem levar a anormalidades, como cicatrizes excessivas ou falha na cicatrização completa. Esses fatores caracterizam as feridas crônicas, que representam um desafio significativo, especialmente em populações idosas e diabéticas, acarretando consequências socioeconômicas importantes (Guest et al., 2015). Embora muitas dessas feridas permaneçam refratárias aos tratamentos atuais, uma melhor compreensão dos mecanismos celulares subjacentes à patologia das feridas é essencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes (Vieira et al., 2018).

Os fatores que influenciam a vulnerabilidade da pele a lesões ainda não foram totalmente compreendidos. A pele de indivíduos idosos e diabéticos, devido à atrofia e às alterações na barreira cutânea, apresenta maior predisposição a lesões (Park et al., 2011; Seyfarth et al., 2011). Além disso, tanto o envelhecimento quanto o diabetes estão associados à perda gradual da matriz dérmica e alterações na mecânica dos tecidos, contribuindo para a vulnerabilidade a danos (Diridollou et al., 2001). Após uma lesão, uma série de alterações moleculares e celulares contribuem para o comprometimento geral do processo de cicatrização. A senescência celular emerge

como um fator relevante na patologia das feridas diabéticas e envelhecidas, exacerbando a inflamação e o estresse oxidativo, contribuindo assim para a cronicidade das feridas (Wilkinson e Hardman, 2020). A inflamação excessiva não apenas intensifica a destruição do tecido, mas também impede a correta cicatrização.

Outras complicações como a neuropatia periférica dificultam a identificação de agressores externos e a retirada do estímulo nocivo; disfunções vasculares e endoteliais provocam uma redução do fornecimento de oxigênio e nutrientes para o tecido, promovendo um quadro de hipóxia local com conseqüente necrose do tecido epitelial (Kavitha et al., 2014). Estes fatores são facilitadores para o rompimento do tecido cutâneo e conseqüentemente, o surgimento das feridas crônicas (Gould et al., 2015).

Após o rompimento tecidual, desdobram-se uma série de respostas fisiológicas complexas que marcam o início do processo de reparo, geralmente observado aproximadamente 24 horas após a ocorrência da lesão (Baum e Arpey, 2005). Em feridas crônicas, o reparo tecidual ocorre de maneira gradual e desorganizada, resultando em um processo que pode se estender por meses a anos até a restauração completa da integridade das estruturas afetadas (Moura et al., 2019). Em condições de tecidos saudáveis, a cicatrização é tradicionalmente descrita como um processo composto por quatro estágios interdependentes e coordenados: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. Entretanto, em casos de feridas com dificuldade de cicatrização, observam-se características celulares e moleculares que levam à estagnação do processo na fase inflamatória, impedindo a progressão adequada da regeneração (Tan et al., 2021).

A persistência da inflamação nesse contexto é atribuída a uma resposta imune desregulada, que resulta em uma migração exacerbada de células inflamatórias. Esse fenômeno conduz a um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, uma elevada concentração de proteases e uma diminuição nos fatores de crescimento, todos contribuindo para a complexidade da resolução do processo de cicatrização (Patel et al., 2019). Após a resposta imediata de hemostasia, caracterizada pela agregação e degranulação plaquetária, seguida pela formação de um coágulo de fibrina, ocorre a transição para a fase inflamatória. Nesta fase, ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, facilitando a quimiotaxia de neutrófilos, os quais são as primeiras células a migrarem para o tecido lesado, seguidos por monócitos e linfócitos (Zhao et al., 2016).

A atração dessas células inflamatórias para o local da lesão é mediada por citocinas, incluindo Fator de Crescimento Transformador Beta (do inglês, Transforming Growth Factor Beta (TGF β) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Singer e Clark, 1999; Guo e Di Pietro, 2010). Os neutrófilos aderem à parede do endotélio por meio de ligação com as selectinas, sendo essenciais na limpeza da área lesada por meio da produção de radicais livres, os quais desempenham um papel crucial na proteção do organismo contra invasores como bactérias e outros microrganismos (Silva et al., 2010). Durante a fase inflamatória, há uma produção significativa de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) através da cadeia respiratória, estimulada pela migração de neutrófilos e macrófagos (Kanta et al., 2011).

Os macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (M1) são recrutados para a ferida entre 48 e 96 horas após a ocorrência da lesão. Essa migração celular é importante para dar continuidade ao processo de fagocitose, contribuindo para a conclusão do debridamento iniciado pelos neutrófilos e aumentando a liberação de citocinas. Após a conclusão da fagocitose, os macrófagos adotam um fenótipo anti-inflamatório (M2), com o objetivo de estimular a angiogênese, a fibroplasia e a síntese da matriz extracelular, processos essenciais para a transição para a fase proliferativa, conforme mostrado na figura 1 (Broughton et al., 2006).

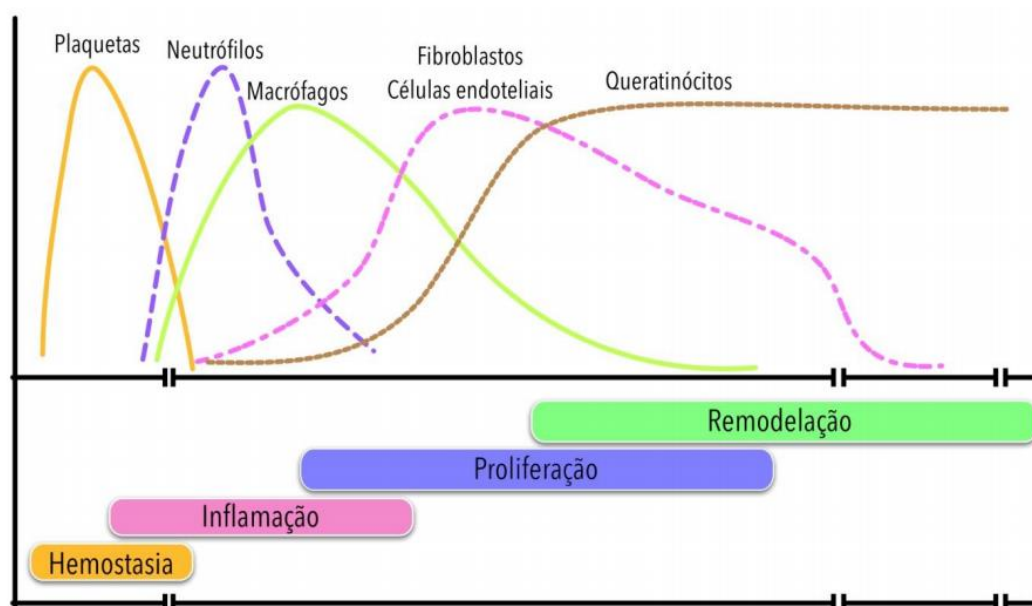


Figura 1: Representação esquemática das fases do processo de cicatrização da pele e da dinâmica celular envolvida. (Campos et al., 2007). A hemostasia ocorre inicialmente, seguida pela fase inflamatória, caracterizada pelo recrutamento de plaquetas, neutrófilos e macrófagos. Na fase de proliferação, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos promovem a reparação tecidual. Por fim,

a fase de remodelação garante a maturação e organização do novo tecido, restaurando a integridade da pele.

O quadro de hiperglicemia crônica e/ou estresse oxidativo associados à diabetes mellitus, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de feridas crônicas, exerce influência sobre a epigenética dos macrófagos, que são modificações que regulam a ativação, polarização e função dos macrófagos em diferentes contextos fisiológicos e patológicos (Cutolo et al., 2022). Isso resulta na desregulação do fenótipo e na permanência prolongada do fenótipo pró-inflamatório M1 no tecido, o que contribui significativamente para a estagnação do processo regenerativo. Como resultado, essa função comprometida dos macrófagos induz a uma expressão contínua de citocinas pró-inflamatórias e suprime a expressão de fatores de crescimento, resultando na inibição da proliferação de queratinócitos e fibroblastos (Loot et al., 1991). Além das alterações epigenéticas mencionadas, outros fatores como a hipóxia induzida pela glicação da hemoglobina, o estreitamento dos vasos sanguíneos e as complicações endoteliais contribuem para a disfunção dos macrófagos e neutrófilos (Brem et al., 2007). Esses eventos biológicos culminam em uma fase inflamatória persistente, caracterizada por níveis elevados e prolongados de citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina 1 beta (IL-1 β) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), que por sua vez inibem a formação do tecido de granulação e a progressão para a fase proliferativa (Zhao et al., 2016).

Nos tecidos saudáveis, o término da liberação de citocinas pró-inflamatórias ocorre aproximadamente quatro dias após a lesão. Nesse estágio, ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) e a interleucina-4 (IL-4), que desempenham um relevante papel no início da fase proliferativa ou de granulação. Esta fase é caracterizada pela reepitelização da epiderme e pelo reparo da camada dérmica ou mesenquimal subjacente. A fase proliferativa ocorre em quatro etapas fundamentais, incluindo a epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Durante esse processo, a derme é restaurada por fibroblastos invasores e proliferantes, os quais sintetizam e secretam proteínas da matriz extracelular embrionária, além de liberarem fatores de crescimento como o TGF- β 1 (Clark et al., 1990; Clark et al., 1996; Leask e Abraham, 2004).

Durante a fase proliferativa do processo de reparação da ferida, os fibroblastos são responsáveis por produzir elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteases, os quais atuam no desbridamento e remodelação fisiológica (Meckmongkol et al.,

2007). A etapa final dessa fase é marcada pela formação do tecido de granulação. Os fibroblastos dos tecidos circundantes migram em direção à ferida, mas requerem ativação para saírem do estado de quiescência (Li et al., 2005). O fator de crescimento mais significativo na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF, seguido pela liberação de TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno do tipo I e a se transformarem em miofibroblastos, os quais promovem a contração da ferida (Barrientos et al., 2008). Em feridas crônicas, a reepitelização é comprometida devido à persistência da inflamação, que inibe a expressão de marcadores que estimulam a migração de queratinócitos (Bhattacharya et al., 2015; Icli et al., 2016).

Durante a fase de maturação ou remodelamento, o colágeno é depositado de forma organizada, inicialmente mais fino que o colágeno normal. A formação do tecido de granulação cessa devido à apoptose das células responsáveis pela sua síntese e manutenção, como fibroblastos e células endoteliais (Mandelbaum et al., 2003; Profyris et al., 2012). Com o amadurecimento da ferida, o colágeno tipo III é substituído por colágeno tipo I, orientado em feixes paralelos. Os miofibroblastos contraem a ferida, reduzindo sua área superficial (Gurtner et al., 2007). Em feridas crônicas, o equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a degradação da antiga é perturbado, especialmente pela ação aumentada de metaloproteinases na ferida diabética, resultando em tecido cicatricial disfuncional (Brem et al., 2007; Goovit et al., 2014).

1.3 Modelo animal

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

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

1.4 Nanotecnologia em feridas

Nanopartículas metálicas, com estruturas que exibem funcionalidade e propriedades biológicas em virtude de seu tamanho reduzido, despertam considerável interesse em diversos campos de pesquisa (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Entre essas, as GNPs recebem destaque especial devido às suas propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas (Daniel e Astruc, 2004). As GNPs têm sido amplamente investigadas por sua biocompatibilidade, atoxicidade, simplicidade de preparação e facilidade de conjugação com biomoléculas (Hainfeld et al., 2006).

Em um cenário onde a inovação é imperativa, a nanotecnologia emerge como uma poderosa aliada na área da saúde, com potencial revolucionário para aprimorar os cuidados médicos (Jeong et al., 2018). Sua aplicação diversificada tem sido cada vez mais explorada, com um crescente entendimento sobre as interações dos nanomateriais com as células e seus efeitos biológicos (Bhattacharya et al., 2008; Arvizo et al., 2012). Diversas técnicas estão disponíveis para produzir nanopartículas (NPs) com precisão de tamanho e forma, permitindo a encapsulação e liberação controlada de moléculas bioativas (Malam et al., 2009). Entre essas, as GNPs se destacam pela sua versatilidade, apresentando capacidade direcionada, baixa toxicidade e alta eficiência de entrega (Ghosh et al., 2017).

As GNPs têm demonstrado promessa no tratamento de diversas condições, incluindo a reparação tecidual, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Victor et al., 2012; Li et al., 2015). A atividade antioxidante das GNPs, influenciada pela sua área superficial, desempenha um papel crucial na neutralização de radicais livres (Medhe et al., 2014; Leu et al., 2012; Esumi et al., 2003). Além disso, as GNPs exibem atividade catalítica na eliminação de radicais livres, aumentando os níveis do fator NRF2 e induzindo a expressão de genes antioxidantes (Rattanata et al., 2015; Wang et al., 2017; Chen et al., 2015).

Estudos demonstram que a aplicação tópica de GNPs acelera a cicatrização, estimulando a produção de colágeno e fatores de crescimento (Kim et al., 2015). Paralelamente, novas formulações contendo nanomateriais estão sendo avaliadas quanto à sua eficácia na cicatrização de feridas (Akturk et al., 2016). Além de suas propriedades antioxidantes, as GNPs também exibem propriedades angiogênicas, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos durante o processo de cicatrização (Li et al., 2015).

A emulsão de nanopartículas metálicas associadas a extratos de plantas surge como uma alternativa promissora, mitigando preocupações com toxicidade e custos (Zhang et al., 2016; Paiva-Santos et al., 2021). Essa abordagem oferece vantagens significativas em termos de segurança e aplicabilidade em comparação com métodos baseados em microrganismos (Paiva-Santos et al., 2021). Estudos indicam o potencial das GNPs associadas com plantas medicinais, como a *C. sativa*, na promoção da cicatrização de feridas e na redução do processo inflamatório (Amjed et al., 2017; Milaneze et al., 2014).

1.5 *Cannabis sativa* no tratamento de feridas

A planta *Cannabis sativa*, da família Cannabaceae, é reconhecida por sua riqueza em canabinoides nos seus topos floridos, os quais interagem com uma variedade de alvos moleculares, incluindo receptores canabinoides e outros componentes do sistema endocanabinoide (Trusler et al., 2015). Recentemente, estudos têm ressaltado a eficácia das terapias à base de *C. sativa* no tratamento da dor, inflamação e cicatrização de feridas (Sangiovanni et al., 2019; Shao et al., 2021).

Com mais de 140 fitocanabinoides identificados, o interesse científico na *C. sativa* cresceu significativamente desde a identificação, na década de 1960, de componentes químicos como o delta-9-tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD) (Gurgel et al., 2019). Estes dois fitocanabinoides são os mais estudados e considerados os mais significantes atualmente, devido à sua capacidade de interação com os receptores canabinoides específicos CB1 e CB2 (Hashemipour et al., 2018).

Enquanto os receptores CB1 predominam no sistema nervoso central e periférico, modulando a excitação e neurotransmissão inibitória, os receptores CB2 estão presentes nas células do sistema imunológico, exercendo funções de imunomodulação (Pertwee et al., 2008). O THC, o fitocanabinoide mais abundante na *C. sativa*, possui alta afinidade pelos receptores CB1 e CB2, porém sua psicoatividade pode restringir seu uso terapêutico (Cuba et al., 2017).

Por outro lado, o CBD, isolado pela primeira vez em 1940, é o principal constituinte não psicotrópico da *C. sativa* (de Freitas et al., 2016). Reconhecido pelo tratamento de diversas doenças como a doença de Alzheimer (Cuba et al., 2017), sepse e inflamação, seu mecanismo exato de ação ainda não foi completamente elucidado, mas parece agir independentemente dos receptores canabinoides,

promovendo seu uso em tratamentos promissores (Fasinu et al., 2016; Hashemipour et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que a ativação dos receptores canabinoides reduz a inflamação, a fibrogênese e estimula a reepitelização durante a cicatrização de feridas na pele (Wang et al., 2016). Além disso, desde os anos 1950, existe um grande interesse na atividade antibacteriana dos canabinoides, com vários estudos evidenciando seu efeito bacteriostático e bactericida, especialmente contra bactérias Gram-positivas (Karas et al., 2020; Klahn et al., 2020).

Atualmente, a pesquisa por curativos medicamentosos inovadores está direcionada ao desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos que assegurem a concentração adequada na ferida, reduzam os intervalos de dosagem e previnam os efeitos colaterais (Mendes et al., 2024). O uso de biomateriais combinados com antioxidantes e anti-inflamatórios tem sido amplamente explorado, e os compostos canabinoides podem representar uma nova abordagem terapêutica para doenças inflamatórias, além de elucidar seu papel nos distúrbios dermatológicos (Trusler et al., 2017).

Entretanto, é importante notar que o tratamento com extrato de *C. sativa* (contendo THC e CBD) em queratinócitos e fibroblastos humanos demonstra uma inibição da liberação de mediadores inflamatórios, a qual parece ocorrer devido ao comprometimento da ativação ou translocação nuclear do NF- κ B, impedindo sua capacidade de induzir a expressão de genes pró-inflamatórios. As células expostas a este extrato apresentam uma redução nos níveis de IL-8, MMP-9 e VEGF, um efeito que não é observado quando expostas apenas ao CBD. Além disso, é interessante observar que compostos canabinoides, incluindo o THC, estão implicados na inibição de certos produtos pró-inflamatórios e mediadores de remodelação da matriz, os quais são reconhecidos por desempenharem papéis significativos no processo de ferida e cicatrização cutânea (Miller et al., 2020).

Embora os dados clínicos sejam escassos, os modelos pré-clínicos demonstram um quadro otimista. Em um estudo conduzido por Sangiovanni et al., (2019), os efeitos do CBD e do extrato de *C. sativa* foram investigados em células de queratinócitos humanos e células de fibroblastos dérmicos humanos. No caso dos queratinócitos, a estimulação com TNF- α levou a um aumento na expressão de 26 genes associados a vias inflamatórias, incluindo quimiocinas como CXCL8 (Interleucina 8) e CXCL10, interleucinas como, IL-1 β e Fator de Crescimento

Endotelial Vascular (VEGF). O tratamento com extrato de *C. Sativa* foi capaz de regular negativamente todos esses 26 genes relacionados à inflamação, enquanto o CBD sozinho mostrou efeito inibitório em 15 deles.

Por outro lado, em células de fibroblastos dérmicos humanos, a exposição ao TNF- α aumentou a expressão de 16 genes envolvidos no processo de cicatrização de feridas. Mais uma vez, o extrato de *C. sativa* mostrou sua eficácia ao regular negativamente todos esses genes, enquanto o CBD sozinho teve impacto em apenas 11 genes, sem demonstrar efeito inibitório em genes associados à inflamação e remodelação da matriz, como IL-6 (interleucina 6) e MMP-9 (matriz metalopeptidase 9) (Sangiovanni et al., 2019).

Estes resultados sugerem que os componentes adicionais presentes no extrato de canabinóides, tais como outros canabinóides, flavonóides e terpenos, podem potencializar um efeito anti-inflamatório sinérgico, superando o efeito do CBD isolado. Tal extrato é amplamente conhecido como *full spectrum*, por conter todos os canabinoides (incluindo o THC), além de flavonoides e terpenos. O extrato que não apresenta THC, mas mantém todos os demais canabinóides e fitoquímicos da planta é conhecido como *broad spectrum* (Berthold et al., 2023). Contudo, é crucial ressaltar a necessidade de estudos pré-clínicos mais robustos e ensaios clínicos para obter uma conclusão definitiva sobre a resposta cutânea de cicatrização de feridas do CBD e seus compostos relacionados (Sangiovanni, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar os efeitos do tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *Cannabis sativa* em um modelo de ferida crônica em camundongos Swiss.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o potencial do tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa* e do extrato de *C. sativa* isolado em lesões epiteliais crônicas através da:

- Quantificação da área (cm²) da ferida para avaliar a contração do tecido epitelial nos dias 1, 11 e 18 do tratamento;
- Quantificação do infiltrado inflamatório e áreas de colágeno através de análise histológica após 7 dias de tratamento;
- Avaliação a expressão gênica (RT-PCR) de NRF2, colágeno tipo I e colágeno tipo III;
- Quantificação dos níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL1 β , TNF- α , IL4, IL10 e TGF- β) após 7 dias de tratamento;
- Avaliação a produção de oxidantes, níveis de dano oxidativo e atividade do sistema antioxidante após 7 dias de tratamento.

3 METODOLOGIA

3.1 Procedimentos Éticos

Este projeto foi submetido para Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da UNESCO sendo aprovado com número de protocolo 10/2024 em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7). Esta pesquisa também seguiu as Diretrizes ARRIVE 2.0 (Percie du Sert et al., 2020).

3.2 Síntese Das Nanopartículas

A nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa* foram obtidas pelo método de inversão de fases (Pires, 2023). Na fase aquosa foram adicionados o surfactante tween 80 (1%) e 100mL 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 400 rpm até o resfriamento.

A formação dos GNPs e nano Cannabis 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 potencial zeta da amostra foi medido através da diluição do gel em água deionizada até uma concentração de 0,01%p de GNP + *C. sativa*. O valor de potencial zeta registrado representa a média dos valores medidos pelo equipamento (Zetasizer Nano ZS, Malvern), o qual calcula a mobilidade eletroforética das partículas e converte está para potencial zeta mediante a equação de Smoluchowski.

Para determinar os grupos funcionais presentes nos géis, foi usada a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker).

3.3 Extrato de *Cannabis sativa*

Para a realização deste estudo, foi utilizado um extrato de *Cannabis sativa* do tipo *full spectrum*, denominado *Whole* (6000 mg), da marca *Revivid*[®], contendo até 0,3% de THC. Esse extrato inclui uma ampla gama de compostos bioativos, como terpenos, fenóis, proteínas, antioxidantes e flavonoides, proporcionando um efeito entourage, fenômeno no qual os diferentes fitocanabinoides e metabólitos secundários atuam de forma sinérgica, potencializando seus efeitos biológicos.

3.4 Animais

Foram utilizados 96 camundongos Swiss machos com as seguintes características: 60 dias de vida, com peso entre 30-45 g, provindos da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x largura 20 cm x altura 13 cm), distribuídos em 5 animais por caixa, colocados sobre estantes e sobre os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente será controlada entre $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*.

Os animais foram tricotomizados e logo após induzidos a lesão epitelial aguda ou crônica de acordo com seus respectivos grupos. Foram distribuídos randomicamente em 8 grupos experimentais (n = 12) sendo 5 animais para histologia, e o restante foi destinado para análises bioquímicas e moleculares.

- I. (FA): Ferida Aguda - sem tratamento local ou sistêmico;
- II. (FC): Ferida Crônica induzida com Resiquimod - sem tratamento local ou sistêmico;
- III. (FC+C50mg): FC + tratamento com extrato de *Cannabis sativa* (50mg/kg);
- IV. (FC+C100mg): FC + tratamento com extrato de *Cannabis sativa* (100mg/kg);
- V. (FC+C200mg): FC + tratamento com extrato de *Cannabis sativa* (200mg/kg);
- VI. (FC+NanoC50mg): FC + tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *Cannabis sativa* (50mg/kg);

- **VII.** (FC+NanoC100mg): FC + tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *Cannabis sativa* (100mg/kg);
- **VIII.** (FC+NanoC200mg): FC + tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *Cannabis sativa* (200mg/kg).

3.5 Lesão Epitelial

O modelo de lesão epitelial aguda foi induzido como descrito por Carvalho et al. (2006). Em todos os animais foi retirado segmento de pele total no dorso dos animais. Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. A região medial-dorsal, entre a linha infraescapular e a cauda, foi removida com uma incisão cirúrgica de forma circular com diâmetro de aproximadamente 2cm².

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

O Resiquimod R848 (tlrl-r848) foi dissolvido em água estéril sem endotoxinas para gerar uma solução estoque de 5mL de Resiquimod (15,9mM). A solução de trabalho de Resiquimod consistiu em 593 μ L de água deionizada, 7,5 μ L de *Tween* 80 (9005656), 750 μ L de propilenoglicol (82280) e 135 μ L da solução estoque de Resiquimod R848 (1,4mM). A solução de trabalho foi preparada em um tubo de 3mL e aplicada em todas as feridas.

Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. Cada camundongo recebeu uma incisão cirúrgica de forma circular com diâmetro de aproximadamente 2cm², 100 μ L da solução de trabalho de Resiquimod R848 1,4mM foram aplicados topicamente por 4 dias. Após 6 dias do último dia de aplicação de Resiquimod, iniciou-se o tratamento dos animais.

3.6 Tratamento

Posteriormente aos 4 dias de indução da lesão crônica, foram esperados 6 dias para o desenvolvimento da lesão. Os tratamentos foram iniciados então no sétimo dia após a última aplicação do Resiquimod, e realizados diariamente até o sétimo dia. Foi

utilizada uma nanoemulsão de GNPs (20 nm, 12,5 ug/mL), com extrato de *C. sativa*. O tratamento tópico teve duração de 7 dias, onde foi aplicado diariamente 500 µl de extrato de *C. sativa* em gel ou nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa* e, após a aplicação, foi esperado 10 minutos para absorção antes da devolução dos animais às suas respectivas caixas. Após 24 horas do último dia de tratamento tópico, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e mortos por decapitação em guilhotina (figura 2). Em seguida, a pele/lesão de 5 animais de cada grupo foi retirada com margem de segurança de 0,5 cm para análise histopatológica. O restante foi destinado para análises bioquímicas e moleculares.

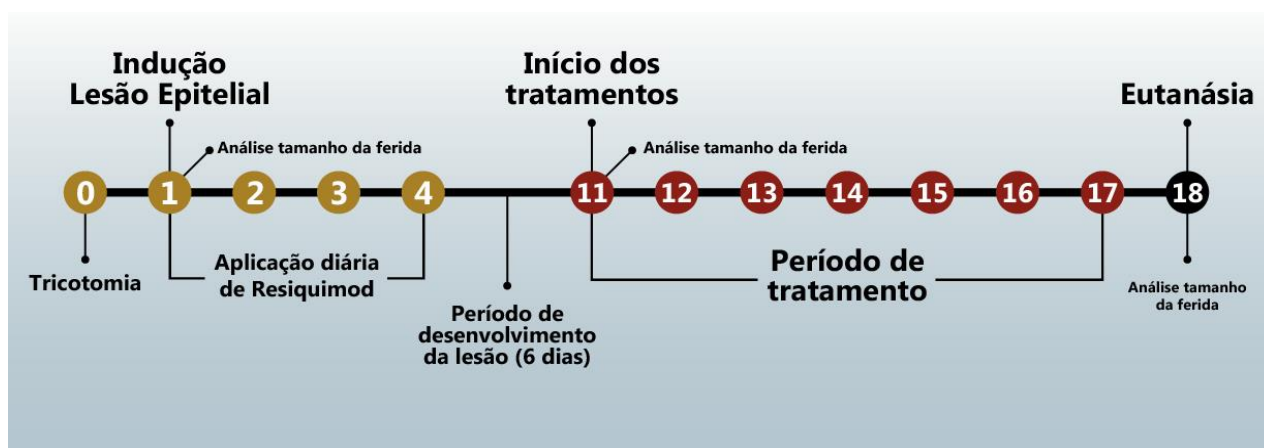


Figura 2. Desenho experimental (Figura elaborada pelo autor, 2024). No dia anterior à indução da lesão epitelial (denominado como dia 0 na figura), procedeu-se à tricotomia dos animais. No dia 1, realizou-se a indução da lesão epitelial e a análise fotográfica para mensuração do tamanho das feridas. Ao longo dos 4 dias subsequentes, aplicou-se Resiquimod diariamente. A partir do 4º dia, iniciou-se o período de desenvolvimento da lesão, com duração de 6 dias. O período de tratamento ocorreu entre os dias 11 e 17. Vinte e quatro horas após o último dia de tratamento (no 18º dia), os animais foram submetidos à eutanásia.

3.7 Eutanásia

Após 24 horas do último tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e foram levados a eutanásia por decapitação. A partir disso, a borda externa da ferida foi cirurgicamente removida e imediatamente processada e armazenada em freezer -80 °C para posteriores análises bioquímicas, histopatológicas e moleculares. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos próprios para descarte de material biológico e armazenado em freezer em uma câmara de congelamento científica com temperatura -20° C, da UNESC, até o recolhimento pela empresa responsável. Todos os pesquisadores envolvidos no projeto utilizaram equipamento de proteção individual requerido para cada etapa do estudo.

3.8 Análise Do Tamanho Das Feridas

O método fotográfico é uma alternativa precisa para aferir a área da ferida, revelando-se uma técnica adequada para feridas em diversas condições, sejam elas limpas, contaminadas ou não. Fotografias digitais das feridas foram capturadas em uma resolução de 3264x2448 pixels e posteriormente analisadas utilizando o software IMAGEJ® 1.51. As imagens das lesões foram adquiridas nos dias 1, 11 e 18 do tratamento, permitindo uma avaliação visual da evolução do processo de cicatrização, além de possibilitar a mensuração de suas dimensões (área, comprimento e largura). Essas medidas foram calculadas com base na variação das áreas das feridas ao longo desse período, expressas em centímetros quadrados. Para garantir a consistência dos resultados, todas as mensurações foram realizadas pelo mesmo pesquisador, que efetuou cinco medições para cada ferida e utilizou o valor médio como representativo.

3.9 Análise Histológica

As amostras de tecido cutâneo de cinco animais por grupo foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras retiradas foram fixadas por 48 horas na mesma solução (PFA 10%), e posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5µm de espessura. Quantificações histológicas da infiltração de leucócitos foram realizadas com hematoxilina-eosina. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, e foram capturados quatro campos oculares por corte (4 animais/grupo). As imagens foram gravadas com o auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas no *software NIH ImageJ 1.36b* (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear de células inflamatórias (HeE). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD).

3.10 Testes Moleculares e Bioquímicos

3.10.1 RT-PCR

A expressão gênica do colágeno tipo III e da fibronectina foi analisada por meio de PCR em Tempo Real. A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente

TRIzol® (Life Technologies), seguindo rigorosamente os protocolos fornecidos pelo fabricante. O RNA extraído foi dissolvido em 30µl de água Milli-Q tratada com 0,1% DEPC (Sigma), consolidado em um tubo único e armazenado a -20°C. A quantificação do RNA total foi efetuada por espectrofotometria nas absorvâncias de 260 nm e 280 nm, sendo a razão entre 260/280 nm utilizada para verificar possíveis contaminações por proteínas. Foram considerados de alta qualidade os RNAs cuja razão 260/280 nm estivesse entre 1,8 e 2,0. Posteriormente, a síntese do DNA complementar (cDNA) foi conduzida por meio da transcriptase reversa M-MLV, que gera uma fita de cDNA a partir do RNA de fita simples. Por fim, a PCR em tempo real foi realizada utilizando o corante SYBR Green, conhecido por se ligar de forma específica ao DNA de fita dupla, permitindo a detecção do produto amplificado em tempo real à medida que os ciclos da reação avançam (Bustin, 2002).

3.10.2 Marcadores Inflamatórios

Com o objetivo de quantificar a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de interesse, foi empregado o método de imunoenensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando a técnica de sanduíche indireto (DuoSet ELISA) e amostras das estruturas avaliadas em duplicatas. Primeiramente, as amostras foram homogeneizadas em um tampão de lise contendo inibidores de proteases, visando preservar o conteúdo proteico das amostras. Após o preparo adequado das amostras, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico, diluído na proporção de 1:100, e deixadas em incubação durante a noite a uma temperatura de 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de lavagem contendo Tween 20 e NaCl, bloqueadas com ELISA/ELISPOT Diluent e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras dos tecidos de interesse foram pipetadas em duplicata na placa, utilizando 100 µl sobre os respectivos anticorpos de captura. Após uma incubação de duas horas, as placas foram submetidas a uma nova lavagem para remover ligações inespecíficas. Na etapa seguinte, foi adicionado o anticorpo de detecção, que se ligou aos antígenos da amostra, formando um "sanduíche" de anticorpo e amostra. Após nova incubação à temperatura ambiente e lavagem subsequente, foi adicionada uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP), seguida pelo substrato cromogênico, tetrametilbenzidina (TMB). A presença da HRP resultou em uma coloração azul

específica na presença do TMB. Para interromper esta reação, foi adicionado ácido sulfúrico diluído (50µl por poço). As concentrações das citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10) e fatores de crescimento (TGF- β) foram determinadas pela leitura da absorbância a 450 nm em um espectrofotômetro (BIO-RAD, modelo 680).

3.10.3 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.10.3.1 Oxidantes

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

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

3.10.3.2 Marcadores de Danos Oxidativos

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹.cm⁻¹.

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

3.10.3.3 Atividades das Enzimas Antioxidantes

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm) segundo Bannister e Calabrese (1987). As amostras de homogenato de tecido epitelial foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15ul foram retiradas da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 ul adrenalina (60mM em água destilada +15 ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 05 min. em intervalos de 10s e medido espectrofotometricamente a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

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

3.10.3.4 Determinações do Conteúdo Proteico

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

3.11 Procedimento Para Análise De Dados

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

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das GNPs

A figura 2 mostra a Análise de Espectrofotômetro UV-Vis, confirmando a formação das GNPs. A análise UV-Vis mostrou picos máximos de absorção característicos de GNPs (525 nm). O comprimento de onda obtido confirma a formação de nanopartículas metálicas. Na tabela 1 encontram-se os resultados da distribuição de tamanho médias e potencial zeta dos diferentes géis. O resultado indica alta estabilidade coloidal, com valores mais negativos na formulação em gel. A figura 3 analisa os grupos funcionais presentes nos géis e para isso foi usada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A imagem mostra que as formulações não tiveram reações químicas entre si, mantendo a integridade e funções biológicas dos grupos funcionais.

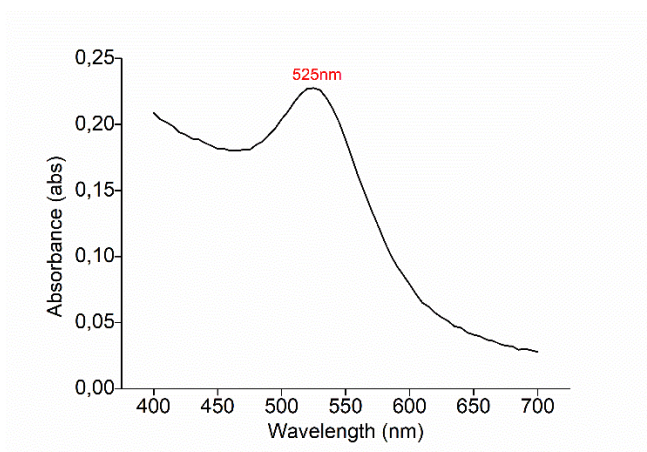


Figura 2: Espectro de absorbância por UV-Vis das nanopartículas de ouro, com pico em 525 nm, indicando a ressonância do plasmom de superfície.

AMOSTRAS	RESULTADO
Nanoemulsão GNP+C. <i>sativa</i>	-40.6 ± 1.05 (mV)
Nanoemulsão GNP+C. <i>sativa</i> + gel	-75.8 ± 4.15 (mV)

Tabela 1: Potencial zeta das nanoemulsões contendo GNPs e *Cannabis sativa*, indicando alta estabilidade coloidal, com valores mais negativos na formulação em gel.

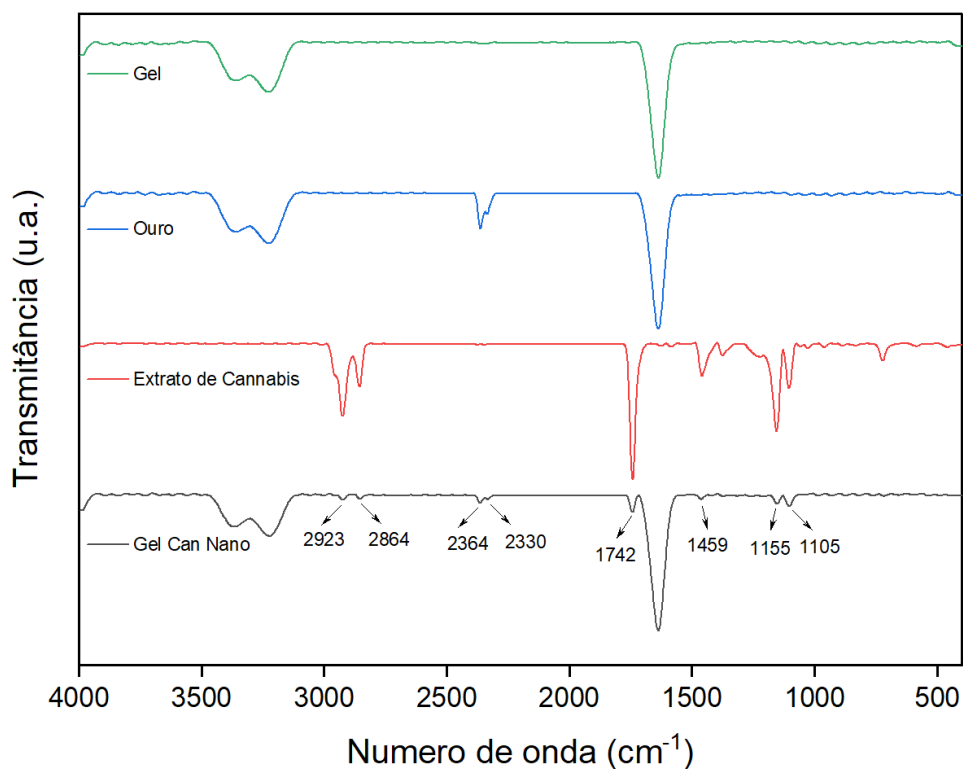


Figura 3: A imagem mostra a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

4.2 Análise da contração da ferida

Em relação à área de contração da ferida, representada na figura 4, no 11^o dia após a indução do modelo de ferida crônica e antes do início dos tratamentos, observou-se que todos os grupos apresentaram menor área de contração da ferida quando comparados ao grupo FA (valor de $p < 0,05$). No 25^o dia, que caracteriza o décimo dia após os devidos tratamentos, observou-se que o grupo FC apresentou menor área de contração da ferida quando comparado com o grupo FA ($p < 0,05$). Além disso, todos os grupos tratados apresentaram maior área de contração da ferida quando comparados ao grupo FC, sendo que os grupos FC + C200mg, FC + NanoC50mg, FC + NanoC100mg e FC + NanoC200mg apresentaram valor de $p < 0,001$.

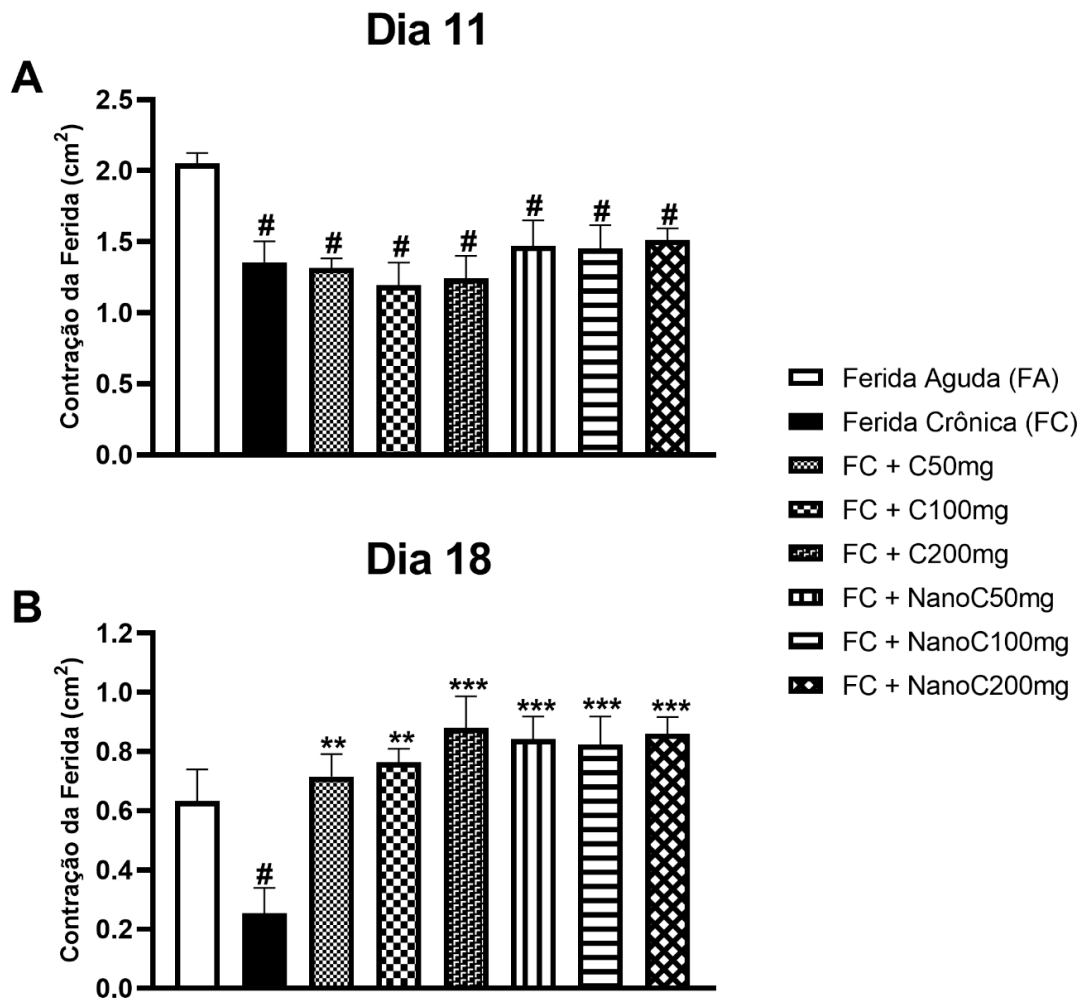
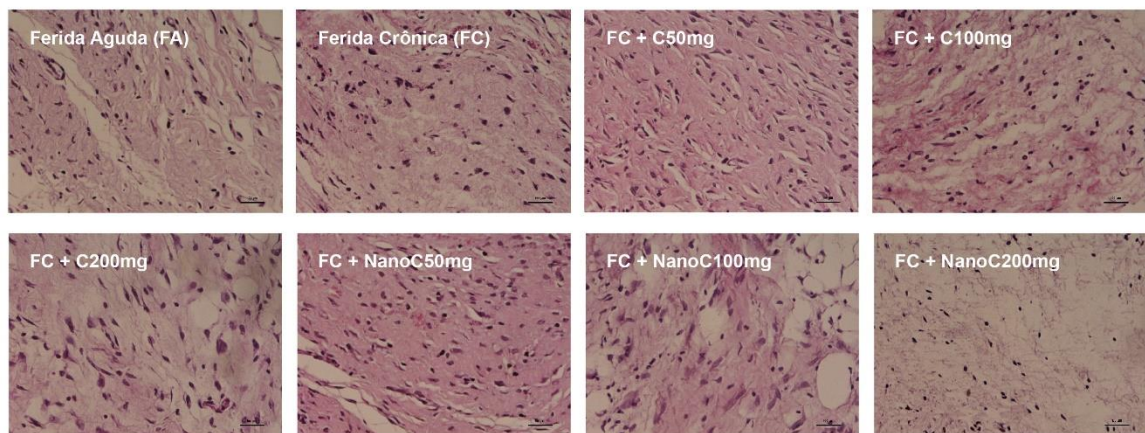


Figura 4. Análise da contração da ferida em cm^2 nos diferentes grupos de tratamento. A figura A representa a área de contração da ferida no 11º dia. A figura B representa a área de contração da ferida no 18º dia. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,5$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). (n=12) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.3 Análise Histológica

Na figura 5A observa-se imagens representativas de cortes histológicos da ferida, corados com HeE, e na figura 5B as quantificações da média de número de infiltrado inflamatório. Os resultados demonstram aumento significativo nos grupos FC, FC + C50mg e FC + C100mg em relação ao grupo FA ($p < 0,05$). Contudo os grupos FC + NanoC50mg, FC + NanoC100mg e FC + NanoC200mg demonstraram diminuição significativa em relação ao grupo FC ($p < 0,001$).

A)



B)

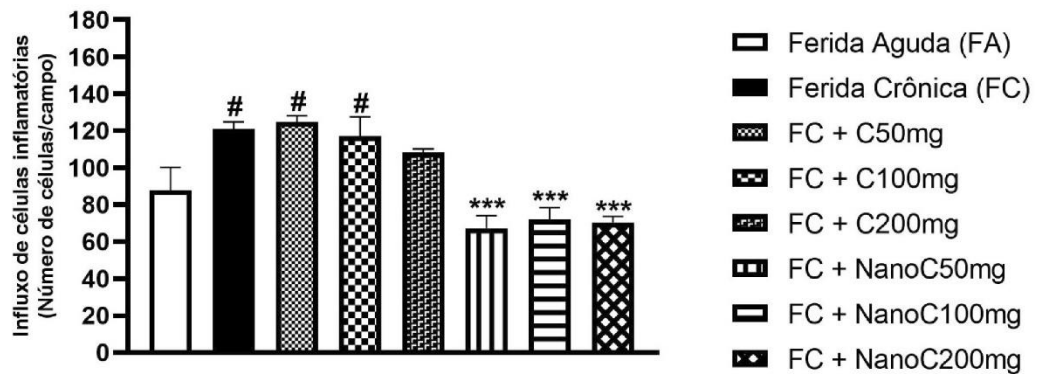


Figura 5. Análise histológica do influxo de células inflamatórias nos diferentes grupos de tratamento. A figura A apresenta as imagens representativas dos grupos experimentais. A figura B representa quantitativamente o influxo de células inflamatórias. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,5$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; e $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $< 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). (n=12) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.4 Análise de expressão gênica por PCR

Para avaliação da expressão gênica de NRF2, colágeno tipo I e colágeno tipo III foi realizada a técnica de PCR (figura 6). O grupo FC apresentou menor expressão quando comparado ao grupo FA apenas na análise de NRF2 (figura 6A, $p < 0,05$). Ao analisar os resultados dos grupos tratados, os grupos FC + C100mg, FC + C200mg e FC + NanoC200mg apresentaram aumento significativo na expressão gênica de NRF2 quando comparado ao grupo FC ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa em relação ao nível de colágeno tipo I (figura 6B).

Em relação ao colágeno tipo III (figura 6C), o grupo FC + NanoC200mg demonstrou um aumento significativo em relação a FA ($p < 0,05$) e um aumento significativo em relação ao grupo FC ($p < 0,001$).

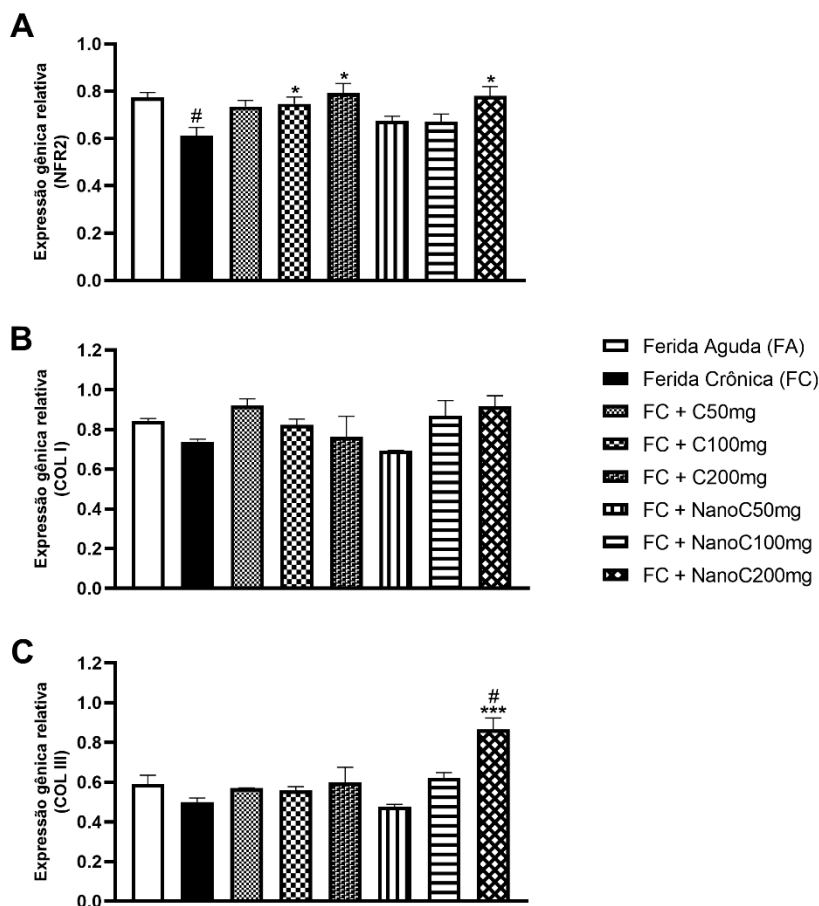


Figura 6. Análise da expressão gênica de NRF2 (figura 6A), colágeno tipo I (figura 6B) e colágeno tipo III (figura 6C) por PCR nos diferentes grupos de tratamento. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,5$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC) e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). (n=12) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.5 Análise de citocinas pró-inflamatórias

Na figura 7 estão representados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (figura 7A) e IL-1 β (figura 7B). Na figura 7A observa-se que o grupo FC apresentou aumento significativo dos níveis de TNF- α quando comparados ao grupo FA ($p < 0,05$), já nos grupos FC + C200mg ($p < 0,05$), FC + NanoC50mg e FC + NanoC200mg ($p < 0,01$) os níveis proteicos dessa citocina diminuíram quando comparados ao grupo FC.

Na figura 7B, o grupo FC, FC + C50mg e FC + C100mg apresentaram aumento dos níveis proteicos de IL-1 β ($p < 0,05$) comparados ao grupo FA. No entanto, os grupos FC + C50mg ($p < 0,05$), FC + C200mg e FC + NanoC100mg ($p < 0,01$), FC + NanoC50mg ($p < 0,001$) e FC + NanoC200mg ($p < 0,0001$) apresentaram diminuição nos níveis de IL-1 β comparados ao grupo FC.

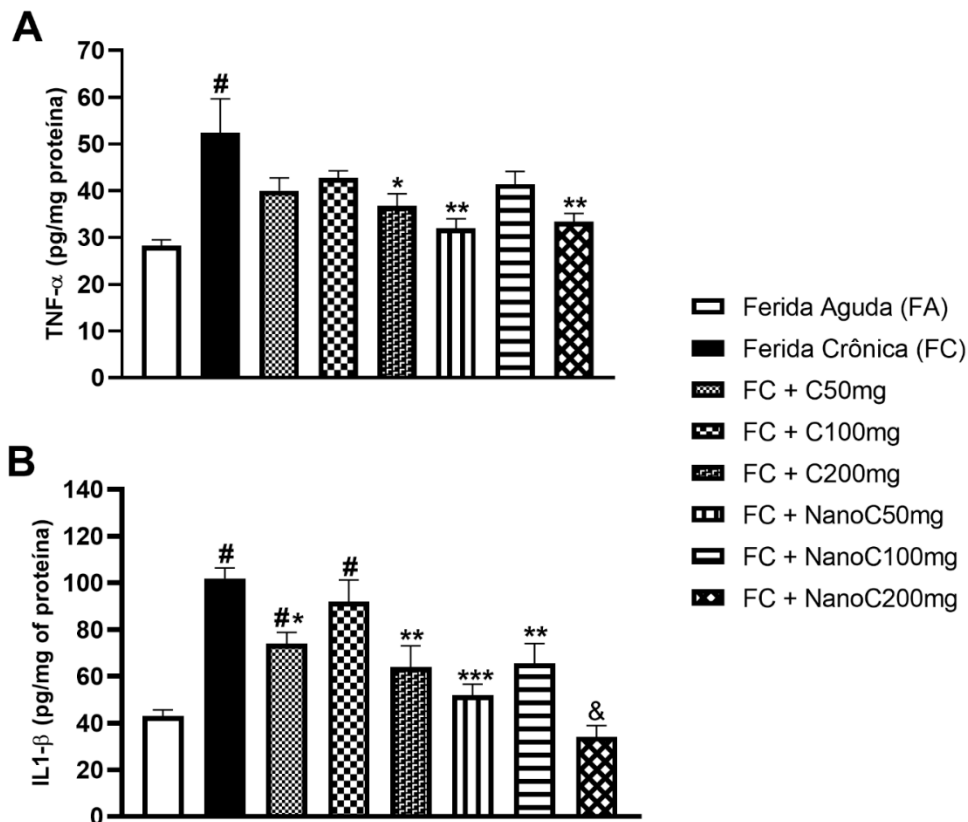


Figura 7. Quantificação dos níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (figura 7A) e IL-1 β (figura 7B) nos diferentes grupos de tratamento. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,5$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; & $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). ($n=12$) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.6 Análise de citocinas anti-inflamatórias

A figura 8 demonstra os resultados referentes aos níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias IL10 (Fig. 8A), IL 4 (Fig. 8B) e fator de crescimento TGF- β (Fig. 8C). Os grupos FC, FC + C50mg, FC + C100mg e FC + NanoC50mg apresentaram diminuição significativa de IL10 em relação ao grupo FA (figura 8A). Todavia os níveis de IL10 apresentaram-se maior nos grupos FC + C200mg, FC + NanoC100mg e FC + NanoC200mg ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo FC. No entanto, quando analisados os níveis proteicos de IL4, apenas o grupo FC + NanoC200mg ($p < 0,05$) apresentou aumento nos níveis desse marcador quando comparados ao grupo FC. Os demais grupos apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo FA ($p < 0,05$).

Na análise dos níveis do fator de crescimento TGF- β (figura 8C), apenas os grupos FC + NanoC100mg e FC + NanoC200mg apresentaram aumento significativo em relação ao grupo FC ($p < 0,05$).

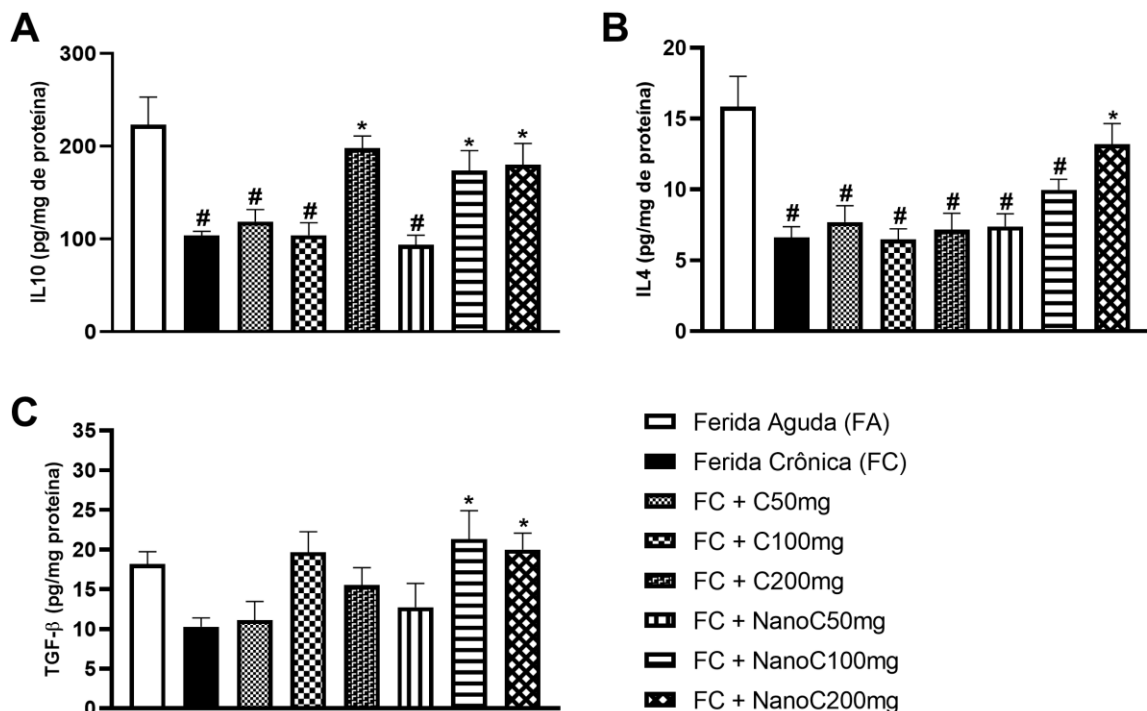


Figura 8. Quantificação dos níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias IL10 (figura 8A), IL4 (figura 8B) e TGF- β (figura 8C) nos diferentes grupos de tratamento. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). (n=12) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.7 Análise do nível de oxidantes

Os níveis de DCF e nitrito foram utilizados como parâmetros oxidativos (figura 9). Em relação os níveis de DCF (figura 9A) os grupos FC, FC + C50mg, FC + C100mg, FC + C200mg, FC + NanoC50mg apresentaram um aumento quando comparados ao grupo FA ($p < 0,05$). O contrário foi observado nos grupos FC + NanoC100mg ($p < 0,05$) e FC + NanoC200mg ($p < 0,01$), onde os níveis de DCF diminuíram significativamente quando comparados ao grupo FC.

Na figura 9B os níveis de nitrito apresentaram-se aumentados no grupo FC ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo FA. E apenas o grupo FC + NanoC200mg ($p < 0,05$) apresentou diminuição significativa desses níveis comparados ao grupo FC.

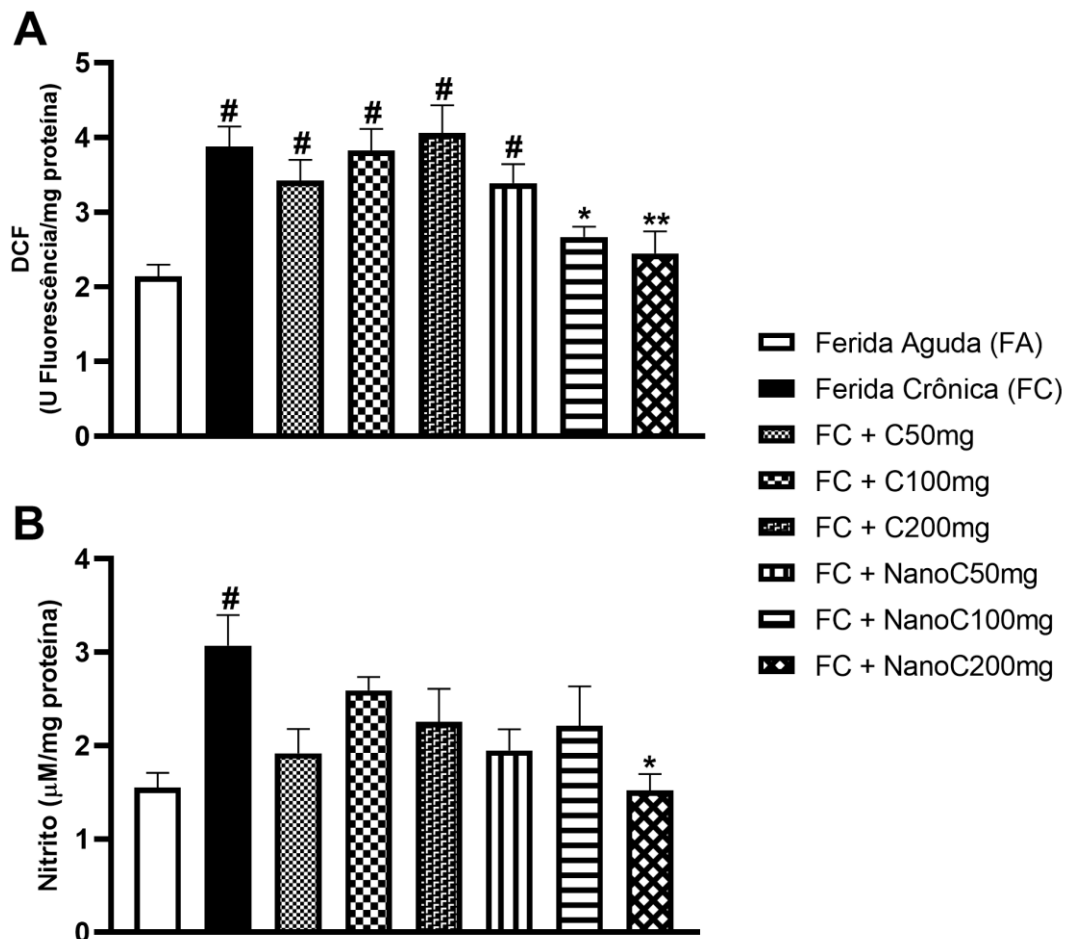


Figura 9. Quantificação dos níveis de oxidantes: DCF (figura 9A) e Nitrito (figura 9B) nos diferentes grupos de tratamento. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). (n=12) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.8 Marcadores de dano oxidativo e antioxidantes

A figura 10 apresenta os marcadores de dano oxidativo e os níveis de enzimas antioxidantes. Como marcadores de dano oxidativo foram analisados os níveis de carbonil (figura 10A) e o conteúdo de sulfidrilas (figura 9B). Em relação a carbonilação de proteínas o grupo FC apresentou aumento significativo em relação ao grupo FA ($p < 0,05$). Já os grupos tratados apresentaram diminuição significativa nos níveis desse marcador sendo os grupos FC + C50mg ($p < 0,01$), FC + C100mg, FC + C200mg e FC + NanoC200mg ($p < 0,001$), FC + NanoC50mg e FC + NanoC100mg ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo FC. A figura 10B representa o conteúdo de sulfidrilas, onde somente o grupo FC + NanoC200mg apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo FA ($p < 0,001$).

Na figura 9C a atividade de GSH apresentou-se diminuídas em todos os grupos comparados ao grupo FA ($p < 0,05$), exceto o grupo FC + NanoC200mg. A atividade de superóxido dismutase está representada na figura 10D, em que demonstra uma diminuição significativa no grupo FC quando comparados ao grupo FA ($p < 0,05$). Os grupos FC + NanoC100mg ($p < 0,0001$) e FC + NanoC200mg ($p < 0,05$) apresentaram aumento significativo em relação ao grupo FC.

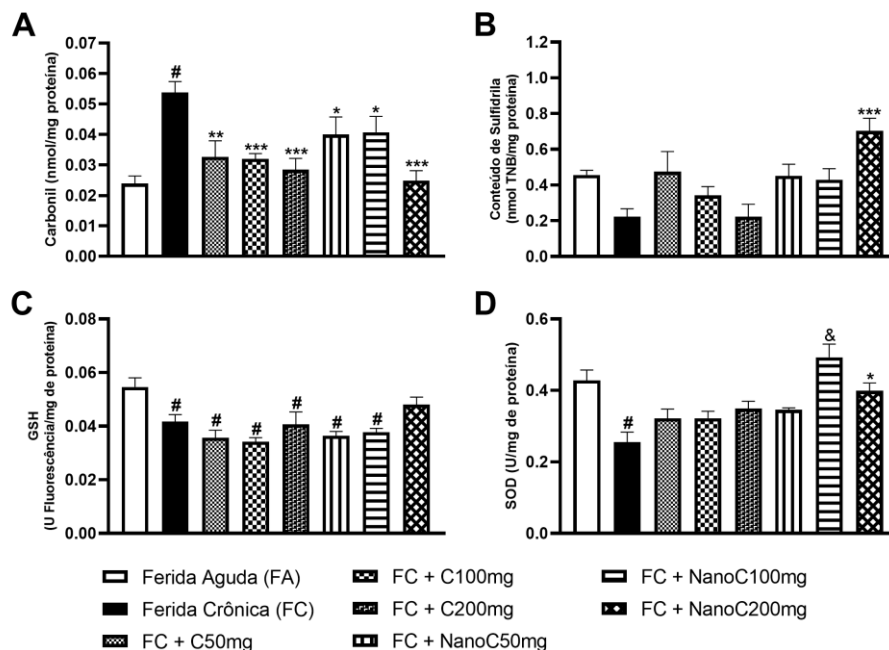


Figura 10. Análise dos marcadores de dano oxidativo: Carbonil (figura 10A) e Conteúdo de Sulfidrilas (figura 10B) e de defesa antioxidante: GSH (figura 10C) e SOD (figura 10D) nos diferentes grupos de tratamento. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Crônica (FC); ** $p < 0,01$ v.s Grupo FC; *** $p < 0,001$ v.s Grupo FC; e $p < 0,0001$ v.s Grupo FC; e # $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida Aguda (FA). (n=12) (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A patogênese de feridas crônicas está associada a diversas respostas fisiológicas alteradas que são comprometidas e juntas falham em resolver o processo regenerativo. Nesse contexto se incluem estresse oxidativo e condições de inflamação sustentada com níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias. São mecanismos com alta complexidade que têm uma grande contribuição para a migração e diferenciação celular prejudicada (Zhao et al., 2016). Entre as principais dificuldades no tratamento de feridas epiteliais está o desafio no tratamento para que o processo de cicatrização não seja retrocedido com um processo de cicatrização excessivamente atrasado e incompleto (Gould et al., 2015). A literatura evidencia uma alta prevalência (Freitas et al., 2011) e incidência (Luz et al., 2010; Souza et al., 2010) de feridas em idosos institucionalizados e em pacientes hospitalizados no Brasil (Vieira et al., 2018). No entanto, essa condição não se restringe apenas aos idosos, acometendo a população em geral e configurando-se como um problema de saúde pública devido aos elevados índices e custos associados ao tratamento (Morais et al., 2008). A extensão prolongada da fase inflamatória é uma das principais causas que impedem a formação adequada do tecido de granulação, aumentando a vulnerabilidade a infecções (Zhao et al., 2016). Portanto, o presente estudo é proposto para desenvolver estratégias terapêuticas capazes de ajustar a resposta inflamatória e atuar de forma integral em diferentes fases da regeneração tecidual.

A maioria dos modelos de feridas pré-clínicas disponível atualmente não levam em consideração a inflamação prolongada e, portanto, consistem basicamente em modelos de feridas agudas, que não retratam as condições clínicas observadas na cicatrização de feridas crônicas (Velnar et al., 2009). Sendo assim, a fim de mimetizar o ambiente inflamatório disfuncional presente nas feridas crônicas, foi utilizado Resiquimod de forma tópica. Este medicamento pertence à classe das imidazoquinolinaminas e é um agonista dos receptores TLR 7 e 8, capaz de estimular a produção de TNF- α e outras citocinas (Dockrell e Kinghorn, 2001). Esse composto é empregado no tratamento tópico de lesões cutâneas, embora seu uso esteja associado a inflamação local como efeito colateral (Holzer-Geissler et al., 2022; Stockfleth et al., 2019). Com base nisso este estudo analisou como a inflamação prolongada pode afetar o processo de cicatrização de feridas. A condição inflamatória foi avaliada através da medição da área de contração da ferida, juntamente com

análises histológicas, níveis de expressão gênica de colágeno tipo III e mediadores inflamatórios.

Ao mensurar e quantificar a área total da lesão em cm², os resultados desta pesquisa demonstram que todos os grupos apresentaram maior contração da ferida quando comparado ao grupo Ferida Aguda (FA), com destaque maior para os grupos tratados com alta concentração de extrato de *C. sativa* e os grupos tratados com nanoemulsão GNPs e extrato de *C. sativa*. Segundo Baswan et al. (2020) o processo de fechamento de feridas é influenciado pela sinalização do sistema endocanabinóide, pois modula a proliferação e diferenciação epidérmica, as funções dos fibroblastos e melhora a inflamação cutânea. Entretanto este resultado indica que apesar da *C. sativa* atuar de forma importante na redução da área da ferida através de seus efeitos bioestimulatórios, os tratamentos associados com GNPs se mostraram mais eficazes na redução do tamanho da ferida.

Estudos recentes demonstraram que as GNPs apresentam a capacidade de suprimir a inflamação, melhorar a angiogênese e promover a regeneração tecidual (Xu et al., 2020). Esses efeitos estão associados às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que tornam as GNPs promissoras no tratamento de doenças inflamatórias e lesões teciduais (Akhtar et al., 2020). Os mecanismos subjacentes à atividade anti-inflamatória das GNPs incluem a inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1β e TNF-α (Zhao et al., 2021). Adicionalmente, as GNPs têm sido aplicadas para estimular a formação de vasos sanguíneos, reduzir o estresse oxidativo e modular a função dos fibroblastos (Chang et al., 2020).

A aplicação biológica das GNPs tem apresentado resultados promissores, graças às suas propriedades de funcionalização, biocompatibilidade, permeabilidade celular facilitada e elevada capacidade de potencializar o efeito terapêutico de fármacos, influenciando a farmacocinética, a biodistribuição ou a absorção celular (Bhattacharya, 2008; Arvizo et al., 2012). Isso se deve à complexidade dos eventos celulares simultâneos presentes na fisiopatologia da ferida crônica, demandando o desenvolvimento de abordagens terapêuticas combinadas que atuem em diferentes etapas do processo regenerativo (Patel et al., 2019).

No processo inflamatório sinais químicos são emitidos por microorganismos mortos e por células locais, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos levando ao influxo desses microorganismos ao local lesado (Broughton et al., 2006). As pesquisas

demonstraram que as GNPs e o extrato de *C. sativa* podem ser terapias seguras e eficientes para diminuir a inflamação e potencializar a cicatrização de feridas (Sunda et al., 2020; Yao et al., 2022; Casagrande et al., 2023). Fato esse que pode ser confirmado a partir da análise histológica do presente estudo, onde é possível observar que o tratamento mostrou diminuição significativa do influxo de células inflamatórias nos grupos tratados com nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa*. Assim como na análise do nível de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL1 β , onde evidenciou-se uma diminuição significativa nos grupos tratados com GNPs e também no grupo tratado com alta concentração de extrato *C. sativa*.

A modulação da infiltração leucocitária por meio das nanopartículas evidencia a capacidade de controlar a fase inicial do processo inflamatório. Esse efeito é alcançado pela significativa redução da interação entre os leucócitos e o endotélio, mediada pela diminuição na expressão de moléculas de adesão, o que limita o recrutamento dessas células ao espaço intersticial (Aili et al., 2023). Além disso, a redução do infiltrado inflamatório está diretamente associada à inibição da fosforilação de I κ B α e à supressão da expressão ou atividade do NF κ B (Liu et al., 2017). Como resultado, observa-se uma menor presença de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos, assim como uma redução na expressão de ICAM-1 nas células endoteliais, o que compromete a adesão firme dos neutrófilos à superfície endotelial. Esses mecanismos culminam em uma atenuação da resposta inflamatória exacerbada, promovendo um processo de reparo mais eficiente e controlado (Aili et al., 2023).

Nas feridas crônicas, os estímulos nocivos são variados e recorrentes, o que amplifica a resposta inflamatória e resulta em uma infiltração excessiva de neutrófilos no local da lesão (Zhao et al., 2016). Esse acúmulo de neutrófilos intensifica a fagocitose, levando a uma produção elevada de EROs. Como consequência, ocorre dano direto à matriz extracelular (MEC), senescência celular prematura e, principalmente, um desequilíbrio na secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e seus inibidores (Eming et al., 2007).

Além disso, os macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (M1) também contribuem para essa desregulação ao produzir citocinas como IL-1 β e TNF- α , que aumentam a síntese de metaloproteinases de matriz (MMPs) e reduzem os níveis de inibidores teciduais (TIMPs) (Mast, 1996). Esse desequilíbrio contínuo favorece a degradação da MEC, prejudica a migração celular e diminui a proliferação de fibroblastos. Como resultado, formam-se subprodutos que ativam cascatas de

sinalização inflamatória, alimentando um processo inflamatório persistente e difícil de resolver (Zhao et al., 2016). Recentemente, no estudo realizado por Ni et al. (2019), foi demonstrado que as GNPs podem controlar a resposta inflamatória por meio da regulação dos fenótipos de macrófagos (M1 e M2) e, portanto, gerar um microambiente com níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias e maior número de citocinas anti-inflamatórias (Mendes et al., 2022). Em adição, a ação anti-inflamatória pode estar relacionada aos efeitos atribuídos à sua capacidade de inibir a ativação do NF- κ B (Wang, Chang e Wu, 2018), uma vez que a inibição do NF- κ B é conhecida por regular negativamente a expressão de COX-2 e iNOS, suprimindo, assim, a resposta inflamatória (Karthikeyan, Senthil e Min, 2020). Outro mecanismo sugerido envolve a interação direta das GNPs com a IL-1 β , inibindo sua ligação ao receptor correspondente, conforme demonstrado por Mendes et al. (2020). Neste estudo, o uso de GNPs na cicatrização de feridas resultou na redução de citocinas pró-inflamatórias e no aumento das citocinas anti-inflamatórias, corroborando os achados do presente estudo.

Associado a isso, Naya (2024) mostrou que o CBD, um dos canabinóides mais estudados presentes na *C. sativa*, pode mitigar respostas inflamatórias por meio de uma modulação multifacetada de componentes-chave dentro da rede de sinalização NF- κ B e interações com outros fatores de transcrição relevantes. Além de impactar a interação entre fatores de transcrição, como o NRF2 e NF- κ B, aumentando a expressão de ativadores de NRF2 e promovendo sua atividade transcricional, por fim, inibindo a via NF- κ B.

Concomitante à diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, observou-se aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 principalmente nos grupos que receberam tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa*. Paralelo a isso os resultados mostraram que o tratamento com nanoemulsão de GNPs e extrato de *C. sativa* com 200mg aumentaram significativamente os níveis de IL-4 em relação ao grupo FA. Dentre os mecanismos que atuam na modulação de respostas inflamatórias exacerbadas, destaca-se a produção de citocinas anti-inflamatórias (Lobo et al., 2016). Os macrófagos, por sua vez, podem assumir diferentes perfis de ativação. Quando apresentam o fenótipo M1, eles produzem mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, ERO e prostaglandinas. Por outro lado, em ambientes com IL-4 e IL-13, os macrófagos se diferenciam no fenótipo M2, caracterizado pela produção de IL-10. Esse perfil anti-inflamatório exerce um papel

fundamental na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e está associado à resolução da inflamação, à fagocitose e ao reparo de tecidos danificados (Korns et al., 2011; Park et al., 2022).

Dessa forma, a nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa* desempenha um papel integrado na modulação da inflamação e na promoção da fase proliferativa da cicatrização, por meio da expressão de fatores de crescimento, como o TGF- β . Esse fator é responsável por regular o crescimento e a diferenciação celular durante o processo de cicatrização de feridas (Oyobode et al., 2021). Os resultados do presente estudo mostraram que os grupos FC + NanoC100mg e FC + NanoC200mg apresentaram um aumento significativo de TGF- β em comparação com o grupo FA. Resultado semelhante foi obtido por Urrutia-Ortega (2024), onde o tratamento tópico de extrato *full spectrum* de *C. sativa* aumentou os níveis de TGF- β em feridas por queimaduras em camundongos. O efeito da planta soma-se ao efeito das GNPs, como mostra outro estudo, de Mendes et. al. (2022) que relatou o aumento de TGF- β nas feridas de ratos Wistar tratados com GNPs. O TGF- β , por sua vez, estimula a produção de colágeno em fibroblastos da pele, promovendo a transição de fibroblastos para miofibroblastos, principalmente por meio da ativação da via intracelular da proteína SMAD (Dang et al., 2011).

Estudos *in vitro* demonstram que o TGF- β favorece a formação de tecido de granulação ao aumentar a expressão de genes associados à síntese da matriz extracelular (MEC), como fibronectina e seu receptor (Greenwel et al., 1997). Além disso, ele regula positivamente o fator de crescimento angiogênico VEGF, essencial para a formação de novos vasos sanguíneos (White et al., 2000; Goldberg et al., 2007). Além disso, os genes que codificam as metaloproteinases de matriz (MMPs) possuem um elemento inibidor dependente de TGF- β em sua região promotora, o que reduz a expressão dessas enzimas e evita a degradação excessiva do colágeno (Patel et al., 2019).

Quando observados os resultados de PCR, observa-se que o tratamento com nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa* 200mg foi eficiente no aumento da expressão gênica de colágeno tipo III. Já foi demonstrado que o tratamento com GNPs contribui para o aumento significativo na expressão de colágeno, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na cicatrização de feridas (Kim et al., 2015; Lau et al., 2017). Assim, sugere-se que os efeitos dessas nanopartículas podem ter sido potencializados com os efeitos do extrato de *C. sativa*. Somado a isso, estudos

indicam que o tratamento com CBD causa alterações na expressão de vários genes em fibroblastos humanos, associados à formação de matriz extracelular contendo colágeno, aumentando sua síntese e deposição (Bouarfa et al., 2024; Toth et al., 2019).

No processo de reparo tecidual, a fase inflamatória é marcada pela alta atividade fagocítica, pelo aumento do consumo de oxigênio e pelo comprometimento funcional das mitocôndrias. Estas condições favorecem a formação de EROs que evoluem para um estado de estresse oxidativo, o qual prejudica o reparo. Observou-se que somente os grupos FC + NanoC100mg e FC + NanoC200mg mostraram efeitos sobre a redução de níveis dos marcadores oxidativos de DCF em comparação ao controle, além disso, o grupo FC + NanoC200mg também mostrou uma diminuição significativa no nível do nitrito.

Segundo Borrelli et al. (2009) o CBD inibe a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e óxido nítrico (NO). Associado a isso, no estudo de Elsilk et al. (2022), foi relatado que as GNPs são muito importantes na diminuição das consequências da síntese excessiva de óxido nítrico (NO) no organismo, podendo ser capazes de reduzir a sua síntese. Sua ação de remoção pode ainda interromper uma cascata de efeitos nocivos gerados em consequência da excessiva síntese de NO, tais como a maior permeabilidade vascular, a desnaturação de proteínas e as mudanças estruturais nas membranas celulares, todos atuando positivamente em processos inflamatórios. Estudos também indicam que as GNPs possuem propriedades anti-inflamatórias, prevenindo a desnaturação de proteínas e utilizando o NO para neutralizar a toxicidade dos radicais livres (Mendes et al., 2022).

A indução de estresse oxidativo é uma alteração esperada no modelo experimental envolvendo a Resiquimod, uma vez que este medicamento leva a um quadro de inflamação prolongada, afetando a cicatrização de feridas (Mendes et al., 2022). Nesse contexto, além de se investigar a produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (DCF e NO), avaliou-se também a atividade de enzimas antioxidantes. Observou-se redução da atividade da SOD nos grupos tratados com extrato de *C. sativa* e no grupo tratado com nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa*, indicando uma incapacidade do sistema antioxidante de conter o dano oxidativo. Por outro lado, nos grupos FC + NanoC100mg e FC + NanoC200, registrou-se um aumento significativo nos níveis de SOD. Diversos estudos comprovam a eficácia das nanopartículas como agentes antioxidantes, destacando-se sua

capacidade de inibir a formação de EROs, neutralizar radicais livres, através da função *scavenger* e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Mendes et al., 2020). Além disso, Li et al. (2015) demonstraram, em um estudo com células endoteliais, que as GNPs promovem o aumento dos níveis de NRF2 — um fator de transcrição que ativa genes antioxidantes. Esse fenômeno ocorre devido à interação das GNPs com as ligações tiol de KEAP1, resultando em alterações conformacionais dessa proteína e, por consequência, liberando NRF2 para ativar a transcrição de genes citoprotetores. Esse processo é fundamental para o efeito antioxidante observado.

As nanopartículas de ouro também exibem uma notável capacidade de eliminar radicais livres, como os íons hidroxila (OH), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO) (Giljohann et al., 2010). Essa eficácia depende das características de sua superfície. Ademais, devido à ampla área superficial das GNPs esféricas, elas demonstram alta afinidade por captar elétrons e interagir com EROs, removendo-os ou inativando-os (Kumar et al., 2013). Por essas razões, as GNPs se revelam potentes agentes antioxidantes, desempenhando um papel essencial na promoção da cicatrização de feridas (Mendes et al., 2024). No presente estudo, a nanoemulsão de GNPs com extrato de *C. sativa* revelou efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios robustos.

De forma geral, a aplicação combinada de GNPs e extrato de *C. sativa*, através da nanoemulsão, mostrou um impacto sinérgico notável na cicatrização de feridas crônicas. Essa estratégia terapêutica não apenas estimulou uma resposta anti-inflamatória eficiente, mas também favoreceu o aumento da atividade antioxidante. Observou-se ainda a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, levando a um aumento nas citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, e nos fatores de crescimento, como TGF- β . Esses componentes são fundamentais para a deposição de colágeno tipo III e, possivelmente, para a remodelação do colágeno tipo I. Esses resultados reforçam o potencial dessa abordagem integrada para promover uma cicatrização mais eficaz e de alta qualidade, reduzindo complicações inflamatórias e danos causados pelo estresse oxidativo.

6 CONCLUSÃO

A avaliação do tratamento com nanoemulsão de GNPs associadas ao extrato de *Cannabis sativa* demonstrou resultados promissores em feridas crônicas induzidas por Resiquimod. Esse tratamento proporcionou uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias e elevação de TGF- β , além de manter o equilíbrio redox celular, essencial para o processo de cicatrização. Como consequência, observou-se uma diminuição significativa no tamanho da ferida após dezoito dias, acelerando a reepitelização ao interromper o ciclo inflamatório persistente característico das feridas crônicas.

Os tratamentos testados, especialmente os que combinam GNPs com extrato de *C. sativa*, demonstraram resultados satisfatórios, indicando potencial eficácia terapêutica. Esses resultados sugerem que a combinação potencializa processos celulares e moleculares, como a modulação da inflamação, a ação antioxidante e o estímulo à síntese de colágeno, favorecendo a contração da ferida e a regeneração tecidual.

Portanto, a associação das GNPs com compostos bioativos da *C. sativa* representa uma estratégia promissora para o reparo de feridas crônicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para explorar outros mecanismos envolvidos nesse processo. Pesquisas futuras podem investigar o uso de GNPs sintetizadas por métodos ecológicos em conjunto com biomateriais, peptídeos ou abordagens de bioengenharia tecidual, ampliando suas aplicações na cicatrização e regeneração de tecidos.

REFERÊNCIAS

- Aili M., Zhou, K., Zhan, J., Zheng, H., e Luo, F. (2023). Anti-inflammatory role of gold nanoparticles in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(36), 8605–8621
- Akhtar S., Asiri, S. M., Khan, F. A., Gunday, S. T., Iqbal, A., Alrushaid, N., Labib, O. A., Deen, G. R., e Henari, F. Z. (2022). Formulation of gold nanoparticles with hibiscus and curcumin extracts induced anti-cancer activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(2), 103594.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 302(2):141-145.
- Akturk O, Kismet K, Yasti AC, Kuru S, Duymus ME, Kaya F, Keskin D. Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: a potential skin wound healing biomaterial. *Journal of biomaterials applications*. 2016; 31(2): 283-301.
- Alven S, AderibigbeBA. Quitosana e hidrogéis à base de celulose para tratamento de feridas. *Jornal internacional de ciências moleculares*. 2020; 21(24): 9656.
- Amjed S, Junaid K, Jafar J, Amjad T, Maqsood W, Mukhtar N, Ansari F. Detection of antibacterial activities of Miswak, Kalonji and Aloe vera against oral pathogens e anti-proliferative activity against cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17(1): 1-10.
- Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biological research*. 2007; 40(2): 97-112.
- Arvizo, R R et al. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2943, 2012.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 2006; 32:279-312.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 2006; 32:279-312.
- Barrientos, S. et al. Perspective Article: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 16, n. 5, p. 585–601, set. 2008.
- Baswan SM, Klosner AE, Glynn K, Rajgopal A, Malik K, Yim S, Stern N. Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020 Dec 8;13:927-942.

Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 2005; 31: 674-86.

Berthold EC, Kamble SH, Kanumuri SRR, Kuntz MA, Senetra AS, Chiang YH, McMahan LR, McCurdy CR, Sharma A. Comparative Pharmacokinetics of Commercially Available Cannabidiol Isolate, Broad-Spectrum, and Full-Spectrum Products. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2023 Jul;48(4):427-435

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

Bhattacharya S, Aggarwal R, Singh VP, Ramachandran S, Datta M. Downregulation of miRNAs during Delayed Wound Healing in Diabetes: Role of Dicer. *Mol Med*. 2016 Mar;21(1):847-860.

Bouarfa M, Chebaibi, M., Amrati, F. E.-Z., Zouhair Souirti, Hamza Saghrouchni, Yassine El atki, Khalid Bekkouche, Hajar Mourabiti, Bari, A., Giesy, J. P., Mohany, M., Al-Rejaie, S. S., Mourad, e Bousta, D. (2024). In vivo and in silico studies of the effects of oil extracted from *Cannabis sativa* L. seeds on healing of burned skin wounds in rats. *Frontiers in Chemistry*, 12.

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

Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1219-22.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg*. 2006; 117(7):12-34.

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

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomater Sci*. 2004;25(5); 843-850.

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

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

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

Cuba LF, Salum FG, Cherubini K, Figueiredo MAZ. Cannabidiol: an alternative therapeutic agent for oral mucositis? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2017 Jun;42(3):245–50

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

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

Daniel, MC; Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantumsize-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Revision.* 2004; 104 (1): 293-346.

Dang Y, Liu B, Liu L, et al. The 800-nm diode laser irradiation induces skin collagen synthesis by stimulating TGF- β /Smad signaling pathway. *Lasers Med Sci.* 2011;26(6):837-843.

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

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

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

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

de Freitas Cuba L, Braga Filho A, Cherubini K, Salum FG, Figueiredo MAZ de. Topical application of Aloe vera and vitamin E on induced ulcers on the tongue of rats subjected to radiation: clinical and histological evaluation. *Supportive Care in Cancer.* 2016 Jun 23;24(6):2557–64.

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

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

Diridollou, S. et al. Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 23, n. 6, p. 353–362, dez. 2001.

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

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

Esposito, G. et al. Cannabidiol in vivo blunts β -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*, v. 151, n. 8, p. 1272–1279, 29 jan. 2009.

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

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

Fasinu PS, Phillips S, EISOhly MA, Walker LA. Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2016 Jul;36(7):781–96

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

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

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

Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Apr 26;49(19):3280-94.

Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 2645–55.

Gooyit M, Peng Z, Wolter WR, Pi H, Ding D, Heseck D, Lee M, Boggess B, Champion MM, Suckow MA, Mobashery S, Chang M. A chemical biological strategy to facilitate diabetic wound healing. *ACS Chem Biol*. 2014 Jan 17;9(1):105-10.

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

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

Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early response of alpha2 (I) collagen to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem*. 1997; 272:19738–45.

Guest, J. F. et al. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ Open*, v. 5, n. 12, p. e009283, dez. 2015.

- Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89(3):219229.
- Gurgel HL de C, Lucena GGC, Faria MD de, Maia GL de A. Uso terapêutico do canabidiol: a demanda judicial no estado de Pernambuco, Brasil. *Saúde e Sociedade*. 2019 Sep;28(3):283–95
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 2007 (453): 314–321.
- Hashemipour MA, Lotfi S, Torabi M, Sharifi F, Ansari M, Ghassemi A, et al. Evaluation of the Effects of Three Plant Species (*Myrtus Communis* L., *Camellia Sinensis* L., *Zataria Multiflora* Boiss.) on the Healing Process of Intraoral Ulcers in Rats. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*. 2017 Jun;18(2):127–35.
- Hennessy EJ, Parker AE, e O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(4): 293-307.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214-226.
- Holzer-Geissler JC, Schwingenschuh S, Zacharias M, Einsiedler J, Kainz S, Reisenegger P, Kotzbeck P. The impact of prolonged inflammation on wound healing. *Biomedicines*. 2022; 10(4): 856.
- Jeong I, et al. mRNA expression and metabolic regulation of npy and agrp1/2 in the zebrafish brain. *Neuroscience Letters*, v. 668, p. 73–79, 6 mar. 2018.
- Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1776–1784.
- Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2011; 54(3):97-101.
- Karas, J.A.; Wong, L.J.M.; Paulin, O.K.A.; Mazeh, A.C.; Hussein, M.H.; Li, J.; Velkov, T. The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics* 2020, 9, 406
- Kavitha KV, Tiwari S, Purandare VB, Khedkar S, Bhosale SS, Unnikrishnan AG. Choice of wound care in diabetic foot ulcer: A practical approach. *World J Diabetes*. 2014; 15;5(4):546-56.
- Kazemzadeh-Narbat M, Annabi N, Khademhosseini AJMT. Surgical sealants and high strength adhesives. 2015; 18 (4): 176-177
- Karthikeyan A, Senthil N, Min T. Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Front Pharmacol*. 2020;11:487.
- Kim JE, Lee J, Jang M, Kwak MH, Go J, Kho EK. Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. *BiomaterSci*. 2015; 3(3):509–519.

Klahn, P. Cannabinoids-promising antimicrobial drugs or intoxicants with benefits? *Antibiotics* 2020, 9, 297.

Korns, D., Frasn, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M., e Bratton, D. L. (2011). Modulation of Macrophage Efferocytosis in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2(57).

Kumar A, Zhang X, Liang XJ. Gold nanoparticles: emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnol Adv.* 2013 Sep-Oct;31(5):593-606.

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

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004; 18(7):816–827

Lebel C P; Ischiropoulos H; Bondy S C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227–231, mar. 1992

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

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

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

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

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

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023.

Loftus S, A longitudinal, quality of life study comparing four layer bandaging and superficial venous surgery for the treatment of venous leg ulcers. *J Tissue Viability* 2001.

Loot MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD, Mekkes JR. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol.* 2002 Mar;81(3):153-60.

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

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

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

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

Mandelbaum SH, Santis EPD, Mandelbaum, MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *AnbrasDermato.* 2003; 78(4): 393-410.

Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L. The fibronectin synergy site modulates TGFbeta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 360: 709–14.

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

Mendes C, Zaccaron RP, Casagrande LR, Venturini LM, da Costa C, Lima IR, Wermuth TB, Arcaro S, Feuser PE, Lock Silveira PC. Green synthesis of gold nanoparticles in an animal model of chronic wound induced with Resiquimod. *J Drug Target.* 2024 Nov;32(9):1086-1100

Merwin JR, Roberts A, Kondaiah P, Tucker A, Madri J. Vascular cell responses to TGF-beta 3 mimic those of TGFbeta 1 in vitro. *Growth Factors.* 1991; 5: 149–58.

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

Miller HP, Bonawitz SC, Ostrovsky O. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on inflammation: A review. *Cellular Immunology.* 2020 Jun;352:104111.

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

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

Morgan, G. Assesment of quality of life in palliative care. *International J Palliative Nurs* 2000; 6(8): 406-10.

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

Moura J, Madureira P, Leal EC, Fonseca AC, Carvalho E. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing. Clin Immunol. 2019 Mar;200:43-54.

Martinez N. et al. An Overview of Cannabidiol as a Multifunctional Drug: Pharmacokinetics and Cellular Effects. Molecules (Basel, Switzerland), v. 29, n. 2, p. 473, 18 jan. 2024.

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

Oyebode O, Houreld NN, Abrahamse H. Photobiomodulation in diabetic wound healing: A review of red and near-infrared wavelength applications. Cell Biochem Funct. 2021 Jul;39(5):596-612.

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

Park, H.-Y. et al. A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process. Experimental Dermatology, v. 20, n. 12, p. 969–974, 20 out. 2011.

Park, M. D., Silvin, A., Ginhoux, F., e Merad, M. (2022). Macrophages in health and disease. Cell, 185(23), 4259–4279.

Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. Biomed Pharmacother. 2019; 112:108615.

Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. Br J Pharmacol. 2008 Jan;153(2):199-215

Pires, P. C., Fernandes, M., Nina, F., Gama, F., Gomes, M. F., Rodrigues, L. E., Meirinho, S., Silvestre, S., Alves, G., e Santos, A. O. (2023). Innovative Aqueous Nanoemulsion Prepared by Phase Inversion Emulsification with Exceptional Homogeneity. Pharmaceutics, 15(7), 1878

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

Rattanata, N., S. Daduang, M. Wongwattanakul, C. Leelayuwat, T. Limpai boon, R. Lekphrom, A. Sandee, P. Boonsiri, S. Chio-Srichan, and J. Daduang. 2015. 'Gold Nanoparticles Enhance the Anticancer Activity of Gallic Acid against Cholangiocarcinoma Cell Lines', *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 7143-7. Rubinfeld, G. D. 2003. 'Epidemiology of acute lung injury', *Crit Care Med*, 31: S276-84.

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

Sangiovanni, E.; Fumagalli, M.; Pacchetti, B.; Piazza, S.; Magnavacca, A.; Khalilpour, S.; Melzi, G.; Martinelli, G.; Dell'Agli, M. Cannabis sativa L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. *Phyther. Res.* 2019, 33, 2083–2093.

Seyfarth, F. et al. Dry skin, barrier function, and irritant contact dermatitis in the elderly. *Clinics in Dermatology*, v. 29, n. 1, p. 31–36, jan. 2011.

Shao, K.; Stewart, C.; Grant-Kels, J.M. Cannabis and the skin. *Clin. Dermatol.* 2021, 39, 784–795.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341(10):738746.

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

Sunda F, Arowolo A. A molecular basis for the anti-inflammatory and anti-fibrosis properties of cannabidiol. *FASEB J.* 2020 Nov;34(11):14083-14092

Tan JL, Lash B, Karami R, Nayer B, Lu YZ, Piotto C, Julier Z, Martino MM. Restoration of the healing microenvironment in diabetic wounds with matrix-binding IL-1 receptor antagonist. *Commun Biol.* 2021; 26:4(1):422.

Tóth, K, Ádám, D, Bíró, T, e Oláh, A (2019). Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System. *Molecules*, 24(5), 918.

Trusler AR, Clark AK, Sivamani RK, Shi VY. The Endocannabinoid System and Its Role in Eczematous Dermatoses. *Dermatitis.* 2017 Jan;28(1):22–32.

Urrutia-Ortega, I. M., Valencia, I., O. Ispanixtlahuatl-Meraz, Benítez-Flores, J. C., Espinosa-González, A. M., Estrella-Parra, E. A., Flores-Ortiz, C. M., Chirino, Y. I., e Avila-Acevedo, J. G. Full-spectrum cannabidiol reduces UVB damage through the inhibition of TGF- β 1 and the NLRP3 inflammasome. *Photochemistry and Photobiology*, 3 jul. 2024.

Van WW. The fibroblast in wound healing. *SurgGinecolObstet* 1967; 124:369

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

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

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

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

Wang, L.-L.; Zhao, R.; Li, J.-Y.; Li, S.-S.; Liu, M.; Wang, M.; Zhang, M.-Z.; Dong, W.-W.; Jiang, S.-K.; Zhang, M.; et al. Pharmacological activation of cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation, fibrogenesis, and promotes re-epithelialization during skin wound healing. *Eur. J. Pharmacol*. 2016, 786, 128–136.

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

White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 259–68.

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

Wilkinson, H. N.; Hardman, M. J. Wound senescence: A functional link between diabetes and ageing? *Experimental Dermatology*, 21 fev. 2020.

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