



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOEMULSÃO DE
CURCUMINA E POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA: AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA *IN VITRO***

JOSÉ RICARDO TOMÉ LOPES MARTINS

Rio Grande, 2024

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOEMULSÃO DE
CURCUMINA E POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA: AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA *IN VITRO***

JOSÉ RICARDO TOMÉ LOPES MARTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Cristiana Lima Dora

Co-orientador: Dr. Gustavo Richter Vaz

Rio Grande, 2024

Ficha Catalográfica

M386d Martins, José Ricardo Tomé Lopes.

Desenvolvimento de hidrogéis contendo nanoemulsão de curcumina e polihexametileno biguanida: avaliação farmacológica *in vitro* / José Ricardo Tomé Lopes Martins. – 2024.
107 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2024.

Orientadora: Dra. Cristiana Lima Dora.

1. Feridas 2. Curcumina 3. Polihexametileno de biguanida
4. Nanoemulsão 5. Hidrogel I. Dora, Cristiana Lima II. Título.

CDU 616-083

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

JOSÉ RICARDO TOMÉ LOPES MARTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOEMULSÃO DE
CURCUMINA E POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA: AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA *IN VITRO***

Banca examinadora:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira – UFRGS (Externo)

Profª Drª Daniela Fernandes Ramos Soares - FURG

Profª Drª Mariana Appel Hort – FURG (Suplente)

Profª Drª Cristiana Lima Dora

Rio Grande, 2024

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo sopro de luz e
perseverança durante todo o percurso.
Aos meus, que vibram a cada passo
dado e nunca desamparam.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristiana Lima Dora, por toda a paciência, profissionalismo e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Gustavo Richter Vaz, pelo incentivo em todos os momentos do meu mestrado, desde a inscrição até a finalização. Obrigado por toda a co-orientação deste trabalho.

Aos parceiros de laboratórios – Frank, Jamile, Débora e, em especial à Daniela Vaiss e Virgínia Yurgel. Vocês foram importantes na condução desse mestrado, ensinando, somando força e apoiando em momentos de dificuldades.

À Profa. Daniela Ramos, por me receber tão bem em seu laboratório, em especial a Marcelle, que esteve presente durante todas as minhas idas ao laboratório. Obrigado por todo conhecimento durante a concepção deste trabalho.

À professora Elizandra Braganhol, pela parceria, receptividade em seu laboratório, doçura e conhecimento doado. Agradeço também as suas alunas Gabi e Jordana, por toda a dedicação em ensinar e me conduzir durante a estadia na UFCSPA.

À professora Letícia Koester e professora Flávia Fachel, pela parceria, receptividade, apoio e orientação durante a minha passagem pela UFRGS. Agradeço especialmente à Patrícia Weimer, por toda paciência, prestatividade, conhecimento e apoio.

Agradeço aos colegas do HU-FURG, em especial à Daniele Rodrigues e Gisele Senhorin. Obrigado por entenderem a importância deste mestrado e por sempre viabilizarem as melhores condições para que eu me dedicasse a pesquisa.

Agradeço ao Celso, pelo companheirismo, amor, paciência e todo o incentivo durante essa caminhada. Sem você a realização desse mestrado não seria a mesma.

Agradeço à Letícia Junqueira, presente que Rio Grande me deu. Obrigado pela amizade e apoio durante todo o mestrado.

Agradeço à Nayara, que mesmo de longe, sempre se faz presente. Obrigado por todas as trocas e vivências. Obrigado por todo apoio, palavras e dedicação, você é uma joia na minha vida

Por fim, agradeço a meus Pais, Ozelita e Zeca, minhas irmãs, Cibelle e Sarah, sobrinhas, Cecília e Alice e a Naldinha. Vocês são minha força, alicerce e luz por todos os caminhos.

“...Eu não vim até aqui pra desistir
agora...”

Engenheiros do Hawaii

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A pele	16
2.2 Feridas e o Processo de Cicatrização	19
2.2.1 Feridas Infectadas	23
2.3 Tratamento para feridas	25
2.3.1 Curativos	25
2.3.2 Fármacos utilizados no tratamento de feridas – polihexametileno de biguanida (PHMB) e Curcumina (CUR)	29
2.4 Tratamento para feridas: Nanotecnologia	33
3. OBJETIVOS	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
Artigo. Desenvolvimento de hidrogéis contendo curcumina e polihexametileno de biguanida: avaliação farmacológica <i>in vitro</i>	65

RESUMO

Feridas representam um desafio clínico que impactam na qualidade de vida dos pacientes e são associadas à morbimortalidade. O tratamento é crucial para acelerar a cicatrização e aprimorar as características da nova pele, porém esbarra em elevados custos e limitação dos curativos disponíveis. Compostos com atividade anti-inflamatória e antioxidante, como a curcumina (CUR), aliados a substâncias com propriedades antimicrobianas como o polihexametileno de biguanida (PHMB), formulados em curativos, como hidrogéis, são aliados promissores associados ao tratamento de feridas. Entretanto, a CUR apresenta características que obstaculiza sua incorporação em formulações farmacêuticas, como hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade, já o PHMB está associado a uma elevada toxicidade. Todavia, através da nanoencapsulação é possível melhorar a solubilidade, aumentar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade destas substâncias. Desta forma, o objetivo deste projeto é desenvolver uma nanoemulsão (NE) contendo CUR e PHMB (NE-CUR-PHMB) e incorporar em hidrogéis de quitosana e hidroxietilcelulose, visando o tratamento de feridas. As características físico-químicas das NEs e hidrogéis foram avaliadas no que diz respeito ao tamanho de partícula e índice de polidispersão, potencial zeta, e bioadesão. Além disso, foram avaliadas possíveis alterações bioquímicas na pele, a viabilidade celular, a atividade antimicrobiana e o potencial irritante das formulações. Os resultados indicaram que foram obtidas nanoemulsões com tamanho e polidispersão adequados para aplicação tópica (~ 225 nm e 0,13; respectivamente), potencial zeta de 35mV e recuperação de fármacos de aproximadamente 75%. Os dados de espectroscopia Raman confocal indicaram que a NE não causou alterações bioquímicas na pele e melhorou sua função de barreira. O teste de viabilidade celular mostrou que não há toxicidade após o tratamento com NE-CUR-PHMB até 1,68 $\mu\text{g/mL}$ para a CUR e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para o PHMB. Em relação a atividade antimicrobiana, a NE-CUR-PHMB demonstrou ser efetiva na inibição do crescimento e atividade anti-biofilme frente a *P. aeruginosa*. Ademais, os hidrogéis contendo a NE-CUR-PHMB mostraram maior adesão após a incorporação das NEs. Os resultados sugerem que a NE-CUR-PHMB e a sua incorporação em hidrogéis podem ser uma promissora abordagem para o tratamento de feridas.

Palavras-chave: feridas, curcumina, polihexametileno de biguanida, nanoemulsão, hidrogel

ABSTRACT

Wounds represent a clinical challenge that impact on patients' quality of life and are associated with morbidity and mortality. Treatment is crucial to speed up healing and improve the characteristics of the new skin, but comes up against high costs and the limitations of available dressings. Compounds with anti-inflammatory and antioxidant activity, such as curcumin (CUR), combined with substances with antimicrobial properties such as polyhexamethylene biguanide (PHMB), formulated into dressings such as hydrogels, are promising allies associated with wound treatment. However, CUR has characteristics that hinder its incorporation into pharmaceutical formulations, such as hydrophobicity and low bioavailability, while PHMB is associated with high toxicity. However, through nanoencapsulation it is possible to improve the solubility, increase the bioavailability and reduce the toxicity of these substances. The aim of this project is to develop a nanoemulsion (NE) containing CUR and PHMB (NE-CUR-PHMB) and incorporate it into chitosan and hydroxyethylcellulose hydrogels, with a view to treating wounds. The physicochemical characteristics of NEs and hydrogels were evaluated in terms of particle size and polydispersity index, zeta potential, and bioadhesion. In addition, possible biochemical changes in the skin, cell viability, antimicrobial activity and the irritant potential of the formulations were evaluated. The results indicated that nanoemulsions were obtained with a size and polydispersity suitable for topical application (~ 225 nm and 0.13, respectively), a zeta potential of 35 mV and drug recovery of approximately 75%. Confocal Raman spectroscopy data indicated that NE did not cause biochemical changes in the skin and that improved its barrier function. The cell viability test showed that there was no toxicity after treatment with NE-CUR-PHMB up to 1.68 $\mu\text{g/mL}$ for CUR and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ for PHMB. In terms of antimicrobial activity, NE-CUR-PHMB proved to be effective in inhibiting growth and anti-biofilm activity against *P. aeruginosa*. In addition, hydrogels containing NE-CUR-PHMB showed greater adhesion after incorporation of NEs. The results suggest that NE-CUR-PHMB and its incorporation into hydrogels could be a promising approach for wound treatment.

Keywords: wounds, curcumin, polyhexamethylene biguanide, nanoemulsion, hydrogel

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Curativos modernos mais utilizados na prática clínica 27

Artigo: Desenvolvimento de hidrogéis contendo curcumina e polihexametileno de biguanida para o tratamento de feridas

Tabela 1: Composição das nanoemulsões desenvolvidas

Tabela 2. Caracterização físico-química das nanoemulsões

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) das formulações frente a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)

Tabela 4. Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo as nanoemulsões

Tabela 5: Escore de irritação e classificação de irritação no ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) (n = 5).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAM - Membrana corioalantóica (CAM)

CIM – Concentração inibitória mínima

CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados

CUR – Curcumina

DEMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EB – Estrato Basal

EC – Estrato córneo

EE – Estrato espinhoso

EG – estrato granuloso

EL – Estrato lúcido

FHN - fator de hidratante natural

HAP – Homogeneização de alta pressão

HEC – Hidroxietilcelulose

HET-CAM - Ensaio da membrana cório-alantoide

MTT - Sal brometo de 3,(4,5-dimetil)-2,5difetil-tetrazólio (MTT)

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NE – Nanoemulsão

NE (A/O) – Nanoemulsão água em óleo

NE-BR – Nanoemulsão branca

NE-CUR – Nanoemulsão contendo curcumina

NE-CUR-PHMB – Nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno de biguanida

NEG – Nanoemulgel

NE (O/A) – Nanoemulsão óleo em água

NE-PHMB – Nanoemulsão contendo polihexametileno de biguanida

NLS - nanopartículas sólidas lipídicas

PDI – Índice de polidispersão

PHMB - Polihexametileno de biguanida

SBF - Soro fetal bovino

TCM – Triglicerídeo de cadeia média

US – Ultrassom

1. INTRODUÇÃO

Maior órgão do corpo humano, a pele é uma estrutura composta por multicamadas, revestindo todo corpo e servindo principalmente como barreira de proteção contra o ambiente externo, sendo a primeira linha de defesa frente agressões biológicas, químicas ou físicas (DABROWSKA et al., 2018; HARRIS-TRYON; GRACE, 2022; PU et al., 2023; QUAN, 2023; RAJKUMAR et al., 2023; KREMER; BURKEMPER, 2024). Frequentemente, a integridade da pele é ameaçada, seja por resultado de traumas, queimaduras, acidentes, infecções, intervenções cirúrgicas, ou doenças, como tumoral, doença vascular e diabetes, comprometendo a função de barreira ficando esta sujeita a feridas, as quais consistem em lesões capazes de interromper a continuidade do tecido da pele, podendo ser superficiais ou mesmo atingir várias camadas, causando extensa destruição (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; NETHI et al., 2019; LIN et al., 2022; QI et al., 2022; FREEDMAN et al., 2023; NGUYN et al., 2023), comprometendo a qualidade de vida dos pacientes, estando associadas a morbimortalidade, sendo um importante problema de saúde na sociedade atual (LINDHOLM; SEARLE, 2016; BOWERS; FRANCO, 2020; SEN, 2021; SINGER, 2022; FERNÁNDEZ-GUARINO et al., 2023; MATAR et al., 2023).

O processo de cicatrização de feridas prossegue através de fases sobrepostas bem orquestradas e reguladas, sendo estas a hemostasia, a inflamação, a proliferação e a remodelação da matriz extracelular (TALBOTT et al., 2022; LIANG et al., 2023), que envolve a participação de várias células, compostos químicos e estruturas de suporte (CHOUHAN et al., 2019; QADIR et al., 2021; SEN, 2021; NANDITHA; KUMAR, 2022). Com isso, o tratamento da superfície da ferida desempenha um papel importante no processo de cicatrização, reduzindo a formação de cicatrizes e melhorando as propriedades da nova pele (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016).

As terapias utilizadas no tratamento das feridas devem oferecer proteção, prevenir e tratar infecções, manter a umidade e a temperatura local, promover a proliferação, a diferenciação e a migração de células epiteliais. Além disso, devem ser terapias biocompatíveis, atóxicas, anti-alérgicas e não aderentes, com custo acessível (SHI ET AL., 2020; NUUTILA; ERIKSSON, 2021; NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018; CAO et al., 2023, ZHAO et al., 2023). Contudo, como existem muitas limitações impostas pelas propriedades e pela tecnologia dos materiais, não há atualmente no

mercado um curativo ideal que atenda a todas as necessidades para a aplicação no tratamento clínico (FARAHANI; SHAFIEE, 2021).

Com a finalidade de suprir as exigências fundamentais no tratamento de feridas, a utilização de terapias de cicatrização na forma de hidrogéis possui ampla aceitação como uma alternativa aos métodos tradicionais e possuem preço acessível quando comparado com curativos tecnológicos de alto custo (MEHMOOD et al., 2014; SIMÕES et al., 2018; ALMEIDA et al., 2021, FREDDMAN et al., 2023).

Hidrogéis são redes tridimensionais compostas por polímeros interligados que podem absorver uma grande quantidade de água ou fluidos biológicos (ZHANG et al., 2023). Ademais, possuem propriedades físicas e químicas que oferecem vantagens ao processo de cicatrização, como fornecimento de um ambiente úmido para a ferida, formar uma barreira contra microrganismos, e de fácil aplicabilidade, sendo adequados para todos os estágios do processo de cicatrização e permitirem a incorporação de ativos em sua matriz (GHOBIL; GRINSTAF, 2015; FRANCESKO; PETKOVAB; TZANOV, 2018; PENG et al., 2022; CAO et al., 2023; LIU et al., 2023; ZHAO et al., 2023; YANG et al., 2024).

O polihexametileno de biguanida (PHMB) é um composto biguanida, eficaz contra uma variedade de patógenos na prevenção da formação de biofilmes (MULDER; CAVORSI; LEE, 2007; MAGINA ET AL., 2016) e empregado em pesquisas de desenvolvimento e produção de curativos (WORSLEY ET AL., 2019; LIANG ET AL., 2020; CHANABODEECHALERMRUNG et al. 2022 RAMASAMY ET AL., 2022), porém, em estudo realizado por Rembe e colaboradores, o PHMB apresentou alta toxicidade mesmo em baixas concentrações (REMBE et al., 2016).

A curcumina (CUR) é um polifenol de ocorrência natural, reconhecido por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias e que vem sendo investigado como agente de cicatrização de feridas (KANT et al., 2014; QU et al. 2018; BARCHITTA et al., 2019; MIRZAHOSSEINIPOUR et al., 2020; HAO et al., 2023). No entanto, essa substância apresenta características, como alta hidrofobicidade, baixa biodisponibilidade e fotossensibilidade, que dificultam a sua incorporação em formulações farmacêuticas, (KUMARI; NANDA, 2023; OBEID; ALSAADI; ALJABALI, 2023).

Neste sentido, a utilização de técnicas baseadas em nanotecnologia possibilita novas soluções e estratégias em comparação com os materiais tradicionais (LO; MAHAMOUDI; FAUZI, 2023). Entre os vários sistemas de nanocarreadores lipídicos, destacam-se as nanoemulsões (NEs) devido a possibilidade de carreamento de compostos ativos, sendo utilizadas em formulações tópicas e para o tratamento de feridas, visto que melhoram a solubilização e biodisponibilidade de ativos, tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, além de diminuir a irritação da pele e fornecem proteção contra degradação enzimática, possuindo preparação e aumento de escala relativamente simples (ABD et al., 2018; ANAND et al., 2019; DHIMAN et al., 2021; LIN et al., 2022).

Frente a crescente preocupação em relação ao manejo e ao tratamento de feridas, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de hidrogéis contendo NEs de CUR e PHMB visando o uso destas formulações no tratamento de feridas da pele com o intuito de obter novas possibilidades de curativos que venham a auxiliar no manejo clínico. Nossa hipótese é que os produtos desenvolvidos possuam as características de um curativo ideal, que possuam baixa toxicidade e como são de fácil aplicação, espera-se que possam ser usados por pacientes adultos e pediátricos, tanto no âmbito domiciliar quanto hospitalar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A pele

A pele, maior órgão do corpo humano, sofre contínuo processo de renovação. Cobrindo toda a superfície externa do corpo, une-se às mucosas do sistema digestivo, respiratório, geniturinário e conjuntiva das pálpebras, além de revestir o conduto auditivo e a superfície externa do tímpano (BARONI et al. 2012; ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). É o órgão responsável por constituir a primeira barreira entre o corpo humano e o meio ambiente (LIN et al., 2022), servindo assim como uma função crítica de barreira (BIGGS et al., 2020), protegendo o organismo de agressões biológicas, químicas, físicas e mecânicas, (NYSTRÖM; BRUCKNER-TUDERMAN, 2018) além de manter o equilíbrio de fluidos e a temperatura corporal. Evita a desidratação, sintetiza a vitamina D e permite a percepção do mundo ao redor através da interface de diferentes terminações nervosas (BARONI et al. 2012; SWANEY; KALAN, 2021; LIN et al., 2022).

Apresenta estrutura multifacetada de três camadas distintas, sendo elas epiderme, derme e hipoderme (**Figura 1**) (WONG et al., 2016; LIN et al., 2022), cada uma delas composta por várias subcamadas, que juntas cooperam para a formação de uma estrutura de matriz altamente especializada essencial para a sobrevivência humana (BARONI et al. 2012; SWANEY; KALAN, 2021).

A epiderme é a camada mais externa, impermeável e biologicamente mais ativa da pele, apresenta espessura variada, relativamente fina, composta por camadas queratinizadas, sendo firmemente fixada a derme (WONG et al., 2016; BHARDWAJ; CHOUHAN; MANDAL, 2018; SWANEY; KALAN, 2021). O equilíbrio entre processos de proliferação e descamação da epiderme resulta em um ciclo de renovação completa entre 15-30 dias, sendo esta camada constituída pelo estrato córneo (EC), estrato lúcido (EL), estrato granuloso (EG), estrato espinhoso (EE) e estrato basal (EB) (BARONI et al. 2012; PEREIRA, 2018; SWANEY; KALAN, 2021).

O EC, primeira camada da epiderme, é seco e morto, composta por células achatadas altamente queratinizadas, fornece proteção contra atritos, ataque de microrganismos e perda de água (MENON; CLEARY; LANE, 2012; SPADA; BARNES; GREIVE, 2018). Após o EC, encontra-se o EL, observado em regiões plantares do corpo, em que a pele é

mais espessa, e composto por uma fina camada de células planas, eosinófilas e translúcidas, em degeneração ou mortas (PEREIRA, 2018).

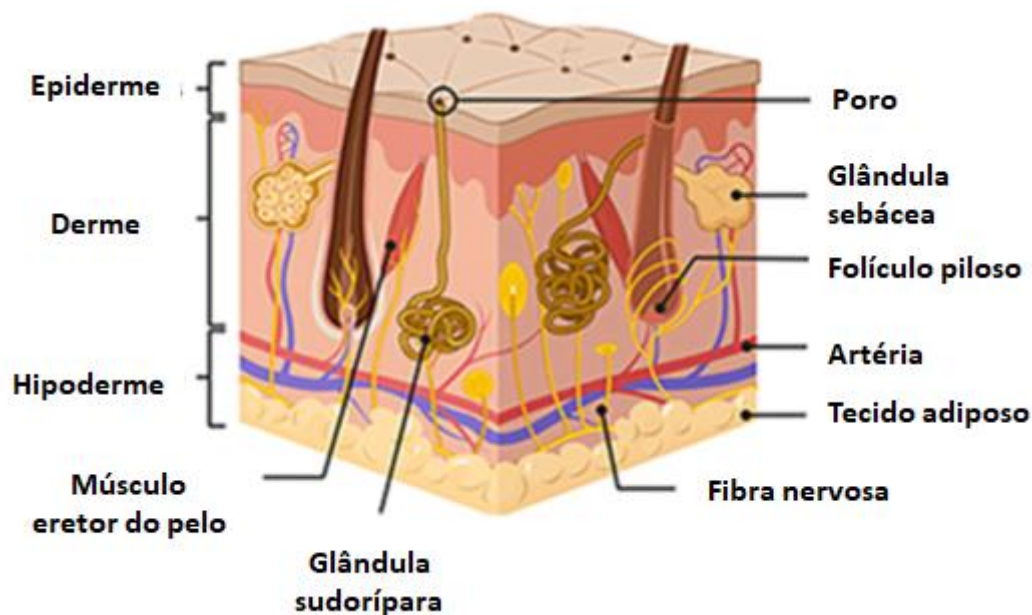


Figura 1: Estruturas da pele – epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Adaptado de LIN et al., 2022.

O EG forma a principal barreira de permeabilidade epidérmica da pele, consiste em 1-5 camadas de células poligonais achatadas que sofrem diferenciação celular final dos queratinócitos superiores do EE (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008). O alto teor lipídico proveniente de ceramidas, colesterol e ácidos graxos gerados pelo EG, em conjunto com complexo de colágeno IV, associados com proteínas como laminina, nidogênio, perlecano, proteoglicanos de sulfato de heparina e moléculas juncionais formam a membrana basal, uma estrutura fina, porém rígida, essencial para a estabilidade mecânica da pele. Esta é uma parte importante da junção dermoepidérmica que define e também adere a epiderme e a derme, proporcionando uma forte barreira mecânica contra patógenos (WONG et al., 2016; BIGGS et al., 2020).

O EE é a camada mais espessa da epiderme, composta principalmente por queratinócitos poliédricos, produtores de tonofilamentos de tonofibrina, os quais formam canais proteicos intercelulares chamados de desmossomos, responsáveis pela aparência espinhosa desta camada sob microscópio. Estes queratinócitos exibem adesões celulares e redes de citoesqueleto complexas, além de intensa atividade mitótica, o que permite uma renovação celular contínua (FUCHS, 2008; LOSQUADRO, 2017). Neste estrato estão presentes as células de Langerhans, as células dendríticas apresentadoras de

antígenos, derivadas de monócitos da medula óssea que desempenham papel importante nas respostas alérgicas de contato e outras respostas mediadas por células contra antígenos estranhos (BARONI et al. 2012; JAHROMI et al., 2018).

O EB (ou germinativo) é a camada progenitora da pele, contendo as células-tronco basais - apresenta atividade mitótica intensa, produzindo queratinócitos para as camadas superiores – melanócitos – os quais produzem o pigmento melanina, protegendo o ácido desoxirribonucleico (DNA) das células contra os raios ultravioleta, além de importante papel na determinação da cor da pele. Estão presentes neste estrato as células de Merkel, localizadas próximas às terminações nervosas da pele, as quais possuem alta sensibilidade ao toque leve e auxiliam na captação e percepção de estímulos táteis e de pressão (BARONI et al. 2012; ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). Ressalta-se que a camada avascular epidérmica obtém seus nutrientes por difusão através da camada dérmica (GANTWERKER; HOM, 2012).

A derme é a segunda camada da pele, composta principalmente por matriz extracelular, fornece a maior parte da resistência mecânica e elasticidade da pele, além de dar suporte a epiderme (WONG et al., 2016; NYSTRÖM; BRUCKNER-TUDERMAN, 2018). Constituída de tecido conjuntivo espesso altamente vascularizado baseia-se principalmente em fibroblastos e matriz extracelular, como glicosaminoglicanos, elastina e colágeno, que favorecem as propriedades mecânicas da pele (BHARDWAJ; CHOUHAN; MANDAL, 2018). Sustenta, nutre e liga o tecido fibroelástico (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014), sendo dividida em duas camadas, a superficial denominada de papilar e a mais profunda denominada reticular (WONG et al., 2016).

A camada papilar está localizada logo abaixo da epiderme, recobre as papilas dérmicas e é densamente povoada por fibroblastos, contém fibrilas finas de colágeno do tipo III e elastina, além de vários capilares, responsáveis por nutrir as células avasculares da epiderme e regular a temperatura (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). A derme reticular é uma mistura de tecido conjuntivo denso, contendo principalmente feixes de fibras colágenas tipo I com fibras elásticas grossas (LOSQUADRO, 2017). Ademais, a derme abriga nervos e receptores sensoriais, glândulas sudoríparas e sebáceas e folículos pilosos, além de conter numerosas células, incluindo fibroblastos e macrófagos (SELLHEYER; KRAHL, 2010; LOSQUADRO, 2017). Os fibroblastos são responsáveis pela síntese e renovação da matriz extracelular, enquanto os macrófagos contribuem para

a eliminação de materiais estranhos ao organismo e porções de tecidos danificados (BARONI et al. 2012).

A hipoderme é a camada mais interna da pele, localizada abaixo da camada reticular da derme, consiste em um tecido conjuntivo frouxo que, dependendo do local, forma camadas deslizantes ou grandes bolsas de tecido adiposo. Os tipos de células encontradas na hipoderme são fibroblastos, células adiposas e macrófagos. Essa camada, oferece proteção contra choques mecânicos, isola o corpo do calor e frio externos e é ativa no metabolismo e no armazenamento geral de energia. Em geral, a derme e a hipoderme são as barreiras cutâneas mais eficazes contra insultos traumáticos e térmicos (BARONI et al. 2012; JAHROMI et al., 2018)

A estrutura da pele é projetada para minimizar o estresse causado ao tecido pelo movimento e/ou forças externas (WONG et al., 2016), podendo ser observadas diferenças na estrutura desse órgão dependendo de uma variedade de fatores como topologia, pH, temperatura, umidade e microbiologia, como também diferenças entre sexo, raça e idade (GRICE et al., 2009; GRICE; SEGRE, 2011; OH et al, 2014). Todas essas desigualdades afetam e influenciam os processos de regeneração e reparo do tecido epitelial, influenciando também na cicatrização de feridas (ARDA;GÖKSÜGÜR;TÜZÜN, 2014; WONG et al., 2016; BLAIR et al., 2020).

2.2 Feridas e o processo de cicatrização

A pele, em contato direto com os mais adversos fatores do ambiente externo, está constantemente sofrendo impactos hostis, resultando em lesões (WILKINSON; HARDMAN, 2020). As feridas e abrasões danificam a estrutura anatômica da pele, causando ruptura da sua superfície e de outros tecidos, acarretando diminuição da função e comprometendo seu potencial imunizante (BANERJEE et al., 2021; WANG et al., 2022). Além disso, a estrutura da pele também fica comprometida pela influência de outros fatores como doenças, drogas e envelhecimento (WANG et al., 2022). Danos à pele, portanto, causam uma ruptura através das quais bactérias podem penetrar e causar inflamação e infecção, localmente (infecção da ferida) ou sistemicamente (septicemia) (PERCIVAL, 2002).

As feridas geralmente são causadas por cortes, arranhões, raspagens ou abrasões, que danificam a epiderme e a derme, mantendo intactas as glândulas sudoríparas e os folículos pilosos (LIN et al., 2022). Feridas de maior profundidade levam a desfechos mais graves

e complexos como infecção local, formação de biofilme, amputações e, em alguns casos, óbito (MALLICK et al., 2022). Dependendo da etiologia, localização, agente causador, complexidade, tratamento e período de cicatrização, as feridas podem ser classificadas em diferentes categorias (BANERJEE et al., 2021). No processo de avaliação das feridas, é de grande importância determinar a natureza da lesão, seja esta aguda ou crônica, assim como a profundidade da lesão da pele e dos tecidos subjacentes (PERCIVAL, 2002).

De acordo com Percival (2002), pelos tipos de feridas, tem-se as lesões incisivas ou cortantes, que causam poucos danos aos tecidos moles; lesões por cisalhamento/desenlramento, que combinam gravidade e fricção, causando ruptura mínima da pele, porém, desvascularização significativa da pele e de tecidos moles; lesão por esmagamento, trauma muscular direto, morte celular imediata e danos ao suprimento sanguíneo subjacente; as queimaduras, classificadas de acordo com a área, tamanho e profundidade da lesão na pele; feridas contaminadas ou não-contaminadas, classificadas pela esterilidade ou contaminação bacteriana; e, de acordo com o tempo de cicatrização, em feridas agudas ou crônicas (PERCIVAL, 2002).

Após o dano tecidual, vários tipos de células, presentes dentro das camadas da pele, entram em ação para coordenar, em estágios precisos, o processo de reparo da pele e assim evitar perda excessiva de sangue e infecções. A cicatrização ocorre através de fases distintas e sobrepostas como: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (DEKONINCK; BLANPAIN, 2019; RODRIGUES et al., 2019) (**Figura 2**).

Imediatamente após a lesão, a hemostasia é o primeiro estágio no processo da cicatrização de feridas, ocorrendo inicialmente a vasoconstrição das paredes dos vasos. Após, plaquetas são atraídas ao local e ligam-se ao colágeno da membrana basal, permitindo sua adesão e ativação, através da ação da trombina. Ativadas, as plaquetas acionam as cascatas de coagulação endógena e exógena, liberando grânulos alfa e grânulos densos contendo citocinas, quimiocinas, adenosina trifosfato, tromboxano A2 e fatores de crescimento, conduzindo os eventos iniciais de reparo, estimulando a agregação de plaquetas e a formação do trombo plaquetário de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina, servindo para fazer a oclusão da ferida e estancar o sangramento (PARK; HWANG; YOON, 2017; LOCATELLI et al., 2021; WANG et al., 2022).

Com a degradação do trombo, ocorre a liberação de fatores de crescimento como interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento derivado de plaquetas, que estimulam células residentes da pele (fibroblastos e queratinócitos), atraem neutrófilos, macrófagos e linfócitos para a área lesada, com intuito de prevenir a infecção e ativar ainda mais a resposta inflamatória. Uma vez formado o coágulo, o processo de coagulação é inibido, evitando a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (PARK; HWANG; YOON, 2017; LOCATELLI et al., 2021; NGUYEN et al., 2023).

Em conjunto com a fase da hemostasia, a etapa inflamatória é considerada como a fase inicial do processo de cicatrização. A degranulação plaquetária e a ativação do sistema complemento, juntamente com células residentes como mastócitos, células de Langerhans, células T e macrófagos, ativam as vias inflamatórias. Ocorre liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, estimulando vasodilatação e atraindo neutrófilos e monócitos para o local da inflamação. Os neutrófilos removem tecidos necróticos e patógenos via fagocitose e liberam espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos antimicrobianos, eicosanóides e enzimas proteolíticas. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos, que por meio da fagocitose englobam detritos celulares necróticos e material patogênico, além de liberar citocinas inflamatórias, ROS e fatores de crescimento. A resposta síncrona de todos os agentes envolvidos estimula os processos de reparo e permitem a resolução da ferida. Em condições ideais, o processo hemostático/inflamatório dura cerca de 3-5 dias, a partir deste momento, a ferida entra no estágio proliferativo (WANG et al., 2017; WILKINSON; HARDMAN, 2020; BANERJEE et al., 2021).

A fase proliferativa se caracteriza pela ampla ativação de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, os quais em conjunto com as células inflamatórias remanescentes induzem e mantêm a proliferação e a migração celular, via sinalização autócrina, parácrina e outros fatores de crescimento, orquestrando o fechamento da ferida, a deposição de matriz extracelular e a angiogênese (MALLICK et al., 2022).

Fibroblastos e queratinócitos, sob estimulação de fatores de crescimento, proliferam continuamente, sintetizando grandes quantidades de colágeno tipo III (fraco e imaturo), proteoglicano e fibronectina, fornecendo a estrutura para a migração celular, proliferação e crescimento para a área danificada. Células endoteliais migram para o local da ferida,

formam contatos intercelulares e vasos sanguíneos, fornecendo nutrientes para as células e removendo resíduos metabólicos (MALLICK et al., 2022).

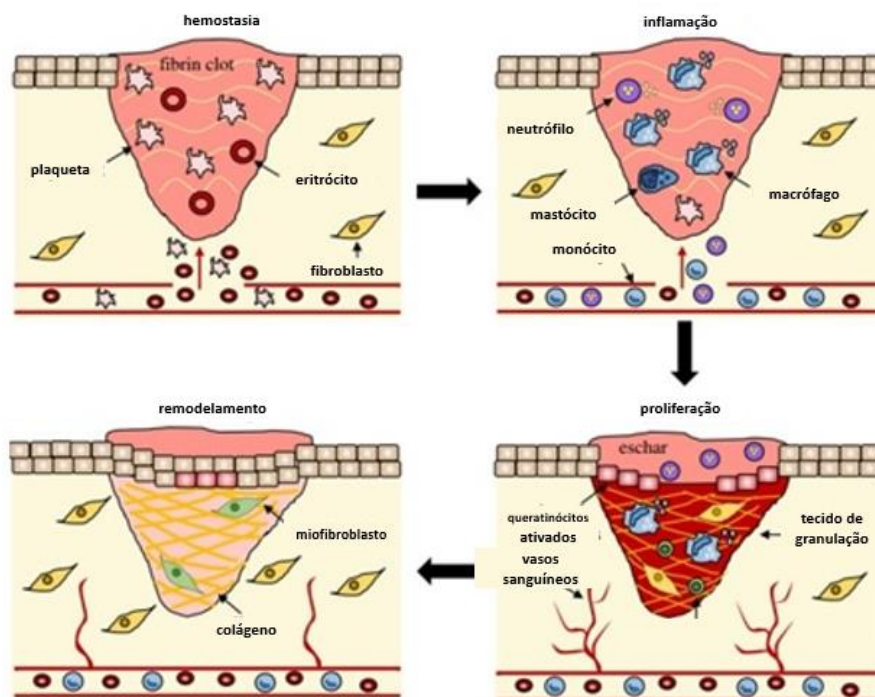


Figura 2: Estágios do processo de cicatrização da pele: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Fonte: Adaptado de Wilkinson; Hardman, 2020.

À medida que o processo de cicatrização progride, o tecido de granulação recém-formado é reconstituído em tecido cicatricial, onde a matriz, composta principalmente por colágeno tipo III, fibronectina e ácido hialurônico, é gradualmente substituída por colágeno tipo I (maduro). Queratinócitos migram das bordas para o leito da ferida e fazem a reepitelização do local lesado, restaurando a função de barreira da pele (RODRIGUES et al., 2019; BANERJEE et al., 2021).

Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos sofrem apoptose e saem do local da lesão, com isso, a resposta de cicatrização diminui e a resistência à tração do tecido cicatricial é semelhante à do tecido normal da pele, porém, o tecido cicatricial da ferida nunca retorna totalmente a arquitetura da pele não-lesada, somente atingindo um nível próximo ou consistente com o normal da pele (WILKINSON; HARDMAN, 2020).

O processo de cicatrização é dinâmico e contínuo, desde o início da lesão até o reparo completo. Requer a mobilização de uma variedade de células, a ação conjunta de citocinas e fatores de crescimento, além da influência do local da ferida em manter um ambiente propício ao crescimento. Ressalta-se que diversos fatores podem afetar a

cicatrização de feridas e interferir nas fases deste processo, ocasionando em retardo e falhas na restauração das funcionalidades da pele, podendo progredir para estados que acarretam risco de vida para o paciente (MALLICK et al., 2022).

Os fatores influenciadores no processo de cicatrização de feridas podem ser divididos em fatores locais e sistêmicos. Os fatores locais, como oxigenação, infecção, presença de corpo estranho, pH, composição do exsudato, temperatura e suficiência venosa, influenciam diretamente nas características da ferida. Enquanto que os fatores sistêmicos estão relacionados ao estado geral do indivíduo, como idade, sexo, isquemia, doenças como diabetes, doenças hereditárias, queloides e câncer, obesidade, estilo de vida (tabagismo, alcoolismo), uso de medicamentos, imunocomprometidos e estado nutricional, afetando assim a capacidade de cura da lesão (GUO;DIPIETRO, 2010; STECHMILLER, 2010; POWER;MOORE;O'CONNOR, 2017).

2.2.1 Feridas Infectadas

A infecção é uma das complicações mais frequentes e significativas das feridas (LIU et al., 2022), resulta de uma resposta inflamatória do organismo aos microrganismos invasores, que causam danos diretos ou indiretos ao tecido saudável e dificulta processo de cicatrização (HURLOW; BOWLER, 2022). Além disso, a infecção de uma ferida compromete a qualidade de vida do indivíduo e aumenta os custos econômicos associados ao tratamento (LABIB, WINTERS, 2023).

O desenvolvimento da infecção é promovido pela interação de três fatores principais, a susceptibilidade do hospedeiro – idade, imunossupressão, obesidade, diabete, insuficiência vascular, má drenagem linfática, neuropatias periféricas e má nutrição; ambiente local da ferida – falta de higiene, cuidados e curativo inadequados, manejo do exsudato, tecido necrótico, granulação retardada e migração epitelial; e a carga biológica microbiana - grau da presença de microrganismos, contaminação cruzada, sinergismo, fatores de virulência, formação de biofilme e fenótipo (HURLOW; BOWLER, 2022; ZEGADŁO et al., 2023). A divisão mais simples das infecções bacterianas são as infecções agudas e crônicas. (ZEGADŁO et al., 2023).

Staphylococcus aureus e *Pseudomonas aeruginosa* são as duas principais bactérias isoladas em feridas crônicas (CAMUS et al., 2022). A *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de produzir uma vasta gama de proteínas de virulência, o que lhe confere uma vantagem significativa como patógeno de feridas. Esses

fatores de virulência podem degradar a matriz extracelular e alterar as vias de sinalização celular, facilitando a adesão dos microrganismos. Isso, por sua vez, leva a danos nos tecidos e à invasão dos vasos sanguíneos. Além do mais, o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* é extremamente desafiador devido às suas rápidas mutações e à capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos (PRASAD et al., 2020; QIN et al., 2022).

Pseudomonas aeruginosa possui a capacidade de formar biofilmes resistentes, permitindo sua sobrevivência em atmosferas hipóxicas e outros ambientes extremamente adversos (QIN et al., 2022). Os biofilmes bacterianos são estruturas tridimensionais viscoelásticas, formadas por bactérias metabolicamente diversas e agregadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas. Os microrganismos que vivem nesses biofilmes apresentam fenótipos diferentes das células planctônicas, o que torna o tratamento extremamente desafiador (RAHMAN et al., 2022; (POUGET et al., 2023).

Curativos antimicrobianos são indicados quando há suspeita de colonização crítica ou infecção localizada em feridas. Se surgirem sinais sistêmicos como febre e leucocitose, sugerindo progressão para bacteremia ou septicemia, é necessário administrar antibióticos sistêmicos (YOUSEFIAN et al., 2022).

Esses curativos utilizam diversos tipos de antissépticos, como fenóis, bisfenóis, metais pesados, aldeídos, álcoois, anilidas, oxidantes e emulsionantes (CAMBIASO-DANIEL et al., 2018); curativos à base de prata (FONDER et al., 2008; GRADA; OBAGI; PHILLIPS, 2019); curativos com iodo (JONES; GREY; HARDING, 2006; Kanagalingam et al., 2015); biguanidas, como PHMB e clorexidina (CAMBIASO-DANIEL et al., 2018), ou antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, betalactâmicos, glicopeptídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina (SIMOES et al., 2018), para reduzir e eliminar a carga biológica local.

Devido à crescente dificuldade no tratamento de infecções, mesmo com elevado interesse, o desenvolvimento de novos antibióticos e outras estratégias terapêuticas está avançando lentamente. Isso se deve à variabilidade e complexidade da resistência aos medicamentos e à falta de uma compreensão aprofundada dos mecanismos patogênicos. Nesse contexto, a criação de abordagens terapêuticas eficazes para combater a invasão de patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa*, tornou-se uma urgência crescente, exigindo esforços colaborativos (PANG et al., 2019; AGGARWAL et al., 2024).

2.3 Tratamento para feridas

2.3.1 Curativos

Independentemente do fator desencadeante, feridas acarretam um elevado impacto nas pessoas que as sofrem, para os seus cuidadores e para o sistema de saúde (LINDHOLM; SEARLE, 2016). Isolamento social, problemas psicológicos, dor, morbidade e mortalidade são alguns dos problemas relacionados ao viver com uma ferida (LINDHOLM; SEARLE, 2016; FARAHANI; SHAFIEE, 2021).

Considerando-se a complexidade do processo de cicatrização de feridas, o qual possui várias etapas, envolvendo, de maneira orquestrada, a participação de diversos componentes e estruturas, o tratamento das lesões de pele torna-se um desafio único, havendo grande necessidade de desenvolvimento de novas terapias (SOOD; GRANICK; TOMASELLI, 2014), capazes de fornecer melhores manejos clínicos, melhor custo-efetividade e que forneçam condições vitais capazes de amplificar o processo de cicatrização (FARAHANI; SHAFIEE, 2021).

Desde a antiguidade, terapias para a cicatrização de feridas são utilizadas pela população, através do uso de substâncias de origem vegetal e animal, organismos vivos, minerais e curativos tradicionais (BOATENG et al., 2008). Os egípcios já faziam uso de mel, graxas e enfaixamentos em feridas, com o objetivo de remover a pele morta e o pus (BROUSSARD; POWERS, 2013). Essas terapias possuíam como principais finalidades manter o ambiente da ferida seco, livre de exsudato e impedir a infecção (BOATENG et al., 2008). Pesquisas posteriores demonstraram que feridas cobertas com curativos oclusivos permitem a manutenção da umidade no ambiente da lesão. O ambiente da ferida úmido contém proteínas e citocinas que facilitam o debridamento autolítico, a angiogênese, a formação de tecido de granulação e a migração de queratinócitos. A oclusão leva ainda à hipóxia, aumentando a produção de citocinas e estimulando a matriz extracelular (BROUSSARD; POWERS, 2013).

Com a evolução no tratamento de feridas, terapias que auxiliam o processo de cicatrização foram classificadas em tradicionais e modernas. Estas, são desenvolvidas para aplicação na superfície das feridas, fornecem proteção e condições essenciais para estimular o processo de cicatrização, reduzem a formação de cicatriz e melhoram as

condições da nova pele (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016; SHI ET AL., 2020; FARAHANI; SHAFIEE, 2021).

Os curativos tradicionais são do tipo gaze seca e úmida, ataduras, algodão e emplastos, podendo ser naturais ou sintéticos. Utilizados como curativos primários ou secundários, oferecem algum tipo de proteção contra infecções e absorção de exsudato e fluidos em uma lesão. No entanto, são mais indicados para feridas limpas e secas, visto que, em contato com exsudato, os curativos tradicionais, tendem a ficar umedecidos e com isso aderir à ferida. Além disso, requererem troca frequente e falham em fornecer um ambiente úmido para a ferida (DHIVYAA; PADMAB; SANTHINIA, 2015).

Terapias para a cicatrização moderna apresentam inúmeras vantagens frente aos curativos tradicionais, pois foram criadas para facilitar as etapas da cicatrização da ferida, propiciando um ambiente úmido, no qual as células epiteliais são capazes de se mover sem impedimentos, ocorrendo uma circulação efetiva de oxigênio e uma baixa carga bacteriana (VOWDEN; VOWDEN, 2017). Estes novos curativos são geralmente baseados em polímeros sintéticos e classificados como produtos passivos, cobrem e protegem as feridas; bioativos, liberam substâncias ativas; e interativos, mantêm um microambiente adequado para a cicatrização. De acordo com o tipo de ferida, diferentes tipos de curativos, com as mais diversas características e associações estão disponíveis no mercado (DHIVYAA; PADMAB; SANTHINIA, 2015). Dentre os curativos modernos mais utilizados na prática clínica podemos citar os hidrogéis, os hidrocolóides, os filmes, as espumas e os alginatos (**Tabela 1**) (SHI et al., 2020).

Estes curativos auxiliam na retenção de umidade e controle de temperatura adequado, biocompatibilidade, fornecerem proteção física e microbiológica, alívio da dor, além de também possibilitarem carrear substâncias farmacologicamente ativas com diversas propriedades, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e epitelizantes (NGUYEN et al., 2023). No entanto, esses curativos possuem a desvantagem em relação ao valor (**Tabela 1**), onde, muitas vezes faz-se necessário a utilização de várias unidades para o tratamento completo de uma ferida.

Tabela 1. Curativos modernos mais utilizados na prática clínica

Tipo de curativo*	Função*	Nome comercial*	Preço Médio (R\$)**
Hidrofibra -Alginato de cálcio	Promover hemostasia e absorção	Algicura®, Bitain® <i>Alginate</i> , Missner®, kendall®, Curatec®	15,00 – 30,00
Hidrofibra - Alginato de cálcio com prata	Promover hemostasia, absorção e controle de infecção	Bitain® <i>Alginate Ag</i> , Missner®, Silvercare®	50,00 – 180,00
Espuma - Gel de silicone e/ou poliuretano	Promover absorção, barreira microbiológica e aos fluidos, minimiza as forças de pressão	Allevyn®, Bitain® silicone	70,00 – 130,00
Malha/ compressa tule - carvão ativado com prata	Controle de infecção e odor	Acticare®, Casex® act carbon Ag, Actsorb® silver	40,00 – 160,00
Hidrocolóide - carboximetilcelulose, e/ou pectina e/ou gelatina	Proporciona um ambiente úmido para a cicatrização, diminui a dor e odor	Comfeel® Plus, Curativo Hidrocoloide Curatec®, Hydrocoll®, Coloplast®	10,00 - 90,00
Hidrogel	Promove o debridamento autolítico e docação de umidade	Purilon® gel, Curatec® gel, Intrasite® gel	30,00 - 80,00
Película de poliuretano	Barreira de proteção contra bactérias e agressões externas	Cremer®, skinupper®, Smith & Nephew®, BSN Medical®	120,00 - 300,00

*Fonte: Adaptado de BOATENG et al., 2008; SOUZA et al., 2012; BROUSSARD; PODERES, 2013; GHOMI et al., 2019; SHI et al., 2020.

**Média de preço realizada através de consulta em fornecedor especializado em curativos (CIRURGICA SALUTAR, 2024)

Dentre os curativos modernos, os hidrogéis são uma rede tridimensional de polímeros orgânicos compostos por substâncias hidrofílicas insolúveis, contendo entre 80-90% de água, semelhante a estrutura da MEC (YANG et al, 2024), absorvem uma boa quantidade de água e exsudato, sendo utilizados em feridas com exsudato de leve a moderado, principalmente em úlceras de pressão, feridas cirúrgicas, queimaduras e dermatites por radiação. Esses géis podem ser aplicados, principalmente, em forma de gel amorfo de fluxo livre, diretamente na ferida na forma de gel, necessitando de uma cobertura secundária; e filme/folha flexível, normalmente pré-formado em molde (**Figura 3**) (BOATENG et al., 2008; BROUSSARD; PODERES, 2013; SOOD; GRANICK; TOMASELLI, 2014; HUANG et al., 2022; LIU et al., 2023).

Polímeros naturais, como os derivados da celulose e da quitosana, são frequentemente empregados na preparação de hidrogéis (YANG et al., 2024; ZHANG et al., 2023; WANG et al., 2023) visto que apresentam uma excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade e podem ter sua atividade aumentada pela adição de nanomateriais (SHEN et al., 2023; YANG et al., 2024).

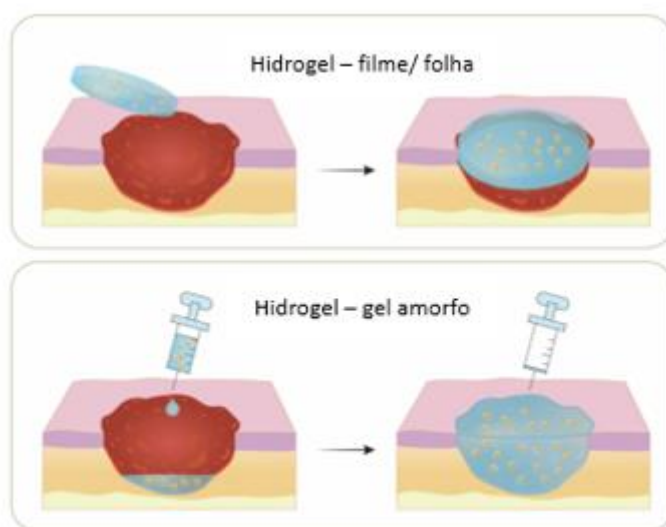


Figura 3: Principais formas de aplicação dos hidrogéis. Fonte: adaptado de HUANG et al., 2022.

Derivada da quitina, a quitosana, tem sido amplamente empregada no tratamento de feridas. Obtida a partir de camarões e caranguejos apresenta um custo relativamente baixo (LOO et al., 2022; PENG et al., 2022). Esse componente é absorvido pelas células epiteliais, desempenhando um papel importante no estímulo do crescimento, fortalecimento da rede tecidual e aumento da síntese de colágeno, favorecendo o processo de cicatrização (ZHAO et al., 2023). Ademais, a quitosana exibe boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, propriedades antibacterianas, capacidade de promover hemostasia, ação anti-inflamatória, absorção eficiente de exsudato e estímulo ao crescimento da fibra colágena além de promover a regeneração tecidual da pele (ISHIHARA et al., 2002; LIM; HUDSON, 2003; HICKMAN et al., 2018; PENG et al., 2022).

A celulose, outro componente utilizado no tratamento de feridas, é um polissacarídeo predominantemente extraído das paredes celulares de plantas e bactérias que apresenta boa resistência mecânica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de induzir a regeneração tecidual (ZHAO et al., 2023). Diversos hidrogéis têm sido desenvolvidos com base na celulose e seus derivados, oferecendo como benefícios uma capacidade de absorção de exsudato, propriedades antimicrobianas e capacidade

regenerativas, fornecendo um ambiente propício para a cicatrização de feridas (FRANCESKO; PETKOVA; TZANNOV, 2018; ALVEN; ADERIBEGBE, 2020; LONG et al., 2022; KESHAVARZ; OLSEN; ALMEIDA, 2023; ZHANG et al., 2023).

Os hidrogéis, devido sua capacidade hidratante, mantêm o ambiente da ferida úmido, limpo, saudável e granuloso, desempenhando um papel no debridamento autolítico dos tecidos necróticos, são capazes de reduzir a temperatura do leito da ferida, característica positiva na redução da dor e no conforto do paciente e servirem como barreira de prevenção à infecção. Além disso, por serem claros ou transparentes, um curativo feito com hidrogel pode ser monitorado sem a sua remoção (VOWDEN; VOWDEN, 2017; CAO et al., 2023; JIN et al., 2023; ZHAO et al., 2023).

Além disso, os hidrogéis podem ser utilizados em conjunto com medicamentos ou agentes antibacterianos, anti-inflamatórios e antioxidantes, demonstrando capacidade de liberação local do medicamento, o que torna esse material carreador de fármacos e de substâncias ativas (SOOD; GRANICK; TOMASELLI, 2014; VOWDEN; VOWDEN, 2017; CARDOSO et al., 2019; SHI et al., 2020; BALESTRIN et al., 2022; CAO et al., 2023; LIU et al., 2023; NASRA et al., 2023).

2.3.2 Fármacos utilizados no tratamento de feridas – polihexametileno de biguanida (PHMB) e Curcumina (CUR)

Medicamentos e moléculas bioativas, como a CUR, podem modular e auxiliar uma ou várias etapas envolvidas no processo de regeneração da pele. Além disso, a associação de curativos com moléculas terapêuticas e antimicrobianos, como PHMB, agentes de limpeza, enzimas e fatores de crescimento, desempenha um papel importante no processo de cicatrização direta ou indiretamente pela remoção dos tecidos necróticos, prevenção e tratamento de infecções, promovendo a regeneração tecidual (DHIVYAA; PADMAB; SANTHINIA, 2015; FARAHANI; SHAFIEE, 2021).

O cloridrato de polihexametileno de biguanida (PHMB) é uma mistura sintética polidispersa de polímeros, possui fórmula molecular $(C_8H_{17}N_5)_n$ (**Figura 4**). É um biocida catiônico que possui um grupo biguanida ligado a um espaçador flexível, o grupo hexametileno. Por sua estrutura anfifílica, alternada entre segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, apresenta um comportamento típico de surfactante (PAULA; NETTO; MATTOSO, 2011; KUSTERS et al., 2013). Possui ótima atividade antimicrobiana, estabilidade química, baixa toxicidade e custo razoável, sendo amplamente empregado,

desde a década de 1950, em vários produtos comercializados mundialmente (PAULA; NETTO; MATTOSO, 2011; KRAMER et al., 2018).

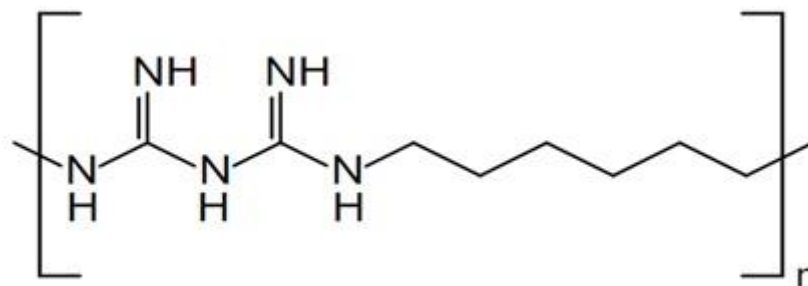


Figura 4: Estrutura química do PHMB

O PHMB liga-se aos grupos fosfolipídicos de fosfato carregados negativamente presentes na parede celular bacteriana, afundando segmentos apolares no interior hidrofóbico, resultando em disfunção da membrana e o consequente aumento da sua permeabilidade, culminando com o rompimento da parede e da membrana celular, acarretando na morte dos microrganismos (BABALSKA; KORBECKA-PACZKOWSKA; KARPINSKI, 2021). Esse composto possui amplo espectro de ação, sendo eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo bactérias de difícil controle como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococos* resistentes à vancomicina (MOORE; GRAY, 2007; FABRY; KOCK, 2014; FABRY; KOCK; VAHLENSIECK, 2014 SHOUKAT et al., 2015; RENZONI et al., 2017), além de possuir ação contra a formação de biofilmes (DAVIS et al., 2017; SALAMONE et al., 2020; STUERMER et al., 2021).

Na revisão sistemática realizada por To e colaboradores (2016), foram exploradas as evidências disponíveis sobre o PHMB e sua eficácia como agente no tratamento de feridas crônicas, ressaltando que este ativo pode ser efetivo no processo de cicatrização de feridas crônicas, além de diminuir a dor associada e a carga bacteriana na lesão (TO et al., 2016).

Devido a sua boa estabilidade e espectro de ação, o PHMB é amplamente empregado no tratamento de feridas em curativos com concentrações que variam de 0,1% a 0,5%, apresentando duração de atividade antibacteriana de 3-7 dias (ALVES et al., 2021; GUIOMAR; URBANO, 2022). Atualmente no mercado, os mais variados tipos de curativos contendo PHMB são comercializados como, Curatec® Gel com PHMB - gel com PHMB 0,1%, utilizado para limpeza, descontaminação, debridamento e umidificação de feridas agudas e crônicas (Curatec, 2024); gaze 100% algodão Curatec®

com PHMB 0,2% - para tratamento de lesões colonizadas/ infectadas (Curatec, 2024); SupresorbXPHMB® - curativo hidrobalance com PHMB, com ação antimicrobiana de amplo espectro, ofertando umidade e retenção de exsudato, utilizado para qualquer tipo de ferida, além de apresentar melhora na sensação de dor (Bisturi, 2024). Aquasept® Plus – solução aquosa 0,2% com indicação de uso na limpeza e descontaminação de feridas. No entanto, conforme observado por Rembe e colaboradores (2016), mesmo em concentrações reduzidas, o PHMB está associado a uma elevada toxicidade (REMBE et al., 2016). Através da utilização da nanotecnologia, podemos obter benefícios que auxiliem na atenuação da toxicidade desse composto.

A *Curcuma longa* L. é uma planta pertencente a espécie *Zingiberaceae*, popularmente conhecida como açafrão e cujos rizomas fornecem a CUR, um constituinte polifenólico de baixo peso molecular e de ocorrência natural (KUMARI et al, 2022). Os curcuminóides são componentes fundamentais da cúrcuma, responsáveis pela sua cor amarelo alaranjada. Os rizomas da cúrcuma contêm de 3-5% de quatro tipos de derivados curcuminóides, sendo a curcumina (77%) o composto majoritário e o constituinte bioativo mais importante, seguido por desmetoxicurcumina (17%), bisdesmetoxicurcumina (3%) e ciclocurcumina (3%) (JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020).

Há séculos a CUR vem sendo amplamente utilizada pela medicina asiática por suas propriedades farmacológicas, biológicas e baixa toxicidade, sendo aplicada no tratamento de distúrbios digestivos, cicatrização de feridas, doenças inflamatórias, alergias cutâneas, infecções, doenças neurodegenerativas, entre outros (SILVA et al., 2018; LIAKOPOULOU; MOURELATOU; HATZIANTONIOU, 2021).

Com fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, a CUR possui uma estrutura formada por dois anéis aromáticos, com funções fenol, unidos por cadeias carbônicas alifáticas insaturadas de carbono contendo um grupo carbonila em C-3 e outro em C-5 (**Figura 5**) (RAFIEE et al., 2019). A CUR exibe tautomerismo, dependendo da natureza química do meio solvente, da temperatura e da polaridade deste, podendo existir nas formas ceto ou enol. Em solução exibe isomeria CIS-TRANS, sendo a forma TRANS a mais estável. A CUR possui uma molécula (**Figura 5**) relativamente hidrofóbica e altamente solúvel em lipídeos, sensível a condições ambientais como umidade, luz, oxigênio, altas temperatura e pH extremo (WAGHULE et al., 2020).

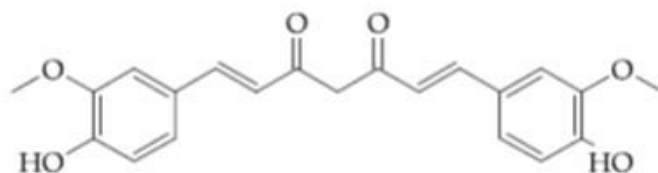


Figura 5: Estrutura química da curcumina

Por sua estrutura polifenólica, a CUR dispõe de uma capacidade de múltiplas ações farmacológicas, tendo estudos documentando seu uso eficaz contra uma variedade de patologias, com resultados promissores e recebendo considerável interesse em diversas linhas de pesquisas (JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020). Em uma revisão de ensaios clínicos conduzida por Salehi e colaboradores (2019) foram constatados efeitos da CUR em distúrbios inflamatórios, cutâneos, cardiovasculares, urogenitais, respiratórios, oculares, gastrintestinais, do sistema nervoso central, doenças malignas e intoxicações (SALEHI et al., 2019).

As propriedades de atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a capacidade de eliminação de radicais livres torna a CUR um potencial candidato para o tratamento de feridas (WAGHULE et. al., 2020). A CUR melhora a contração da ferida, modula a resposta inflamatória, aumenta a deposição de colágeno e promove angiogênese, fatores responsáveis por manter a homeostase e restaurar a integridade do tecido lesado, objetivos fundamentais no processo de cicatrização de feridas (KULAC et al., 2013; EMIROGLU et al., 2015; HEYDARI ET al., 2022; SOOD et al., 2023).

As propriedades físico-químicas da CUR, no entanto, dificultam a sua utilização e aplicações clínicas. Baixa solubilidade em água, sensibilidade a luz, instabilidade no pH fisiológico, biodisponibilidade oral menor que 1%, elevada metabolização e baixos níveis plasmáticos e teciduais são problemas encontrados pelos pesquisadores no manejo desse composto (SALEHI et al., 2021). No entanto, o uso da nanotecnologia é uma alternativa que pode contribuir para melhorar as propriedades da CUR, obtendo melhorias na sua solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (ZHENG; MCCLEMENTS, 2020; WITIKA et al., 2021; HASSANIZADEH et al., 2023). Nesse contexto, NEs têm sido relatadas como um ótimo carreador lipídico para a CUR (JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020; KUMAR; NANDA, 2023).

2.4 Tratamento para feridas: Nanotecnologia

A nanotecnologia é um ramo tecnológico que manuseia a matéria na escala nanométrica, gerando produtos com propriedades únicas, com grande área de superfície em relação a seu volume (RAJENDRAN et al., 2018; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019). Os nanocompostos podem melhorar a eficiência de ativos farmacêuticos, como agentes anti-inflamatórios, antibióticos ou fatores de crescimento, aumentar a biodisponibilidade, otimizar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, melhorar a estabilidade e reduzir a degradação, além de minimizar potencial toxicidade dos compostos ativos (SHARIFI et al., 2020).

A utilização e a aplicação da nanotecnologia no tratamento de feridas em diferentes fases do reparo vêm sendo explorada (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019). Nas terapias de feridas, dois tipos de nanomateriais são mais utilizados, os com propriedades intrínsecas capazes de promover o tratamento da lesão, como a prata (BURDUŞEL et al., 2018), o ouro (VIJAYAKUMAR et al., 2019), a quitosana (HSU et al., 2011) e o zinco (GAO et al., 2017); e os nanomateriais que atuam como veículos para agentes terapêuticos, como os nanocarreadores lipídicos (NASKAR; KIM, 2020).

Sistemas de entrega de compostos ativos utilizando nanotecnologia têm sido foco de pesquisas na área farmacêutica e direcionados ao tratamento de feridas por possuírem potenciais aplicações como sistemas de liberação de compostos ativos seguros, biocompatíveis e econômicos, além da capacidade de prevenir a degradação do composto e apresentarem baixa toxicidade, alta eficiência, capacidade de sustentar uma liberação controlada e possibilitar o direcionamento a locais específicos no organismo (WANG et al., 2019). Entre os tipos de nanopartículas utilizadas como sistemas carreadores no tratamento de cicatrização de feridas destacam-se os lipossomas e os nanocarreadores lipídicos (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; WANG et al., 2019; LO; MAHMOUDI; FAUZI, 2023).

Lipossomas são vesículas lipídicas esféricas constituídas em uma porção central aquosa circundada por uma ou mais bicamadas de moléculas anfifílicas, como fosfolipídios e colesterol (CHEN et al., 2013; SAFTA; BOGDAN; MOLDOVAN; 2022). São sistemas não tóxicos, biocompatíveis, não imunogênicos, biodegradáveis e amplamente utilizados para aplicações em feridas (TAKAHASHI et al., 2009;

KARATOPRAL et al., 2020; CUI; PAN; PAN, 2017; ALLAW et al., 2021; SAFTA; BOGDAN; MOLDOVAN; 2022; JAHROMI; ROTHAMMER; FUHRMANN, 2023).

Os nanocarreadores lipídicos são constituídos por uma fase aquosa e lipídios, sendo estabilizados por surfactantes (SOUTO et al., 2022). Quando em sua constituição há somente lipídios sólidos a temperatura ambiente obtém-se nanopartículas sólidas lipídicas (NLS), quando há a associação de lipídios sólidos e líquidos a temperatura ambiente têm-se os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e quando há apenas a presença de lipídios líquidos a temperatura ambiente obtém-se as nanoemulsões (NEs) (MOTSOENE; ABRAHAMSE; KUMAR, 2023).

As NEs são sistemas de dispersões coloidais compostos por dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, estabilizados por surfactantes e co-surfactantes, formando partículas em escala nanométrica (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018; ASHAOLU, 2020; HO; ABIKA; MIKKONENA, 2022). Apresentam gotículas com aparência translúcida (clara) ou nebulosa (branco leitoso) (SINGH et al., 2017), distribuição de tamanho uniforme e formam sistemas termodinâmica e cineticamente estáveis (RAI et al., 2018).

O sistema das NEs é composto por uma fase dispersa e uma fase contínua podendo ser categorizados em dois tipos: óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (**Figura 6**) (SINGH et al., 2017). Nas NEs A/O, a água é dispersa em uma fase contínua oleosa; já nas NEs O/A, o óleo é disperso em uma fase aquosa contínua (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). Dependendo do tipo de surfactante utilizado, pode-se prever o tipo de NEs que serão formadas, caso o surfactante principal seja solúvel em água ocorre o favorecimento para a formação de NEs do tipo O/A, caso contrário, com surfactante solúvel em óleo, tenderá para NEs do tipo A/O (MOGHASSEMI et al., 2022).

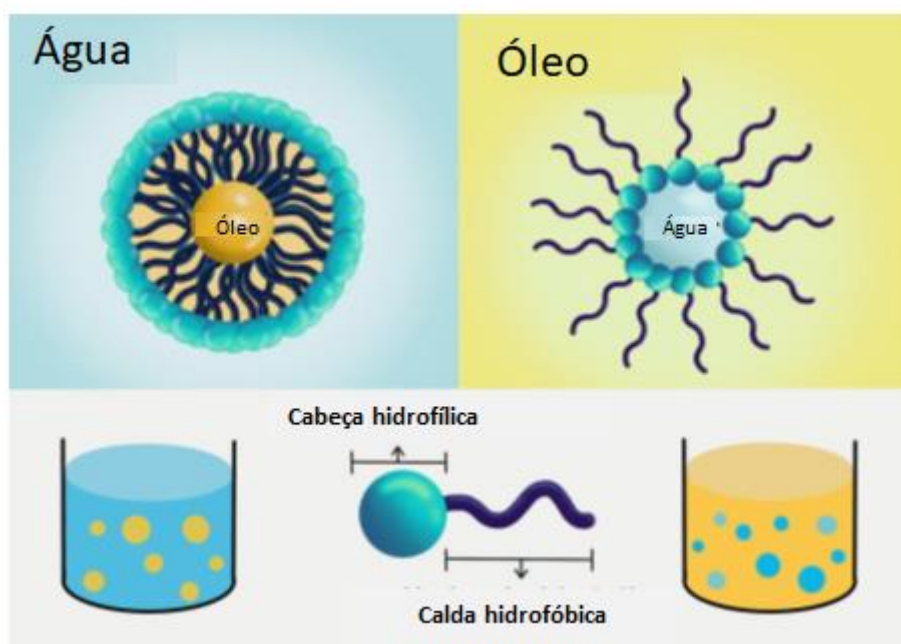


Figura 6: Estruturas das NEs baseadas na composição da fase oleosa e aquosa. Fonte: Adaptado de ASHAOLU, 2020.

Dentre os componentes das formulações de NEs, uma variedade de moléculas apolares como triglicerídeos, óleos vegetais, óleos minerais, ácidos graxos livres e óleos essenciais podem ser utilizadas como constituintes da fase oleosa (KUMAR et al., 2019). Emulsões O/A podem conter entre 2-20% de partículas de lipídios (RAI et al., 2018). A seleção do lipídeo/ óleo é fundamental para a formação da fase oleosa, pois, é geralmente nessa fase que ocorre a solubilização do fármaco destinado a ser utilizado para o tratamento de várias patologias (SINGH et al., 2017). A fase aquosa é basicamente formada por água, podendo conter outros compostos como tampões, sais, co-solventes, conservantes, carboidratos e proteínas, os quais promovem formulações com propriedades físico-químicas e fisiológicas diversas (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

No processo de preparo de NEs, um surfactante adequado ou uma combinação de dois ou mais surfactantes é adicionada à formulação. Surfactantes e co-surfactantes são moléculas tensoativas anfífilas, dotadas de uma região hidrofóbica e outra hidrofílica e que possuem a capacidade de adsorver rapidamente na interface óleo-água, facilitando a ruptura dos glóbulos, agindo por reduzir a tensão interfacial entre as fases contínua e dispersa das NEs, formando uma nova interface e fornecendo uma barreira contra floculação e coalescência, proporcionando estabilização (HO; ABIKA; MIKKONENA, 2022).

Obter uma distribuição monodal com tamanho de partícula desejado é um critério importante na fabricação de uma NE (SINGH et al., 2017). Para a produção de NEs, vários métodos podem ser utilizados, sendo que estes podem ser classificados de acordo com a energia empregada durante o preparo. Técnicas que utilizam alta energia recorrem ao uso de forças de cisalhamento e turbulência, geradas através do uso de energia mecânica (FERNANDEZ et al., 2004; KAMAICO; MCCLEMENTS, 2016) e técnicas de baixa energia utilizam a energia e as propriedades físico-químicas dos sistemas para quebrar as gotículas, obtendo gotas muito pequenas (TRADOS et al., 2004; KAMAICO; MCCLEMENTS, 2016).

Ao utilizar energia mecânica para fornecer energia ao sistema, com o objetivo de quebrar e misturar as fases oleosas e aquosas, os métodos de alta energia quebram grandes gotas em gotas menores, de tamanho pertencente a escala nanométrica, produzindo NEs com alta energia cinética (KUMAR et al., 2019). Homogeneização a alta pressão, microfluidização e sonicação são os métodos de alta energia mais utilizados e, atualmente, são os mais empregados para a produção de NEs em escala industrial, possibilitando um maior controle no tamanho das gotículas com a seleção dos componentes da formulação, bem como o controle da cor, da estabilidade e da reologia das NEs (KOMAICO e MCCLEMENTS, 2016; KUMAR et al., 2019). Por lidarem com alta temperatura e pressão, métodos de alta energia têm uso limitado para fármacos e moléculas termolábeis, visto que durante o processo de produção pode ocorrer a degradação destas (AZMI et al., 2019).

Métodos de baixa energia incluem temperatura de inversão de fases, emulsificação espontânea e inversão de fase catastrófica (AZMI et al., 2019). Esses métodos são mais eficientes energeticamente, pois utilizam da energia química interna do sistema para formar pequenas gotículas em certas misturas de surfactante-óleo-água, quando parâmetros como a composição ou temperatura do sistema são alteradas (RAI et al., 2018). São métodos que não requerem uso de equipamentos sofisticados ou de alto custo, porém, podem ficar limitados pelo tipo de óleo e emulsificantes utilizados (KOMAICO E MCCLEMENTS, 2016).

As características das NEs dependem dos componentes e das propriedades químicas e físicas da fase oleosa e dos surfactantes utilizados, como também da concentração dos componentes utilizados na fase aquosa, podendo diferir na viscosidade, índice de refração, tensão interfacial, solubilidade em água, densidade e estabilidade química

(AZMI et al., 2019). A escolha de um método para produção de NEs está diretamente atrelada a natureza dos compostos da formulação, principalmente a fase oleosa e os tensoativos (surfactantes) utilizados, além dos atributos físico-químicos e funcionais desejados no produto final, como características ópticas, de estabilidade, reológicas e de liberação (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018; MUSHTAQ et al., 2023).

Devido a efeitos hidrofóbicos e interações moleculares desfavoráveis associados as propriedades da camada interfacial, as NEs são sistemas termodinamicamente instáveis, possuindo uma força motriz impulsionando para reduzir a área de contato entre as fases de óleo e água, levando, com o tempo, a decomposição das NEs (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). Essa decomposição pode ocorrer por vários fenômenos, como floculação, coalescência, sedimentação, separação gravitacional e amadurecimento de Ostwald (SINGH et al., 2017). A composição do surfactante, tamanho da gota e carga superficial são características que estão diretamente relacionadas com a estabilidade das NEs. Quando o movimento Browniano das nanopartículas supera as forças gravitacionais da emulsão, a estabilidade cinética é alcançada e inibe a agregação das gotículas (ASHAOLU, 2020).

O tamanho das gotículas, sua distribuição e as forças de interação de superfície entre gotículas e agente surfactante desempenham um papel importante na estabilidade das NEs (SINGH et al., 2017). Técnicas microscópicas avançadas como microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão são utilizadas para caracterizar a morfologia das gotículas e o tamanho das NEs (HO; ABIKA; MIKKONENA, 2022).

O índice de polidispersão (PDI) é uma medida que indica a uniformidade de distribuição do tamanho das gotículas, já o espalhamento de luz dinâmico ou difração a laser são técnicas utilizadas para analisar o tamanho de gotícula. Para medir a carga na superfície das NEs utiliza-se o potencial zeta, através do princípio da mobilidade eletroforética, fornecendo indicativos referentes a estabilidade a longo prazo (SINGH et al., 2017; WANG et al., 2023). NEs são ainda avaliadas com base em sua viscosidade, teor e eficiência de encapsulação do composto ativo, liberação *in vitro*, permeação/retenção *ex vivo* através de membranas biológicas e avaliação *in vivo* de atividade farmacológica (RAI et al., 2018; PREETI et al., 2023).

Sistemas de entrega de medicamentos baseados em NEs têm sido utilizados para contornar e superar limitações associadas às características das moléculas encapsuladas e

ofertar melhoria na administração de compostos ativos. Os sistemas baseados em NEs oferecem vantagens, como maior área superficial, maior estabilidade, métodos fáceis de preparo, possibilidade de solubilizar moléculas tanto lipofílicas quanto hidrofílicas (ASHAOLU, 2020; MUSHTAQ et al., 2023), melhor perfil de liberação de compostos ativos e capacidade de aprimorar propriedades organolépticas dos compostos quando nanoencapsulados (AZMI et al., 2019). Em relação as vias de administração, NEs podem ser empregadas para a administração por via oral, parenteral, pulmonar, ocular, nasal e transdérmica, podendo efetivamente melhorar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade dos compostos, além de possuir potencial de direcionamento a regiões específicas (KUMAR et al., 2019; WIKITA et al., 2020; GARCIA et al., 2022; MOGHASSEMI et al., 2022).

Os principais benefícios da utilização de NEs para o tratamento de feridas incluem a alta capacidade de carga de medicamento, liberação controlada e proteção contra degradação enzimática, melhorar a solubilidade e biodisponibilidade, além de preparação e aumento de escala relativamente simples (CHHABRA et al., 2023).

A utilização de NEs direcionadas ao tratamento de doenças de pele e sua utilização em formulações para aplicação tópica tem sido demonstrada através de diversos estudos (SHAKEEL; RAMADAN; AHMED, 2009; BASPINAR; BORCHERT, 2012; CHARLES et al., 2014; ESPINOZA et al., 2019; NASR et al., 2022). NEs têm sido desenvolvidas para aplicações no tratamento de feridas (CHHABRA et al., 2023), carregamento de compostos cicatrizantes (AHMAD et al., 2019; RYU et al., 2020; ARAUJO et al., 2023), no tratamento de queimaduras (DOLGACHEV et al., 2021), além de carregamento de agentes antimicrobianos direcionados ao tratamento de feridas infectadas (CAO et al., 2017; CHEN et al., 2022).

Para aplicação tópica, as NEs apresentam algumas desvantagens, como baixa viscosidade, espalhabilidade e retenção inadequada na pele, desvantagens essas que podem ser resolvidas utilizando uma abordagem envolvendo nanoemulgeis (NEGs), compostos formados por NEs (O/A ou A/O) integradas em um sistema à base de gel (LAL et al., 2023). As NEs protegem os compostos ativos contra a degradação enzimática e a hidrólise e melhora a permeação através da pele, a parte do gel estabiliza o sistema, diminuindo a tensão superficial e interfacial, melhorando a estabilidade termodinâmica, além de aumentar a viscosidade e a espalhabilidade, resultando em melhor tempo de retenção (SENGUPTA; CHATTERJEE, 2017; AITHAL; NARAYAN; NAYAK, 2020).

Os NEGs apresentam como vantagens, a alta capacidade de carga de fármacos, melhor poder de penetração e difusão e menor irritação à pele quando comparado a outros nanotransportadores (AITHAL; NARAYAN; NAYAK, 2020; DONTI et al., 2023).

Yousef e colaboradores (2019) desenvolveram NEs carregadas com CUR utilizando diferentes surfactantes, co-surfactantes e óleos com o objetivo de melhorar o perfil de liberação cutânea da CUR, fornecendo evidências do uso de NEs como sistema de entrega para compostos lipofílicos à pele, sendo a CUR um potencial composto para formulações direcionadas as camadas mais profundas deste órgão (YOUSEF et al., 2019).

Em estudo conduzido por Ahmad e colaboradores (2019), um sistema de liberação de fármaco auto nanoemulsificante de CUR foi produzido. Utilizando óleo de cravo (óleo), tween-80 (surfactante) e PEG-400 (co-surfactante), NEs O/A carregadas com CUR (CUR-NE) foram desenvolvidas pelo método de ultrasonicação e avaliadas, frente a CUR pura, quanto a solubilização, permeação através da pele e potencial cicatrização. As CUR-NE apresentaram tamanho de gota de $93,64 \pm 6,48$ nm, PDI de $0,263 \pm 0,021$, com potencial zeta $-11,67 \pm 0,11$ e teor de droga de $98,11 \pm 0,16\%$. O sistema de liberação de apresentou resultados satisfatórios com aumento da solubilidade, permeação da pele e um potencial papel na melhoria da cicatrização de feridas, além de ação anti-inflamatória (AHMAD et al., 2019).

Ali e colaboradores (2022), formularam um sistema de NEs de CUR (CR-NE) e vitamina E, avaliando-o quanto à eficácia no processo de cicatrização em animais diabéticos. O sistema CR-NE, com NEs O/A, foi produzido pela técnica de homogeneização a alta pressão, utilizando tween-80 (surfactante), PEG-400 (co-surfactante) e α -tocoferol (óleo). A NE otimizada (CR-NE-II) exibiu tamanho de gota de $26,76 \pm 0,9$ nm, carga superficial negativa ($-10,86 \pm 1,06$ mV) e teor de farmaco de $68,05 \pm 1,2\%$. Observou-se melhoria no processo de cicatrização, onde o sistema de NEs apresentou atividade antioxidante e antibacteriana, além de um aumento da deposição de colágeno, acelerando a regeneração da pele em comparação com animais não tratados (ALI et al., 2022).

Sistemas de NEs contendo CUR (CUR-NE) e vitamina D3 foram desenvolvidos por diferentes métodos e incorporados a hidrogéis por Demisli e colaboradores (2020), tendo suas características e propriedades avaliadas bem como o efeito citotóxico no tecido epitelial nasal. NEs O/A foram produzidas através de método de baixa energia –

emulsificação espontânea - e alta energia - homogeneização a alta pressão – utilizando azeite extra virgem (óleo), Tween-80 (surfactante), miristato de isopropila, Maisine® CC, Labrasol® e Transcutol® HP. As CUR-NE obtidas pelo método de alta energia apresentaram tamanho de gota de $165,6 \pm 1,0$ nm e PDI de $0,072 \pm 0,008$. Neste estudo foi observado que as NEs O/A, obtidas pelo método de baixa e alta energia, são biocompatíveis e que os hidrogéis a base de NEs são adequados como carreadores de compostos lipofílicos como CUR e vitamina D3 (DEMISLI et al., 2020).

As propriedades físico-químicas, permeação e retenção do fármaco *ex vivo* e a propriedade de cicatrização de feridas *in vivo* de diferentes sistemas de NE contendo CUR e dispersos em hidrogéis foram avaliadas por Algahtani e colaboradores (2021). O sistema NE carregado com CUR foi preparado pela técnica de ultrassom de alta energia, utilizando Labrafac® PG como fase oleosa, Tween 80 como surfactante e PEG 400 como co-surfactante, obtendo NEs com tamanho de gota $56,25 \pm 0,69$ nm, PDI de $0,05 \pm 0,0$, carga superficial negativa com potencial zeta $-20,26 \pm 0,65$ mV e teor de CUR de $99,23 \pm 0,28$. Os resultados mostram-se satisfatórios quanto ao desenvolvimento de um nanoemulgel de CUR, avaliando com sucesso o processo de permeação cutânea e a eficácia na cicatrização de feridas (ALGAHTANI et al., 2021).

Com o objetivo de projetar e caracterizar curativos nanotecnológicos carregados com CUR, Araujo e colaboradores (2023) desenvolveram um sistema de NE O/A carregadas com CUR e realizaram sua incorporação em gazes. As NEs foram produzidas através de dois métodos de alta energia, ultrassom (US) e um homogeneizador de alta pressão (HAP), utilizando triglicerídeos de cadeia média e Span 80 como fase oleosa e Tween 80 como surfactante. Foram obtidas NE com tamanhos de 135 nm, PDI de 0,101 e potencial zeta de $-22,08$ mV (NE-CUR-US) e NE com tamanhos de 144,55 nm, PDI de 0,125 e potencial zeta de -18 mV (NE-CUR-HAP), ambas com alta eficiência de encapsulamento e estabilidade por até 120. A incorporação das NEs na gaze foi realizada com sucesso, mostrando-se como um promissor curativo para o tratamento de queimaduras (ARAUJO et al., 2023).

Em sequência ao estudo anterior, Araujo e colaboradores (2023), utilizando a técnica de HAP, obtiveram resultados favoráveis ao desenvolvimento de uma NE-CUR, além de observar seus efeitos positivos relacionados a viabilidade celular. No entanto, o efeito antimicrobiano frente à *Pseudomonas aeruginosa* só foi alcançado com a associação da gentamicina (ARAUJO et al., 2023).

O efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina de nanopartículas carregadas com PHMB e norfloxacina foi alvo de pesquisa por parte de Kamaruzzaman e colaboradores (2018). O PHMB foi dissolvido em água destilada estéril e a nadifloxacina foi dissolvida em solução de hidróxido de sódio 0,1 M, em seguida foram misturados em um tubo de microcentrífuga e incubados em um agitador. A associação dos compostos formulados como nanopartículas demonstrou ser mais eficaz que a utilização dos antimicrobianos livres (sozinhos ou em associação). Além disso, a formulação em nanopartículas reduziu a toxicidade do PHMB e manteve inalterado seu poder de ação (KAMARUZZAMAN et al., 2018).

Müller e colaboradores (2011) combinaram emulsões O/A ou lipossomas contendo fosfatidilcolina de gema de ovo e PHMB. O PHMB foi diluído em água para concentrações finais de 0,1; 0,2 e 0,4% (p/v) de PHMB. Volumes iguais de dispersões contendo lipossomas e emulsões o/a) e 0,1; 0,2 ou 0,4% (p/v) de PHMB foram combinados e bem misturados à temperatura ambiente (20 ± 2 °C). O estudo avaliou a atividade bacteriana dos sistemas contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e citotoxicidade. Foi observado que tanto o sistema de emulsões quanto os lipossomas foram capazes de diminuir a citotoxicidade sem alterar o efeito antisséptico (MÜLLER et al., 2011).

He e colaboradores (2022), com o objetivo de desenvolver novos agentes e estratégias antibacterianas, criaram um sistema de nanopartículas (Au NPs) de ouro funcionalizadas com PHMB, caracterizando-o e avaliando a atividade antibacteriana e anti-biofilme. Au NPs foram preparadas pelo método da temperatura de inversão de fases, após, 10 mL de PHMB (10 mg mL⁻¹) foram adicionados a 10 mL dos Au NPs por gotejamento e a mistura foi levemente agitada por 2 h para garantir que o PHMB entrasse em contato com os Au NPs amplamente, o nanosistema PHMB@Au NPs (1 mg mL⁻¹) foi então dispersado em água. O estudo evidenciou que o sistema inibiu a formação de biofilmes e auxiliou no processo de cicatrização, demonstrando um grande potencial como agentes antimicrobianos e para pesquisas na terapia de feridas infectadas (HE et al., 2022).

Nanolipossomas carregadas com PHMB foram desenvolvidas por Ahani e colaboradores (2018). Através da técnica de HAP foram obtidas nanolipossomas com tamanho de gota de $43,78 \pm 0,04$ nm, PDI de $0,205 \pm 0,004$, potencial zeta positivo de $11,0 \pm 0,08$ mV, teor de droga de $55,4 \pm 0,3\%$ e um perfil de liberação de 92% nas primeiras 24h. Também foram avaliadas a atividade antimicrobiana contra bactérias

gram-negativas e gram-positivas e a citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos dos nanolipossomas. O estudo evidenciou que a encapsulação do PHMB em nanolipossomas melhorou a biocompatibilidade e a segurança do polímero, além de manter sua atividade antimicrobiana (AHANI et al., 2018).

Um hidrogel a base de quitosana contendo emulsão de perfluorocarbono (PEs), nanopartículas de quitosana carregadas com fator de crescimento epidérmico (EGF) e PHMB foi desenvolvido, com sucesso, por Lee e Lin (2022), sendo empregado para o tratamento de feridas diabéticas. As PEs foram fabricadas pela homogeneização, em banho de gelo, brometo de perfluorooctano e Pluronic F-68. Um total de 100 µg de EGF humano foi primeiramente misturado com quitosana (50–160 kDa), em ácido acético, e em seguida a mistura foi adicionada, gota a gota, ao tripolifosfato de sódio sob agitação magnética para fabricar nanopartículas de EGF (ENPs). Após agitação a 2000 rpm à temperatura ambiente por 4 h, os ENPs obtidos foram lavados por centrifugação e ressuspensos em água deionizada, juntamente com as PEs e o PHMB. O hidrogel, nominado de $PE_{ENP}PCH$, foi fabricado usando um método de ciclagem de congelamento-descongelamento, onde 1mL de água deionizada contendo o PHMB, PEs e ENPs foi misturada com quitosana (50–160 kDa) e acetato de polivinila. Após completa dissolução, a solução foi despejada em um molde de fundição e submetida a oito ciclos de congelamento-descongelamento para formar o $PE_{ENP}PCH$. No estudo, observou-se ações anti-inflamatória, atividade antibacteriana e promotor de crescimento celular, obtendo maior eficiência no fechamento de feridas com deposição mais rápida de colágeno, menor resposta inflamatória e recuperação mais ágil da integridade e funcionalidade do tecido quando em comparação com outros curativos. Além disso, um nanocarreador fornece uma abordagem viável para dispersar agentes no hidrogel (LEE e LIN, 2022).

Diante das informações supracitadas, produtos utilizando nanotecnologia demonstraram resultados satisfatórios e promissores para o tratamento de feridas. Com isso, o desenvolvimento de curativos na forma de hidrogel contendo NEs de CUR e PHMB, substâncias que possuem ações comprovadamente envolvidas no processo de cicatrização de feridas, como anti-inflamatória, antibacteriana e de regeneração tecidual, poderá viabilizar uma nova formulação para o tratamento de feridas nos sistemas de saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver hidrogeis contendo nanoemulsão de CUR e PHMB e avaliar os efeitos farmacológicos *in vitro*.

3.2 Específicos

- Desenvolver NEs contendo CUR e PHMB (NE-CUR-PHMB) e caracterizá-las quanto as propriedades físico-químicas;
- Verificar possíveis alterações bioquímicas na pele de orelha suína da nanoemulsão branca (NE-BR) através da espectroscopia Raman confocal;
- Desenvolver hidrogéis de quitosana e hidroxietilcelulose contendo as NE-CUR-PHMB e caracterizá-los quanto as propriedades físico-químicas e bioadesão;
- Avaliar a viabilidade celular e o efeito antimicrobiano da NE-CUR-PHMB *in vitro*;
- Avaliar o potencial irritante das formulações desenvolvidas através do ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD, E. et al. Minoxidil Skin Delivery from Nanoemulsion Formulations Containing Eucalyptol or Oleic Acid: Enhanced Diffusivity and Follicular Targeting. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, 2018.

AGAME-LAGUNES, B, et al. Effect of Curcumin Nanoemulsions Stabilized with MAG and DAG-MCFAs in a Fructose-Induced Hepatic Steatosis Rat Model. **Pharmaceutics**, v. 13(4), p. 509, 2021.

AGGARWAL, R. et al. Antibiotic resistance: a global crisis, problems and solutions. **Crit Rev Microbiol**, v. 1, n. 26, 2024.

AHANI, E. et al. A novel biocompatible antibacterial product: Nanoliposomes loaded with poly(hexamethylene biguanide chloride). **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 32(3), p. 242-262, 2017. .

AHMAD, N. et al. Preparation of a novel curcumin nanoemulsion by ultrasonication and its comparative effects in wound healing and the treatment of inflammation. **RSC advances**, v. 9, n. 35, p. 20192-20206, 2019.

AITHAL, G. C.; NARAYAN, R.; NAYAK, U. Y. Nanoemulgel: A Promising Phase in Drug Delivery. **Curr Pharm Des**, v. 26(2), p. 279-291, 2020.

ALGAHTANI, M. S. et al. Preparation and Characterization of Curcumin Nanoemulgel Utilizing Ultrasonication Technique for Wound Healing: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation. **Gels**, v. 7, n. 4, p. 213, 2021.

ALI, M. et al. Novel Curcumin-Encapsulated α -Tocopherol Nanoemulsion System and Its Potential Application for Wound Healing in Diabetic Animals. **Biomed Res Int**, v. 2022, 2022.

ALMEIDA, I. B. et al. Smart Dressings for Wound Healing: A Review. **Advances in skin & wound care**, v. 34, n. 2, p. 1-8, 2021.

ALLAW, M. et al. Formulation of liposomes loading lentisk oil to ameliorate topical delivery, attenuate oxidative stress damage and improve cell migration in scratch assay. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112351, 2021.

ALMEIDA, I. B. et al. Smart Dressings for Wound Healing: A Review. **Advances in skin & wound care**, v. 34, n. 2, p. 1-8, 2021.

ALVES, P. J. et al. Update on the role of antiseptics in the management of chronic wounds with critical colonisation and/or biofilm. **Int Wound J**, v. 18, n. 3, p. 342-358, 2021.

ANAND, K. et al. Nano-emulgel: Emerging as a Smarter Topical Lipidic Emulsion-based Nanocarrier for Skin Healthcare Applications. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 16–35, 2019.

ANSARI, L. et al. Curcumin-based nanoformulations alleviate wounds and related disorders: A comprehensive review. **Biofactors**, v. 49(4), p. 736-781, 2023.

ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3–13, 2014.

ARAÚJO, G. M. S. et al. Designing and characterization of curcumin-loaded nanotechnological dressings: A promising platform for skin burn treatment. **Int J Pharm**, v. 635:122712, 2023.

ARAÚJO, G. M. S. et al. Toward a Platform for the Treatment of Burns: An Assessment of Nanoemulsions vs. Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Curcumin. **Biomedicines**, v. 11(12), p. 3348, 2023.

ASHAOLU, T. J. Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. **Environ Chem Lett**, v. 19, n. 4, p. 3381-3392, 2021.

ASMAWI, A. A. et al. Modeling the Effect of Composition on Formation of Aerosolized Nanoemulsion System Encapsulating Docetaxel and Curcumin Using D-Optimal Mixture Experimental Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4357, 2020.

AZMI, N.A.N. et al. Nanoemulsions: Factory for Food, Pharmaceutical and Cosmetics. **Processes**, v. 7, p. 617, 2019.

BAGALE, U. et al. Ultrasound-Assisted Stable Curcumin Nanoemulsion and Its Application in Bakery Product. **Int J Food Sci**, v. 2022, 2022.

BABALSKA, Z. Ł.; KORBECKA-PACZKOWSKA, M.; KARPÍŃSKI, T. M. Wound Antiseptics and European Guidelines for Antiseptic Application in Wound Treatment. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, p. 1253, 2021.

BALESTRIN, L. A. et al. Effect of Hydrogel Containing Achyrocline satureioides (Asteraceae) Extract-Loaded Nanoemulsions on Wound Healing Activity. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2726, 2022.

BARCHITTA, M. et al. Nutrition and Wound Healing: An Overview Focusing on the Beneficial Effects of Curcumin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1119, 2019.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BANERJEE, K. et al. Nanoceutical Adjuvants as Wound Healing Material: Precepts and Prospects. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 9, 2021.

BASPINAR, Y.; BORCHERT, H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions--is there a benefit of the positive charge?. **International journal of pharmaceutics**, vol. 430, n. 1-2, p. 247-252, 2012.

BHARDWAJ, N.; CHOUHAN, D.; MANDAL, B. B. 3D functional scaffolds for skin tissue engineering. **Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds**, p. 345-365, 2018.

BHATTACHARYA, D.; GHOSH, B.; MUKHOPADHYAY, M. Development of nanotechnology for advancement and application in wound healing: a review. **IET Nanobiotechnology**, v. 13, n. 8, p. 778–785, 2019.

BISTURI, 2023. Disponível em: <https://www.bisturi.com.br/>. Acesso em: janeiro de 2024.

BLAIR, M. J. et al. Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. **Advances in wound care**, v. 9(3), p. 127–143, 2020.

BIGGS, L. C. et al. Mechanical Forces in the Skin: Roles in Tissue Architecture, Stability, and Function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 2, p. 284–290, 2020.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **J Pharm Sci**, v. 97(8), p. 2892-923, 2008.

BOWERS, S.; FRANCO, E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. **American Family Physician**, v. 101, n. 3, p. 159–166, 2020.

BROUSSARD, K. C.; POWERS, J. G. Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 14, n. 6, p. 449–459, 2013.

BURDUŞEL, A.-C. et al. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 9, p. 681, 2018.

CAMBIASO-DANIEL, J. et al. Topical Antimicrobials in Burn Care: Part 1-Topical Antiseptics. **Ann Plast Surg**, 2018.

CAMUS, L. et al. Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. **Adv Exp Med Biol**, n. 1386, p. 397-424, 2022.

CAO, Z. et al. Nanoemulsion is an effective antimicrobial for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in infected wounds. **Nanomedicine**, v. 12, n. 10, p. 1177-1185, 2017.

CAO, J. et al. Rational Design of Multifunctional Hydrogels for Wound Repair. **J. Funct. Biomater**, v. 14, p. 553, 2023.

CARDOSO, A. M. et al. Chitosan hydrogels containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use: Skin permeation/penetration and efficacy in wound healing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 205–217, 2019.

CHANABODEECHALERMRUNG, B. et al. Dual Crosslinked Ion-Based Bacterial Cellulose Composite Hydrogel Containing Polyhexamethylene Biguanide. **Membranes**, v. 12, n. 9, 2022.

CHEN, J. et al. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 2, p. 197–204, 2012.

CHEN, J. et al. Effective Treatment of Skin Wounds Co-Infected with Multidrug-Resistant Bacteria with a Novel Nanoemulsion. **Microbiol Spectr.**, v. 10, n. 2, 2022.

CHHABRA, J. et al. Potential of nanoemulsions for accelerated wound healing: innovative strategies. **Int J Surg**, v. 109(8), p. 2365-2377, 2023.

CHOUHAN, D. et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. **Biomaterials**, v. 216, p. 1-19, 2019.

CIRURGICA SALUTAR, 2024. Disponível em: <https://www.cirurgicasalutar.com.br/>

CONSTANTINIDES, P. P. et al. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 60(6), p. 757-67, 2008.

CUI, M.-D.; PAN, Z.-H.; PAN, L.-Q. Danggui Buxue Extract-Loaded Liposomes in Thermosensitive Gel Enhance In Vivo Dermal Wound Healing via Activation of the VEGF/PI3K/Akt and TGF- β /Smads Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

CURATEC, 2024. Disponível em: <https://www.curatec.com.br/>. Acesso em: janeiro de 2024.

DĄBROWSKA, A. K. et al. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. **Skin Res Technol**, v. 24(2), p. 165-174, 2018.

DAVIS, S.C. et al. Effectiveness of a polyhexanide irrigation solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in a porcine wound model. **Int Wound J**, v. 14, n 6, p. 937-944, 2017.

DEMISLI, S. et al. Development and Study of Nanoemulsions and Nanoemulsion-Based Hydrogels for the Encapsulation of Lipophilic Compounds. **Nanomaterials**, v. 10, n. 12, p. 2464, 2020.

DEKONINCK, S.; BLANPAIN, C. Stem cell dynamics, migration and plasticity during wound healing. **Nat Cell Biol**, v. 21(1), p. 18-24, 2019.

DHIMAN, N. et al. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2021.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings - a review. **BioMedicine**, v. 5(4), p. 22, 2015.

DOLGACHEV, V. A et al. Dermal Nanoemulsion Treatment Reduces Burn Wound Conversion and Improves Skin Healing in a Porcine Model of Thermal Burn Injury. **Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association**, vol. 42, n. 6, p. 1232-1242, 2021.

DONTHI, M. R. et al. Nanoemulgel: A Novel Nano Carrier as a Tool for Topical Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 15(1), p. 164, 2023.

DORA C. L. et al. Physicochemical and Morphological Characterizations of Glyceryl Tristearate/Castor Oil Nanocarriers Prepared by the Solvent Diffusion Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23(11), p. 1972-198, 2021.

ABOU EL-EZZ, D. et al. Enhanced In Vivo Wound Healing Efficacy of a Novel Hydrogel Loaded with Copper (II) Schiff Base Quinoline Complex (CuSQ) Solid Lipid Nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, 2022.

EMIROGLU, G. et al. The Effects of Curcumin on Wound Healing in a Rat Model of Nasal Mucosal Trauma. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

ESPINOZA, L.C. et al. Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases. **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med**, v. 19, p. 115-125, 2019.

FABRY, W.; KOCK, H.-J. . In-vitro activity of polyhexanide alone and in combination with antibiotics against Staphylococcus aureus. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 1, p. 68–72, 2014.

FABRY, W. H. K.; KOCK, H.-J.; VAHLENSIECK, W. Activity of the Antiseptic Polyhexanide Against Gram-Negative Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, p. 138–143, 2014.

FARAHANI, M.; SHAFIEE, A. Wound Healing: From Passive to Smart Dressings. **Advanced Healthcare Materials**, v. 10, n. 16, 2021.

FATIMA, F. et al. Design and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles Loaded Topical Gels: Repurpose of Fluoxetine in Diabetic Wound Healing. **Gels (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, p. 21, 2022.

FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53-58, 2004.

FERNÁNDEZ-GUARINO, M. et al. The Role of Physical Therapies in Wound Healing and Assisted Scarring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7487, 2023.

FONDER, M. A. et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 58, p. 185-206, 2008.

FRANCESKO, A.; PETKOVA, P.; TZANOV, T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. **Curr Med Chem**, v. 25(41), p. 5782-5797, 2018.

FREEDMAN, B. R. et al. Breakthrough treatments for accelerated wound healing. **Science advances**, v. 9(20), 2023.

FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **The Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 2, p. 273–284, 2008.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin Plast Surg**, v. 39(1), p. 85-97, 2012.

GAO, Y. et al. ZnO nanoparticles as an antimicrobial tissue adhesive for skin wound closure. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 23, p. 4535–4541, 2017.

GHOBRIL, C.; GRINSTAFF, M. W. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. **Chemical Society reviews**, v. 44, n. 7, p. 1820-1835, 2015.

GHOMI, E. R. Wound dressings: Current advances and future directions. **J. APPL. POLYM. SCI**, v. 136(27), p. 47738, 2012.

GAINZA, G. et al. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 51–61, 2014.

GRADA, A.; OBAGI, Z.; PHILLIPS, T. Management of chronic wounds in patients with pemphigus. **CWCMR**, v. 6, p. 89-98, 2019.

GUIOMAR, A. J.; URBANO, A. M. Polyhexanide-Releasing Membranes for Antimicrobial Wound Dressings: A Critical Review. **Membranes**, v. 12, n. 12, p. 1281, 2022.

GUO S, DIPIETRO LA. Factors affecting wound healing. **J Dent Res**. v. 89, n. 3, p. 2019-229, 2010.

GUPTA, B. et al. Self-Gelling Solid Lipid Nanoparticle Hydrogel Containing Simvastatin as Suitable Wound Dressing: An Investigative Study. **Gels**, v. 8, n. 1, p. 58, 2022.

HAO, M. et al. Pharmacological Mechanisms and Clinical Applications of Curcumin: Update. **Aging Dis**, v. 14(3), p. 716-749, 2023.

HARRIS-TRYON T. A; GRICE E. A. Microbiota and maintenance of skin barrier function. **Science**, v. 376, n. 6596, p. 940-945, 2022.

HASSANIZADEH S. et al. Effect of nano-curcumin on various diseases: A comprehensive review of clinical trials. **Biofactors**, v. 49(3), p. 512-533, 2023.

HE, X. et al. A Vehicle-Free Antimicrobial Polymer Hybrid Gold Nanoparticle as Synergistically Therapeutic Platforms for *Staphylococcus aureus* Infected Wound Healing. **Advanced Science**, v. 9, n. 14, p. 2105223, 2022.

HEYDARI, P. et al. Comparing the wound healing effect of a controlled release wound dressing containing curcumin/ciprofloxacin and simvastatin/ciprofloxacin in a rat model: A preclinical study. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2021.

HO, T. M.; Abik, F.; Mikkonen, K. S. An overview of nanoemulsion characterization *via* atomic force microscopy. **Crit Rev Food Sci Nutr**, V. 62(18), P. 4908-4928, 2022.

HICKMAN, D. A. et al. Biomaterials and advanced technologies for hemostatic management of bleeding, **Advanced materials (Deerfield Beach Fla)**, v. 30 (4), 2018.

HOSNY, K. M. et al. Design and Development of Neomycin Sulfate Gel Loaded with Solid Lipid Nanoparticles for Buccal Mucosal Wound Healing. **Gels (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 6, p. 385, 2022.

HSU, S. et al. Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 198–206, 2011.
Ishihara, M. et al., Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, **Biomaterials**, v. 23 (3), p. 833-840, 2002.

HUANG, J. N. et al. Combination therapy of hydrogel and stem cells for diabetic wound healing. **World J Diabetes**, v. 13(11), p. 949-961, 2022.

HURLOW, J.; BOWLER, P. G. Acute and chronic wound infections: microbiological, immunological, clinical and therapeutic distinctions. **J Wound Care**, v. 31, n. 5, p. 436-445, 2022.

INAL, A.; YENIPAZAR, H.; ŞAHİN-YEŞİLÇUBUK, N. Preparation and characterization of nanoemulsions of curcumin and echium oil. **Heliyon**, v. 8, n. 2, 2022.

JAHROMI, M. A. et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 33–64, 2018.

JAHROMI, P. L.; ROTHAMMER, M.; FUHRMANN, G. Polysaccharide hydrogel platforms as suitable carriers of liposomes and extracellular vesicles for dermal applications. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 200, 2023.

JIANG, T.; LIAO, W.; CHARCOSSET, C. Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. **Food Res Int**, v. 132, 2020.

JONES, V. J. The use of gauze: will it ever change? **International Wound Journal**, v. 3, n. 2, p. 79–88, 2006.

JONES, V.; GREY, J. E.; HARDING, K. G. Wound dressings. **BMJ**, v. 332, p. 777-780, 2006.

JIN, S. et al. Progress of Hydrogel Dressings with Wound Monitoring and Treatment Functions. **Gels**, v. 28(9), p. 694, 2023.

KAMARUZZAMAN, N. F. et al. Polyhexamethylene Biguanide and Nadifloxacin Self-Assembled Nanoparticles: Antimicrobial Effects against Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Polymers**, v. 10, n. 5, 2018.

KANAGALINGAM, J. et al. Practical use of povidone-iodine antiseptic in the maintenance of oral health and in the prevention and treatment of common oropharyngeal infections. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 69, p. 1247-1256, 2015.

KANT, V. et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int Immunopharmacol**, v. 20, n. 2, p. 322-330, 2014.

KARATOPRAK, G. Ş. et al. Potential Antioxidant and Enzyme Inhibitory Effects of Nanoliposomal Formulation Prepared from *Salvia aramiensis* Rech. f. Extract. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 293, 2020.

KESHAVARZ, R.; OLSEN, S.; ALMEIDA, B. Using biomaterials to improve mesenchymal stem cell therapies for chronic, nonhealing wounds. **Bioeng Transl Med**, v. 9(1), 2023.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 15(2), p. 331-352, 2016.

KRAMER A. et al. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 1, p. 28-58, 2017.

KREMER, M.; BURKEMPER, N. Aging Skin and Wound Healing. **Clin Geriatr Med**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2024.

KULAC, M. et al. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 44, n. 1, p. 83–90, 2012.

KUMAR, M. et al. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.

KUMARI, A. et al. Wound-Healing Effects of Curcumin and Its Nanoformulations: A Comprehensive Review. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, 2022.

KUMARI, M.; NANDA, D. K. Potential of Curcumin nanoemulsion as antimicrobial and wound healing agent in burn wound infection. **Burns**, v. 49(5), p. 1003-1016, 2023.

KÜSTERS, M. et al. Rapid, simple and stability-indicating determination of polyhexamethylene biguanide in liquid and gel-like dosage forms by liquid chromatography with diode-array detection. **J Pharm Anal**, v. 3(6), p. 408-414, 2013.

LABIB, A.; WINTERS, R. Complex Wound Management. 2023 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL)**, StatPearls Publishing, 2024.

LAL D. K. et al. An Overview of Nanoemulgels for Bioavailability Enhancement in Inflammatory Conditions via Topical Delivery. *Pharmaceutics*, v. 15(4), p. 1187, 2023.

LEE, B. N. Enhancement of Storage Stability and Masking Effect of Curcumin by Turmeric Extract-Loaded Nanoemulsion and Water-Soluble Chitosan Coating. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 8, 2022.

LEE, Y. H.; LIN, S. J. Chitosan/PVA Hetero-Composite Hydrogel Containing Antimicrobials, Perfluorocarbon Nanoemulsions, and Growth Factor-Loaded Nanoparticles as a Multifunctional Dressing for Diabetic Wound Healing: Synthesis, Characterization, and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 3, 2022.

LIAKOPOULOU, A.; MOURELATOU, E.; HATZIANTONIOU S. Exploitation of traditional healing properties, using the nanotechnology's advantages: The case of curcumin. *Toxicol Rep*, v. 28, n. 8, p. 1143-1155, 2021.

LIANG, A. et al. Porous Poly(Hexamethylene Biguanide) Hydrochloride Loaded Silk Fibroin Sponges with Antibacterial Function. *Materials (Basel)*, v. 12, n. 2, 2020.

LIANG, Z. et al. Impact of moist wound dressing on wound healing time: A meta-analysis. *Int Wound J*, v. 20(10), p. 4410-4421, 2023.

LIM, H. S.; HUDSON, S. M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals, *J. Macromol. Sci. C Polym. Rev. J.*, v. 43 (2), p. 223-269, 2003.

LIN, Y. et al. Recent Advances in Nano-Formulations for Skin Wound Repair Applications. *Drug Design, Development and Therapy*, v. Volume 16, p. 2707–2728, 2022.

LINDHOLM, C.; SEARLE, R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*, v. 13, n. S2, p. 5–15, 2016.

LIU, Y. et al. Research progress on antimicrobial hydrogel dressing for wound repair. *European Polymer Journal*, v. 197, 2023.

- LIU, Y. F. et al. Therapeutic strategies for chronic wound infection. **Chin J Traumatol**, v. 25, n. 1, p. 11-16, 2022.
- LOCATELLI, L. et al. Platelets in Wound Healing: What Happens in Space? **Front Bioeng Biotechnol**, v. 9, 2021.
- LO, S.; MAHMOUDI, E.; FAUZI, M. B. Applications of drug delivery systems, organic, and inorganic nanomaterials in wound healing. **Discov Nano**, v. 18(1), p. 104, 2023.
- LOO, H. L. et al. Application of chitosan-based nanoparticles in skin wound healing. **Asian J Pharm Sci**, v. 17(3), p. 299-332, 2022.
- LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.
- LUO, R. et al. Accelerated Skin Wound Healing by Electrical Stimulation. **Adv Healthc Mater**, v. 10(16), 2021.
- MALLICK, S. et al. Engineered Nanotechnology: An Effective Therapeutic Platform for the Chronic Cutaneous Wound. **Nanomaterials (Basel)**, v. 12(5), p. 778, 2022.
- MAGINA, S. et al. High Pressure Laminates with Antimicrobial Properties. **Materials (Basel)**, v. 9, n. 2, 2016.
- MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 251, p. 55-79, 2018.
- MEHMOOD, N. et al. Applications of modern sensors and wireless technology in effective wound management. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 4, p. 885–895, 2013.
- MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **Int J Pharm**, v. 435(1), p. 3-9, 2012.
- MIRZAHOSSEINIPOUR, M. et al. Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101639, 2020.

MOGHASSEMI, S. et al. Nanoemulsion applications in photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 351, p. 164–173, 2022.

MOORE, K.; GRAY, D. Using PHMB antimicrobial to prevent wound infection KEY WORDS AMD™ wound dressings Cost-effectiveness MRSA Polyhexamethylene biguanide (PHMB) Wound infection. **Product REVIEW Wounds UK**, v. 3, n. 2, 2007.

MOTSOENE, F.; ABRAHAMSE, H.; KUMAR, S. S. Multifunctional lipid-based nanoparticles for wound healing and antibacterial applications: A review. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 321, 2023.

MULDER, G. D.; CAVORSI, J. P.; LEE, D. K. Polyhexamethylene Biguanide (PHMB): An Addendum to Current Topical Antimicrobials. **Wounds**, v. 19, n. 7, p. 172-182, 2007.

MÜLLER, G.; KOBURGER, T.; KRAMER, A. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. **Chem Biol Interact**, v. 201, n. 1-3, p. 58-64, 2013.

MUSHTAQ, A. et al. Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. **Food Chem X**, v. 18, 2023.

NASKAR, A.; KIM, K. Recent Advances in Nanomaterial-Based Wound-Healing Therapeutics. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, 2020.

NASRA, S. et al., Functional hydrogel-based wound dressings: A review on biocompatibility and therapeutic efficacy. **Life Sci.**, v. 334, 2023.

NANDITHA, C. K.; KUMAR, G. S. V. Bioactive peptides laden nano and micro-sized particles enriched ECM inspired dressing for skin regeneration in diabetic wounds. **Mater Today Bio**, v.14, 2022.

NASR, A. M. et al. Quaternized Chitosan Thiol Hydrogel-Thickened Nanoemulsion: A Multifunctional Platform for Upgrading the Topical Applications of Virgin Olive Oil. **Pharmaceutics**, v. 14(7), p. 1319, 2022.

NEGUT, I. GRUMEZESCU, V., GRUMEZESCU, A. M. Treatment Strategies for Infected Wounds. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.

NETHI, S. K. et al. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 7, p. 2652-2674, 2019.

NGUYEN, H. M. et al. Biomedical materials for wound dressing: recent advances and applications. **RSC advances**, v. 13(8), p. 5509–5528, 2023.

NUUTILA, K.; ERIKSSON, E. Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings. **Advances in Wound Care**, v. 10, n. 12, 2020.

NYSTRÖM, A.; BRUCKNER-TUDERMAN, L. Matrix molecules and skin biology. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 89, p. 136–146, maio 2019.

OBEID, M. A.; ALSAADI, M.; ALJABALI, A. A. Recent updates in curcumin delivery. **J Liposome Res**, v. 33(1), p. 53-64, 2023.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnol Adv**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PARK, J.; HWANG, S.; YOON, I.-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1259, 2017.

PENG, W. et al. Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. **Int J Biol Macromol**, v. 208, p. 400-408, 2022.

PAULA, G. F.; NETTO, G. I.; MATTOSO, L. H. C. Physical and Chemical Characterization of Poly(hexamethylene biguanide) Hydrochloride. **Polymers**, v. 3, p. 928-941, 2011.

PERCIVAL, N. J. Classification of Wounds and their Management. **Surgery**, v. 20, n. 5, p. 114-117, 2002.

PEREIRA R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Adv Wound Care**, v. 5, n.5, p. 208-229, 2016.

POUGET, C. et al. Polymicrobial Biofilm Organization of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Chronic Wound Environment. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 18, 2022.

POWER, G.; MOORE, Z.; O'CONNOR, T. Measurement of pH, exudate composition and temperature in wound healing: a systematic review. **J Wound Care**, v. 26(7), p. 381-397, 2017.

PRASAD, A. S.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa* virulence proteins pseudolysin and protease IV impede cutaneous wound healing. **Lab Invest**, v. 100, n. 12, p. 1532-1550, 2020.

PREETI, S. S. et al. Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs. **Scientifica**, 2023.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–72, 2008.

PU, S. Y. et al. Effects of Oral Collagen for Skin Anti-Aging: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 15(9), p. 2080, . 2023.

QADIR, A. et al. Phytochemical-Based Nano-Pharmacotherapeutics for Management of Burn Wound Healing. **Gels**, v. 7, n. 4, 2021.

QIN, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduct Target Ther**, v. 7, n. 1, 2022.

QU, J. et al. Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. **Biomaterials**, v. 183, p. 185–199, 2018.

QUAN, T. Human Skin Aging and the Anti-Aging Properties of Retinol. **Biomolecules**, v. 13(11), p. 1614, 2023.

RAFIEE, Z. et al. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 445–458, 2019.

RAHMAN, M. U. et al. Microrheology of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown in wound beds. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 8, n. 1, 2022.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203–225, 2018.

RAJENDRAN, N. K. et al. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 421–430, 2018.

RAMASAMY S. et al. Fabrication of collagen with polyhexamethylene biguanide: A potential scaffold for infected wounds. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, n. 110, v. 110, n. 3, p. 535-546, 2022.

REMBE, J. D. et al. Comparing two polymeric biguanides: chemical distinction, antiseptic efficacy and cytotoxicity of polyaminopropyl biguanide and polyhexamethylene biguanide. **J Med Microbiol**. v. 65, n. 8, p. 867-876, 2016.

RENZONI, A. et al. Impact of Exposure of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Polyhexanide *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 10, 2017.

RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Ver**, v. 99(1), p. 665-706, 2019.

RYU, K. et al. Topical Delivery of Coenzyme Q10-Loaded Microemulsion for Skin Regeneration. **Pharmaceutics**, vol. 12, n. 4, p. 332, 2020.

SAFTA, D. A.; BOGDAN, C.; MOLDOVAN, M. L. Vesicular Nanocarriers for Phytocompounds in Wound Care: Preparation and Characterization. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 991, 2022.

SALEHI, B. et al. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, p. 527–545, 2019.

SALEHI, B. et al. Curcumin nanoformulations for antimicrobial and wound healing purposes. **Phytotherapy research: PTR**, 2021.

SALAMONE, A. B. et al. Synergistic Effect and Antibiofilm Activity of a Skin and Wound Cleanser. **Wounds**, v. 32, n. 8, p. 208-216, 2020.

SELLHEYER, K.; KRAHL, D. Skin mesenchymal stem cells: Prospects for clinical dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 859–865, 2010.

SEN, C. K. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. **Advances in wound care**, v. 10, n. 5, p. 281-292, 2021.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. **Int J Pharm**, v. 526(1-2), p. 353-365, 2017.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W.; AHMED, M. A. Investigation of true nanoemulsions for transdermal potential of indomethacin: characterization, rheological characteristics, and *ex vivo* skin permeation studies. **Journal of drug targeting**, vol. 17, n. 6, p. 435-441, 2009.

SHEN, Z. et al. Advances in Functional Hydrogel Wound Dressings: A Review. **Polymers (Basel)**, v. 15(9), p. 2000, 2023.

SHOUKAT, K. et al. A systematic comparison of antimicrobial wound dressings using a planktonic cell and an immobilized cell model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1552–1560, 2015.

SILVA, A. C. et al. Impact of curcumin nanoformulation on its antimicrobial activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p.74-82, 2018.

SIMÕES, D. et al. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 127, p. 130-141, 2018.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SIMÕES, D. et al. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 127, p. 130-141, 2018.

SINGER, A. J. Healing Mechanisms in Cutaneous Wounds: Tipping the Balance. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 28(5), p. 1151-1167, 2022.

SHI, C. et al. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, n. 182, 2020.

SOOD, A.; GRANICK, M. S.; TOMASELLI, N. L. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 8, p. 511–529, 2014.

SOOD A. et al. Curcumin-loaded alginate hydrogels for cancer therapy and wound healing applications: A review. **Int J Biol Macromol**, v. 223, 2023.

SOUTO, E. B. et al. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. **Heliyon**, v.8, n. 2, 2022.

SOUTO, E. B. et al. Microemulsions and Nanoemulsions in Skin Drug Delivery. **Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 158, 2022.

SOUZA, P. H. et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Rev Bras Cir Plást.**, v. 27(2), p. 623-626, 2012.

SPADA, F.; BARNES, T. M.; GREIVE, K. A. Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 11, p. 491-497, 2018.

STECHMILLER, J. K. Understanding the role of nutrition and wound healing. **Nutr Clin Pract**, v. 25(1), p. 61-8, 2010.

STUERMER, E. K. et al. In vitro Activity of Antimicrobial Wound Dressings on *P. aeruginosa* Wound Biofilm. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

SWANEY, M. H.; KALAN, L. R. Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 4, 2021.

TAKAHASHI, M. et al. Liposomes Encapsulating Aloe vera Leaf Gel Extract Significantly Enhance Proliferation and Collagen Synthesis in Human Skin Cell Lines. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 12, p. 643–650, 2009.

TALBOTT, H. E. et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. **Cell Stem Cell**, v. 29(8), p. 1161-1180, 2022.

TO, E. et al. The Effectiveness of Topical Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Agents for the Treatment of Chronic Wounds: A Systematic Review. **Surg Technol Int**, v. 29, p. 45-51, 2016.

TRADOS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

VAZ, G. R. et al. Curcumin and Quercetin-Loaded Lipid Nanocarriers: Development of Omega-3 Mucoadhesive Nanoemulsions for Intranasal Administration. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 7, p. 1073, 2022.

VIJAYAKUMAR, V. et al. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 137–148, 2019.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (Oxford)**, v.35(9), p. 489-494, 2017.

WAGHULE, T. et al. Emerging Trends in Topical Delivery of Curcumin Through Lipid Nanocarriers: Effectiveness in Skin Disorders. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 7, 2020.

WANG, F. et al. How Effective are Nano-Based Dressings in Diabetic Wound Healing? A Comprehensive Review of Literature. **International journal of nanomedicine**, v. 17, p. 2097–2119, 2022.

WITIKA, B. A. et al. Biocompatibility of Biomaterials for Nanoencapsulation: Current Approaches. **Nanomaterials (Basel)**, v. 10(9), p. 1649, 2020.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biol**, V. 10, n. 9, 2020.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, 2015.

WORSLEY, A. et al. Polyhexamethylene Biguanide:Polyurethane Blend Nanofibrous Membranes for Wound Infection Control. **Polymers**, v. 11, n. 5, p. 915, 2019.

YANG, DAN. et al. Hydrogel wound dressings containing bioactive compounds originated from traditional Chinese herbs: A review. **Smart Materials in Medicine**, v. 5(1), p. 153-165, 2024.

YOUSEF et al. Mechanistic Evaluation of Enhanced Curcumin Delivery through Human Skin In Vitro from Optimised Nanoemulsion Formulations Fabricated with Different Penetration Enhancers. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, p. 639, 2019.

YOUSEFIAN, F. et al. Antimicrobial Wound Dressings: A Concise Review for Clinicians. **Antibiotics (Basel)**, v. 12, n. 9, 2023.

ZEGADŁO, K. Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 2, 2023.

ZHANG, S. et al. Polysaccharide-based hydrogel promotes skin wound repair and research progress on its repair mechanism. **Int J Biol Macromol**, v. 1, p. 248, 2023.

ZHENG, B.; MCCLEMENTS, D. J. Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and Bioavailability. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2791, 2020.

ZHAO, Y. et al. Recent Advances of Natural-Polymer-Based Hydrogels for Wound Antibacterial Therapeutics. **Polymers (Basel)**, v.15(15), p. 3305, 2023.

Artigo 1. Desenvolvimento de hidrogéis contendo curcumina e polihexametileno de biguanida: avaliação farmacológica *in vitro*

RESUMO

A curcumina (CUR) é uma substância de origem natural com propriedades anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante, porém, que apresenta alta hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade, o que dificulta sua utilização na terapêutica. O polihexametileno de biguanida (PHMB) é uma substância com comprovada ação antimicrobiana e anti-biofilme, entretanto, apresenta alta toxicidade. O desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo nanocarreadores lipídicos, como as nanoemulsões (NEs), são uma forma promissora de minimizar tais problemas, melhorando a solubilização de compostos lipofílicos e diminuindo a toxicidade. Com isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar NEs contendo CUR e PHMB (NE-CUR-PHMB) e incorporar as NEs em hidrogéis de quitosana e hidroxietilcelulose (HEC) com a intenção de produzir um curativo para o tratamento de feridas. O estudo avaliou as características físico-químicas das NEs, assim como possíveis alterações bioquímicas da pele após a aplicação das NEs nas mesmas. Além disso, foram testados os efeitos das NEs na viabilidade celular e na atividade antimicrobiana. Ademais, as NEs foram incorporadas em hidrogéis de quitosana e HEC e foram avaliadas a bioadesão e o potencial irritante das formulações. Os resultados indicaram que a NE-CUR-PHMB possui tamanho adequado para aplicação tópica ($\sim 225\text{nm}$), índice de polidispersão baixo ($\sim 0,13$), potencial zeta positivo ($\sim 35\text{mV}$) e recuperação de fármacos de aproximadamente 75%. A espectroscopia Raman confocal demonstrou que a NE não causou alterações bioquímicas na pele e aumentou suas funções de barreira. O teste de viabilidade celular não mostrou toxicidade após tratamento com NE-CUR-PHMB até $1,68\text{ }\mu\text{g/mL}$ para a CUR e $12,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ para o PHMB. Em relação a atividade antimicrobiana, a NE-CUR-PHMB, na concentração $5\text{ }\mu\text{g/mL}$, inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* acima de 90% mantendo esse efeito por, pelo menos, 24 h, além de apresentar atividade de inibição de formação de biofilme. Ambos hidrogéis contendo as NEs necessitaram de maiores forças de deslocamento, possuindo maiores capacidades bioadesivas. No entanto, foi observado uma maior manutenção das características das NEs após sua incorporação no hidrogel de HEC. Por fim, o ensaio HET-CAM comprovou o potencial não irritativo das formulações. Os resultados demonstram que foi possível desenvolver uma NE contendo CUR e PHMB com características adequadas a aplicação tópica e que a incorporação em hidrogéis, especialmente de HEC, mantém suas características, sendo uma plataforma promissora para o tratamento de feridas.

Palavras-chave: feridas, curcumina, polihexametileno de biguanida, nanoemulsão, hidrogel

ABSTRACT.

Curcumin (CUR) is a substance with anti-inflammatory, antioxidant and healing properties, but it has high hydrophobicity and low bioavailability, making it difficult to use in therapy. Polyhexamethylene biguanide (PHMB) is a substance with proven antimicrobial and anti-biofilm action; however, it is highly toxic. The development of pharmaceutical forms containing lipid nanocarriers, such as nanoemulsions (NEs), is a promising way of minimizing these problems, improving the solubilization of lipophilic compounds and reducing toxicity. With this in mind, the aim of this study was to develop and characterize NEs containing CUR and PHMB (NE-CUR-PHMB) and to incorporate the NEs into chitosan and hydroxyethylcellulose (HEC) hydrogels with the intention of producing a dressing for wound treatment. The study evaluated the physicochemical characteristics of the NEs, as well as possible biochemical changes in the skin after their use. In addition, the effects of NEs on cell viability and antimicrobial activity were tested. In addition, the NEs were incorporated into chitosan and HEC hydrogels and the bioadhesion and irritant potential of the formulations were evaluated. The results indicated that NE-CUR-PHMB has a size suitable for topical application (~225nm), a low polydispersity index (~0.13), a positive zeta potential (~35mV) and drug recovery of approximately 75%. Confocal Raman spectroscopy showed that NE did not cause biochemical changes in the skin and increased its barrier functions. The cell viability test showed no toxicity after treatment with NE-CUR-PHMB up to 1.68 µg/mL for CUR and 12.5 µg/mL for PHMB. In terms of antimicrobial activity, NE-CUR-PHMB, at a concentration of 5 µg/mL, inhibited the growth of *P. aeruginosa* by over 90% and maintaining this effect for at least 24 h, as well as showing biofilm formation inhibition activity. Both hydrogels containing the NEs required greater displacement forces, possessing greater bioadhesive capacities. However, greater maintenance of the NEs' characteristics was observed after their incorporation into the HEC hydrogel. Finally, the HET-CAM test proved the non-irritating potential of the formulations. The results show that it was possible to develop an NE containing CUR and PHMB with characteristics suitable for topical application and that incorporation into hydrogels, especially HEC, maintains its characteristics, making it a promising platform for wound treatment.

Keywords: wounds, curcumin, polyhexamethylene biguanide, nanoemulsion, hydrogel

Introdução

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, desempenha várias funções essenciais, sendo a principal delas a proteção contra o ambiente externo [1-4]. Frequentemente a integridade da pele é ameaçada, seja por traumas, acidentes, queimaduras, ou até mesmo doenças, como tumorais e diabetes, comprometendo sua função de barreira. Isso a torna propensa a feridas, que são lesões que podem interromper a continuidade da pele, podendo ser superficiais ou atingir várias camadas [5-6]. Em certas situações, as feridas podem ser contaminadas por uma variedade de agentes patogênicos encontrados no ambiente, por micróbios endógenos ou ainda pela microflora presente na pele adjacente [7-10], comprometendo a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, as feridas causam morbimortalidade e custos econômicos substanciais, configurando-se como um desafio de saúde na sociedade atual [11-15].

A cicatrização de feridas segue um processo complexo e coordenado, passando por fases como hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Diversos tipos celulares, compostos químicos e estruturas de suporte desempenham papéis essenciais nesse processo [16-20]. O manejo adequado da ferida é fundamental para otimizar o processo de cicatrização, reduzindo a formação de cicatrizes e aprimorando as características da pele regenerada [21]. Para promover a cicatrização eficaz, terapias específicas são aplicadas, como os curativos, adaptadas à gravidade e a natureza da ferida. Essas terapias visam proteger, prevenir e tratar infecções, manter a umidade e a temperatura ideais e estimular processos celulares para o fechamento da lesão, devendo ser biocompatíveis, não tóxicas, não alérgicas e não aderentes [22-26].

Os hidrogéis, um dos curativos mais utilizados no tratamento de feridas, são redes tridimensionais compostas por polímeros entrelaçados [27]. Suas propriedades físicas e químicas oferecem benefícios no processo de cicatrização, incluindo excelente absorção de água, sendo capazes de manter o ambiente úmido na ferida e formar barreira de proteção contra microrganismos [26, 28]. Além disso, os hidrogéis são biodegradáveis e biocompatíveis e não tóxicos, o que os torna adequados para tratar diversos tipos de feridas em todos os estágios do processo de cicatrização, permitindo a incorporação de ativos em sua matriz [25, 29-32].

O polihexametileno de biguanida (PHMB) é um composto biguanida eficaz contra uma variedade de patógenos, na prevenção da formação de biofilmes [33-34] e empregado em

pesquisas de desenvolvimento e produção de curativos [35-38]. No entanto, Rembe et al. (2016) [39] demonstrou que esse composto apresentou alta toxicidade mesmo em baixas concentrações. A curcumina (CUR), um polifenol presente na natureza, é notável por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, sendo investigada como um potencial agente promotor de cicatrização de feridas [40-44]. Entretanto, a CUR possui elevada hidrofobicidade, baixa biodisponibilidade e fotossensibilidade, o que a aplicabilidade deste composto na terapêutica, dificultando ainda a sua incorporação em formulações farmacêuticas [45-46]. Nesse contexto, a nanotecnologia surge como uma alternativa viável para superar tais dificuldades apresentadas.

A nanotecnologia é uma área da tecnologia que manipula a matéria em escala nanométrica, resultando em produtos com propriedades singulares com grande área de superfície em relação ao seu volume [47-49]. Desta forma, vários tipos de nanomateriais têm sido utilizados nas terapias de cicatrização de feridas, tais como os nanocarreadores lipídicos. Dentre eles, as nanoemulsões (NEs) se destacam devido a possibilidade de solubilização de ativos, permitindo incorporar substâncias lipofílicas nas gotículas e hidrofílicas na fase aquosa, como é o caso da CUR e do PHMB respectivamente, além de possibilitar uma melhora na permeação dos ativos e uma diminuição da irritação da pele, fornecendo proteção contra degradação enzimática, além de serem de serem formulações de fácil preparo, com menor custo e possibilitarem aumento de escala de produção relativamente simples, permitindo a produção em larga escala de acordo com a técnica de preparo [50-54].

Diversos sistemas de NEs contendo CUR foram desenvolvidos, demonstrando aumento da solubilidade deste princípio ativo e potencial para cicatrização de feridas tópicas [55,56], além de alta eficácia e estabilidade para aplicação na cicatrização de feridas [57,58] e sendo observado maior velocidade de contração da ferida [59]. Ademais, um nanoemugel de CUR produziu um aumento nas propriedades biofarmacêuticas da CUR, além de apresentar eficácia na cicatrização de feridas [60]. Nanocompostos carregados com PHMB também foram alvos de pesquisa para utilização como antimicrobianos e mostraram serem eficazes na terapia de feridas infectadas, apresentando menor toxicidade [61-64].

Em nosso grupo de pesquisa, NEs contendo CUR forma desenvolvidas e incorporadas em curativo do tipo gaze, mostrando-se uma abordagem promissora para o tratamento de queimaduras [65]. Em outro estudo, Araujo et al (2023) [66], avaliou o efeito

antimicrobiano e a viabilidade celular de NE-CUR. No entanto, embora tenha sido observada uma viabilidade celular adequada, os resultados indicaram baixo efeito antimicrobiano da CUR sem a utilização de outro antibiótico em associação. Desta forma, este trabalho teve o objetivo de incorporar duas substâncias em uma mesma NE, a CUR com intuito de auxiliar o processo de cicatrização e o PHMB, para evitar a infecção da lesão e produzir hidrogéis de quitosana e hidroxietilcelulose visando a produção de um curativo para o tratamento de feridas.

Não foram encontrados na literatura nenhum artigo que utilize a CUR e o PHMB em um mesmo sistema, nem essa associação em hidrogéis, demonstrando assim a originalidade deste trabalho.

Materiais e Métodos

Materiais e reagentes

CUR, PHMB, monooleato de sorbitano (Span® 80), monolaurato de sorbitano de polioxietileno (Tween® 20) e triglicerídeos de cadeia média (TCM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Hidroetilcelulose (HEC) foi adquirido de uma farmácia de manipulação local. Quitosana foi adquirida do Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI-FURG). Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e sal brometo de 3,(4,5-dimetil)-2,5difênil-tetrazólio (MTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Soro fetal bovino (SBF) e solução de tripsina foram obtidos da Gibco (Grand Island, NE, EUA). A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada foi ATCC 15442, caldo Muller Hinton (Himedia®, Kennett Square, PA, EUA) e Gentamicina da Sigma-Aldrich. Água de grau HPLC foi preparada usando um sistema Milli-Q da Millipore® (Burlington, MA, EUA), metanol, ácido acético e todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

Métodos

Preparo das nanoemulsões contendo CUR e PHMB

As NEs foram preparadas através do método de homogeneização a alta pressão [66,67]. Técnica que consistiu em, inicialmente preparar uma fase oleosa – composta por CUR, um lipídio líquido – triglicerídeo de cadeia média (TCM), e Span 80, aquecidos a 60°C sob agitação magnética a 700 rpm por 30 minutos. Após, uma fase aquosa – composta por PHMB, água e tween 20, aquecidos a 60°C sob agitação magnética a 700 rpm, foi

vertida sobre a fase oleosa, aumentando a agitação magnética para 1.100 rpm por 2 minutos. A pré-emulsão foi submetida a um homogeneizador de alta velocidade (Ultra Turrax®) a uma velocidade de 14.000 rpm por 2 minutos e posteriormente vertida no homogeneizador a alta pressão (Avestin®), por 6 ciclos com pressão de 10.000 PSI. As formulações foram preparadas em triplicata. Para o preparo das NEs branca (NE-BR), a CUR não foi adicionada na fase oleosa e o PHMB não foi adicionado na fase aquosa. As composições das NEs desenvolvidas podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das NEs desenvolvidas

FORMULAÇÃO	TCM (mg)	SPAN 80 (mg)	TWEEN 20 (mg)	CUR (mg)	PHMB (mg)	Água Milli-Q q. s. p. (mL)
NE-BR	70	30	20	-	-	10
NE-CUR	70	30	20	0,6	-	10
NE-PHMB	70	30	20	-	5	10
NE-CUR-PHMB	70	30	20	0,6	5	10

NE-BR: nanoemulsão sem CUR e PHMB; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida.

Determinação do tamanho da partícula e do índice de polidispersão (PDI)

O tamanho de partícula e o PDI foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando-se o equipamento Litesizer® 500 (Anton Paar). As medições de tamanho de partícula foram realizadas em ângulo de 90° na temperatura de 25°C após diluição adequada (1:1000) das amostras em água Milli - Q®. Cada análise de tamanho foi realizada em triplicata pelo próprio equipamento. O raio hidrodinâmico foi determinado usando a equação de Stokes – Einstein (1): $R = (\kappa B T / 6 \pi \eta D)$, onde κB é a constante de Boltzmann (J / K), T é a temperatura (em K), D é o coeficiente de difusão e η é a viscosidade do meio - neste caso, da água ($\eta = 0,89$ cP a 25°C).

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi avaliado por anemometria laser doppler, utilizando-se o equipamento Litesizer® 500 (Anton Paar). Para as medições do potencial zeta, as amostras, em diluição adequada, foram colocadas na célula electroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados como valores médios da mobilidade electroforética, utilizando-se a equação de Smoluchowski. Cada análise de potencial zeta foi realizada em triplicata pelo próprio equipamento.

Determinação do teor e da Recuperação da CUR e do PHMB nas NEs

O teor de CUR e do PHMB nas formulações foi analisado por espectroscopia UV/Vis. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer®, Lambda 45, utilizando-se de uma cubeta de quartzo de 1 cm e detecção a 425nm para CUR e 237nm para PHMB.

O método de quantificação por espectroscopia UV/Vis foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão, conforme descrito no *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* [68].

O conteúdo de CUR e PHMB (concentração total) na NE foi calculado após a determinação dos compostos ativos nas soluções metanólicas e foi expresso em µg de CUR/mL e µg de PHMB/mL de NE. A recuperação de CUR e PHMB foi calculada como a percentagem total do composto ativo encontrada na NE em relação à quantidade inicial adicionada. Para a realização das análises as amostras foram preparadas em triplicata.

Espectroscopia Raman Confocal

Efeito da NE-BR na penetração cutânea preparação da pele de orelha suína

As orelhas suínas foram obtidas de um matadouro local (Gantner GmbH, Hollabrunn, Austria) e estocadas por no máximo 2 meses a -18°C. No dia anterior ao experimento, as orelhas foram descongeladas durante a noite (18h, 8°C) e no dia do experimento foram levadas a temperatura ambiente por 2 h, limpas em água corrente, secas e os pelos foram removidos com tesoura. As áreas de teste (3x3 cm) foram marcadas no centro da orelha. Quantidades definidas (63 µL) de NE_caff (NE branca contendo 1% (p/p) de cafeína anidra como fármaco modelo) ou tratamento controle (1% (p/p) de cafeína anidra em água destilada) foram aplicadas homogeneamente na pele, massageando as amostras de pele por 30 s. Em seguida, as amostras foram deixadas sob proteção luminosa por 60 min para a permeação. Após esse tempo, a pele foi limpa suavemente por 10 s, separada da cartilagem e esticada sobre placas de isopor com o auxílio de agulhas para obtenção de um bom contato para a análise espectroscópica Raman.

Monitoramento da NE-BR na penetração cutânea usando espectroscopia Raman Confocal

Os experimentos de espectroscopia confocal Raman foram realizados utilizando um microespectrômetro confocal Raman (gen2 Skin Composition Analyzer, River Diagnostics, Rotterdam, Holanda) com dois lasers incorporados, operando em comprimento de onda de 785 nm para análise da região da impressão digital da pele ($400\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) e 671 nm para análise da região de alto número de onda (HWN, $2000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$). Os dados foram coletados utilizando um detector Charge Coupled Device (CCD). Os perfis de penetração na pele dos tratamentos aplicados foram obtidos com resolução de profundidade espacial de 5 μm .

Para as medições, o tecido da pele foi colocado suavemente em contato com a janela de sílica fundida da etapa de medição. Para garantir um contato adequado e minimizar danos à amostra, foi aplicado um peso constante de 300g. Os espectros de pele foram registrados de 0 a 28 μm para baixo em incrementos de 2 μm com um tempo de exposição de 5 s por etapa (região de impressão digital) e 2 s por etapa (região HWN). Várias réplicas foram realizadas para cada amostra individual ($n = 5$ para região de impressão digital, $n = 3$ para a região HWN) em posições aleatórias e calculadas a média para cálculos adicionais.

Os espectros coletados foram analisados utilizando o SkinTools® software version 2.0 (River Diagnostics, The Netherlands). As quantidades de cafeína anidra em cada ponto de medição foram calculadas conforme descrito por Caspers et al. (2001) [70]. Para tanto, foi utilizado um algoritmo de ajustes pelos mínimos quadrados baseado em componentes endógenos da pele e um espectro de referência do composto ativo utilizado. Cada espectro obtido foi ajustado aos espectros de referência para obter a concentração relativa de composto ativo. Todos os coeficientes de ajuste foram ajustados ao sinal de queratina para compensar a variação da intensidade do sinal devido a diminuição do sinal Raman em pontos de medição mais profundos. A concentração de queratina é considerada relativamente constante no estrato córneo (EC) e, portanto, serve como referência interna. Desta forma, foram obtidos perfis relativos de penetração de cafeína anidra na pele nos 20 μm superiores das amostras de pele. Além disso, o teor de água nos primeiros 28 μm das amostras de pele foram analisados e plotados para observar a hidratação do EC e as alterações causadas pela aplicação da NE-BR e da água como controle.

Parâmetros de hidratação da pele – ureia e fator hidratante natural (FHN)

Além do monitoramento da penetração, os parâmetros básicos de hidratação da pele foram avaliados por meio de espectroscopia Raman confocal [71]. Utilizando o algoritmo de ajuste pelos mínimos quadrados, as contribuições espectrais relativas do FHN em geral e da ureia em particular foram analisadas em diferentes profundidades de pele para obter perfis de concentração e avaliar as alterações causadas pelo tratamento com a amostra NE-BR e da água como controle.

Ensaio de viabilidade celular

As linhagens de fibroblastos humanos de pulmão (MCR-5) foram obtidas da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Para o cultivo das células foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de FBS, sendo mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram semeadas em densidade de 5x10³ células/poço em placas de 96 poços para o ensaio de MTT. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida, foram tratadas por 48 e 72 h com a CUR livre (L-CUR), PHMB livre (L-PHMB) e a junção das duas substâncias, NE-CUR, NE-PHMB e NE-CUR-PHMB – sendo todos os tratamentos solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO 0,01%). Foram utilizadas concentrações variando entre 0,11 e 13,5 µg/mL para a CUR; entre 0,78 e 100 µg/mL para o PHMB, para a NE-BR, foram empregados volumes que corresponderam proporcionalmente aos necessários para alcançar as concentrações dos compostos previamente descritas. Como resultado, as proporções em volume da NE-BR variaram entre 0,00425% à 0,68% do volume total de cada poço nas placas.

Foi utilizado um ensaio colorimétrico para determinar a atividade metabólica e a viabilidade celular, o ensaio de brometo de 3(4,5-dimetil)-2,5difênil-tetrazólio (MTT), dependente de desidrogenase. Ao final do tempo de incubação, o meio foi removido e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada ao meio de cultura na concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 90 min 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Em seguida, o MTT foi retirado e 100 µL de DMSO foram adicionados. A absorbância final foi lida em 492 nm usando um espectrofotômetro SpectraMax® M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem em comparação aos controles (DMSO 0,01%) em triplicatas [66, 72,73].

Ensaio de atividade antimicrobiana

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana, foram testados os excipientes das NEs (span 80, TCM, tween 20), CUR livre (L-CUR), PHMB livre (L-PHMB) e as NEs (NE-CUR, NE-PHMB e NE-CUR-PHMB) contra *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Também foi avaliado o controle de esterilidade do meio de cultura (caldo Muller Hinton), a esterilidade dos compostos e o controle positivo da viabilidade do microrganismo. Como controle de inibição bacteriana foi utilizado o fármaco gentamicina em concentração entre 32 µg/mL e 0,0625 µg/mL.

Para determinar a CIM, foi utilizado a metodologia recomendada pelo *Clinical And Laboratory Standards Institute* (2020) [74] com modificações. Onde, 50 µL de cada composto foi eluído em 50 µL caldo Mueller Hinton e procedeu-se o ensaio de microdiluição seriada (1:2), com a finalidade de variar as concentrações de acordo com a quantidade de CUR (600 – 0,47 µg/mL) e PHMB (5000 – 0,15 µg/mL). Posteriormente, foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano preparado em caldo Mueller Hinton, obtendo-se 5×10^5 UFC/mL ao final do experimento, e a microplaca de 96 poços foi incubada por 24h a uma temperatura de $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Ao final desse período, um corante indicador de viabilidade celular - resazurina (0,02%) [75] – foi adicionado a placa, a qual foi novamente incubada a $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ até que houvesse mudança do controle positivo de azul para rosa, e a microplaca foi lida e determinado a CIM, como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Efeito do L-PHMB e NE-CUR-PHMB no crescimento da *P. aeruginosa* (ATCC 15442)

A partir da CIM, foi avaliada a cinética de crescimento da *P. aeruginosa* (ATCC 15442) na presença de diferentes concentrações de L-PHMB e NE-CUR-PHMB, em concentrações inibitórias e sub-inibitórias (2,5; 5,0 e 10 µg/mL) preparadas em meio Mueller Hinton caldo acrescidas de inóculo bacteriano, semelhantemente ao apresentado no item anterior. O crescimento celular microbiano após a exposição a cada concentração foi determinado, através da leitura das absorbâncias no espectrofotômetro em comprimento de onda 600 nm nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 21, 22, 23 e 24h, as quais foram expressas em uma curva de crescimento bacteriano. A partir de cada leitura foi

calculada a porcentagem de inibição considerando a seguinte equação (2): $((100 - (\text{DO das células expostas} / \text{DO das células não expostas}) \times 100)$, onde DO é a densidade ótica.

Atividade antibiofilme – inibição do biofilme

O ensaio da capacidade de inibição da formação de biofilme foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Halicki et al. (2020) [76], onde as cepas foram expostas a diferentes concentrações das formulações, para determinar se seriam capazes de inibir/evitar a formação de biofilme bacteriano. Com isso, a partir do crescimento em ágar MacConkey, uma suspensão bacteriana da cepa *P. aeruginosa* (ATCC 15442) foi preparada com concentração final de 1×10^6 UFC/mL. Após, 100 µL da suspensão foram transferidos para uma microplaca de fundo plano com 96 poços e expostos às seguintes concentrações dos compostos ativos, previamente determinadas no ensaio de atividade antimicrobiana – 4x CIM, 2x CIM, CIM e ½ CIM. Os seguintes controles foram incluídos: controle positivo, com meio e bactéria, para garantir a capacidade de formação de biofilme da cepa, e controle de esterilidade, contendo apenas meio de cultura. As placas foram incubadas por 24h a $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. A seguir, foram realizadas as etapas de lavagem, fixação e coloração, iniciando com a retirada do conteúdo dos poços, seguido de três lavagens com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x (150 µL) para retirar células suspensas, as células aderidas foram fixadas com metanol 100% (150 µL) e coradas com solução de cristal violeta 0,4% (200µL). Após, os poços foram lavados três vezes com água destilada (200µL) e o corante dissolvido em etanol 100% (200 µL). A densidade óptica dos poços foi medida a 600 nm utilizando o Thermo Plate TP-Reader BioTek Elx800; os resultados foram interpretados matematicamente de acordo com Stepanovic et al. 2007 [77], sendo o resultado final foi expresso em porcentagem, utilizando a equação (3): $100 \times (1 - (\text{DO}_{\text{tratamento}} - \text{DO}_{\text{controle negativo}}) / (\text{DO}_{\text{controle positivo}} - \text{DO}_{\text{controle negativo}}))$. Onde $\text{DO}_{\text{tratamento}}$ é a densidade óptica do biofilme bacteriano exposto a diferentes concentrações dos compostos ativos; $\text{DO}_{\text{controle negativo}}$ é a densidade óptica dos poços contendo apenas meio; e $\text{DO}_{\text{controle positivo}}$ é a densidade óptica dos poços contendo biofilme. Além disso a cepa foi classificada em uma das quatro categorias: não produtora de biofilme, fraca, moderada ou forte produtora de biofilme [78].

Hidrogéis contendo NE-CUR-PHMB

Preparo da quitosana

A quitosana foi produzida a partir da quitina, que foi isolada de resíduos de camarão (*Penaeus brasiliensis*) por meio de processos de desmineralização, desproteinização e desodorização. A produção de quitosana foi realizada por desacetilação alcalina da quitina utilizando metodologias estabelecidas [79-81]. O grau de desacetilação da quitosana foi estimado utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN) (Bruker, Ascend 400MHz, Estados Unidos) [82]. O peso molecular médio da viscosidade da quitosana foi calculado pelo viscosímetro Cannon-Fenske (Schott Gerate, GMBH-D65719, Alemanha). Primeiro, a viscosidade intrínseca (η) foi obtida utilizando a equação de Huggins, Eq. (1). Em seguida, o peso molecular foi calculado usando a equação de Mark-Houwink, Eq. (2).

$$\frac{\eta_{SP}}{c} = (\eta) + k(\eta)^2 c \quad (4)$$

$$[\eta] = K(MW)^a \quad (5)$$

onde η_{SP}/c refere-se à viscosidade reduzida (mL/g), η_{SP} é a viscosidade específica, que engloba a relação entre a viscosidade da solução de quitosana e a viscosidade do solvente (adimensional), c é a concentração de quitosana (g/mL), k é a constante de Huggins (adimensional) e K e a são constantes, cujos valores dependem do solvente e do polímero ($K = 1.81 \times 10^{-3}$ mL/g and $a = 0.93$) [83].

Preparo e caracterização dos hidrogéis de hidroxietilcelulose e quitosana

Para o hidrogel com HEC, como polímero formador de gel, após o preparo das NEs, a HEC foi adicionada a uma proporção 2% (p/p) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente – 700 rpm por 24 h – para formar uma formulação consistente semissólida.

Para o hidrogel de quitosana como polímero formador de gel, inicialmente 1,2 g de quitosana foram dissolvidas em 30 mL de ácido acético a 1% (v/v) seguida de agitação à temperatura ambiente – 700 rpm por 24 h, obtendo um hidrogel à concentração de 4% do

polímero. Após, a NE foi adicionada ao hidrogel na proporção 1:1 (p/p), obtendo um hidrogel à concentração de 2% do polímero.

Os hidrogeis foram caracterizados quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Além disso foi determinado o teor e a recuperação do composto ativo conforme descrito anteriormente.

Medidas de Bioadesão

As medições de bioadesão dos hidrogeis foram realizadas utilizando um Analisador de Textura (TA.XTplus Texture Analyzer; Stable Microsystem, Godalming, UK) equipado com uma sonda de móvel mucoadesão de gel (P/10, cilindro de 10 mm de diâmetro). Para simular a aplicação tópica, pele fresca de orelha suína foi adquirida em frigorífico local (Ouro do Sul, Harmonia, RS, Brasil) e utilizada como substrato. Primeiramente, a pele foi removida com bisturi e a espessura ajustada de 0,9 a 1,1 mm com tesoura e medidor de espessura (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão). Antes das experiências, as secções de pele foram reidratadas com PBS pH 7,4. Em seguida, os cortes de pele suína foram cuidadosamente fixados na sonda e foram aplicados 400 µL de cada formulação (n = 6/grupo). Os parâmetros de análise foram definidos como velocidade de teste (5,0 mm/s), força aplicada (2,5 N), tempo de contato (30 s) e distância de retorno (10,0 mm). A técnica de tensão de tração determina o trabalho (mN.mm) necessário para a remoção da formulação da mucosa medindo a força (mN) e a distância (mm) necessárias para completar o deslocamento [84]. O trabalho de adesão (mN.mm) foi registrado e calculado no software Exponent (versão 6.1, Stable Microsystem, Godalming, UK).

Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

Foram obtidos ovos de galinha fertilizados de um produtor local imediatamente após a postura e colocados em uma incubadora rotativa automática (Chocar Chocadeiras, Conceição do Coité, Brasil) por 10 dias sob temperatura controlada ($37,8 \pm 1,0$ °C) e umidade relativa (45–65 %). Completando o 10º dia, os ovos foram velados, para garantir a viabilidade dos embriões e os ovos defeituosos ou quebrados foram descartados. Em seguida, a casca foi removida na célula de ar com o auxílio de uma pinça e a membrana inteira foi removida, revelando a membrana corioalantóica (CAM) altamente vascularizada.

Em seguida, 300 µL da substância teste (controles, compostos livres, NEs e hidrogéis) (n=5) foram aplicados a CAM e deixados em contato por 300s. Além dos grupos das formulações, foram testados: NaCl 0,9% p/v (controle negativo), NaOH 0,1 M (controle positivo para hemorragia e coagulação), lauril sulfato de sódio 1% p/v (controle positivo para vasoconstricção) e DMSO (diluyente da L-CUR). Devido a opacidade das NEs, solução salina foi utilizada para enxugar a CAM após 20s, a fim de facilitar a visualização dos efeitos vasculares [84]. Foi calculado o score de irritação (IS), de acordo com a equação (6):

$$IS = [5 \times (301 - \text{tempo de hemorragia})/300] + [7 \times (301 - \text{tempo de vasoconstricção})/300] + [9 \times (301 - \text{tempo de coagulação})/300]$$

O IS foi apresentado como média e desvio padrão relativo em porcentagem (RSD%), tendo a análise estatística do escore IS realizada por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida de teste post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, os danos a membrana corioalantóica foram classificados pela média como não irritante (0–0,9), levemente irritante (1,0–4,9), moderadamente irritante (5–8,9) e extremamente irritante (9–21) [85].

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando um software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para o ensaio espectroscopia Raman Confocal, os dados paramétricos foram analisados por meio do teste t de Student não pareado e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann Whitney. Para o ensaio de inibição de biofilme foi utilizado análise de variância unidirecional seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Para todos os outros ensaios, foi utilizado análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste post hoc de Tukey. Um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Caracterização das Nanoemulsões

A seleção dos componentes das NEs baseou-se em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa Araujo et al (2023) (66) e estão apresentados na Tabela 1. As propriedades das NEs obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão são mostradas na Tabela 2. As formulações exibiram gotículas monodispersas ($PDI < 0,22$), com tamanho entre 224

– 250 nm. O potencial Zeta das formulações sem PHMB, ou seja, NE-BR e NE-CUR foi negativo (~ -28 mV), já para as formulações contendo o PHMB (NE-PHMB e NE-CUR-PHMB), observa-se um potencial zeta positivo, ~ 37 mV e 35 mV, respectivamente.

Curvas de calibração, geradas pela diluição de uma solução estoque de CUR e PHMB em metanol foram utilizadas para a quantificação. Para a CUR – foi obtida uma curva de calibração ($y = 0,1225x + 0,0356$) com determinação do coeficiente global igual ou superior a $R^2 = 0,993$ e limite de quantificação $0,19 \mu\text{g/mL}$; para o PHMB – foi obtida uma curva de calibração ($y = 0,0605x + 0,067$) com determinação do coeficiente global igual ou superior a $R^2 = 0,994$ e limite de quantificação $0,61 \mu\text{g/mL}$. A taxa de recuperação calculada para a CUR, variou de ~ 86 - 77% (NE-CUR e NE-CUR-PHMB), respectivamente. Para o PHMB, a taxa de recuperação foi de $\sim 74\%$, tanto para NE-PHMB quanto para NE-CUR-PHMB.

Tabela 2. Caracterização físico-química das NEs

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Teor dos ativos (mg/mL)	Recuperação (%)
NE-BR	250,3 $\pm$ 6,00	0,16 $\pm$ 0,07	-28,00 $\pm$ 1,4	-	-
NE-PHMB	245,6 $\pm$ 3,00	0,22 $\pm$ 0,02	37,20 $\pm$ 0,9	3,68 $\pm$ 0,06	73,7 $\pm$ 1,5
NE-CUR	239,7 $\pm$ 7,00	0,10 $\pm$ 0,07	-28,10 $\pm$ 0,9	0,52 $\pm$ 0,02	85,9 $\pm$ 2,6
NE-CUR-PHMB	224,6 $\pm$ 1,80	0,13 $\pm$ 0,05	35,30 $\pm$ 0,2	0,46/3,71 $\pm$ 0,03/0,04	76,7 $\pm$ 0,8/ 74,2 $\pm$ 4,38

NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida

Espectroscopia Raman confocal

Avaliação da permeação cutânea da NE-BR

O estudo do efeito de penetração da NE-BR, utilizando cafeína como modelo de fármaco, foi conduzido utilizando a orelha suína como modelo substituto da pele humana. Os resultados são mostrados na Figura 1. Foi observado uma tendência relativa mais elevada de recuperação de fármaco nos primeiros $8 \mu\text{m}$ do ES, porém, desvios-padrão elevados dificultam uma análise estatística eficiente ($p > 0,05$). Além disso, a profundidade máxima de penetração foi idêntica tanto para a NE quanto para o controle.

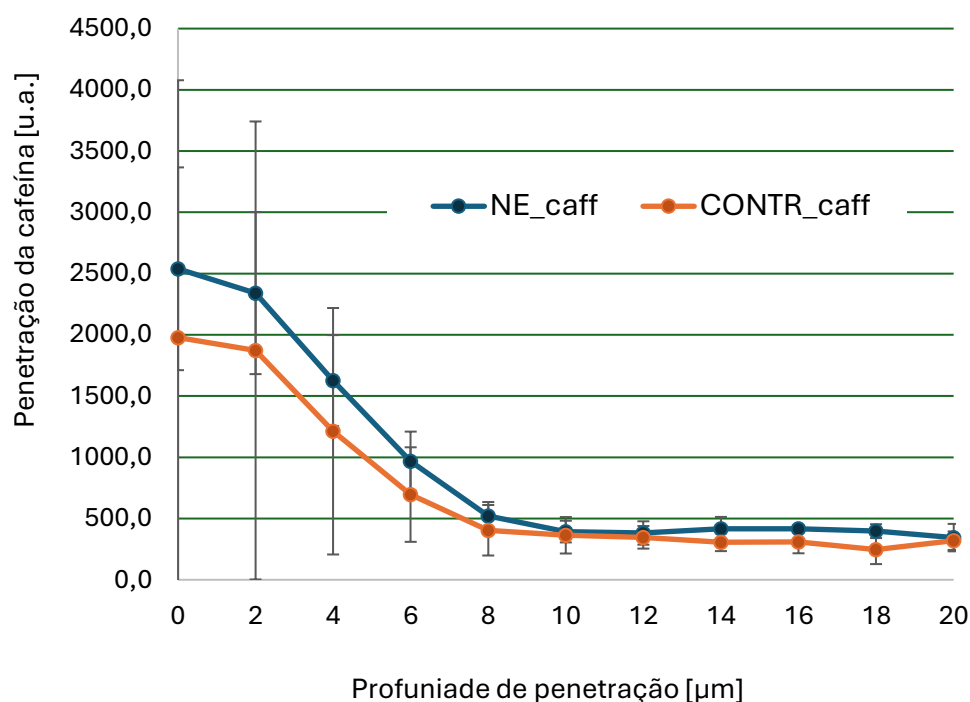


Figura 1: Perfil de penetração na pele da cafeína anidra (1% p/p) incorporada a NE-BR e solução de controle aquosa após 60 min, conforme determinado por espectroscopia Raman confocal. As quantidades relativas de fármaco penetrada são dadas em unidades arbitrárias (u.a.) como contribuições relativas aos espectros de pele registrados em pontos de medição desde a superfície da pele até 20 μm . Os valores são uma média $\pm$ DP $n=3$ experimentos individuais utilizando amostras da pele da mesma orelha suína. NE_caff: cafeína anidra incorporada na NE-BR; CONTR_caff: cafeína anidra em um fluido de solução controle aquosa.

Efeito do tratamento da NE-BR na massa de água do EC

A análise do conteúdo de água do EC e da hidratação da epiderme subjacente foi conduzida por espectroscopia Raman confocal para visualizar os potenciais efeitos da NE-BR na hidratação da pele. Como observado na Figura 2, a aplicação da NE por 60 min causou um aumento do teor de água no EC na superfície da pele (62% m/m para NE vs 42% m/m para controle) e na profundidade de medição de 2 μm (45% m/m para NE vs 42% m/m para controle). Novamente foram observadas grandes flutuações ($p>0.05$ em ambos os pontos de medição). Foi observado um aumento esperado na hidratação da pele nos primeiros 12 μm EC até que um patamar foi alcançado, indicando que a região epidérmica foi alcançada.

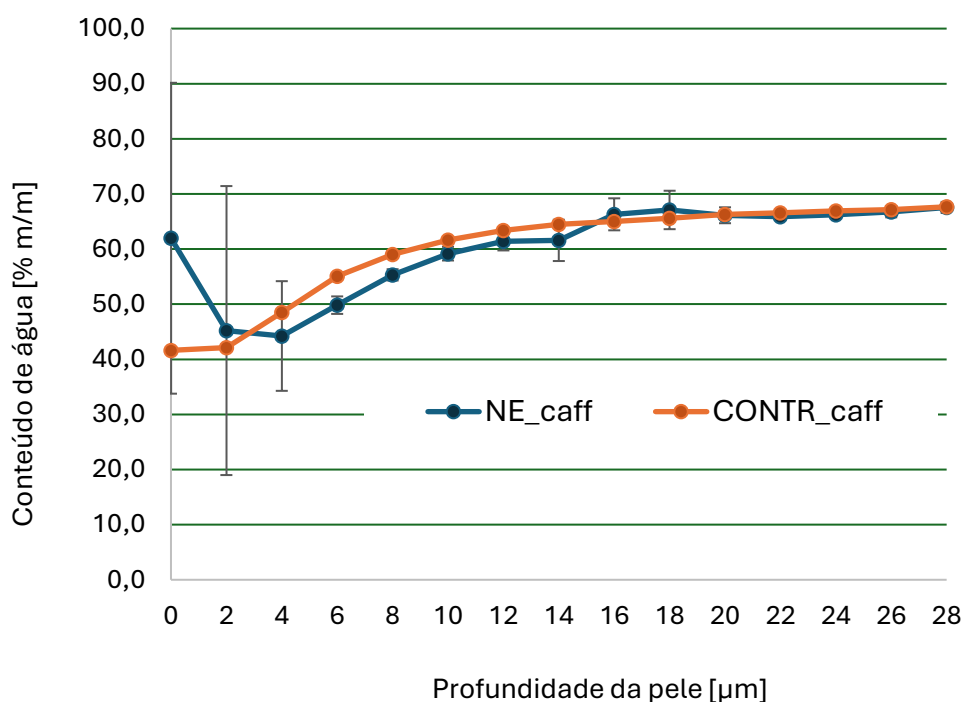
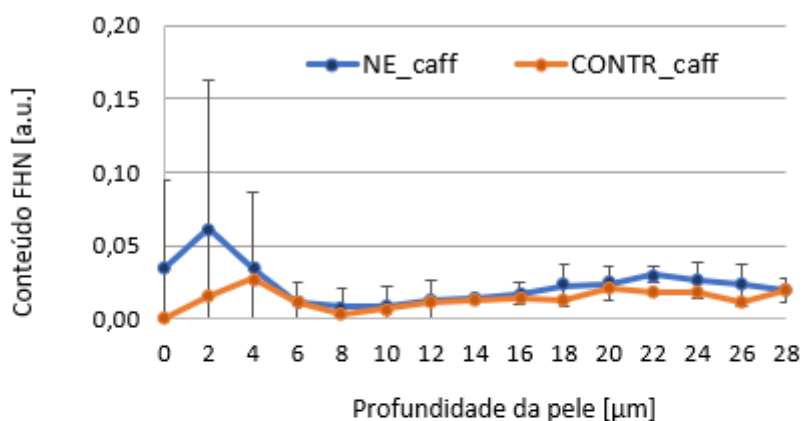


Figura 2: Conteúdo de água em % (m/m) da epiderme suína conforme determinado por espectroscopia Raman confocal em diferentes profundidades da pele (da superfície da pele até 28 μm) após tratamento com cafeína anidra (1% p/p) incorporada na NE-BR e solução controle aquosa por 60 min. Os valores são uma média $\pm$ DP n=3 experimentos individuais utilizando amostras da pele da mesma orelha suína. NE_caff: cafeína anidra incorporada na NE-BR; CONTR_caff: cafeína anidra em um fluido de solução controle aquosa.

Efeito da NE-BR no teor de ureia e FHN

A análise das contribuições espectrais relativas do FHN em geral e da ureia em particular foi conduzida por espectroscopia Raman confocal para visualizar os potenciais efeitos do tratamento com NE-BR *versus* o controle (Figura 3). Novamente, as diferenças não alcançaram significância estatística devido a flutuações. No entanto, a tendência geral estava alinhada com os resultados anteriores, indicando uma elevada compatibilidade cutânea do tratamento com NE-BR: os níveis de FHN foram ligeiramente mais elevados na superfície da pele até 4 μm , ademais, o teor de ureia não foi afetado negativamente.

A



B

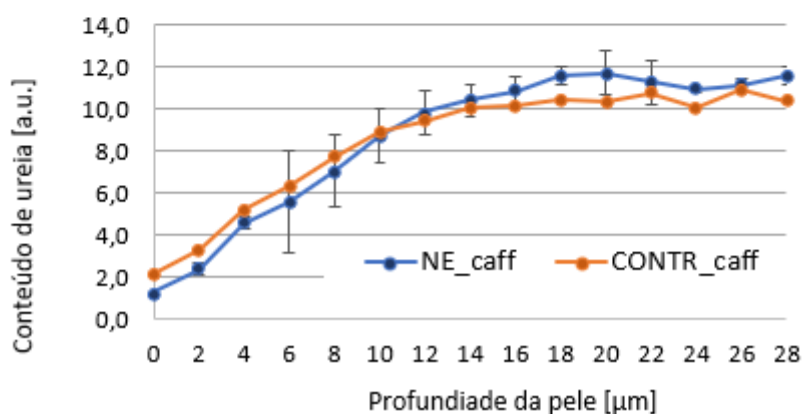


Figura 3: Conteúdo relativo de FHN (A) e ureia (B) determinados por espectroscopia Raman confocal em diferentes profundidades da pele (da superfície da pele até 28 μm) após tratamento com cafeína anidra (1% p/p) incorporada na NE-BR e solução de controle aquosa por 60 min. Os valores são uma média $\pm$ DP n=3 experimentos individuais utilizando amostras da pele da mesma orelha suína. NE_caff: cafeína anidra incorporada na NE-BR; CONTR_caff: cafeína anidra em um fluido de solução controle aquosa.

Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT, sendo avaliado o perfil de segurança das formulações, avaliando a citotoxicidade em uma linhagem de fibroblastos humanos de pulmão (MCR-5) [72,86]. Em virtude do desenvolvimento de uma formulação inovadora, inicialmente foi explorado o efeito citotóxico da NE-BR (Figura 4). Pode-se observar que os tratamentos não levaram a morte celular nas concentrações avaliadas (0,0425%, 0,085%, 0,17%, 0,34%, e 0,68%) da NE-BR. Os resultados indicam que os excipientes da NE não possuem efeito citotóxico para a linhagem de fibroblastos (MCR-5).

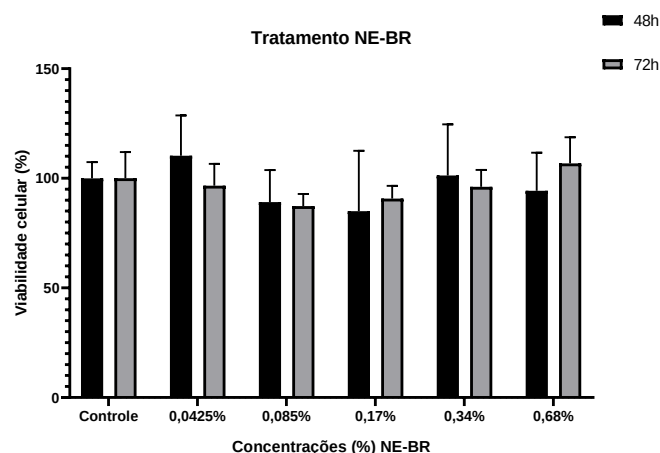


Figura 4: Viabilidade celular (ensaio MTT) de células fibroblastos (MCR-5) após 48 h e 72 h de tratamento com NE-BR. Controles de veículos apropriados com DMSO 0,01% (v/v). Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, diferente do grupo controle. NE-BR: nanoemulsão branca.

Os resultados foram obtidos após 48h e 72h de tratamento (Figura 5), onde, como pode ser visto, ao comparar as formulações (livre *versus* nano), observa-se um aumento significativo na viabilidade celular ($p < 0,05$) quando os compostos são incorporados nas NEs. Em relação a CUR (a) e (d), para a NE, nas concentrações de 0,85 - 3,7 $\mu\text{g/mL}$, ocorre uma tendência de aumento a viabilidade celular, fato observado somente na concentração 0,85 $\mu\text{g/mL}$ do composto livre. Nas comparações, tanto para o PHMB (b) e (e) quanto para a CUR + PHMB (c) e (f), entre as formulações livre e nano, vê-se que as concentrações de PHMB (6,25 - 12,5 $\mu\text{g/mL}$) apresentam uma melhora significativa na viabilidade celular.

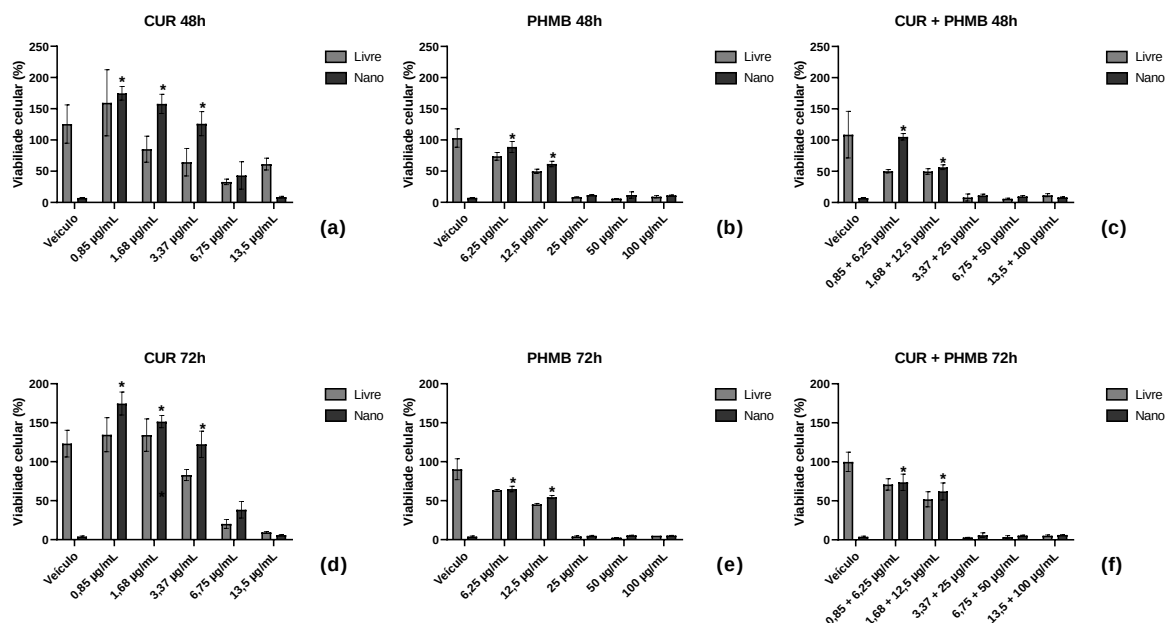


Figura 5: Viabilidade celular (ensaio MTT) de células fibroblastos humanos de pulmão (MCR-5) após 48 h e 72 h de tratamento com formulações livres (L-CUR e L-PHMB) e nano (NE-CUR, NE-PHMB, NE-CUR-PHMB). Controles de veículos apropriados com DMSO 0,01% (v/v) e NE-BR para os tratamentos com compostos livres e em nanoemulsão, respectivamente. O valor representa a média $\pm$ DP para testes em triplicata. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, diferente entre os grupos. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.00. L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida; Nano: compostos carregados em nanoemulsão; Livre: compostos dissolvidos em veículo apropriado.

A partir dos resultados obtidos com o tratamento NE-BR e dos apresentados na Figura 5, novas concentrações foram definidas para o ensaio MTT com as formulações livre e nano (Figura 6). No tempo 48 h, a CUR (a) livre apresentou efeito superior ao da NE, enquanto o PHMB (b) mostrou efeito semelhante para ambas as formulações, efeitos observados também quando os dois compostos (c) estão presentes na mesma formulação. No tempo de 72 h, quando os compostos são incorporados na NE, um aumento significativo na viabilidade celular ($p < 0,05$) é perceptível, para a CUR (d) em todas as concentrações (0,11, 0,21, 0,42, 0,85 e 1,68 $\mu\text{g/mL}$), e para o PHMB (e) nas concentrações 0,78 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$. A associação dos compostos (f) foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular, quando incorporados em NEs, nas concentrações 0,11 + 0,78 $\mu\text{g/mL}$, 0,21 + 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e 0,42 + 3,125 $\mu\text{g/mL}$, de CUR e PHMB respectivamente.

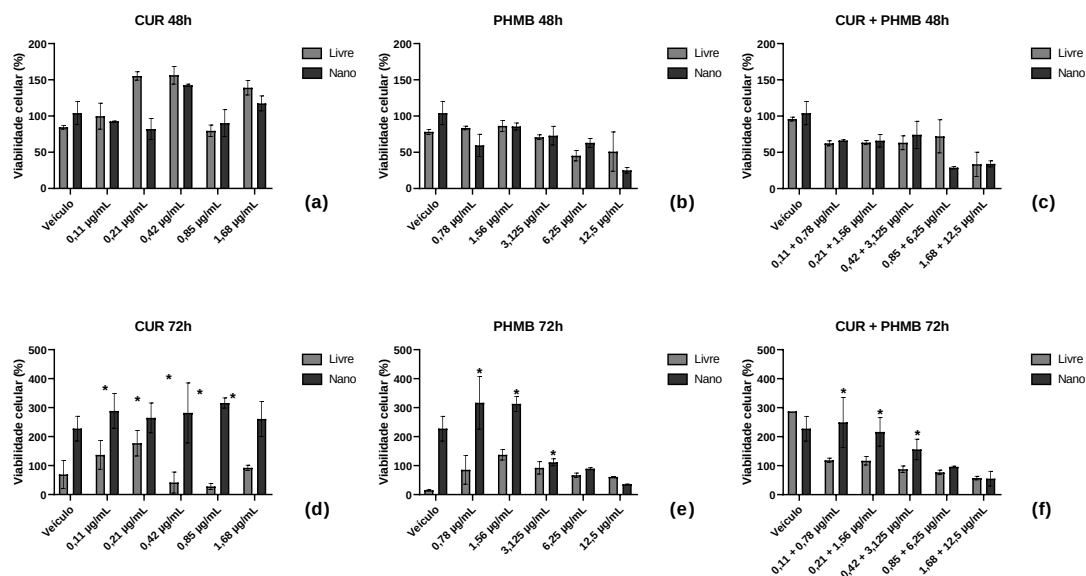


Figura 6: Viabilidade celular (ensaio MTT) de células fibroblastos humanos de pulmão (MCR-5) após 48 h e 72 h de tratamento com formulações livres (L-CUR e L-PHMB) e nano (NE-CUR, NE-PHMB, NE-CUR-PHMB). Controles de veículos apropriados com DMSO 0,01% (v/v) e NE-BR para os tratamentos com compostos livres e em nanoemulsão, respectivamente. O valor representa a média $\pm$ DP para testes em triplicata. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, diferente entre os grupos. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.00. L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida; Nano: compostos carregados em nanoemulsão; Livre: compostos dissolvidos em veículo apropriado.

Ensaios de atividade antimicrobiana

Determinação da CIM

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos excipientes da formulação (dados não mostrados), das nanoemulsões obtidas e dos compostos ativos na forma livre contra uma cepa de uma bactéria gram-negativa, *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Os resultados são mostrados na Tabela 3. Os excipientes (TCM, Tween 20 e Span 80) foram testados nas concentrações utilizadas para a produção das NEs e não apresentaram atividade antimicrobiana. Com relação a curcumina, a CIM, tanto para L-CUR quanto para NE-CUR foi acima de 150 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando atividade antimicrobiana. Em contrapartida, considerando as concentrações de PHMB, a CIM para L-PHMB foi de 5,0

µg/mL, ao passo que as da NE-PHMB e NE-CUR-PHMB foram ligeiramente mais altas, atingindo 10 µg/mL.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) das formulações frente a *P. aeruginosa* (ATCC 15442)

Espécie	Formulação	CIM µg/mL
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	L-CUR	> 150*
	L-PHMB	5**
	NE-CUR	> 150*
	NE-PHMB	10**
	NE-CUR-PHMB	10**

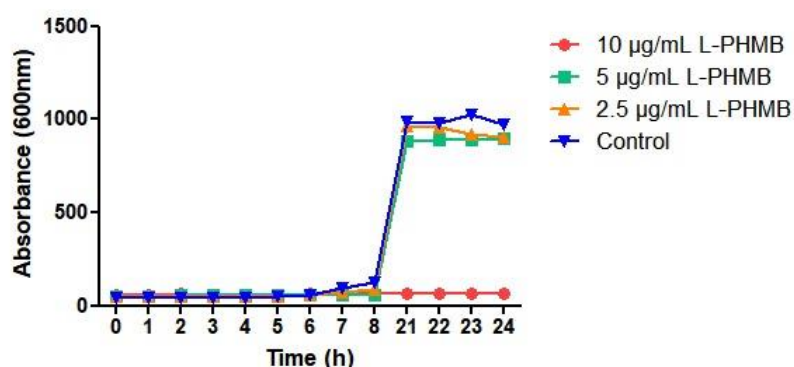
L-CUR: curcumina livre; L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; NE-BR: nanoemulsão branca; NE-CUR: nanoemulsão contendo curcumina; NE-PHMB: nanoemulsão contendo polihexametileno biguanida; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão contendo curcumina e polihexametileno biguanida. * Referente a concentração de curcumina nas formulações L-CUR e NE-CUR. ** Referente a concentração do PHMB nas formulações L-PHMB, NE-PHMB e NE-CUR-PHMB.

Observando os resultados obtidos da CIM, o composto PHMB apresentou maior efeito, em menor concentração, sobre a inibição do crescimento bacteriano, enquanto a CUR não interferiu na diminuição da CIM. Com isso, para a continuidade dos ensaios de atividade antimicrobiana, utilizamos o L-PHMB e o NE-CUR-PHMB.

Efeito do L-PHMB e NE-CUR-PHMB no crescimento da *P. aeruginosa* (ATCC 15442)

Ao analisar o efeito das formulações L-PHMB e NE-CUR-PHMB no crescimento da *P. aeruginosa* (ATCC 15442), nota-se um efeito semelhante entre estas, considerando diferentes concentrações do composto PHMB (Figura 7). Em concentrações subinibitórias, observou-se um efeito ligeiramente superior da NE (Figura 7b) em relação ao composto livre (Figura 7a), onde, a NE-CUR-PHMB na concentração 5,0 µg/mL apresentou o efeito na inibição do crescimento bacteriano, mantendo quase 100% de inibição após a exposição, enquanto o L-PHMB, na mesma concentração, perde seu efeito após 8 h de exposição. Para o L-PHMB, a concentração acima da CIM – 10 µg/mL - inibiu 93,64% de crescimento bacteriano, enquanto a CIM da NE-CUR-PHMB inibiu 91,90% de crescimento bacteriano, mantendo o efeito até às 24h.

(A)



(B)

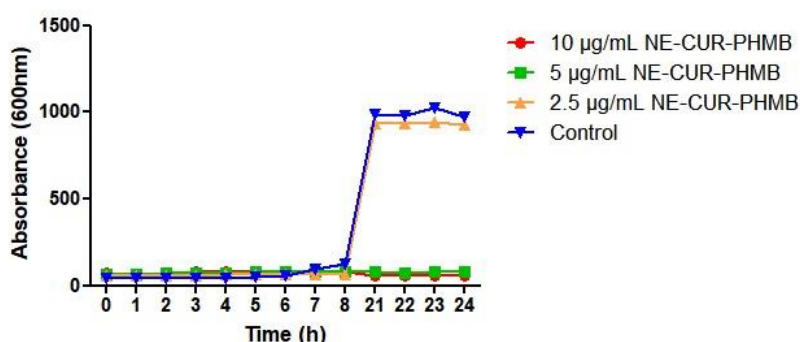


Figura 7: Efeito de diferentes concentrações (10 µg/mL – vermelho, 5 µg/mL – verde, 2,5 µg/mL – laranja) do L-PHMB (a) e da NE-CUR-PHMB (b) no crescimento da *P. aeruginosa* ATCC 15442. L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão com curcumina e polihexametileno biguanida; C+ Pa 15: controle positivo *P. aeruginosa* (ATCC 15442).

Atividade antibiofilme – inibição do biofilme

As formulações L-PHMB e NE-CUR-PHMB, nas concentrações (4x CIM, 2x CIM, CIM e ½ CIM), foram submetidas aos ensaios de inibição de biofilme, frente a cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 15442). A cepa utilizada no experimento foi classificada como moderada formadora de biofilme, de acordo com Stepanovic et al. (2000) [78]. Para todas as formulações testadas observou-se a inibição da formação de biofilme, quando comparado com os controles, sendo estas acima de 80% ($p < 0,05$) (Figura 8). Não sendo observadas diferenças entre o PHMB livre ou nanoencapsulado em associação com a CUR, indicando que a nanoencapsulação não interfere no efeito antibiofilme deste composto.

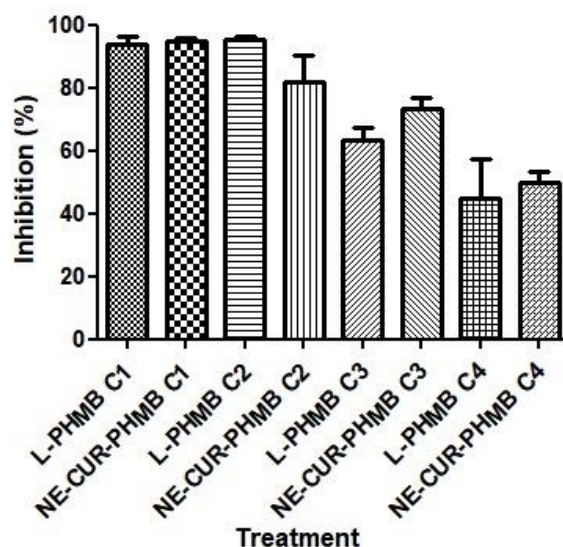


Figura 8: Capacidade de inibição de formação de biofilme de cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) das formulações L-PHMB e NE-CUR-PHMB. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.00. L-PHMB: polihexametileno biguanida livre; NE-CUR-PHMB: nanoemulsão com curcumina e polihexametileno biguanida. C1, C2, C3 e C4 são as concentrações do PHMB nas formulações L-PHMB e NE-CUR-PHMB, correspondendo a 4x CIM, 2x CIM, CIM e $\frac{1}{2}$ CIM, respectivamente.

Hidrogéis contendo NE-CUR-PHMB

O grau de desacetilação e os valores de peso molecular da quitosana foram $84,4 \pm 2,1\%$ e 650 ± 23 kDa, respectivamente. Além disso, a quitosana produzida pode ser projetada como quitosana de alto peso molecular (>250 kDa) [82].

Partindo das formulações NE-BR e NE-CUR-PHMB foram obtidos hidrogéis feitos com hidroxietilcelulose (HGN-BR e HGN-NE-CUR-PHMB) - e com quitosana (HGQ-BR e HGQ-NE-CUR-PHMB). Os resultados da caracterização físico-química indicaram que o tamanho das gotículas, PDI e potencial zeta da NE foram muito semelhantes após a sua incorporação no hidrogel de HEC (Tabela 4). Já após a incorporação no gel de quitosana, um leve aumento foi observado nessas análises. Além disso, conforme previsto, uma vez que a incorporação no gel acaba por diluir a amostra, houve uma diminuição no teor dos ativos nessas formulações, sendo maior para o hidrogel de quitosana.

Tabela 4. Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo as nanoemulsões

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Teor dos ativos (mg/mL)	Recuperação (%)
HGN-BR	255,9±0,76	0,22±0,02	-37,23±1,4	-	-
HGN-NE-CUR-PHMB	229,7±0,50	0,24±0,03	29,20±0,6	0,51±0,8 3,70±0,4	75,7±2,3 74,0±2,6
HGQ-BR	376,6±8,61	0,46±0,03	57,77±0,9	-	-
HGQ-NE-CUR-PHMB	491,9±2,51	0,31±0,03	53,4±1,8	0,24±0,1 1,61±0,4	34,7±1,9 33,5±1,8

A Figura 9 apresenta os resultados do ensaio de bioadesão cutânea em termos de trabalho de adesão. Foi observado um aumento da bioadesão quando os hidrogéis foram produzidos com a NE em comparação com a utilização de água no preparo (grupos controle HGN e HGQ). No entanto, não foi observada diferença entre os grupos de hidrogéis de hidroxietilcelulose e quitosana contendo NE-BR ou NE-CUR-PHMB.

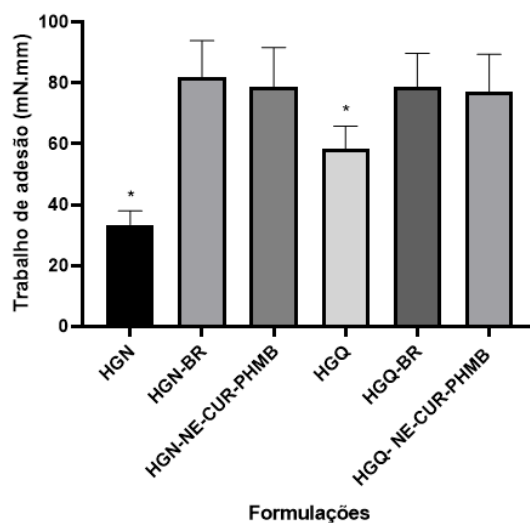


Figura 9: Trabalho de adesão (mN.mm) expresso em valores médios $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. $p < 0,05$. O gráfico foi construído utilizando o software GraphPad Prism 8.00. HGN: hidrogel de hidroxietilcelulose 2% em água; HGN-BR: hidrogel de hidroxietilcelulose 2% contendo NE-BR; HGN-NE-CUR-PHMB: hidrogel de hidroxietilcelulose 2% contendo NE-CUR-PHMB; HGQ: hidrogel de quitosana 2% em água; HGQ-BR: hidrogel de quitosana 2% contendo NE-BR; HGQ-NE-CUR-PHMB: hidrogel de quitosana 2% contendo NE-CUR-PHMB.

Ensaio de membrana corioalantóica de ovo de galinha (HET-CAM)

Os resultados do potencial irritante são mostrados na Figura 10 e na Tabela 5. Antes de proceder com o teste utilizando as NEs e os hidrogéis, os controles positivos e negativos foram avaliados quanto aos efeitos vasculares de hemorragia, coagulação e vasoconstrição. As pontuações IS calculadas para o hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M p/v) e lauril sulfato de sódio 1% p/v, foram 13,19 e 10,42; respectivamente, sendo classificados como extremamente irritantes (Tabela 5). Conforme esperado, os controles negativos cloreto de sódio (NaCl 0,9% p/v) e dimetilsulfóxido (DMSO), não apresentaram reações irritantes. Para a NE-BR, não foi evidenciado efeitos irritantes, sugerindo que os componentes das NEs são seguros para aplicação tópica (Figura 10). Com relação aos ativos livres e sua incorporação nas NEs, não foi observado nenhum tipo de reação vascular. Por fim, ao testar os hidrogéis com e sem as NEs, nenhum tipo de reação irritante foi observado (Figura 10 e Tabela 5).

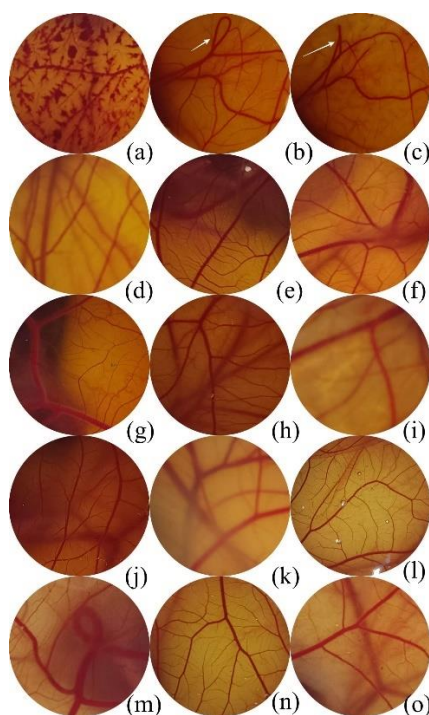


Figura 10: Imagens ilustrativas do efeito potencialmente irritante de substâncias aplicadas na membrana corioalantóide por um período de 5 min. (a) NaOH 0,1M, (b) lauril sulfato de sódio 1% p/v antes, (c) lauril sulfato de sódio 1% p/v controle positivo depois (d) NaCl 0,9% p/v, (e) DMSO, (f) L-CUR, (g) L-PHMB, (h) NE-BR, (i) NE-PHMB, (j) NE-CUR, (k) NE-CUR-PHMB, (l) HGN, (m) HGN-NE-CUR-PHMB, (n) HGQ, (o) HGQ- NE-CUR-PHMB. As setas indicam os efeitos da vasoconstrição (b) e (c). Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey – todos os grupos avaliados (d - o) diferiram em relação aos grupos controle de hemorragia (a) e vasoconstrição (b e c) ($p < 0,01$).

Tabela 5: Escore de irritação e classificação de irritação no ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) (n = 5)

Substância	IS (DPR %)	Classificação
NaOH 0.1M	13.19 (1.66)	Extremamente irritante
Lauril sulfato de sódio 1% p/v	10,42 (1.43)	Extremamente irritante
NaCl 0,9% p/v	0 (0)	Não irritante
DMSO	0 (0)	Não irritante
L-CUR	0 (0)	Não irritante
L-PHMB	0 (0)	Não irritante
NE-BR	0 (0)	Não irritante
NE-PHMB	0 (0)	Não irritante
NE-CUR	0 (0)	Não irritante
NE-CUR-PHMB	0 (0)	Não irritante
HGN	0 (0)	Não irritante
HGN- NE-CUR-PHMB	0 (0)	Não irritante
HGQ	0 (0)	Não irritante
HGQ- NE-CUR-PHMB	0 (0)	Não irritante

DISCUSSÃO

Nanoemulsões (NE) são sistemas heterogêneos formados por partículas coloidais, na faixa nanométrica, que contêm água, óleos e surfactantes, [87,88], resultando em transportadores com elevada capacidade de incorporação de substâncias, tanto de substâncias lipofílicas (como a curcumina – CUR) no núcleo oleoso quanto hidrofílicas (como o polihexametileno biguanida – PHMB) na fase aquosa. Neste sentido, as NEs melhoram a solubilidade e consequentemente a biodisponibilidade dos compostos, além de proteger contra degradação enzimática e apresentar potencial para a diminuição da toxicidade [89,90].

Neste estudo, desenvolvemos uma NE contendo CUR/PHMB (NE-CUR-PHMB) e hidrogéis de HEC e quitosana contendo as NEs, como uma possível plataforma voltada para o tratamento de feridas com ação antimicrobiana e antibiofilme. Embora existam NEs de CUR [66, 59,91] aplicadas ao tratamento de feridas e, nanoformulações contendo PHMB [62, 92] avaliando seus efeitos antimicrobianos e cicatrizantes, nenhum estudo fez a associação dessas duas substâncias em uma formulação e sua incorporação em hidrogéis, demonstrando a originalidade deste trabalho.

As características das NEs dependem dos componentes, das propriedades químicas e físicas da fase oleosa e dos surfactantes utilizados, além da concentração dos componentes utilizados na fase aquosa [93]. Com base nisso, a composição das NEs deste

estudo esteve de acordo com estudo anterior realizado por Araujo et al. (2023) [66], conforme apresentado na Tabela 1, selecionando componentes estáveis, seguros, de baixo custo e utilizados em produtos terapêuticos de uso tópico [66]. Ademais, foi utilizada a técnica de homogeneização a alta pressão (HAP) no preparo das NEs, uma técnica que permite o escalonamento da produção e a produção das formulações sem o uso de solventes orgânicos [94,95].

Prosseguindo a caracterização, o primeiro parâmetro fundamental de avaliação é o tamanho médio das NEs. Esse parâmetro é importante pois influencia nas propriedades físico-químicas, na cinética de liberação do composto e na sua biodistribuição [96]. Outro parâmetro relacionado ao tamanho é o índice de polidispersão (PDI), onde um valor inferior a 0,3 indica uma distribuição unimodal, com faixa de tamanho estreita [97,98]. Assim, verificamos que as formulações desenvolvidas no presente trabalho possuíam características monodispersas (PDI menor que 0,22) e que o tamanho médio das gotículas estava adequado para administração tópica (em torno de 200 nm). Ao avaliarmos o tamanho da NE-CUR-PHMB, observamos que este é maior do que o valor encontrado em outros estudos que desenvolveram NE contendo CUR, 191 - 196 nm [66] e 166 nm [99], produzidas pelo método de HAP - e 171 nm [91] produzida pelo método de emulsificação espontânea. Entretanto, os valores obtidos para nossa formulação são considerados satisfatórios para aplicação na pele [100].

Além disso, o potencial zeta também foi avaliado e este reflete a estabilidade eletrostática de nanomateriais em uma solução, onde valores superiores a 30 mV em módulo são considerados indicativos de estabilidade cinética a longo prazo da formulação [101]. No caso deste trabalho, a formulação desenvolvida contendo a CUR e o PHMB apresentou um valor positivo de potencial zeta (35 mV), indicando uma boa estabilidade eletrostática. Nanopartículas com potencial zeta superiores a + 30 mV são consideradas fortemente catiônicas [101]. Na NE-CUR-PHMB, o valor encontrado em nosso estudo foi influenciado pela presença do PHMB na fase aquosa e superfície da NE, visto que é uma substância catiônica [102].

Com o intuito de observar se a NE branca (NE-BR) causaria alterações bioquímicas na pele de orelha suína, realizamos, em parceria com a Universidade de Viena (Austria), a espectroscopia Raman confocal. Ao observar a profundidade máxima de penetração em pele, a penetração foi idêntica tanto para a NE quanto para a solução controle, indicando que não houve nenhum efeito permanente de agressão da formulação às funções de

barreira da pele [103]. Além disso, a NE-BR apresentou uma tendência de aumento da hidratação do estrato córneo EC (Figura 2). O perfil de hidratação da pele fornece informações sobre a capacidade de retenção de água e as propriedades de barreira, tendo implicações diretas para a farmacologia da pele [104]. Além disso, a progressão da inclinação (Figura 2) correspondeu aos resultados anteriores, obtidos por Binder et al. (2018) [105], indicando que a NE-BR seguiu o comportamento esperado de uma formulação aplicada a pele.

Prosseguindo com a espectroscopia confocal Raman, foram analisados o teor de fator de hidratação natural (FHN) e ureia da pele (Figura 3A e 3B). A ureia é um dos componentes do FHN e possui efeito no conteúdo de água e na capacidade de retenção de água do EC [106], podendo servir como um marcador de perda de água [103]. Dessa forma, corroborando com os dados de penetração e hidratação da pele (Figura 1 e Figura 2), a formulação proporcionou melhorias nos parâmetros fisiológicos da pele, aumentando a função de barreira durante o tratamento, o que pode potencialmente contribuir para uma melhor ação local da NE em uma pele lesionada, como uma ferida.

A viabilidade celular, utilizando linhagem de fibroblastos humanos (MCR-5) após exposição de 48 – 72 h, foi avaliada visando determinar a toxicidade das NEs. Inicialmente, optou-se por realizar uma ampla curva concentração-resposta partindo de concentrações mais altas até concentrações mais baixas da CUR e do PHMB (Figura 5 e Figura 6). Os resultados obtidos mostraram que no tempo de 72 h a NE-CUR-PHMB foi segura a uma concentração de 1,68 µg/mL para a CUR e 12,5 µg/mL para o PHMB. Para as concentrações de 0,85 µg/mL para a CUR e 6,25 µg/mL para o PHMB ocorreu uma tendência de indução da viabilidade celular. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a CUR possui efeito positivo na proliferação de fibroblastos [107].

A citotoxicidade de nanoformulações contendo CUR em linhagens de fibroblastos foram previamente descritas por outros autores. Sadeghianmaryan et al. (2020) [108] desenvolveram polímeros nanoestruturados eletrofiados contendo CUR e constataram que a formulação foi segura a uma concentração de 100 µg/mL. Araujo et al (2023) [66], determinaram que uma NE contendo CUR foi segura a uma concentração de 125 µg/mL. Já no caso do PHMB, a viabilidade celular foi avaliada por Rembe et al. (2016) [39] contra linhagens celulares de fibroblastos murinos e queratinócitos humanos, e foi observado que em todas as concentrações avaliadas (0,1 – 0,005 %), o PHMB mostrou uma elevada citotoxicidade. Neste sentido, destaca-se o potencial de utilização dos dois

ativos co-incorporados, que auxilia na diminuição da toxicidade do PHMB e na melhora do efeito cicatrizante da CUR. O potencial cicatrizante da CUR tem sido alvo de estudo por diversos pesquisadores, visto que essa substância possui ação anti-inflamatória [109-111] e antioxidante [112], além de impactos na fase proliferativa do processo de cicatrização, com efeitos na formação de tecido de granulação e deposição de colágeno [113,114], na proliferação de fibroblastos [107], na angiogênese, na epitelização e na apoptose de células indesejadas [115].

No entanto, uma das principais razões para o não sucesso no processo de cicatrização é a infecção e a formação de biofilme, levando a ferida a torna-se crônica, acarretando no aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes [116]. *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista comum em pacientes com feridas infectadas [117], apresenta considerável morbidade e mortalidade [118] e seu tratamento é desafiador devido a sua capacidade de formar biofilme [119], secretar uma variedade de fatores de virulências [120] e sofrer rápidas mutações [119]. A atividade antimicrobiana, antibiofilme e antisséptica do PHMB frente a *Pseudomonas aeruginosa* está documentada na literatura [38, 121, 122]. O PHMB liga-se aos grupos fosfolipídicos da parede celular bacteriana, causando uma disfunção da membrana e um aumento da sua permeabilidade, acarretando no rompimento da parede e na morte celular [123].

Dessa forma, decidiu-se por avaliar a atividade antimicrobiana da NE-CUR-PHMB e do PHMB livre (L-PHMB) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, visto que, a concentração inibitória mínima (CIM) para a CUR ($> 150 \mu\text{g/mL}$) não mostrou ser suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Ao avaliar CIM para PHMB livre e nanoencapsulado, a formulação livre apresentou uma menor CIM (Tabela 3). No entanto, observando o efeito das formulações no crescimento da cepa, a nanoformulação mostrou um efeito superior na inibição do crescimento bacteriano (Figura 7) na concentração $5 \mu\text{g/mL}$, mantendo esse efeito por, pelo menos, 24 h e inibindo o crescimento bacteriano acima de 90%, indicando uma ótima atividade frente ao crescimento da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Ademais, ambas as formulações apresentaram atividade semelhante na capacidade de inibição de formação de biofilme (Figura 8). Tomados em conjunto, os nossos resultados demonstram que a incorporação do PHMB em NE não afeta negativamente a atividade antimicrobiana do ativo contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, mantendo ou

otimizando o efeito, por diminuir a toxicidade deste composto. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos publicados anteriormente, mostrando que a nanoencapsulação mantém a atividade antimicrobiana dos compostos, como PHMB [62], tobramicina [124], colistina [125] e prata [126].

A associação de moléculas terapêuticas a curativos proporciona melhorias ao processo de cicatrização de feridas [127]. Os hidrogéis são um dos tipos de curativos mais utilizados para o tratamento de feridas devido a sua capacidade hidratante, sua adesividade e biocompatibilidade e por servir como barreira de prevenção a infecções, além de permitir a incorporação de substâncias de interesse na terapêutica [128,129].

Nesse estudo, desenvolvemos hidrogéis contendo a NE-CUR-PHMB, utilizando quitosana e hidroxietilcelulose como polímeros formadores de gel. A quitosana obtida apresentou um grau de desacetilação superior a 80%, que fornece mais grupos amina ($-NH_2$) através da estrutura da quitosana [130]. Esses grupos polares podem interagir com moléculas de água e melhorar o comportamento de inchamento do hidrogel. Além disso, os grupos amino desprotonados causados pela neutralização do hidrogel podem reduzir as interações eletrostáticas entre as cadeias poliméricas [131].

Ademais, de acordo com a projeção de uma quitosana de alto peso molecular, polímeros de maior peso molecular desempenham um papel importante no desenvolvimento de hidrogel devido à sua capacidade de aumentar as interações intermoleculares. Essa característica leva a maior quantidade de emaranhamento entre as cadeias poliméricas, atuando como ligações cruzadas físicas dentro da estrutura do hidrogel e melhorando as propriedades físico-químicas do hidrogel de quitosana. A rede densa e as interações eletrostáticas reduzidas são importantes na cicatrização de feridas pois podem reduzir a taxa de difusão de água e de compostos bioativos, restringindo o volume livre disponível dentro da matriz de hidrogel. Portanto, essas características podem manter o ambiente úmido e proporcionar a liberação sustentada de compostos bioativos [132-135].

De modo geral, verificou-se que na formulação contendo hidroxietilcelulose as características físico-químicas da NEs foram mantidas (Tabela 4). Esses resultados estão em acordo com o estudo realizado por Argenta et al. (2018) [136], visto que esse agente espessante é hidrofílico não-iônico, e, portanto, não altera a carga superficial das partículas, além de produzir uma dispersão homogênea com propriedades bioadesivas e capacidade de formação de filme. No caso dos hidrogéis de quitosana foi observado

alteração no tamanho das gotículas e no aumento do potencial zeta, devido ao revestimento de quitosana, que é catiônica, na fase dispersa das gotículas, além de uma menor recuperação dos ativos (Tabela 4) [137].

Sistemas bioadesivos, como hidrogéis, prologam o tempo de permanência da formulação no local de aplicação, visto que aumentam a espalhabilidade e a resistência à fricção. No caso de hidrogéis carreadores de medicamentos, essas características resultam em uma liberação prolongada, reduzindo a necessidade de novas aplicações e favorecendo a aceitabilidade ao tratamento, tornando-se um biomaterial atrativo para formulações tópicas [138]. Assim, independente do polímero formador de gel utilizado, os hidrogéis contendo as NEs desenvolvidos em nosso trabalho apresentaram resultados de bioadesão satisfatórios, gerando maior adesão após a incorporação das NEs, o que faz dessas formulações promissoras para aplicação tópica.

Por fim, as formulações apresentaram potencial não irritativo no ensaio HET-CAM. Este teste é utilizado como uma metodologia alternativa ao teste de irritação ocular *in vivo* para avaliar o potencial irritante de substâncias químicas. No entanto, também vem sendo empregado como teste de triagem preliminar antes de ensaios *in vivo*, com o objetivo de determinar o potencial irritante de substâncias nas membranas e na pele [73, 139,140,141]. Comparando os resultados descritos nesse trabalho, podemos observar que a NE-CUR-PHMB é uma formulação que possui um bom comportamento na pele, capaz de diminuir a citotoxicidade do PHMB e possui potencial para induzir a proliferação de fibroblastos, além de apresentar atividade antimicrobiana e anti-biofilme contra *P. aeruginosa*. Ademais sua incorporação em hidrogéis, especialmente de HEC, manteve as características da NE, melhorou a bioadesão e, tanto as NEs quanto os hidrogéis mostram-se não irritativos, demonstrando ser formulações promissoras para o tratamento de feridas.

CONCLUSÃO

Foram obtidas formulações com tamanho nanométrico e propriedades adequadas para aplicação dérmica. A NE-BR demonstrou não causar alterações bioquímicas na pele, aumentando a função de barreira. A NE-CUR-PHMB proporcionou uma diminuição da citotoxicidade do PHMB e um aumento da solubilidade da CUR. Em relação aos ensaios de atividade antimicrobiana, a NE-CUR-PHMB apresentou atividade contra *P. aeruginosa*, além de atividade inibidora de biofilme. A incorporação das NEs em hidrogéis, especialmente de hidroxietilcelulose, manteve as características da NE e

aumentou a bioadesão, além de não ter sido observado um potencial irritante para nenhuma formulação desenvolvida. Desta forma, os resultados indicam o potencial promissor da NE-CUR-PHMB e sua incorporação em hidrogéis para uso tópico na cicatrização de feridas. No entanto, ressalta-se que estudos complementares que avaliem a eficácia farmacológica *in vivo* são essenciais para confirmar a eficácia clínica das formulações desenvolvidas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Dąbrowska, A. K. et al. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol*, v. 24(2), p. 165-174, 2018.
2. Harris-Tryon TA, Grice EA. Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science*. 2022 May 27;376(6596):940-945.
3. Pu, S. Y. et al. Effects of Oral Collagen for Skin Anti-Aging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, v. 15(9), p. 2080, 2023.
4. Quan, T. Human Skin Aging and the Anti-Aging Properties of Retinol. *Biomolecules*, v. 13(11), p. 1614, 2023.
5. Kremer M, Burkemper N. Aging Skin and Wound Healing. *Clin Geriatr Med*. 2024 Feb;40(1):1-10. doi: 10.1016/j.cger.2023.06.001. Epub 2023 Aug 23. PMID: 38000854.
6. Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J.-M. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, v. 17, n. 12, p. 1063–72, 2008
7. Nethi, S. K. et al. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomaterials Science*, v. 7, n. 7, p. 2652-2674, 2019.
8. Lin, Y. et al. Recent Advances in Nano-Formulations for Skin Wound Repair Applications. *Drug Design, Development and Therapy*, v. Volume 16, p. 2707–2728, 2022.
9. Freedman, B. R. et al. Breakthrough treatments for accelerated wound healing. *Science advances*, v. 9(20), 2023.
10. Nguyen, H. M. et al. Biomedical materials for wound dressing: recent advances and applications. *RSC advances*, v. 13(8), p. 5509–5528, 2023.
11. Lindholm, C.; Searle, R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*, v. 13, n. S2, p. 5–15, 2016.
12. Bowers, S.; Franco, E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. *American Family Physician*, v. 101, n. 3, p. 159–166, 2020.
13. Sen, C. K. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Advances in wound care*, v. 10, n. 5, p. 281-292, 2021.
14. Singer, A. J. Healing Mechanisms in Cutaneous Wounds: Tipping the Balance. *Tissue Eng Part B Rev*, v. 28(5), p. 1151-1167, 2022.
15. Fernández-Guarino M, Bacci S, Pérez González LA, Bermejo-Martínez M, Cecilia-Matilla A, Hernández-Bule ML. The Role of Physical Therapies in Wound Healing and Assisted Scarring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(8):7487.
16. Chouhan, D. et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, v. 216, p. 1-19, 2019.

17. Qadir, A. et al. Phytochemical-Based Nano-Pharmacotherapeutics for Management of Burn Wound Healing. *Gels*, v. 7, n. 4, 2021.
18. Nanditha, C. K.; Kumar, G. S. V. Bioactive peptides laden nano and micro-sized particles enriched ECM inspired dressing for skin regeneration in diabetic wounds. *Mater Today Bio*, v.14, 2022.
19. Talbott, H. E. et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell*, v. 29(8), p. 1161-1180, 2022.
20. Liang, Z. et al. Impact of moist wound dressing on wound healing time: A meta-analysis. *Int Wound J*, v. 20(10), p. 4410-4421, 2023.
21. Pereira R. F.; Bártolo, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Adv Wound Care*, v. 5, n.5, p. 208-229, 2016.
22. Negut, I. Grumezescu, V., Grumezescu, A. M. Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules*, v. 23, n. 9, 2018.
23. Shi, C. et al. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 8, n. 182, 2020.
24. Nuutila, K.; Eriksson, E. Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings. *Advances in Wound Care*, v. 10, n. 12, 2020.
25. CAO, J. et al. Rational Design of Multifunctional Hydrogels for Wound Repair. *J. Funct. Biomater*, v. 14, p. 553, 2023.
26. Zhao, Y. et al. Recent Advances of Natural-Polymer-Based Hydrogels for Wound Antibacterial Therapeutics. *Polymers (Basel)*, v.15(15), p. 3305, 2023.
27. Zhang, S. et al. Polysaccharide-based hydrogel promotes skin wound repair and research progress on its repair mechanism. *Int J Biol Macromol*, v. 1, p. 248, 2023
28. Liu, Y. et al. Research progress on antimicrobial hydrogel dressing for wound repair. *European Polymer Journal*, v. 197, 2023.
29. Ghobril, C.; Grinstaff, M. W. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. *Chemical Society reviews*, v. 44, n. 7, p. 1820-1835, 2015.
30. Francesko, A.; Petkova, P.; Tzanov, T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Curr Med Chem*, v. 25(41), p. 5782-5797, 2018.
31. Peng, W. et al. Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. *Int J Biol Macromol*, v. 208, p. 400-408, 2022.
32. Yang, Dan. et al. Hydrogel wound dressings containing bioactive compounds originated from traditional Chinese herbs: A review. *Smart Materials in Medicine*, v. 5(1), p. 153-165, 2024.
33. Mulder GD, Cavorsi JP, Lee DK. Polyhexamethylene Biguanide (PHMB): An Addendum to Current Topical Antimicrobials. *Wounds*. 2007 Jul;19(7):173-82.
34. Magina, S. et al. High Pressure Laminates with Antimicrobial Properties. *Materials (Basel)*, v. 9, n. 2, 2016.
35. Worsley, A. et al. Polyhexamethylene Biguanide:Polyurethane Blend Nanofibrous Membranes for Wound Infection Control. *Polymers*, v. 11, n. 5, p. 915, 2019.
36. Liang, A. et al. Porous Poly(Hexamethylene Biguanide) Hydrochloride Loaded Silk Fibroin Sponges with Antibacterial Function. *Materials (Basel)*, v. 12, n. 2, 2020.

37. Chanabodeechalermrung, B. et al. Dual Crosslinked Ion-Based Bacterial Cellulose Composite Hydrogel Containing Polyhexamethylene Biguanide. *Membranes*, v. 12, n. 9, 2022.
38. Ramasamy S. et al. Fabrication of collagen with polyhexamethylene biguanide: A potential scaffold for infected wounds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, n. 110, v. 110, n. 3, p. 535-546, 2022
39. Rembe JD, Fromm-Dornieden C, Schäfer N, Böhm JK, Stuermer EK. Comparing two polymeric biguanides: chemical distinction, antiseptic efficacy and cytotoxicity of polyaminopropyl biguanide and polyhexamethylene biguanide. *J Med Microbiol*. 2016 Aug;65(8):867-876.
40. Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol*. 2014 Jun;20(2):322-30.
41. Qu, J. et al. Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials*, v. 183, p. 185–199, 2018.
42. Barchitta, M. et al. Nutrition and Wound Healing: An Overview Focusing on the Beneficial Effects of Curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 5, p. 1119, 2019.
43. Mirzahasseinipour, M. et al. Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 29, p. 101639, 2020.
44. Hao, M. et al. Pharmacological Mechanisms and Clinical Applications of Curcumin: Update. *Aging Dis*, v. 14(3), p. 716-749, 2023.
45. Kumari, M.; Nanda, D. K. Potential of Curcumin nanoemulsion as antimicrobial and wound healing agent in burn wound infection. *Burns*, v. 49(5), p. 1003-1016, 2023.
46. Obeid, M. A.; AlsaadI, M.; Aljabali, A. A. Recent updates in curcumin delivery. *J Liposome Res*, v. 33(1), p. 53-64, 2023.
47. Rajendran, N. K. et al. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 44, p. 421–430, 2018.
48. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med*. 2013, 9, 1–14.
49. Su, S.; M. Kang, P. Recent Advances in Nanocarrier-Assisted Therapeutics Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2020, 12, 837.
50. Abd, E. et al. Minoxidil Skin Delivery from Nanoemulsion Formulations Containing Eucalyptol or Oleic Acid: Enhanced Diffusivity and Follicular Targeting. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 1, 2018.
51. Anand, K. et al. Nano-emulgel: Emerging as a Smarter Topical Lipidic Emulsion-based Nanocarrier for Skin Healthcare Applications. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, v. 14, n. 1, p. 16–35, 2019.
52. Dhiman, N. et al. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. *Frontiers in Chemistry*, v. 9, 2021.

53. Lin, Y. et al. Recent Advances in Nano-Formulations for Skin Wound Repair Applications. *Drug Design, Development and Therapy*, v. Volume 16, p. 2707–2728, 2022.
54. Lo, S.; MahmoudI, E.; Fauzi, M. B. Applications of drug delivery systems, organic, and inorganic nanomaterials in wound healing. *Discov Nano*, v. 18(1), p. 104, 2023.
55. Ahmad, N., Ahmad, R., Al-Qudaihi, A., Alaseel, S. E., Fita, I. Z., Khalid, M. S., & Pottoo, F. H. (2019). Preparation of a novel curcumin nanoemulsion by ultrasonication and its comparative effects in wound healing and the treatment of inflammation. *RSC advances*, 9(35), 20192–20206.
56. Yousef SA, Mohammed YH, Namjoshi S, Grice JE, Benson HAE, Sakran W, Roberts MS. Mechanistic Evaluation of Enhanced Curcumin Delivery through Human Skin In Vitro from Optimised Nanoemulsion Formulations Fabricated with Different Penetration Enhancers. *Pharmaceutics*. 2019 Dec 1;11(12):639.
57. Pathan, I.B.; Munde, S.J.; Shelke, S.; Ambekar, W.; Mallikarjuna Setty, C. Curcumin Loaded Fish Scale Collagen-HPMC Nanogel for Wound Healing Application: Ex-Vivo and In-Vivo Evaluation. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater*. 2019, 68, 165–174.
58. Ali M, Khan NR, Subhan Z, Mehmood S, Amin A, Rabbani I, -Rehman FU, Basit HM, Syed HK, Khan IU, Khan MS, Khattak S. Novel Curcumin-Encapsulated α -Tocopherol Nanoemulsion System and Its Potential Application for Wound Healing in Diabetic Animals. *Biomed Res Int*. 2022 Sep 15;2022:7669255.
59. Thomas, L.; Zakir, F.; Mirza, M.A.; Anwer, M.K.; Ahmad, F.J.; Iqbal, Z. Development of Curcumin Loaded Chitosan Polymer Based Nanoemulsion Gel: In Vitro, Ex Vivo Evaluation and in Vivo Wound Healing Studies. *Int. J. Biol. Macromol*. 2017, 101, 569–579.
60. Algahtani MS, Ahmad MZ, Nourein IH, Albarqi HA, Alyami HS, Alyami MH, Alqahtani AA, Alasiri A, Algahtani TS, Mohammed AA, Ahmad J. Preparation and Characterization of Curcumin Nanoemulgel Utilizing Ultrasonication Technique for Wound Healing: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation. *Gels*. 2021 Nov 14;7(4):213.
61. Müller G, Koburger T, Kramer A. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2013 Jan 25;201(1-3):58-64.
62. Ahani E, Montazer M, Toliyat T, Mahmoudi Rad M. A novel biocompatible antibacterial product: Nanoliposomes loaded with poly(hexamethylene biguanide chloride). *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2017;32(3):242-262.
63. Kamaruzzaman NF, Pina MF, Chivu A, Good L. Polyhexamethylene Biguanide and Nadifloxacin Self-Assembled Nanoparticles: Antimicrobial Effects against Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Polymers (Basel)*. 2018 May 12;10(5):521.
64. He X, Dai L, Ye L, Sun X, Enoch O, Hu R, Zan X, Lin F, Shen J. A Vehicle-Free Antimicrobial Polymer Hybrid Gold Nanoparticle as Synergistically Therapeutic Platforms for *Staphylococcus aureus* Infected Wound Healing. *Adv Sci (Weinh)*. 2022 May;9(14):e2105223.
65. Araújo MSG, Lima Rodrigues J, Campello Yurgel V, Silva C, Manuel Cavaco Paulo A, Isabel Saí Loureiro A, Lima Dora C. Designing and characterization of

- curcumin-loaded nanotechnological dressings: A promising platform for skin burn treatment. *Int J Pharm.* 2023 Mar 25;635:122712.
66. Araújo GMS, Loureiro AIS, Rodrigues JL, Barros PAB, Halicki PCB, Ramos DF, Marinho MAG, Vaiss DP, Vaz GR, Yurgel VC, Bidone J, Muccillo-Baisch AL, Hort MA, Paulo AMC, Dora CL. Toward a Platform for the Treatment of Burns: An Assessment of Nanoemulsions vs. Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Curcumin. *Biomedicines.* 2023 Dec 18;11(12):3348.
 67. MULLER, R. H; Lucks, J. S. Eur. Patent No.0605497, 1996.
 68. ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. In: Q2B(R1): Guideline on validation of analytical procedure-methodology. 2005.
 69. Medeiros L, Dos Santos RF, da Rolt Nervis B, Jacobi M, Hashizume LN, Gazzzi RP, Visioli F, Nunes JS, Lavayen V, De Franco VC, Daitx TS, Pereira SC, Ferreira GA, Pohlmann A, Guterres S, Frank LA, Bussamara R. Synthesis of films based on chitosan and protic ionic liquids to be used as wound dressing on the oral mucosa. *Int J Biol Macromol.* 2023 Dec 31;253(Pt 6):127134.
 70. Caspers, P. J. et al. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol*, v. 116, p. 434-442, 2001.
 71. Binder, L. et al. Confocal Raman spectroscopy: In vivo measurement of physiological skin parameters - A pilot study. *J Dermatol Sci*, v. 88, p. 280-288, 2017.
 72. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunological Methods* 1983, 65, 55–63.
 73. Balestrin LA, Kreutz T, Fachel FNS, Bidone J, Gelsleichter NE, Koester LS, Bassani VL, Braganhol E, Dora CL, Teixeira HF. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) Extract-Loaded Nanoemulsions as a Promising Topical Wound Healing Delivery System: In Vitro Assessments in Human Keratinocytes (HaCaT) and HET-CAM Irritant Potential. *Pharmaceutics.* 2021 Aug 12;13(8):1241.
 74. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2020. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI, Wayne, PA
 75. Costa, P.; Gomes, A.T.P.C.; Braz, M.; Pereira, C.; Almeida, A. Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium* Inactivation Mediated by Phages. *Antibiotics* 2021, 10, 974.
 76. Halicki PCB, Radin V, von Groll A, Nora MV, Pinheiro AC, da Silva PEA, Ramos DF. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-Pyridinylhydrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist.* 2020 Dec;26(12):1429-1436.
 77. Stepanovic', S., D. Vukovic', V. Hola, G. Di Bonaventura, S. Djukic', I. Cirkovic', and F. Ruzicka. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115:891–899.
 78. Stepanovic, S., D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic, and M. Svabic-Vlahovic. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40:175–179.
 79. Weeska, R.F.; Moura, J.M.; Batista, L.M.; Rizzi, J.; Pinto, L.A.A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of

- response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 80 (3), p. 749-753, 2007.
80. Moura J.M., Farias B.S., Rodrigues D.A.S., Moura C.M., Dotto G.L., Pinto L.A.A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. *J. Polym. Environ*, v. 23, p. 470-477, 2015.
 81. G. L. Dotto, V. C. de Souza, J. M. de Moura, C. M. de Moura, L. A. de Almeida Pinto. Influence of Drying Techniques on the Characteristics of Chitosan and the Quality of Biopolymer Films. *Drying Technology*, v. 29, 1784-1791, 2011.
 82. B. S. de Farias, D. D. R. Grundmann, F. Z. Rizzi, N. S. S. Martins, T. R. Sant'Anna Cadaval Junior, L. A. de Almeida Pinto. Production of low molecular weight chitosan by acid and oxidative pathways: Effect on physicochemical properties. *Food Research International*, v. 123, p. 88-94, 2019.
 83. M. A. Masuelli. Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, v. 2, n. 2, p. 37-43, 2014.
 84. Weimer, P. et al., Correlation between the Skin Permeation Profile of the Synthetic Sesquiterpene Compounds, Beta-Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, and the Antiedematogenic Activity by Topical Application of Nanoemulgers. *Biomolecules*, v. 12(8), p. 1102, 2022.
 85. ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test—Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. In ICCVAM Test Method Evaluation Report; National Institute of Health (NIH): Research Triangle Park: Durham, NC, USA, 2010; pp. B30–B38, ISBN 1661-6596.
 86. Chassot, J.M.; Ribas, D.; Silveira, E.F.; Grünspan, L.D.; Pires, C.C.; Farago, P.V.; Braganhol, E.; Tasso, L.; Cruz, L. Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric Nanocapsules: Development, In Vitro Cytotoxicity, and In Vivo Evaluation of Acute Lung Injury. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015, 15, 855–864.
 87. Lo, S, Mahmoudi E, Fauzi MB. Applications of drug delivery systems, organic, and inorganic nanomaterials in wound healing. *Discov Nano.* 2023 Aug 22;18(1):104. doi: 10.1186/s11671-023-03880-y. PMID: 37606765; PMCID: PMC10444939.
 88. Motsoene F, Abrahamse H, Dhilip Kumar SS. Multifunctional lipid-based nanoparticles for wound healing and antibacterial applications: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2023 Nov;321:103002. doi: 10.1016/j.cis.2023.103002. Epub 2023 Sep 27. PMID: 37804662.
 89. MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 251, p. 55-79, 2018.
 90. Gorain B, Pandey M, Leng NH, Yan CW, Nie KW, Kaur SJ, Marshall V, Sisinthy SP, Panneerselvam J, Molugulu N, Kesharwani P, Choudhury H. Advanced drug delivery systems containing herbal components for wound healing. *Int J Pharm.* 2022 Apr 5;617:121617. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121617. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35218900.
 91. Alyoussef, A.; El-Gogary, R.I.; Ahmed, R.F.; Ahmed Farid, O.A.H.; Bakeer, R.M.; Nasr, M. The Beneficial Activity of Curcumin and Resveratrol Loaded in Nanoemulgel for Healing of Burn-Induced Wounds. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2021, 62, 102360.
 92. Lee, Y. H.; Lin, S. J. Chitosan/PVA Hetero-Composite Hydrogel Containing Antimicrobials, Perfluorocarbon Nanoemulsions, and Growth Factor-Loaded Nanoparticles as a Multifunctional Dressing for Diabetic Wound Healing:

- Synthesis, Characterization, and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 3, 2022.
93. Azmi, N.A.N. et al. Nanoemulsions: Factory for Food, Pharmaceutical and Cosmetics. *Processes*, v. 7, p. 617, 2019.
 94. Komaiko, J. S.; McClements, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, v. 15(2), p. 331-352, 2016.
 95. kumar, M. et al. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive Nutrition and Food Science*, v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.
 96. Fontanive, V. C. P. et al. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, p. 549-558, 2014.
 97. Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; Freitas, L.L.; Pohlmann, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 2003, 26, 726–737.
 98. Hoseini B, Jaafari MR, Golabpour A, Momtazi-Borojeni AA, Karimi M, Eslami S. Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles. *Sci Rep*. 2023 Oct 21;13(1):18012.
 99. Demisli, S. et al. Development and Study of Nanoemulsions and Nanoemulsion-Based Hydrogels for the Encapsulation of Lipophilic Compounds. *Nanomaterials*, v. 10, n. 12, p. 2464, 2020.
 100. Bolzinger A.; Briançon S.; Pelletier J.; Chavalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* .2012 June; 17(3):156-165.
 101. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*. 2011;697:63-70.
 102. Ntow-Boahene W, Papandronicou I, Miculob J, Good L. Fungal cell barriers and organelles are disrupted by polyhexamethylene biguanide (PHMB). *Sci Rep*. 2023 Feb 16;13(1):2790. doi: 10.1038/s41598-023-29756-w. PMID: 36797386; PMCID: PMC9935507.
 103. Wolf M, Klang V, Stojcic T, Fuchs C, Wolzt M, Valenta C. NLC versus nanoemulsions: Effect on physiological skin parameters during regular in vivo application and impact on drug penetration. *Int J Pharm*. 2018 Oct 5;549(1-2):343-351. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.007. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30099212.
 104. Caspers PJ, Lucassen GW, Puppels GJ. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys J*. 2003 Jul;85(1):572-80.
 105. Binder L, Kulovits EM, Petz R, Ruthofer J, Baurecht D, Klang V, Valenta C. Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy - A comparative study. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018 Sep;130:214-223. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.07.007. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29981829.
 106. Egawa M, Sato Y. In vivo evaluation of two forms of urea in the skin by Raman spectroscopy after application of urea-containing cream. *Skin Res Technol*. 2015 Aug;21(3):259-64.
 107. Ravanfar K, Amniattalab A, Mohammadi R. Curcumin-Polyethylene Glycol Loaded on Chitosan-Gelatin Nanoparticles Enhances Burn Wound

- Healing in Rat. *J Burn Care Res.* 2022 Nov 2;43(6):1399-1409. doi: 10.1093/jbcr/irac048. PMID: 35420679.
108. Sadeghianmaryan A, Yazdanpanah Z, Soltani YA, Sardroud HA, Nasirtabrizi MH, Chen X. Curcumin-loaded electrospun polycaprolactone/montmorillonite nanocomposite: wound dressing application with anti-bacterial and low cell toxicity properties. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2020 Feb;31(2):169-187
 109. Merrell, J.G.; McLaughlin, S.W.; Tie, L.; Laurencin, C.T.; Chen, A.F.; Nair, L.S. Curcumin-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanofibres: Diabetic Wound Dressing with Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009, 36, 1149–1156.
 110. Wang, J.; Wang, H.; Zhu, R.; Liu, Q.; Fei, J.; Wang, S. Anti-Inflammatory Activity of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles in IL-1 β Transgenic Mice Subjected to the Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. *Biomaterials* 2015, 53, 475–483.
 111. Zhang, Y.; Liu, Z.; Wu, J.; Bai, B.; Chen, H.; Xiao, Z.; Chen, L.; Zhao, Y.; Lum, H.; Wang, Y.; et al. New MD2 Inhibitors Derived from Curcumin with Improved Anti-Inflammatory Activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 148, 291–305.
 112. Borra, S.K.; Mahendra, J.; Gurumurthy, P.; Jayamathi; Iqbal, S.S.; Mahendra, L. Effect of Curcumin against Oxidation of Biomolecules by Hydroxyl Radicals. *J. Clin. Diagn. Res.* 2014, 8, CC01–CC5.
 113. Aslam, Z.; Roome, T.; Razzak, A.; Aslam, S.M.; Zaidi, M.B.; Kanwal, T.; Sikandar, B.; Bertino, M.F.; Rehman, K.; Shah, M.R. Investigation of Wound Healing Potential of Photo-Active Curcumin-ZnO-Nanoconjugates in Excisional Wound Model. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2022, 102956.
 114. Mobaraki, M.; Bizari, D.; Soltani, M.; Khshmhohabat, H.; Raahemifar, K.; Amirdehi, M.A. The Effects of Curcumin Nanoparticles Incorporated into Collagen-Alginate Scaffold on Wound Healing of Skin Tissue in Trauma Patients. *Polymer* 2021, 13, 4291
 115. Sharma, A.; Panwar, V.; Salaria, N.; Ghosh, D. Protease-Responsive Hydrogel, Cross-Linked with Bioactive Curcumin-Derived Carbon Dots, Encourage Faster Wound Closure. *Biomater. Adv.* 2022, 139, 212978
 116. Williams M. Wound infections: an overview. *Br J Community Nurs.* 2021 Jun 1;26(Sup6):S22-S25. doi: 10.12968/bjcn.2021.26.Sup6.S22. PMID: 34106009.
 117. Cardona, A.F.; Wilson, S.E. Skin and soft-tissue infections: A critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 61, S69–S78.
 118. Spervovasilis, N.; Psychogiou, M.; Poulakou, G. Skin manifestations of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2021 Apr 1;34(2):72-79.
 119. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, Liang H, Song X, Wu M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jun 25;7(1):199.
 120. Prasad ASB, Shruptha P, Prabhu V, Srujan C, Nayak UY, Anuradha CKR, Ramachandra L, Keerthana P, Joshi MB, Murali TS, Satyamoorthy K. *Pseudomonas aeruginosa* virulence proteins pseudolysin and protease IV impede cutaneous wound healing. *Lab Invest.* 2020 Dec;100(12):1532-1550.

121. Gryson L, Meaume S, Feldkaemper I, Favalli F. Anti-biofilm Activity of Povidone-Iodine and Polyhexamethylene Biguanide: Evidence from In Vitro Tests. *Curr Microbiol.* 2023 Apr 1;80(5):161.
122. Rippon M, Rogers AA, Westgate S, Ousey K. Effectiveness of a polyhexamethylene biguanide-containing wound cleansing solution using experimental biofilm models. *J Wound Care.* 2023 Jun 2;32(6):359-367.
123. BABALSKA, Z. Ł.; KORBECKA-PACZKOWSKA, M.; KARPIŃSKI, T. M. Wound Antiseptics and European Guidelines for Antiseptic Application in Wound Treatment. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 12, p. 1253, 2021.
124. Sans-Serramitjana, E., Jorba, M., Fusté, E., Pedraz, J. L., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2017). Free and Nanoencapsulated Tobramycin: Effects on Planktonic and Biofilm Forms of *Pseudomonas*. *Microorganisms*, 5(3), 35.
125. Sans-Serramitjana, E.; Fusté, E.; Martínez-Garriga, B.; Merlos, A.; Pastor, M.; Pedraz, J.L.; Esquisabel, A.; Bachiller, D.; Vinuesa, T.; Viñas, M. Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 2016, 15, 611–618
126. Salomoni R, Léo P, Montemor AF, Rinaldi BG, Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnol Sci Appl.* 2017 Jun 29;10:115-121. doi: 10.2147/NSA.S133415. PMID: 28721025; PMCID: PMC5499936.
127. Farahani, M.; Shafiee, A. Wound Healing: From Passive to Smart Dressings. *Advanced Healthcare Materials*, v. 10, n. 16, 2021.
128. Huang, J. N. et al. Combination therapy of hydrogel and stem cells for diabetic wound healing. *World J Diabetes*, v. 13(11), p. 949-961, 2022.
129. LIU, Y. et al. Research progress on antimicrobial hydrogel dressing for wound repair. *European Polymer Journal*, v. 197, 2023.
130. J. Roda Zitha Vilanculos, B. Silva de Farias, J. Inês Engelmann, E. Silveira Ribeiro, P. Diaz de Oliveira, T. Roberto Sant'Anna Cadaval, L. Antonio de Almeida Pinto. Physicochemical evaluation of chitosan-xanthan gum nanoemulsions as polyunsaturated enriched lipid-carrier. *J Mol Liq*, v. 386, 122533, 2023.
131. F. Ávila-Salas, A. Marican, S. Pinochet, G. Carreño, O. Valdés, B. Venegas, W. Donoso, G. Cabrera-Barjas, S. Vijayakumar, E. F. Durán-Lara. Film Dressings Based on Hydrogels: Simultaneous and Sustained-Release of Bioactive Compounds with Wound Healing Properties. *Pharmaceutics*, v. 11, p. 447, 2019.
132. Y. Zhang, X. Dou, L. Zhang, H. Wang, T. Zhang, R. Bai, Q. Sun, X. Wang, T. Yu, D. Wu, B. Han, X. Deng. Facile Fabrication of a Biocompatible Composite Gel with Sustained Release of Aspirin for Bone Regeneration. *Bioact Mater*, v. 11, p. 130-139, 2022.
133. C. Norioka, Y. Inamoto, C. Hajime, A. Kawamura, T. Miyata. A universal method to easily design tough and stretchable hydrogels. *NPG Asia Mater*, v. 13, n. 34, 2021.
134. Y. Kamiyama, R. Tamate, T. Hiroi, S. Samitsu, K. Fujii, T. Ueki. Highly stretchable and self-healable polymer gels from physical entanglements of ultrahigh-molecular weight polymers. *Sci Adv*, v. 8, 2022.
135. J. Su, J. Li, J. Liang, K. Zhang, J. Li, Hydrogel preparation methods and biomaterials for wound dressing. *Life*, v. 11, 2021.
136. Argenta DF, Bidone J, Koester LS, Bassani VL, Simões CMO, Teixeira HF. Topical Delivery of Coumestrol from Lipid Nanoemulsions Thickened with

- Hydroxyethylcellulose for Antiherpes Treatment. *AAPS PharmSciTech*. 2018 Jan;19(1):192-200.
137. Chin YC, Tan JYP, Choudhury H, Pandey M, Sisinthy SP, Gorain B. Development and optimization of chitosan coated nanoemulgel of telmisartan for intranasal delivery: A comparative study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021 Jan; 6: 102341
 138. Carvalho FC, Bruschi ML, Evangelista RC, Gremiao MPD. Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 46 (1).
 139. Luepke, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem. Toxicol*. 1985, 23, 287–291
 140. Pereira, R.L.; Leites, F.I.; Paese, K.; Sponchiado, R.M.; Michalowski, C.B.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E.S. Hydrogel containing adapalene- and dapsone-loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: Development, characterization, in vitro irritation and permeation studies. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 2016, 42, 2001–2008.
 141. Weimer P, Kreutz T, Limberger RP, Rossi RC, de Lima ÁAN, Veiga VF Jr., de Araújo BV, Koester LS. Correlation between the Skin Permeation Profile of the Synthetic Sesquiterpene Compounds, Beta-Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, and the Antiedematogenic Activity by Topical Application of Nanoemulgels. *Biomolecules*. 2022; 12(8):1102.



ATA DA SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA

A banca examinadora, designada pela Portaria nº 441/2024 de vinte e seis de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, em sessão presidida e registrada pela orientadora Profa. Dra. Cristiana Lima Dora, reuniu-se no dia quatro de março de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, por meio de videoconferência (<https://meet.google.com/wvs-kttd-iaz>), para avaliar a Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada: "Desenvolvimento de hidrogéis contendo Nanoemulsão de Curcumina e Polihexametileno Biguanida: avaliação farmacológica in vitro." do mestrando José Ricardo Tomé Lopes Martins. Para o início dos trabalhos, a Senhora Presidente procedeu à abertura oficial da sessão, com a apresentação dos membros da banca examinadora. A seguir, prestou esclarecimentos sobre a dinâmica de funcionamento da sessão, concedendo o tempo de até 30 (trinta) minutos para a apresentação da dissertação pelo mestrando, que iniciou às 14:05 horas e terminou às 14 horas e 35 minutos. Após a apresentação, passou a palavra aos membros da banca examinadora, para que procedessem à arguição e apresentassem suas críticas e sugestões. Ao término dessa etapa de avaliação, de acordo com os membros da banca examinadora, a dissertação de mestrado avaliada foi APROVADO.

Rio Grande, 04 de março de 2024.

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora (Orientadora – FURG)

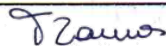
Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira (Externo – UFRGS)

Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos Soares (Titular – FURG)

Profa. Dra. Mariana Appel Hort (Suplente - FURG)











Documento assinado digitalmente
JOSE RICARDO TOME LOPES MARTINS
Data: 05/03/2024 22:58:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CIENTE: _____

Mestrando José Ricardo Tomé Lopes Martins