

CAROLINA DA ROCHA VENTURA

**OTIMIZAÇÃO DE UM NANOSSISTEMA PARA A
VEICULAÇÃO TRANSCUTÂNEA DO ÁCIDO
GÁLICO**

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Catarina Pereira Leite

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

CAROLINA DA ROCHA VENTURA

**OTIMIZAÇÃO DE UM NANOSSISTEMA PARA A
VEICULAÇÃO TRANSCUTÂNEA DO ÁCIDO
GÁLICO**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre no Curso de Mestrado Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, no dia 9 de Abril de 2021, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 71/2021 de 18 de Março de 2021, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof^ª Doutora Catarina Fialho Rosado

Orientadora: Prof^ª Doutora Maria Catarina Pereira Leite

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

*“O conhecimento faz-nos responsáveis”
(Che Guevara)*

Agradecimentos

Chegar ao fim desta etapa só foi possível com o apoio e dedicação da minha Orientadora, Professora Catarina Leite, agradeço por ter sido incansável na realização deste trabalho e por toda a disponibilidade e prontidão de resposta.

Quero agradecer também ECTS e CBIOS por disponibilizar as condições necessárias para a realização deste estudo científico.

Um grande obrigado também aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós que foram o meu grande apoio nestes últimos anos, por terem acreditado em mim e por terem dado a motivação necessária para conseguir terminar este curso.

Por fim, agradeço aos meus verdadeiros amigos, que tornaram estes últimos anos da faculdade mais divertidos e por todas as sessões de estudo que me deram ânimo e força para conseguir ultrapassar mais um obstáculo.

Resumo

O ácido gálico é um composto fenólico que possui diversos tipos de bioatividade, incluindo propriedades cicatrizantes, o que levou a um grande interesse no estudo da veiculação deste fitoquímico para contornar a sua baixa biodisponibilidade e elevada reatividade química, para ser utilizado eficazmente no tratamento de feridas crônicas.

Concomitantemente, os transferossomas são nanossistemas com grande potencial para administração transcutânea, pois têm a capacidade de penetrar até camadas mais profundas da pele e são excelentes transportadores de bioativos.

Assim, este estudo teve como intuito a otimização de uma formulação transferossomal contendo ácido gálico para aplicação tópica e transdérmica através de um desenho experimental do tipo Box-Behnken.

Esta estratégia de otimização foi implementada com sucesso, tendo-se obtido uma formulação com as características desejáveis previamente estabelecidas. Nomeadamente, a formulação otimizada apresentou cerca de 107 nm de diâmetro hidrodinâmico, uma distribuição de tamanhos uniforme (índice de polidispersão de 0,2) e uma elevada capacidade de carga (0,73). Estes resultados corroboram a mais-valia da utilização de um desenho experimental para a otimização de nanossistemas.

Resumidamente, este estudo abre portas à possibilidade de veicular o ácido gálico por via transcutânea de forma a que se possa eventualmente beneficiar das inúmeras propriedades deste fitoquímico para o tratamento de feridas crônicas.

Palavras-chave: Ácido gálico, nanotecnologia, desenho experimental Box-Behnken, cicatrização de feridas crônicas.

Abstract

Gallic acid is a phenolic compound that possesses diverse bioactivities including wound healing properties, which lead to great investigative interest, particularly on the study of the delivery of this phytochemical to circumvent its low bioavailability and high chemical reactivity, to be effectively used in the treatment of chronic wounds.

Concomitantly, transferosomes are nanosystems with great potential for transcutaneous administration, as they have the ability to penetrate deeper layers of the skin and are excellent bioactive transporters. Thus, this study aimed to optimize a transfersomal formulation containing gallic acid for topical and transdermal administrations through a Box-Behnken experimental design.

This optimization strategy was successfully implemented considering the previously established desirable characteristics. Namely, the optimized formulation had about 107 nm of hydrodynamic diameter, a uniform size distribution (polydispersity index of 0.2) and a high loading capacity (0.73). These results corroborate the added value of using a Box-Behnken factorial design for nanosystems optimization.

In summary, this study is a door-opener for the possibility of administering gallic acid via the transcutaneous route so that one may eventually benefit from the innumerable properties of this phytochemical for the treatment of chronic wounds.

Keywords: Gallic acid, nanotechnology, Box-Behnken experimental design, chronic wounds healing.

Abreviaturas, siglas e símbolos

% (m/m)	Porcentagem massa-massa
% (m/V)	Porcentagem massa-volume
CC	Capacidade de carga
D _h	Diâmetro hidrodinâmico
EA	Eficiência de associação
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FAK	Quinase de adesão focal
PBS	Tampão fosfato-salino
PdI	Índice de polidispersão
R ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
X ₁	Concentração lipídica
X ₂	Razão Tween:lipido
X ₃	Tempo de sonicação
Y ₁	Diâmetro hidrodinâmico
Y ₂	Índice de polidispersão
Y ₃	Capacidade de carga

Índice Geral

RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	V
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A PELE	2
<i>Epiderme</i>	3
<i>Derme</i>	5
<i>Hipoderme</i>	5
1.2 ADMINISTRAÇÃO TRANSCUTÂNEA.....	5
1.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	6
<i>Tipos de feridas</i>	7
<i>Processo biológico da cicatrização de feridas</i>	8
<i>Abordagens terapêuticas para a cicatrização de feridas</i>	10
1.4 ÁCIDO GÁLICO.....	11
1.5 ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	12
<i>Tipos de nanopartículas</i>	14
<i>Nanopartículas lipídicas</i>	15
<i>Nanopartículas poliméricas</i>	18
<i>Nanopartículas metálicas</i>	18
1.6 ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS PARA VEICULAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO	21
1.7 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	22

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1 MATERIAIS	25
2.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO	25
2.3 PRODUÇÃO DOS TRANSFEROSSOMAS	26
2.4 CARATERIZAÇÃO DOS TRANSFEROSSOMAS	26
<i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão</i>	<i>26</i>
<i>Eficiência de associação e capacidade de carga.....</i>	<i>26</i>
2.5 OTIMIZAÇÃO DOS TRANSFEROSSOMAS.....	27
 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 28
3.1 ESTUDOS PRELIMINARES.....	29
<i>Curva de calibração do ácido gálico.....</i>	<i>29</i>
<i>Cromatografia de exclusão por tamanho</i>	<i>30</i>
<i>Influência do tempo de sonicação.....</i>	<i>31</i>
3.2 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO TRANSFEROSSOMAL	32
 4. CONCLUSÃO	 37
 5. BIBLIOGRAFIA.....	 39

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Função dos tipos de células presentes na epiderme (adaptado de Losquadro, 2017).	3
Tabela 2 - Nanossistemas em desenvolvimento para veiculação do ácido gálico.....	21
Tabela 3 - Fatores e respostas consideradas no desenho experimental do tipo Box-Behnken e respetivos níveis testados ou critérios desejáveis definidos.	27
Tabela 4 - Formulações produzidas e caracterizadas no desenho experimental do tipo Box- Behnken. Especificação dos fatores em estudo e das respostas obtidas em cada formulação.	33
Tabela 5 - Resultados da caracterização da formulação otimizada, produzida considerando como fatores 1% (m/V) como concentração de lípido, 15:85 (m/m) como razão Tween:lípido e 10 min como tempo de sonicação, e comparação com os dados teóricos previstos.....	36

Índice de Figuras

Figura 1 - Camadas da pele e os respetivos constituintes (Silvério et al., 2009).	2
Figura 2 - Representação do processo de cicatrização de feridas (Hamdan et al., 2017a).....	9
Figura 3 - Estrutura química do ácido gálico (Choubey et al., 2018).	11
Figura 4 - Representação de um transferossoma com fármaco encapsulado (Fernández-García et al., 2020).	16
Figura 5 - Curva de calibração do ácido gálico e respetiva equação da reta.....	29
Figura 6 - Cromatograma típico dos transferossomas encapsulados com ácido gálico.	31
Figura 7 - Variação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do índice de polidispersão (PdI) de transferossomas na presença e ausência de ácido gálico em função do tempo de sonicação...	32
Figura 8 - Gráficos tridimensionais de superfície de resposta que demonstram o efeito dos fatores concentração de lípido (X_1) e tempo de sonicação (X_3) nas respostas obtidas, nomeadamente D_h (Y_1), o PdI (Y_2) e CC (Y_3).	35

1. Introdução

1. Introdução

1.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa cerca de 15% do peso corporal. A pele é composta por 3 camadas principais, nomeadamente a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1).

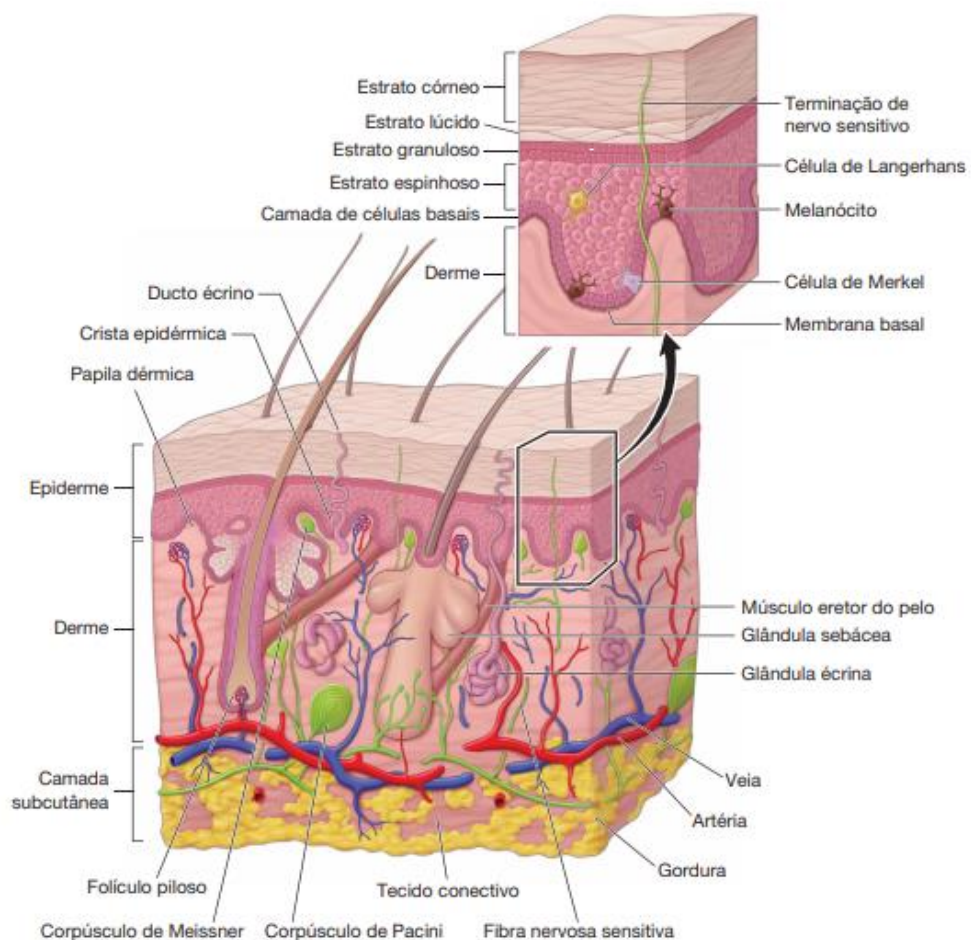


Figura 1 - Camadas da pele e os respetivos constituintes (Silvério et al., 2009).

Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial da pele e não apresenta vascularização. Esta é formada por 4 ou 5 camadas de epitélio estratificado e tem como principal função a proteção do organismo, impedindo a entrada de microrganismos e outros agentes agressores externos. Esta camada tem uma espessura muito fina, que pode variar entre 0,007 e 0,12 mm. Esta é a única camada da pele que possui células anucleadas. A epiderme é composta por cinco tipos de células (Tabela 1) e por 5 camadas, nomeadamente o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo.

Tabela 1 - Função dos tipos de células presentes na epiderme (Losquadro, 2017).

Tipo de célula	Função
Queratinócitos	Produção de queratina, a proteína responsável pela resistência e impermeabilidade da pele.
Corneócitos	Proteção e impermeabilização da pele
Melanócitos	Produção de melanina, o pigmento que determina a cor da pele e a protege contra os raios ultravioleta.
Células de Langerhans	Células apresentadoras de antígenos com um papel importante na proteção contra os patógenos.
Células de Merkel	Em conjunto com terminações nervosas periféricas, formam os discos táteis, que são estruturas especializadas envolvidas nas sensações finas.

a) Estrato Basal

O estrato basal é a camada mais profunda na epiderme, que consiste numa camada única de células cúbicas ou cilíndricas que estão em contacto com a derme. Este estrato é essencialmente composto pelas células basais, que são precursoras dos queratinócitos. A intensa atividade de mitose das células basais é responsável pela contínua regeneração cutânea na epiderme, já que estas dão origem aos queratinócitos que vão migrando superficialmente e maturando nas camadas superiores (Losquadro, 2017).

b) Estrato Espinhoso

O estrato espinhoso está localizado acima da camada basal. Os queratinócitos que migraram do estrato basal para esta camada formam adesões intercelulares, designadas desmossomas, que são responsáveis pelo aspeto espinhoso desta camada e pela resistência ao atrito da pele (Losquadro, 2017).

c) Estrato Granuloso

O estrato granuloso é composto por queratinócitos que apresentam grânulos contendo querato-hialina (substância precursora da queratina) e têm também grânulos lamelares, cuja composição lipídica é essencial para a formação da barreira cutânea. Durante a migração dos queratinócitos para as camadas mais superficiais, estas células vão perdendo gradualmente os seus organelos e vão-se tornando cada vez mais compactas (Losquadro, 2017).

d) Estrato Lúcido

O estrato lúcido é a camada que está presente nas partes de pele mais grossa, como as palmas das mãos, as plantas dos pés e os lábios. Esta camada apresenta células finas e transparentes cujos núcleos e organelos foram digeridos por lisossomas.

e) Estrato córneo

O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme que contém camadas de células achatadas e sem núcleo que se encontram mortas e queratinizadas. Os queratinócitos provenientes do estrato granuloso estão nesta camada completamente queratinizados, tendo a designação de corneócitos, e aderem uns aos outros via desmossomas, sendo revestidos pelos lípidos segregados pelos grânulos lamelares. A estrutura do estrato córneo é responsável por duas das mais importantes características da pele – as suas funções de barreira protetora e de controlo da hidratação da pele. As células que se encontram mais à superfície da pele não se ligam entre si, o que vai facilitar a sua remoção na pele, para que novas células proveniente do estrato basal as venham substituir posteriormente (Losquadro, 2017).

Derme

A derme é a camada que está situada abaixo da epiderme. Tem uma espessura que pode variar entre 1-4 mm. Esta camada vascularizada é formada principalmente por tecido conjuntivo, contendo colagénio e fibras elásticas, os quais vão fornecer resistência e elasticidade à pele. Esta camada é também composta por vasos sanguíneos, terminações nervosas e glândulas sudoríparas.

A derme possui terminações nervosas, que explicam o facto de termos sensibilidade à temperatura, pressão, prurido e dor na pele. Estas terminações nervosas localizam-se em maior quantidade nas pontas dos dedos, na face e nas orelhas, e são também responsáveis pela regulação da temperatura do corpo (Losquadro, 2017).

Hipoderme

A hipoderme é a camada mais interna da pele, e é formada essencialmente por células adiposas que têm a função de isolamento térmico e de reserva de gorduras. A quantidade de tecido adiposo pode variar consoante a área do corpo, idade e sexo. Este tecido subcutâneo faz a ponte entre a derme e os tecidos musculares e ósseos presentes nas camadas mais internas (Soraia Assad Nasbine Rabeh Márcia Beatriz Berzoti Gonçalves, 2003).

1.2 Administração transcutânea

A administração transcutânea engloba o transporte de compostos bioativos através das camadas da pele com possibilidade de exercer o seu efeito terapêutico a nível local ou a nível sistémico. Assim, este tipo de administração engloba tanto a via de administração tópica, como a via de administração transdérmica (Sá, 2014)

A via de administração transdérmica tem sido mais utilizada ao longo dos últimos anos como alternativa a outras vias no alívio da dor, contraceção e reposição hormonal ou mesmo no tratamento de demências, como por exemplo a doença de Alzheimer (Prausnitz & Langer, 2008). Esta via tão popular nos dias de hoje é definida como um meio de administração

cutâneo, por exemplo através de um adesivo impregnado com a substância ativa, que possibilita a difusão do fármaco até a corrente sanguínea de forma controlada e prolongada. Assim, esta via de administração pode ser benéfica, já que evita a toma oral diária de medicamentos, permitindo, por outro lado, manter uma concentração sistémica constante da dose medicamentosa e assim prolongar os efeitos terapêuticos (Münch, Wohlrab, & Neubert, 2017)(Brás, 2016).

Apesar de ser uma prática mais conveniente, as características físico-químicas do fármaco podem ser dificultar grandemente a sua permeação, em particular devido à barreira altamente especializada do estrato córneo. Para uma substância conseguir penetrar na pele, esta deve ser altamente lipofílica e apresentar um peso molecular baixo, no máximo até 1 kDa (Prausnitz & Langer, 2008)(Münch et al., 2017).

A utilização desta via cutânea apresenta tanto vantagens como desvantagens, entre as quais se destacam:

Vantagens (Brás, 2016; Münch et al., 2017; Prausnitz & Langer, 2008)

- Evita o efeito de primeira passagem, aumentando assim a biodisponibilidade;
- É indolor;
- Não invasiva;
- Não existe contacto com o sistema gastrointestinal;
- É facilmente autoadministrável;
- Proporciona maior adesão à terapêutica.

Desvantagens (Brás, 2016; Münch et al., 2017; Prausnitz & Langer, 2008)

- Possível irritação cutânea;
- Não é hipoalergénico;
- Dificuldade na administração de substâncias hidrofílicas;
- Baixa permeabilidade de macromoléculas.

1.3 Cicatrização de feridas

Tipos de feridas

As feridas podem ser classificadas como agudas ou como crónicas. Uma ferida aguda é designada como uma lesão recente e à superfície da pele (epiderme ou derme). Este tipo de lesão pode acontecer em qualquer parte do corpo e pode ser desde um arranhão superficial até um ferimento que afete os vasos sanguíneos, nervos ou músculos. A cicatrização deste tipo de ferimentos ocorre num período curto e sem complicações. Estas feridas são causadas normalmente por fatores externos, como traumas biológicos, químicos ou físicos (Leal & Carvalho, 2014).

As feridas agudas podem ser classificadas como feridas cirúrgicas e feridas traumáticas. As feridas cirúrgicas são de uma forma geral incisões realizadas intencionalmente por profissionais de saúde e o seu corte é feito com precisão e não há contaminação, pois as incisões são realizadas em condições assépticas. Utilizam-se pontos ou emplastros para ocultar e proteger a ferida, mas também pode ser vantajoso deixar a ferida sem qualquer tipo de penso para se obter uma cicatrização mais rápida.

Relativamente às feridas traumáticas, estas são classificadas consoante a sua etiologia. O agente causador pode ser uma abrasão, laceração, perfusão ou incisão. Os sintomas de uma ferida aguda são dor, inchaço, sangramento local. Caso a ferida infete, esta normalmente apresenta pus ou drenagem purulenta. No caso de as feridas agudas não serem tratadas podem eventualmente evoluir para feridas crónicas (Leal & Carvalho, 2014).

As feridas crónicas são lesões que demoram mais tempo a cicatrizar comparativamente com as feridas agudas, já que afetam normalmente camadas mais profundas da pele e o tecido demora mais tempo a ser restabelecido. Noutras palavras, na fase de cicatrização, as feridas crónicas têm tendência a estagnar na fase inflamatória devido a diversos fatores, como:

- **Mediadores inflamatórios:** O aumento dos níveis de mediadores inflamatórios pode desequilibrar os níveis dos fatores de crescimento e danificar a matriz extracelular, prejudicando a cicatrização.
- **Infeção na ferida:** A presença de infeção resulta na redução dos níveis de fatores de crescimento devido à libertação de enzimas e metaloproteinases da matriz (MMPs)

bacterianas. Para além disso, estas enzimas também degradam a fibrina que é necessária para a cicatrização de feridas.

- **Biofilmes:** Estrutura microbiana capaz de aderir a superfícies, com a finalidade de proteger as bactérias que a constituem. O biofilme vai desempenhar um papel importante na produção e manutenção do ambiente da ferida crónica, dificultando o combate à infeção.
- **Hipoxia:** Refere-se ao baixo nível de oxigénio nos tecidos cutâneos que favorece a proliferação de bactérias e desfavorece a proliferação de fibroblastos e a produção de colagénio.
- **Má nutrição:** Uma dieta escassa em proteínas desfavorece a formação de fibroblastos, o que resulta na permanência da cicatrização da ferida na fase inflamatória, que leva a um processo lento na cicatrização (Leal & Carvalho, 2014).

Outra razão que pode levar à transformação de uma ferida aguda numa ferida crónica é a falta de cuidado adequado, que será propício à entrada de microrganismos, desfavorecendo o processo de cicatrização.

Normalmente as feridas crónicas estão associadas a patologias subjacentes como a diabetes, a obesidade ou a insuficiência venosa. Alguns exemplos deste tipo de feridas são as úlceras de pressão, as úlceras de pé diabético e as úlceras venosas. De forma a garantir uma cicatrização com sucesso nos vários tipos de úlceras é necessário um correto diagnóstico e o tratamento adequado da patologia associada, de maneira a restabelecer as condições normais de cicatrização (Leal & Carvalho, 2014).

Processo biológico da cicatrização de feridas

As feridas representam um risco para a saúde humana e, por esse motivo, o processo de cicatrização começa imediatamente para uma rápida recuperação da lesão, apesar de ser um processo biológico complexo.

Existem vários fatores que podem interferir no processo de cicatrização de feridas. Estas interferências levam a interrupções, a alterações ou ao prolongamento do processo que pode levar a um maior tempo de cicatrização da ferida ou pode resultar na formação de uma ferida crónica. Os fatores responsáveis pela má cicatrização de feridas geralmente são a

oxigenação, infecção na ferida, idade avançada e condições patológicas do indivíduo, como a diabetes, obesidade ou ainda a existência de um desequilíbrio no estado nutricional.

A cicatrização envolve 4 fases designadas hemóstase, inflamação, proliferação e reparação (Figura 2). A hemóstase é iniciada com a formação da lesão que afeta os vasos sanguíneos, causando a vasoconstrição dos mesmos que é mediada pelas catecolaminas e pelas prostaglandinas. A corrente sanguínea é interrompida pelas plaquetas e pela formação de coágulos de fibrina que libertam citocinas pro-inflamatórias e fatores de crescimento que vão migrar para o local onde está a ferida, com o objetivo de eliminar corpos estranhos, bactérias e controlar a hemorragia. A fase inflamatória tem início quando os neutrófilos, macrófagos e linfócitos migram para a zona onde se encontra a ferida. Os neutrófilos são responsáveis pela eliminação de microrganismos que afetam a ferida. Os macrófagos têm a função de induzir e remover as células em apoptose (incluindo os neutrófilos). Posteriormente os macrófagos vão estimular a produção de queratinócitos e fibroblastos e a angiogénese, promovendo a regeneração do tecido.

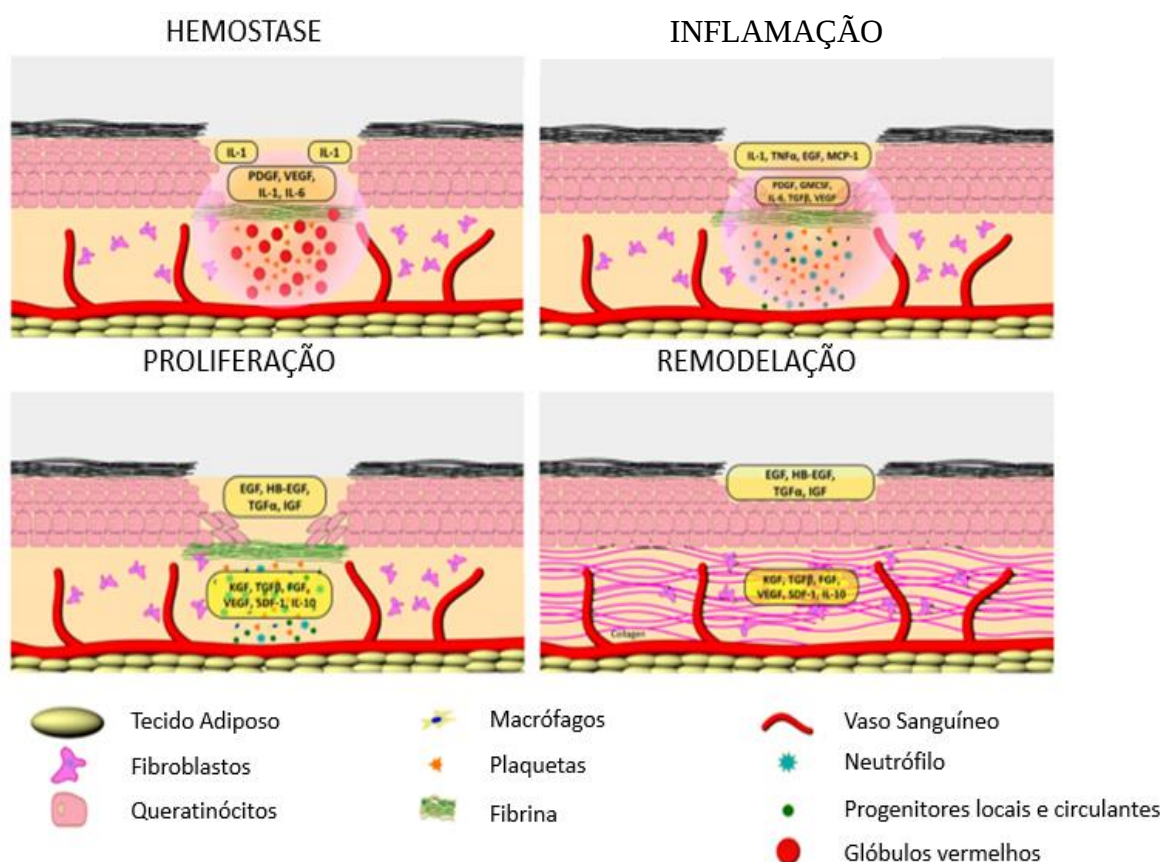


Figura 2 - Representação do processo de cicatrização de feridas (Hamdan et al., 2017a).

A terceira fase do processo de cicatrização é a fase da proliferação, que é iniciada pela migração dos epitélios para a matriz provisória dentro da ferida, este processo é designado de reepitelização. Nesta fase de cicatrização os fibroblastos, os queratinócitos e as células endoteliais vão ser o suporte para a proliferação dos capilares, através da formação de colagénio e pela formação do tecido de granulação, onde está localizada a ferida. A síntese dos componentes da matriz extracelular é realizada na ferida, através dos fibroblastos, sendo que é o último processo na fase de proliferação. Por último, a fase de remodelação é caracterizada pela reorganização dos componentes da matriz extracelular com o intuito de restabelecer a formação do tecido normal. O mesmo processo não acontece no caso das feridas crónicas, pois estas estagnam na fase inflamatória, sendo acompanhadas por um exsudado substancial, infeções graves, dor e necrose tecidual (Koehler, Brandl, & Goepferich, 2018; Leal & Carvalho, 2014; Ramasastry, 2005)

Abordagens terapêuticas para a cicatrização de feridas

Diversos estudos revelam que as feridas agudas revestidas com pensos oclusivos que retêm a humidade cicatrizam duas vezes mais rapidamente do que feridas semelhantes expostas ao ar livre. Adicionalmente, as feridas que estiveram expostas a ambientes extremamente secos apresentam uma elevada morte tecidual (Rheinecker, 1995; Tan, Winarto, Dosan, & Aisyah, 2019). O facto de um ambiente húmido acelerar o processo de cicatrização levou ao fabrico de pensos oclusivos à base de polímeros, com o objetivo de preservar a ferida num ambiente húmido e simultaneamente acelerar a reepitelização, estimular a síntese de colagénio e criar um ambiente com baixa concentração de oxigénio no leito da ferida, o que leva à promoção da angiogénese.

Além disso, foi demonstrado também que os tratamentos oclusivos resultam numa diminuição das taxas de infeção em comparação aos tratamentos não oclusivos. Isto deve-se à capacidade dos tratamentos oclusivos de manter uma barreira mais eficaz contra a contaminação externa. Contudo, é importante não proporcionar um ambiente excessivamente húmido na ferida, pois o excesso de humidade na ferida pode levar à inibição da proliferação

de fibroblastos e o fluido da ferida crónica contém proteases que destroem o material da matriz extracelular e os fatores de crescimento (Rheinecker, 1995; Tan et al., 2019)

O tratamento ideal para a cicatrização de feridas baseia-se então nos seguintes critérios (Sood, Granick, & Tomaselli, 2014):

- Capacidade de remoção de exsudado;
- Proporcionar um ambiente húmido;
- Proteger contra a entrada de microrganismos;
- Não causar trauma na remoção do penso;
- Evitar deixar resíduos na ferida;
- Aliviar a dor;
- Ser hipoalergénico.

1.4 Ácido gálico

O ácido gálico (Figura 3) é um ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, que é um composto fenólico encontrado na maioria das plantas, nomeadamente em sementes de uva, nas rosas, na casca do carvalho, nas nozes, no sumagre, no lúpulo e em folhas de chá. Este ácido possui diversos benefícios para a saúde. Para além de ter propriedades antioxidantes, este composto tem propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, neuroprotetoras, anticancerígenas e antidiabéticas (Yang et al., 2016). Estudos mostraram que o ácido gálico possui também efeitos na migração celular em condições normais e diabéticas, ou seja, o ácido gálico poderá ter um elevado potencial cicatrizante para feridas crónicas na diabetes (Yang et al., 2016).

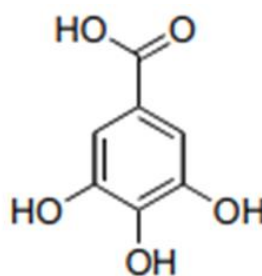


Figura 3 - Estrutura química do ácido gálico (Choubey et al., 2018).

A obtenção do ácido gálico pode ser realizada de diversas formas, através de hidrólise ácida ou enzimática dos taninos, que são polifenóis de origem vegetal. Este ácido pode também ser originado através da fermentação microbiana, a partir da quebra da ligação do éster com a auxílio da enzima tanase. Ou pode ser sintetizado também pela via do ácido chiquímico, envolvendo reações de oxidação e enolização (Choubey et al., 2018).

O ácido gálico possui várias propriedades com potencial para aplicação cutânea em condições como a dermatite atópica e a hiperpigmentação, como agente antienvelhecimento, e ainda como cicatrizante. Estudos revelaram que o ácido gálico protege os queratinócitos e fibroblastos do stress oxidativo (Khan et al., 2019; Yang et al., 2016). No entanto, se for utilizado numa quantidade elevada pode causar citotoxicidade. Como já foi referido anteriormente, o ácido gálico é um antioxidante, o que leva à redução dos níveis de radicais livres, evitando assim um maior risco de lesões nos tecidos. O efeito antioxidante é também manifestado por regular positivamente a expressão dos genes antioxidantes, o que também favorece a proteção contra o envelhecimento cutâneo. O uso do ácido gálico na cicatrização de feridas é particularmente vantajoso, já que este ácido potencia a ação de diversas proteínas essenciais à cicatrização de feridas. É o exemplo da proteína JNK, C-Jun N-terminal quinase, que ao ser fosforilada nas células epiteliais que se encontram em torno de uma ferida favorece a cicatrização da lesão. De facto, foi demonstrado que a utilização de ácido gálico despoleta a fosforilação da proteína JNK, favorecendo a cicatrização tecidual. Tal como esta proteína, no mesmo estudo revelou-se que o ácido gálico também ativa as proteínas FAK (quinase de adesão focal) e ERK (quinases reguladas por sinal extracelular), acelerando a migração celular dos fibroblastos e queratinócitos, tanto em doentes não diabéticos como em doentes diabéticos. Como já era conhecido que a proteína FAK em condições de hiperglicemia é inibida o que pode levar à inibição da migração celular, poderá ser então vantajoso aplicar ácido gálico como agente cicatrizante (Yang et al., 2016).

1.5 Abordagens nanotecnológicas para a cicatrização de feridas

O recurso à nanotecnologia é uma das estratégias mais promissoras para a cicatrização de feridas. Estas tecnologias têm um excelente potencial para favorecer o tratamento de feridas

em pacientes com uma capacidade reduzida de cicatrização. Contudo, convém lembrar que existem barreiras significativas ao tratamento das feridas, como a heterogeneidade e a complexidade clínica das feridas crônicas ou graves (Tocco, Zavan, Bassetto, & Vindigni, 2012).

A nanotecnologia diz respeito à produção e à aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas através do controlo da sua forma e tamanho em escala nanométrica (EMEA, 2006). As principais vantagens da nanotecnologia quanto à sua aplicação para a cicatrização de feridas estão enumeradas de seguida:

- Alta capacidade de direcionar compostos bioativos a um alvo específico, com possibilidade de aumento significativo da biodisponibilidade *in vivo* devido à sua baixa solubilidade, meia-vida reduzida e/ou dispersão do local da ferida;
- Boa relação superfície-volume que leva a um aumento da probabilidade de interação do composto veiculado com seu alvo biológico e pode facilitar a penetração dos compostos nas feridas, ideal para administração tópica de compostos bioativos;
- Boa capacidade de transporte, o que possibilita que substâncias anteriores que não tenham sido administradas possam ser encapsuladas e libertadas de forma sustentada;
- Alta capacidade de libertar compostos bioativos de forma controlada, que favorece uma interação contínua do composto com o alvo específico, sem atingir uma rápida saturação, o que também pode limitar a toxicidade do composto já que a quantidade máxima administrada não está em contacto com a pele de uma só vez (Mordorski, Rosen, & Friedman, 2015).

Embora existam inúmeras vantagens quanto à utilização da nanotecnologia para a cicatrização de feridas acompanhadas de resultados promissores, também se podem enumerar algumas desvantagens. Estas são:

- Sucesso limitado na produção de nanossistemas eficazes devido a diversos fatores como: o conhecimento limitado quanto à fisiopatologia na recuperação de feridas e tecidos; variabilidade da população de pacientes e comorbilidades

a nível individual; complexidade da conceção de ensaios clínicos; custos associados e falta de consciência do público em geral.

- Os efeitos biológicos dos nanossistemas devem ser cuidadosamente avaliados antes da sua utilização na prática clínica, uma vez que os estudos sistémicos que comprovem a eficiência das nanopartículas a dirigir o fármaco ao alvo pretendido são escassos, assim como as normas internacionais quanto à toxicidade e biocompatibilidade dos nanossistemas (Hamdan et al., 2017b).

Tipos de nanopartículas

O avanço da nanotecnologia tem vindo a despoletar o desenvolvimento de inúmeros tipos de nanopartículas com potencialidade de aplicação terapêutica, nomeadamente as nanopartículas lipídicas, as nanopartículas poliméricas, as nanopartículas metálicas, entre outras. Para além da sua classificação quanto aos materiais que as constituem, as nanopartículas usadas para a cicatrização de feridas podem também ser agrupadas em duas categorias, a saber, nanomateriais que apresentam propriedades intrínsecas benéficas para o tratamento de feridas e nanossistemas para veiculação de agentes terapêuticos (Hamdan et al., 2017b).

Como nanomateriais que apresentam benefícios para a cicatrização de feridas temos:

- Nanomateriais metálicos e de óxido metálico, como, por exemplo, a prata que apresenta propriedades antimicrobianas, sendo benéfica contra biofilmes bacterianos e bactérias multirresistentes.
- Nanomateriais não metálicos, como os que têm na sua composição o carbono, como, por exemplo, o fulereno, cujas propriedades anti-inflamatória e antioxidante favorecem a cicatrização de feridas crónicas.
- Nanomateriais poliméricos, como o quitosano que apresenta propriedades antibacterianas também vantajosas para a cicatrização de feridas.

No que diz respeito aos nanossistemas para veicular substâncias ativas, temos:

- As nanopartículas para veicular óxido nítrico, que é um poderoso agente antibacteriano, principalmente contra bactérias formadoras de biofilmes. As nanopartículas ideais para veicular este agente terapêutico têm como critérios

apresentar uma capacidade de carga elevada, baixa toxicidade e capacidade de libertação prolongada.

- As nanopartículas para veicular antibióticos e antioxidantes, que devem ser mais eficazes no tratamento da ferida em comparação com o agente antibacteriano ou antioxidante isolado.

É de salientar que é possível conjugar as duas abordagens, utilizando nanomateriais com propriedades benéficas intrínsecas para veicular agentes terapêuticos. Estudos realizados com nanopartículas de ouro para veicular galato de epigallocatequina e ácido α -lipóico revelaram maior rapidez no processo de cicatrização no caso de uma úlcera diabética, através da regulação da inflamação e da angiogénese. Além do mais, o facto de se utilizar nanopartículas de ouro foi benéfico para melhorar a absorção cutânea (Chen et al., 2012). Num outro estudo para veicular a curcumina verificou-se que a sua administração conjunta com nanopartículas de silano permite não só uma entrega local e de libertação prolongada, como também impede a degradação do antioxidante, aumento assim a sua biodisponibilidade, o que leva a uma taxa de maior sucesso e rapidez no que diz respeito à sua função no processo de cicatrização de feridas (Chen et al., 2012). É de salientar que é possível incorporar outro tipo de substâncias nas nanopartículas, como, por exemplo, fatores de crescimento e péptidos antimicrobianos (Hamdan et al., 2017b).

Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas são estruturas coloidais com o tamanho compreendido entre 0,1 e 1000 nm. Este tipo de nanossistemas é bastante procurado devido à sua facilidade de produção e também pelo facto de não possuírem na sua natureza toxicidade em comparação com outros nanossistemas coloidais.

A utilização das nanopartículas lipídicas por via cutânea é vantajosa devido à proteção das substâncias ativas que estão encapsuladas, à sua boa estabilidade física, a um possível aumento da biodisponibilidade do agente terapêutico encapsulado e ao controlo da libertação do fármaco. Outra vantagem prende-se com a eventual capacidade do fármaco encapsulado conseguir alcançar camadas mais profundas da pele, já que o aumento da área de contacto das nanopartículas, aumenta o seu poder de adesão ao estrato córneo. Por último, os lípidos que

constituem estes nanossistemas conferem hidratação à pele, já que formam um filme oclusivo na superfície da pele, o que evita a perda transepidérmica de água e, por outro lado, suplementa o próprio filme lipídico da pele aquando da sua adesão ao estrato córneo (Garcês, Amaral, Sousa Lobo, & Silva, 2018).

De uma forma geral, as nanopartículas constituídas por lípidos podem ser agrupadas em dois grandes grupos: nanopartículas lipídicas e sistemas vesiculares. As nanopartículas lipídicas dividem-se em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), que são compostas apenas por lípidos sólidos e em carregadores lipídicos nanoestruturados (NLC), que são constituídos por lípidos sólidos e líquidos (Garcês et al., 2018).

Dentro dos sistemas vesiculares estão englobados os lipossomas, os niossomas, os etossomas, os transferossomas, entre outros. Estes sistemas são constituídos por uma bicamada lipídica que engloba um vacúolo interno aquoso, permitindo desta forma encapsular tanto moléculas hidrofílicas, quanto hidrofóbicas. Estes sistemas distinguem-se entre si devido à composição da bicamada lipídica, que pode ser constituída apenas por fosfolípidos no caso dos lipossomas, ou por mais do que um constituinte, como é o caso dos niossomas que são constituídos por surfactantes e colesterol (Kapoor et al., 2019).

Os transferossomas (Figura 4) são vesículas esféricas ultra-deformáveis e elásticas compostas por uma bicamada fosfolipídica na qual se intercala um ativador de superfície, nomeadamente surfactantes ou ácidos biliares (Fernández-García et al., 2020).

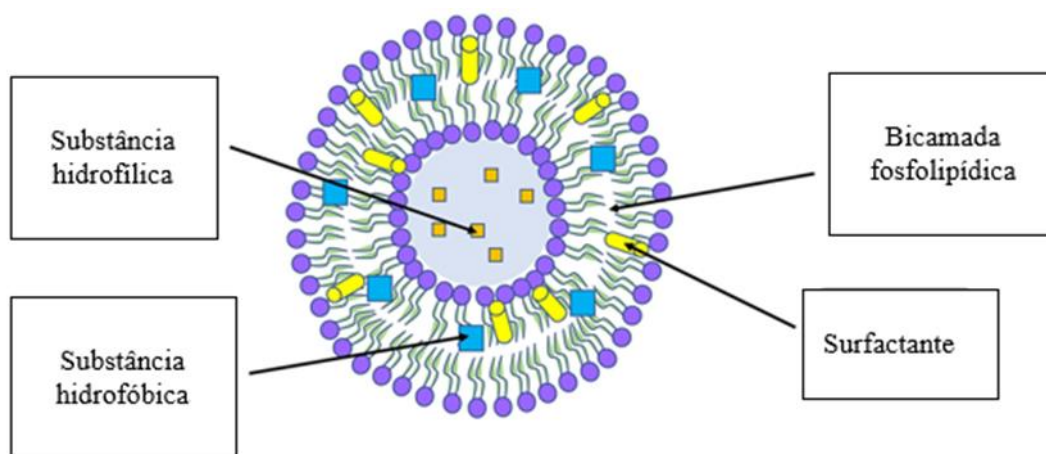


Figura 4 - Representação de um transferossoma com fármaco encapsulado (Fernández-García et al., 2020).

Uma das vantagens da utilização deste tipo especial de vesículas para administração cutânea é a sua biocompatibilidade e biodegradação devido à sua composição ser maioritariamente fosfolipídios naturais e ativadores de superfície. A sua elevada biodisponibilidade também é bastante benéfica para este tipo de administração, pois evita o efeito de primeira passagem (Opatha, Titapiwatanakun, & Chutoprapat, 2020).

Em particular, os transferossomas são os sistemas vesiculares com maior potencialidade de aplicação em sistemas transdérmicos, já que têm a capacidade de passar pelos espaços intercorneocitários do estrato córneo e penetrar até zonas mais profundas da pele de forma intacta em comparação com outros sistemas vesiculares. De forma a potenciar a sua penetração da pele, os transferossomas devem apresentar um tamanho menor que 300 nm, para que o gradiente osmótico transepidérmico possa estimular a sua penetração na pele. Este gradiente osmótico transepidérmico deve-se à diferença na quantidade de água existente da epiderme (75%) e na superfície da pele (15%). Como os transferossomas são nanopartículas com superfície hidrofílica vão deslocar-se para a zona mais hidratada (Fernández-García et al., 2020).

Uma outra característica dos transferossomas que facilita a sua passagem através das diversas camadas da pele é a incorporação de ativadores de superfície. Estes compostos afetam a bicamada fosfolipídica, aumentando a sua capacidade de se deformar, evitando a quebra das vesículas e facilitando a penetração destes sistemas vesiculares nos poros existentes no estrato córneo, muitas das vezes significativamente menores do que o seu próprio tamanho, devido às suas propriedades elásticas (Fernández-García et al., 2020).

Outra das grandes vantagens dos transferossomas é a possibilidade de encapsulação de diversas substâncias ativas, pois estas vesículas conseguem encapsular moléculas hidrofílicas e lipofílicas. As substâncias hidrofílicas são encapsuladas no núcleo aquoso, enquanto as substâncias hidrofóbicas são incorporadas na bicamada lipídica (Figura 4).

Apesar das inúmeras vantagens dos transferossomas, estes também acarretam alguns custos, principalmente no equipamento e matérias-primas necessários à sua produção. Por esta razão, os fosfolípidos mais utilizados para a preparação de transferossomas são a lecitina de soja e a fosfatidilcolina (C18), porque têm um custo relativamente baixo e porque são lípidos abundantes das membranas celulares, o que leva a que sejam bem aceites pela pele, evitando efeitos secundários (Fernández-García et al., 2020). No entanto, os transferossomas têm de ser

armazenados a temperaturas baixas e ao abrigo da luz, por estes serem instáveis a nível químico e terem tendência a oxidar (Opatha et al., 2020).

Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são utilizadas frequentemente como sistemas de libertação modificada de fármacos, visto terem a capacidade de controlar a libertação de substâncias. Este tipo de nanopartículas são estruturas coloidais constituídas por polímeros que podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, cujo tamanho pode variar entre 10-1000 nm.

As nanopartículas poliméricas possuem inúmeras vantagens, destacando-se principalmente a capacidade de libertação controlada da substância ativa e a possível veiculação a um local específico, numa concentração exata. Os polímeros apresentam também baixa toxicidade e são facilmente modificáveis, o que permite ajustar as suas propriedades conforme necessário. O tamanho reduzido destas nanopartículas facilita que possam ultrapassar as diversas barreiras cutâneas e oferece um aumento na biodisponibilidade do fármaco encapsulado, seja este de carácter hidrofóbico, como hidrofílico (Delgado, 2013). No entanto estas nanopartículas não deixam de ter desvantagens como o seu elevado custo de produção e a dificuldade de produção em grande escala (Nutter & Ratts, 1973).

As nanopartículas poliméricas subdividem-se em nanocápsulas e nanoesferas. Estas diferenciam-se quer pela sua composição, quer pela sua estrutura. As nanocápsulas funcionam como sistema reservatório, apresentando um núcleo líquido e uma parede polimérica. Neste tipo de nanopartículas poliméricas, o fármaco pode estar distribuído no núcleo líquido (aquoso ou oleoso) ou pode estar encapsulado no invólucro polimérico. Por outro lado, as nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica, na qual o princípio ativo está dissolvido na matriz ou adsorvido à superfície da partícula (El-Say & El-Sawy, 2017; Nutter & Ratts, 1973).

Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas são utilizadas no campo da nanotecnologia devido aos seus inúmeros benefícios, tais como serem relativamente biocompatíveis, fáceis de produzir e

de modificar quer a sua composição, quer o seu tamanho. Estas nanopartículas são também muito utilizadas por terem variadas particularidades, tais como apresentarem propriedades magnéticas, de adsorção e biocatalíticas (Pereira et al., 2015).

São diversos os metais utilizados para produzir este tipo de nanopartículas, como o alumínio, cobre, ouro, prata, titânio, silício, ferro, selénio, cálcio, entre outros. Vários são os exemplos de aplicações das nanopartículas metálicas. Os aluminossilicatos, compostos por óxidos de alumínio e silício, parecem acelerar o processo de coagulação no caso de uma ferida aberta. Por outro lado, nanobiomagnetos têm na sua composição óxido de ferro com propriedades paramagnéticas, sendo por isso muito promissores como agentes de contraste em ressonâncias magnéticas, ou para a separação de proteínas com potencial de aplicação no diagnóstico de doenças genéticas. Este tipo de nanopartículas metálicas também poderá ser utilizado no campo da oncologia, pois os nanobiomagnetos conseguem direcionar a substância ativa para o local específico onde se encontra o tumor, através da aplicação de um campo magnético (Loomba & Scarabelli, 2013).

Apesar da enorme versatilidade das nanopartículas metálicas, é preciso ter em conta os possíveis efeitos adversos das mesmas, como a sua nanotoxicidade. De facto, estas nanopartículas de acordo com a sua composição podem ser nefastas para a saúde pública e para o meio ambiente (Loomba & Scarabelli, 2013).

No âmbito das nanopartículas metálicas encontram-se os nanomateriais que apresentam propriedades intrínsecas que são benéficas para o tratamento de feridas, nomeadamente as nanopartículas de prata e as de ouro.

a) Nanopartículas de prata

A nanotecnologia tem fornecido os meios para produzir as partículas de prata, visto que a prata tem sido utilizada frequentemente em diferentes campos da biomedicina, especialmente como agente antibacteriano para o tratamento de queimaduras, feridas abertas e diversas feridas crónicas que estão infetadas. Uma das vantagens de utilizar a prata para a cicatrização de feridas são os efeitos antibacterianos contra bactérias multirresistentes e formadores de biofilme. O mecanismo de ação da prata é através da precipitação das proteínas da parede celular e da membrana plasmática, atuando também ao nível do metabolismo das bactérias, levando à inibição da sua replicação (Cláudia Gama Elias, Daniela Monteiro Brandão, Eunice Maria

Rodrigues Roque Proença e Cunha, & Maria do Rosário Nunes Pereira Mesquita, 2012). O papel das nanopartículas de prata na cicatrização de feridas tem sido demonstrado em vários estudos *in vivo* e este papel consiste na promoção da cicatrização de feridas pela redução da inflamação modulada por citocinas e também no aumento da taxa de cicatrização de feridas através da promoção da proliferação e migração de queratinócitos juntamente com uma diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida. Além disso, a administração tópica de nanopartículas de prata apresenta uma melhor atividade antimicrobiana comparada com outras formulações. Isto deve-se à interação com o enxofre e com o fosforo de proteínas presentes na membrana das bactérias. Apesar do uso progressivo das nanopartículas de prata para aplicações terapêuticas, é importante ter conhecimento que o uso de compostos metálicos pode levar a possíveis efeitos colaterais. A utilização de materiais que têm como base a prata como agente cicatrizante têm uma biocompatibilidade aceitável, mas ainda apresentam alguns inconvenientes, como por exemplo o desenvolvimento de argiria (leito da ferida com uma cor azul acinzentada) após o seu uso prolongado (Tocco et al., 2012). Para contornar estes inconvenientes, é possível realizar algumas modificações à nanoformulação, como a alteração da superfície das nanopartículas de prata, o uso de outras formas de prata e também a utilização de nanopartículas de prata em concentrações muito baixas para evitar o risco de toxicidade (Hamdan et al., 2017b).

b) Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro são materiais biologicamente ativos muito promissores como agentes de diagnóstico, na regeneração de tecidos, na administração direcionada de fármacos e na cicatrização de feridas. Ao contrário das nanopartículas de prata, os nanomateriais de ouro não são utilizados em aplicações biomédicas de forma isolada, porque este tipo de material não apresenta qualquer atividade antimicrobiana. Adicionalmente, as nanopartículas de ouro têm de ser incorporadas noutras biomoléculas como os polissacáridos, fatores de crescimento, péptidos e moléculas de adesão celular para serem utilizados efetivamente no campo da biomedicina. Quando as nanopartículas de ouro são combinadas com o colagénio, gelatina, quitosano, antioxidantes ricos em compostos ou fármacos antimicrobianos, apresentam propriedades interessantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade e também um elevado potencial para eliminar microrganismos. Estas nanopartículas de ouro modificadas são utilizadas na cicatrização de feridas. Existem vários

estudos que demonstraram que a aplicação tópica de nanopartículas de ouro no local da ferida melhorou a cicatrização da ferida devido ao aumento da reepitelização e formação do tecido de granulação (Rajendran, Kumar, Houreld, & Abrahamse, 2018).

1.6 Abordagens nanotecnológicas para veiculação do ácido gálico

Tal como referido anteriormente, o ácido gálico apresenta diversas propriedades benéficas com potencial terapêutico. No entanto, a sua aplicação terapêutica é dificultada pela sua baixa solubilidade aquosa, baixa estabilidade físico-química e reduzida biodisponibilidade sistêmica (Khan et al., 2019). Neste sentido, a comunidade científica tem vindo a utilizar abordagens nanotecnológicas para veicular o ácido gálico, com o intuito de aumentar a sua biodisponibilidade. Alguns dos trabalhos reportados até ao momento estão compilados na Tabela 2.

Tabela 2 - Nanossistemas em desenvolvimento para veiculação do ácido gálico.

Nanossistema	Tamanho (nm)	PdI ¹	EE ² (%)	Referência
Lipossomas	95-115	0,15-0,25	60-100	(Zhang, Pu, Tang, Wang, & Sun, 2019)
Nanopartículas poliméricas	225	0,09	26	(De Cristo Soares Alves, Mainardes, & Khalil, 2016)
	120-190	n.d.	n.d.	(Tapia-Hernández et al., 2019)
Nanopartículas metálicas	5-10	n.d.	n.d.	(Shah et al., 2017)
Nanopartículas lipídicas	38-52	0,21-0,29	50-61	(Ali et al., 2020)
Dendrímeros	350	0,71	148	(Alfei, Marengo, Zuccari, Turrini, & Domenicotti, 2020)

¹. PdI: Índice de polidispersão. ². EE: Eficiência de encapsulação. ³. n.d.: não determinado.

É de notar que diversos tipos de nanopartículas têm vindo a ser testados, desde sistemas vesiculares, nanopartículas lipídicas, poliméricas e metálicas, assim como dendrímeros. Estes últimos são macromoléculas poliméricas altamente ramificadas que são obtidas por polimerização controlada, podendo apresentar diversas arquiteturas e funcionalizações à superfície. Tal como os restantes tipos de nanossistemas também se têm demonstrado eficazes para veicular diversos agentes terapêuticos (Mandal, 2020).

Para além da diversidade de tipos de nanopartículas, os sistemas em desenvolvimento apresentam também uma enorme variabilidade de tamanhos e eficiência de encapsulação (Tabela 2), sendo que as microesferas de alginato de cálcio apresentam o diâmetro mais elevado, enquanto as nanopartículas metálicas apresentam o tamanho menor. Por outro lado, a maior eficiência de encapsulação foi obtida nos dendrímeros, enquanto a menor foi obtida nas nanopartículas poliméricas. É de salientar que estes estudos são ainda iniciais, pelo que é importantíssimo determinar a eficácia e a segurança destes nanossistemas *in vivo* de forma a concluir sobre a aplicabilidade dos sistemas em desenvolvimento.

1.7 Motivação e objetivos

Como referido anteriormente, a cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que consiste em 4 fases: hemóstase, inflamação, proliferação e reparação. Para existir uma cicatrização completa da ferida é necessário concluir as 4 etapas referidas anteriormente no momento certo. Contudo, o processo de cicatrização pode ser afetado caso existam interferências numa das suas fases, o que pode levar à formação de uma ferida crónica. Este tipo de feridas resulta de um estado inflamatório patológico devido a um processo de cicatrização prolongado, incompleto ou desorganizado. Apesar dos inúmeros estudos sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na má cicatrização de feridas, a pesquisa de tratamentos que promovem a reparação dos tecidos e facilitam a cicatrização de feridas é ainda necessária particularmente quanto ao tratamento de feridas crónicas.

Hoje em dia, cada vez mais pessoas têm lesões cutâneas que podem levar à formação de uma ferida crónica, nomeadamente úlceras por pressão, úlceras venosas e feridas em diabéticos. Avanços recentes no estudo do mecanismo de cicatrização têm desencadeado o desenvolvimento de novos tratamentos com o recurso à nanotecnologia, como o uso de

materiais com propriedades de absorção de exsudado, de substratos elásticos que são compatíveis com a capacidade e hidratação da pele, entre outros. O uso da nanotecnologia pode permitir ainda ajustar e otimizar certos métodos utilizados nos tratamentos de feridas, ou seja, esses tratamentos podem ser adaptados para cada ferida de cada pessoa em específico, com possibilidade de veiculação de anti-inflamatórios, antibióticos, fatores de crescimento, e outros compostos benéficos. Assim, a nanotecnologia tem-se demonstrado uma estratégia com potencial para o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento de feridas crónicas (Leal & Carvalho, 2014; Zarrintaj et al., 2017).

O ácido gálico é um fitoquímico com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e cicatrizantes, pelo que é um candidato interessante para ser considerado no tratamento da ferida crónica. No entanto, a sua baixa biodisponibilidade sistémica, reduzida solubilidade aquosa e elevada reatividade química dificultam grandemente a sua veiculação (Khan et al., 2019). Neste sentido, a encapsulação do ácido gálico num nanossistema poderá ser vantajoso para aumentar a sua biodisponibilidade sistémica e reduzir a sua degradação.

No caso particular do ácido gálico, a administração transcutânea poderá ser uma alternativa interessante, devido ao sabor desagradável deste composto. Neste contexto, os transferossomas são nanossistemas vesiculares vantajosos, já que através da sua elevada elasticidade conseguem penetrar até às camadas mais profundas da pele, aumentando assim a probabilidade de veiculação dos compostos encapsulados até à circulação sanguínea (Fernández-García et al., 2020).

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo central a otimização de uma formulação transferossomal para veicular o ácido gálico com vista a uma administração tópica e transdérmica para regeneração cutânea. Para tal, recorreu-se a um desenho experimental do tipo Box-Behnken. Esta estratégia de *quality-by-design* é altamente eficiente na redução do número de ensaios, do consumo de reagentes e do tempo associado ao desenvolvimento de novas formulações, já que permite avaliar de forma simultânea o efeito de várias variáveis independentes (e das suas interações) nas variáveis dependentes selecionadas (Ali et al., 2020).

2. Materiais e métodos

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

O ácido gálico monohidratado, o fosfato de potássio monobásico, Tween 80[®] e o cloreto de potássio foram obtidos na Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). A lecitina de soja foi proveniente da VWR International bvba (Leuven, Bélgica). O hidrogenofosfato de sódio di-hidratado e o clorofórmio foram adquiridos na Scharlau Chemie, SA (Sentmenat, Espanha). O cloreto de sódio foi adquirido de José M. Vaz Pereira, SA (Benavente, Portugal), o metanol foi proveniente do Carlo Erba Reagenti SpA (Rodano, Itália) e o Sephadex[™] G-25 médio foi adquirido na GE Healthcare Bio-sciences AB (Uppsala, Suécia).

A solução tampão utilizada (PBS, pH 7,4) foi preparada a partir do fosfato de potássio monobásico (1,8 mM), hidrogenofosfato de sódico di-hidratado (10 mM), cloreto de potássio (2,7 mM) e do cloreto de sódio (137 mM), os quais foram dissolvidos em água destilada. O pH da solução tampão foi ajustado com uma solução (1M) de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico (PanReac AppliChem (Darmstadt, Alemanha)).

2.2 Curva de calibração do ácido gálico

Prepararam-se seis soluções padrão de ácido gálico em tampão PBS com as seguintes concentrações: 0, 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml. As seis soluções padrão foram analisadas, em células de quartzo, num espectrofotómetro UV/Vis (Evolution 300, Thermo scientific) para a obtenção dos espectros de absorvência no intervalo entre 200 nm e 350 nm. A partir dos valores de máximo de absorvência a 259 nm das soluções padrão foi construída a curva de calibração do ácido gálico.

2.3 Produção dos transferossomas

A preparação dos transferossomas baseou-se no método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Em primeiro lugar, a lecitina de soja e o Tween 80[®] foram dissolvidos numa mistura de clorofórmio e metanol numa proporção 3:1 (v/v). De seguida, os solventes orgânicos foram removidos através de um evaporador rotativo (VV 2000, Heidolph) a 40 °C e 90 rpm durante 45 minutos. Os traços de solventes orgânicos foram removidos sob vácuo durante, no mínimo, 2 h. O filme lipídico obtido foi, em seguida, hidratado com uma solução de ácido gálico a 0,75% (m/V) através de agitação vigorosa. Por último, as vesículas obtidas foram sujeitas a sonicação (sonicador Q125, QSonica Sonicators), com uma amplitude de 50%.

2.4 Caracterização dos transferossomas

Determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão

O diâmetro hidrodinâmico (D_h) e o índice de polidispersão (PdI) dos transferossomas produzidos foram caracterizados por espectroscopia de correlação fotónica no equipamento Delsa[™] Nano C da Beckman Coulter, Inc. Cada formulação foi analisada em triplicado à temperatura ambiente (23 ± 2 °C) após diluição com água destilada (20-25x).

Eficiência de associação e capacidade de carga

A eficiência de associação (EA) e a capacidade de carga (CC) foram determinadas através de um método indireto após a separação da fração livre de ácido gálico por cromatografia de exclusão por tamanho. Para tal, utilizou-se como fase estacionária o Sephadex[™] G-25 e como fase móvel a solução tampão (PBS, pH 7,4) à temperatura ambiente no escuro. Após a separação da fração livre de ácido gálico da fração encapsulada de uma alíquota de 500 µL de transferossomas, a concentração de ácido gálico presente na fração livre foi determinada pelo método da curva de calibração por espectrofotometria UV-Vis,

considerando o máximo de absorvência a 259 nm e o fator de diluição utilizado. A EA e a CC foram então calculadas tal como se indica de seguida:

$$EA (\%) = \frac{\text{Concentração total de ácido gálico} - \text{Concentração de ácido gálico na fração livre}}{\text{Concentração total de ácido gálico}} \times 100$$

$$CC = \frac{\text{Concentração total de ácido gálico} - \text{Concentração de ácido gálico na fração livre}}{\text{Concentração total de lípido}}$$

2.5 Otimização dos transferossomas

A formulação transferossomal para veicular o ácido gálico foi otimizada pelo recurso a um desenho experimental do tipo Box-Behnken. Os fatores (ou variáveis independentes) consideradas foram a concentração lipídica (X_1), a razão Tween:lípido (X_2) e o tempo de sonicação (X_3), tendo sido avaliados três níveis para cada um dos fatores considerados através da produção de 15 amostras independentes (Tabela 3). As respostas (ou variáveis dependentes) avaliadas foram o D_h (Y_1), o PdI (Y_2) e a CC (Y_3). Os dados experimentais obtidos foram analisados no software STATISTICA (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), que com base nos critérios desejáveis definidos para cada resposta (Tabela 3) sugeriu os valores ótimos a usar como fatores. O desenho experimental foi validado através da preparação e caracterização de três réplicas independentes da formulação ótima e posterior comparação com os valores teóricos previstos pelo desenho experimental.

Tabela 3 - Fatores e respostas consideradas no desenho experimental do tipo Box-Behnken e respetivos níveis testados ou critérios desejáveis definidos.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
X_1 = Concentração de lípido (% m/V)	1	1.5	2
X_2 = Razão Tween/lípido (m/m)	5:95	10:90	15:85
X_3 = Tempo de sonicação (min)	5	10	15
Respostas	Desejabilidade		
	Elevada	Média	Baixa
Y_1 = Diâmetro hidrodinâmico (nm)	100	110	125
Y_2 = Índice de polidispersão	0,1	0,2	0,3
Y_3 = Capacidade de carga	1	0,50	0,35

3. Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

O objetivo central deste trabalho foi a otimização de uma formulação transferossomal para veicular o ácido gálico com vista a uma administração tópica e transdérmica para regeneração cutânea. Numa fase inicial foram realizados diversos estudos preliminares que foram essenciais para o sucesso da segunda fase do trabalho, a implementação do desenho experimental do tipo Box-Behnken para otimização da formulação transferossomal.

3.1 Estudos preliminares

Curva de calibração do ácido gálico

O primeiro estudo preliminar realizado foi a determinação da curva de calibração do ácido gálico por espectrofotometria UV/Vis. Para tal, foram obtidos os espectros de absorção de várias soluções padrão com concentrações crescentes de ácido gálico (0-25 µg/ml). De seguida, os valores de absorvência no comprimento de onda máximo (259 nm) foram considerados para se traçar a curva de calibração apresentada na Figura 5.

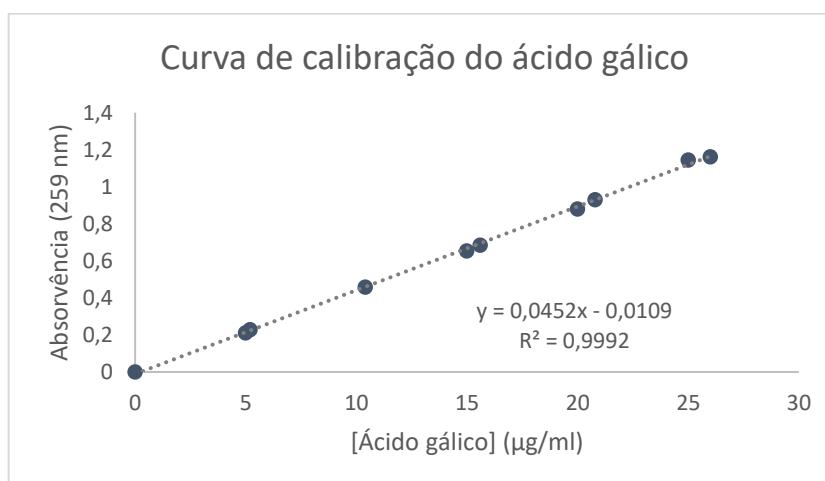


Figura 5 - Curva de calibração do ácido gálico e respetiva equação da reta.

A curva de calibração obtida está em conformidade com a literatura (Dar, Jain, Jain, & Modak, 2017) e o coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 0,9992$) demonstra a linearidade deste método analítico. Assim, este método foi considerado válido para determinar a concentração de ácido gálico adicionada no passo inicial da produção de transferossomas, assim como para dosear a quantidade de ácido gálico que não foi encapsulado, permitindo assim o cálculo da eficiência de associação e da capacidade de carga das formulações que foram subsequentemente produzidas.

Cromatografia de exclusão por tamanho

Utilizou-se no presente estudo a cromatografia de exclusão por tamanho com o objetivo separar a fração de ácido gálico encapsulada da fração livre, como método indireto para determinar a eficiência de associação e a capacidade de carga dos transferossomas. De forma a verificar se o método escolhido era adequado para separar efetivamente a fração encapsulada e a fração livre do ácido gálico, traçou-se o cromatograma apresentado na Figura 6. Para tal, aplicou-se uma alíquota (500 µl) de transferossomas constituídos por 1,5% (m/V) de lecitina de soja, 10:90 de razão Tween 80:lípido (m/m) e 0,75% (m/V) de ácido gálico e deixou-se eluir durante 60 min, enquanto se recolhiam alíquotas de fase móvel de dois em dois minutos. O espectro de absorção das alíquotas recolhidas foi seguidamente analisado por espectrofotometria UV/Vis para detetar a presença de ácido gálico com base na curva de calibração previamente obtida.

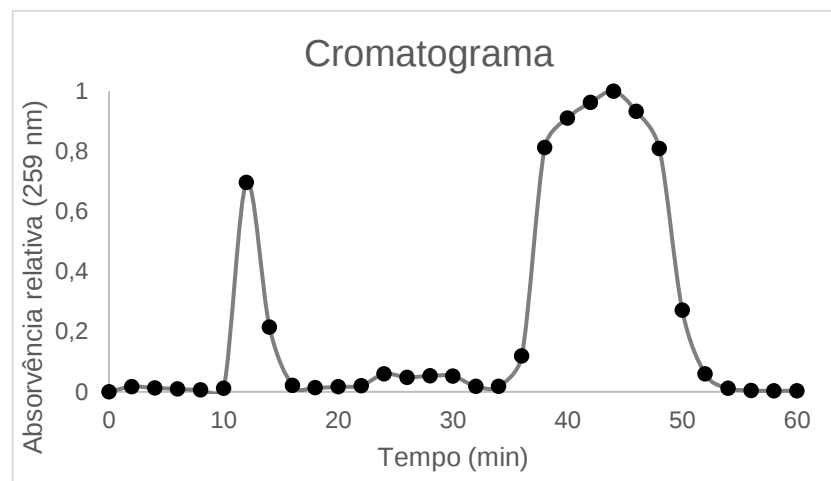


Figura 6 - Cromatograma típico dos transferossomas encapsulados com ácido gálico.

Tendo como base a Figura 6, conclui-se que o método utilizado é eficaz para separar a fração de ácido gálico encapsulada da fração de ácido gálico livre. Como se pode observar, verifica-se um aumento da absorvência por volta dos 10 minutos, correspondente à fração constituída pelos transferossomas. E só por volta dos 35 minutos é que se verifica novamente um aumento pronunciado da absorvência, altura em que a fração livre de ácido gálico é eluída da coluna. Desta forma, a cromatografia de exclusão por tamanho foi considerada válida para separar a fração livre da fração encapsulada de ácido gálico.

Influência do tempo de sonicação

A utilização de um desenho experimental para a otimização de formulações pressupõe a definição à partida dos níveis a testar de cada variável independente. Através da análise da literatura, verificou-se que o tempo de sonicação é usualmente utilizado como variável independente (Ahmed, 2015; Fernández-García et al., 2020; Jangdey, Gupta, Saraf, & Saraf, 2017). Assim sendo, realizou-se um estudo inicial para analisar a influência do tempo de sonicação no diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersão (Pdl) de transferossomas. Para tal, prepararam-se transferossomas constituídos por 1,5% (m/V) de lecitina de soja e 10:90 de razão Tween 80:lípido (m/m) na presença e ausência de 0,75% (m/V) de ácido gálico. Estas formulações foram então sujeitas a sonicação durante intervalos de tempo crescentes, sendo caracterizadas por espectroscopia de correlação fotónica ao fim de cada intervalo de tempo. A

variação do diâmetro hidrodinâmico e de PDI em função do tempo de sonicação é apresentado na Figura 7.

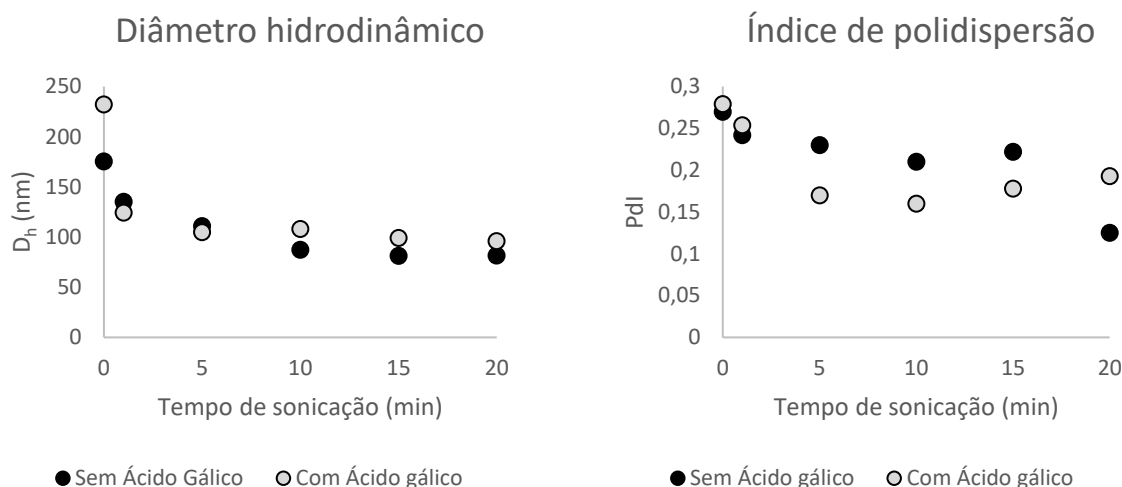


Figura 7 - Variação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do índice de polidispersão (PDI) de transferossomas na presença e ausência de ácido gálico em função do tempo de sonicação.

Através da análise da Figura 7, verificou-se que o diâmetro hidrodinâmico dos transferossomas com e sem ácido gálico decresce com o aumento do tempo de sonicação, ficando relativamente estável a partir dos 5 minutos de sonicação. Por outro lado, obtiveram-se valores de PDI abaixo de 0,25 entre os 5 e os 20 minutos de sonicação, apresentando a formulação com ácido gálico encapsulado valores de PDI inferiores aos da formulação sem ácido gálico entre os 5 e os 15 minutos de sonicação. Assim sendo, selecionou-se 5, 10 e 15 minutos como os níveis de tempo de sonicação a testar no desenho experimental para otimizar a formulação transferossomal de ácido gálico.

Os níveis a testar das outras duas variáveis independentes, a saber concentração lipídica e razão Tween:lipídeo, foram escolhidos com base na revisão da literatura existente (Ahmed, 2015; Fernández-García et al., 2020; Jangdey et al., 2017).

3.2 Otimização da formulação transferossomal

O desenho experimental do tipo Box-Behnken foi a estratégia utilizada para se proceder à otimização da formulação transferossomal para veicular ácido gálico pela via

transcutânea. Este método é bastante vantajoso por ser uma estratégia multivariada de otimização de formulações, que permite avaliar o impacto de várias variáveis independentes (e suas interações) em várias variáveis dependentes. Mais ainda, esta estratégia de *quality-by-design* tem-se demonstrado uma mais-valia para reduzir os custos de otimização e a duração da mesma, pela redução do número de ensaios necessários (Ali et al., 2020).

Neste trabalho, as variáveis independentes ou fatores escolhidos com base nos estudos preliminares e na revisão da literatura foram os seguintes: a concentração lipídica (X_1), a razão Tween:lipídio (X_2) e o tempo de sonicação (X_3). A influência de três níveis destes fatores (indicados na Tabela 3) foi avaliada em três repostas (ou variáveis dependentes), nomeadamente o D_h (Y_1), o PdI (Y_2) e a CC (Y_3). Para tal, foram produzidas 15 formulações em que se testaram os três níveis dos fatores em estudo, tal como indicado na Tabela 4. As formulações produzidas foram caracterizadas quanto às respostas em estudo e também quanto à EE, resultados esses que estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Formulações produzidas e caracterizadas no desenho experimental do tipo Box-Behnken. Especificação dos fatores em estudo e das respostas obtidas em cada formulação.

<i>Formulação</i>	X_1	X_2	X_3	D_h (nm)	PdI	CC	EA (%)
B1	1	5	10	112	0,28	0,76	98,97
B2	2	5	10	112	0,14	0,35	98,92
B3	1	15	10	92	0,13	0,71	99,12
B4	2	15	10	112	0,20	0,41	98,86
B5	1	10	5	119	0,24	0,77	98,94
B6	2	10	5	120	0,26	0,41	98,93
B7	1	10	15	120	0,22	0,76	99,01
B8	2	10	15	117	0,20	0,39	98,73
B9	1,5	5	5	111	0,21	0,49	98,55
B10	1,5	15	5	123	0,28	0,50	98,78
B11	1,5	5	15	106	0,14	0,47	98,86
B12	1,5	15	15	107	0,26	0,50	98,84
B13	1,5	10	10	115	0,15	0,55	99,06
B14	1,5	10	10	98	0,17	0,48	98,87
B15	1,5	10	10	120	0,15	0,55	98,93

X_1 , concentração de lipídio (% m/v); X_2 , razão Tween:lipídio (m/m); X_3 , tempo de sonicação (min); D_h , diâmetro hidrodinâmico (nm); PdI , índice de polidispersão; CC , capacidade de carga; EA : eficiência de associação (%)

O D_h dos transferossomas produzidos variou entre 92 nm e 123 nm, o que é bastante vantajoso, tendo em conta que quanto menor for o tamanho do transferossoma, mais fácil vai ser a sua penetração no estrato córneo. De facto, todas as formulações apresentam tamanhos inferiores a 300 nm, condição essencial para apresentarem uma boa permeação cutânea sem alteração estrutural (Fernández-García et al., 2020). Os valores de PDI das formulações produzidas variaram entre 0,13 e 0,28, indicando que todas as formulações apresentam uma distribuição de tamanhos homogénea, já que todos valores se situam abaixo de 0,3. Relativamente à eficiência de associação, esta foi de aproximadamente 99% em todas as formulações, e a capacidade de carga variou entre 0,35 e 0,77, o que indica que as formulações testadas são adequadas para a veiculação de ácido gálico.

De forma a exemplificar de forma mais clara a influência da variação dos fatores em estudo nas respostas obtidas, foram realizadas análises de superfície de resposta. Como exemplo, o efeito da concentração de lípido e do tempo de sonicação em cada uma das respostas avaliadas está representado na Figura 8. Como se pode verificar, o D_h e o PDI são menores quando se utiliza uma concentração de lípido de cerca de 1,5% (m/v) e quando o tempo de sonicação é cerca de 10 minutos. Relativamente à capacidade de carga, verificou-se que este parâmetro aumenta, quanto menor for a concentração de lípido, não variando o seu valor com os diferentes tempos de sonicação em estudo.

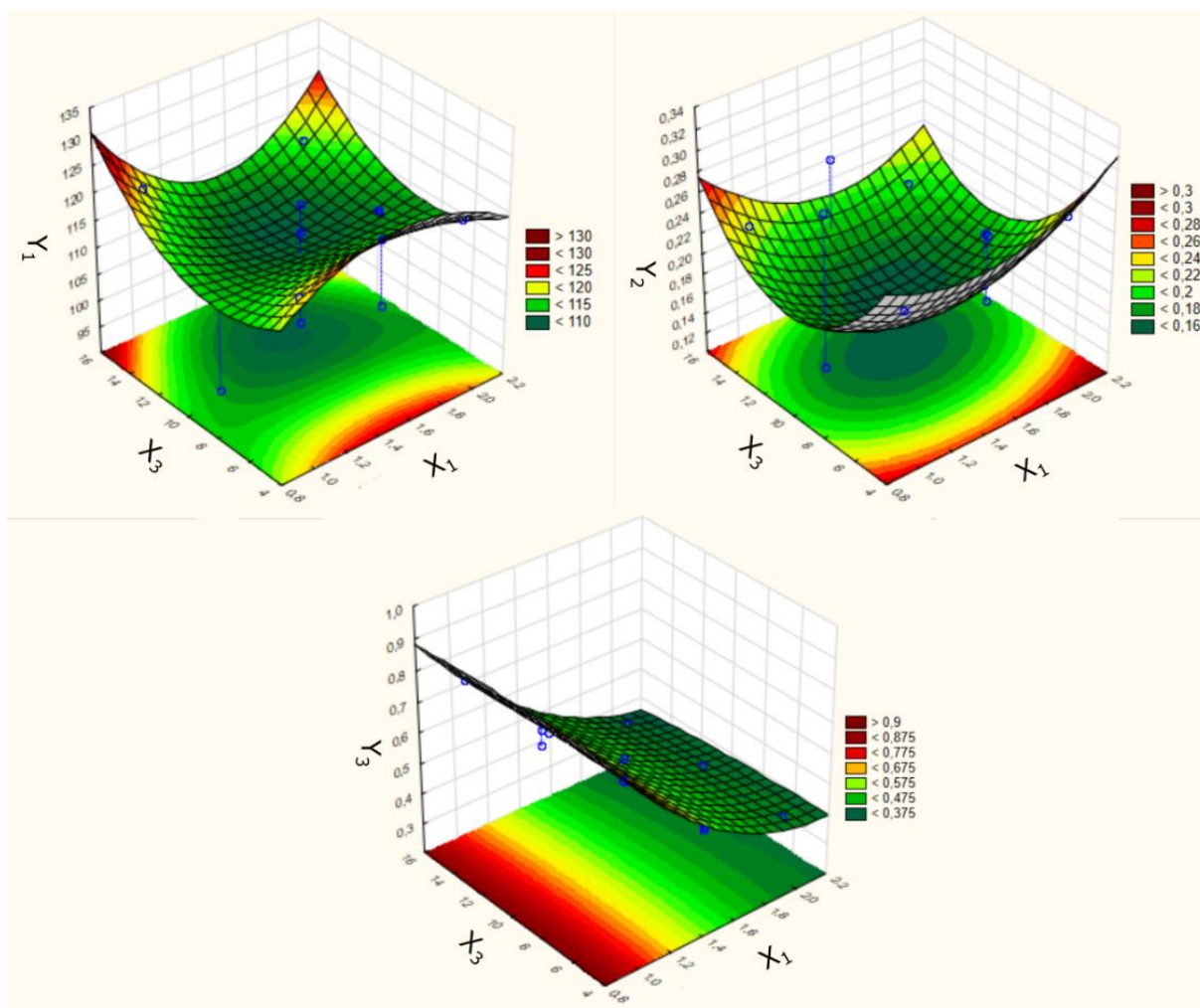


Figura 8 - Gráficos tridimensionais de superfície de resposta que demonstram o efeito dos fatores concentração de lípido (X₁) e tempo de sonicação (X₃) nas respostas obtidas, nomeadamente D_h (Y₁), o Pdl (Y₂) e CC (Y₃).

O tratamento estatístico das respostas obtidas com cada uma das formulações produzidas permitiu que o software STATISTICA fizesse a previsão do valor ótimo para cada uma das variáveis independentes, de forma a que se obtivesse uma formulação transferossomal otimizada tendo em conta os critérios desejáveis selecionados (Tabela 3). Obtiveram-se como valores ótimos dos fatores para se produzir a formulação otimizada: 1% (m/V) como concentração de lípido, 15:85 (m/m) como razão Tween:lipídeo e 10 min como tempo de sonicação. Para validar a previsão indicada pelo desenho experimental foram produzidas três réplicas independentes da formulação otimizada, e os resultados obtidos quanto às respostas em estudo foram comparados com os valores teóricos previstos pelo tratamento matemático efetuado (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da caracterização da formulação otimizada, produzida considerando como fatores 1% (m/V) como concentração de lípido, 15:85 (m/m) como razão Tween:lípido e 10 min como tempo de sonicação, e comparação com os dados teóricos previstos.

Resposta	Dados experimentais	Dados teóricos
D_h (nm)	107 ± 9	92,0
PdI	0,20 ± 0,04	0,13
CC	0,732 ± 0,002	0,71

Os resultados obtidos a nível experimental da formulação otimizada foram razoavelmente semelhantes aos resultados teóricos previstos para a mesma formulação pelo desenho experimental do tipo Box-Behnken. Este resultado valida o desenho experimental realizado e demonstra mais uma vez a mais-valia de se utilizar este tipo de desenho experimental para otimizar nanoformulações. É de realçar que o desenho experimental implementado permitiu a obtenção de uma formulação transferossomal com os parâmetros desejáveis, isto é, com um D_h de cerca de 100 nm, com uma distribuição de D_h uniforme (PdI = 0,20) e com uma capacidade de carga elevada (CC = 0,732).

Comparativamente com outras formulações em desenvolvimento para veicular ácido gálico (Tabela 2), o nanossistema produzido neste trabalho apresentou um valor de diâmetro hidrodinâmico inferior ao nanossistema de nanopartículas poliméricas (De Cristo Soares Alves et al., 2016; Tapia-Hernández et al., 2019), aos dendrímeros (Alfei et al., 2020) e às microsferas de alginato de cálcio (Essifi et al., 2020). Assim, é previsível que esta formulação transferossomal possa apresentar melhores propriedades de penetração cutânea. Além disso, a eficiência de associação desta formulação transferossomal também foi superior à reportada no caso das microsferas de alginato de cálcio (Essifi et al., 2020), das nanopartículas poliméricas (De Cristo Soares Alves et al., 2016) e das nanopartículas lipídicas (Ali et al., 2020). Neste sentido, os transferossomas otimizados neste trabalho parecem ser bastante promissores para a abordagem por via transcutânea do tratamento das feridas crónicas.

4. Conclusão

4. Conclusão

O principal objetivo deste trabalho centrou-se na otimização de uma formulação transferossomal para veicular o ácido gálico por via transcutânea para regeneração da pele, utilizando um desenho fatorial do tipo Box-Behnken como estratégia de *quality-by-design*.

No geral, o desenho experimental foi implementado com sucesso. De facto, foi possível otimizar uma formulação transferossomal composta por lecitina de soja e Tween® 80 tendo em conta os critérios desejáveis definidos à partida. O diâmetro hidrodinâmico da formulação otimizada foi à volta dos 100 nm, o que sugere que esta formulação poderá apresentar uma boa penetração cutânea. Outro parâmetro que foi otimizado foi o índice de polidispersão, tendo-se obtido uma distribuição homogénea dos tamanhos da formulação otimizada. Relativamente à capacidade de carga obtida, a formulação otimizada apresentou valores elevados, o que significa que grande parte do ácido gálico adicionado foi encapsulado. Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o desenho experimental do tipo Box-Behnken é vantajoso para otimizar formulações transferossomais, pois demonstrou ser uma estratégia eficaz e económica.

Para dar continuidade a este trabalho, seria interessante proceder à caracterização de propriedades adicionais dos transferossomas otimizados. Por exemplo, através de estudos para avaliar a estabilidade físico-química da formulação otimizada, bem como da realização de estudos *in vitro* para avaliar a sua capacidade de penetrar na pele e a sua toxicidade celular. No caso dos resultados nos estudos *in vitro* serem promissores, seria então interessante verificar a eficácia e a segurança no tratamento das feridas crónicas desta formulação *in vivo*.

5. Bibliografia

5. Bibliografia

- Ahmed, T. A. (2015). Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett-Burman design and characterization. *Journal of Liposome Research*, 25(1), 1–10. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.950276>
- Alfei, S., Marengo, B., Zuccari, G., Turrini, F., & Domenicotti, C. (2020). Dendrimer Nanodevices and Gallic Acid as Novel Strategies to Fight Chemoresistance in Neuroblastoma Cells, 10(6), 1243. <https://doi.org/10.3390/nano10061243>
- Ali, S., Radwan, A., Yousry, C., El-maadawy, W. H., Elmeshad, A. N., & Shoukri, R. A. (2020). Impact of Reverse Micelle Loaded Lipid Nanocapsules on the Delivery of Gallic Acid into Activated Hepatic Stellate Cells: A Promising Therapeutic Approach for Hepatic Fibrosis, 37(9). <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02891-z>
- Brás, A. R. R. (2016). Sistemas de administração transdérmica de fármacos: desafios e oportunidades, 1–37. Obtido de [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/40807/1/M_Ana Rita Bras.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/40807/1/M_Ana%20Rita%20Bras.pdf)
- Chen, S. A., Chen, H. M., Yao, Y. Der, Hung, C. F., Tu, C. S., & Liang, Y. J. (2012). Topical treatment with anti-oxidants and Au nanoparticles promote healing of diabetic wound through receptor for advance glycation end-products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(5), 875–883. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.018>
- Choubey, S., Goyal, S., Varughese, L. R., Kumar, V., Sharma, A. K., & Beniwal, V. (2018). Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1283–1293. <https://doi.org/10.2174/1389557518666180330114010>
- Cláudia Gama Elias, Daniela Monteiro Brandão, E. C. R. A. C., Eunice Maria Rodrigues Roque Proença e Cunha, G. C. S. R., & Maria do Rosário Nunes Pereira Mesquita, P. M. P. de C. e R. (2012). *pensos com ação terapêutica* (ordem dos). Obtido de https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/manual_de_material_de_penso_com_acao_terapeutica_4190435775cacce58e0732.pdf
- Dar, F. A., Jain, K., Jain, B., & Modak, M. (2017). Preliminary Phytochemical Analysis and Characterization of Flavonoid Moiety from Vitex negundo Leaves Origin in Madhya Pradesh State by HPLC Study. *UK Journal of Pharmaceutical Biosciences*, 5(5), 60–65.

<https://doi.org/10.20510/ukjpb/5/i5/166558>

- De Cristo Soares Alves, A., Mainardes, R. M., & Khalil, N. M. (2016). Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. *Materials Science and Engineering C*, 60, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.014>
- Delgado, J. M. F. (2013). Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. *Instituto Politécnico de Bragança*, 1–117. Obtido de <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/9219>
- El-Say, K. M., & El-Sawy, H. S. (2017). Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1–2), 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>
- EMA. (2006). Reflection Paper on Nanotechnology-Based Medicinal Products for Human Use. *European Medicines Agency*, 1–4. Obtido de <http://www.emea.eu.int/http://www.emea.eu.int/htms/human/itf/itfguide.htm>
- Essifi, K., Lakrat, M., Berraaouan, D., Fauconnier, M., Bachiri, A. El, & Tahani, A. (2020). Optimization of gallic acid encapsulation in calcium alginate microbeads using Box - Behnken Experimental. *Polymer Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03397-9>
- Fernández-García, R., Lalatsa, A., Statts, L., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M. P., & Serrano, D. R. (2020). Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 573. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118817>
- Garcês, A., Amaral, M. H., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2018). Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>
- Hamdan, S., Pastar, I., Drakulich, S., Dikici, E., Tomic-Canic, M., Deo, S., & Daunert, S. (2017a). Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Central Science*, 3(3), 163–175. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00371>
- Hamdan, S., Pastar, I., Drakulich, S., Dikici, E., Tomic-Canic, M., Deo, S., & Daunert, S.

- (2017b). Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Central Science*, 3(3), 163–175. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00371>
- Jangdey, M. S., Gupta, A., Saraf, S., & Saraf, S. (2017). Development and optimization of apigenin-loaded transfersomal system for skin cancer delivery: in vitro evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(7), 1452–1462. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1247850>
- Kapoor, B., Gupta, R., Gulati, M., Singh, S. K., Khursheed, R., & Gupta, M. (2019). *The Why, Where, Who, How, and What of the vesicular delivery systems. Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 271). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.07.006>
- Khan, B. A., Mahmood, T., Menaa, F., Shahzad, Y., Yousaf, A. M., Hussain, T., & Ray, S. D. (2019). New Perspectives on the Efficacy of Gallic Acid in Cosmetics & Nanocosmeceuticals. *Current Pharmaceutical Design*, 24(43), 5181–5187. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190118150614>
- Koehler, J., Brandl, F. P., & Goepferich, A. M. (2018). Hydrogel Wound Dressings for Bioactive Treatment of Acute and Chronic. *European Polymer Journal*, 100, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046>
- Leal, E. C., & Carvalho, E. (2014). Cicatrização de Feridas : O Fisiológico e o Patológico, 9(3), 133–143. <https://doi.org/10.3390/nano7100306>
- Loomba, L., & Scarabelli, T. (2013). Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: Aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates. *Therapeutic Delivery*, 4(9), 1179–1196. <https://doi.org/10.4155/tde.13.74>
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
- Mandal, A. K. (2020). Dendrimers in targeted drug delivery applications: a review of diseases and cancer. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(4), 287–297. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1713780>
- Mordorski, B., Rosen, J., & Friedman, A. (2015). Nanotechnology as an innovative approach for accelerating wound healing in diabetes. *Diabetes Management*, 5(5), 329–332.

<https://doi.org/10.2217/dmt.15.28>

- Münch, S., Wohlrab, J., & Neubert, R. H. H. (2017). Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.019>
- Nutter, D. O., & Ratts, T. (1973). Direct actions of prostaglandins E1, A1, and F2 α on myocardial contraction. *Prostaglandins*, 3(3), 323–336. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(73\)90071-3](https://doi.org/10.1016/0090-6980(73)90071-3)
- Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., & Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: A promising nanoencapsulation technique for transdermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 12(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090855>
- Pereira, L., Mehboob, F., Stams, A. J. M., Mota, M. M., Rijnaarts, H. H. M., & Alves, M. M. (2015). Metallic nanoparticles: Microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 114–128. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.819484>
- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1261–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>
- Rajendran, N. K., Kumar, S. S. D., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). A review on nanoparticle based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.009>
- Ramasasthy, S. S. (2005). Acute Wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32(2), 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.12.001>
- Rheinecker, S. B. (1995). Wound management: the occlusive dressing. *Journal of athletic training*, 30(2), 143–146. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16558325> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1317847>
- Sá, M. C. M. X. de. (2014). Novos sistemas terapêuticos de administração transcutânea.
- Shah, S. T., Yehye, W. A., Saad, O., Simarani, K., Chowdhury, Z. Z., Alhadi, A. A., & Al-Ani, L. A. (2017). Surface functionalization of iron oxide nanoparticles with gallic acid as potential antioxidant and antimicrobial agents. *Nanomaterials*, 7(10), 306.

<https://doi.org/10.3390/nano7100306>

- Silvério, M. D. O., Castro, C. F. S., Miranda, A. R., Iqbal, L., Lateef, M., Ali, S., ... MIOT, L, D, et al., 2009. (2009). Estrutura e função da pele. *Cecil Medicina*, 22(6), 65. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.324>
- Sood, A., Granick, M. S., & Tomaselli, N. L. (2014). Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Advances in Wound Care*, 3(8), 511–529. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>
- Soraia Assad Nasbine Rabeh Márcia Beatriz Berzoti Gonçalves, P. (2003). AVALIAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS NA ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM MATERIAL COMPLEMENTAR: Anatomia e Fisiologia da Pele, 1–5.
- Tan, S. T., Winarto, N., Dosan, R., & Aisyah, P. B. (2019). The Benefits Of Occlusive Dressings In Wound Healing. *The Open Dermatology Journal*, 13(1), 27–33. <https://doi.org/10.2174/1874372201913010027>
- Tapia-Hernández, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Cinco-Moroyoqui, F. J., Ruiz-Cruz, S., Juárez, J., Castro-Enríquez, D. D., ... Rodríguez-Félix, F. (2019). Gallic Acid-Loaded Zein Nanoparticles by Electrospraying Process. *Journal of Food Science*, 84(4), 818–831. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14486>
- Tocco, I., Zavan, B., Bassetto, F., & Vindigni, V. (2012). Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration. *Journal of Nanomaterials*, 2012(Figure 1), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/714134>
- Yang, D. J., Moh, S. H., Son, D. H., You, S., Kinyua, A. W., Ko, C. M., ... Kim, K. W. (2016). Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions, 21(7), 899. <https://doi.org/10.3390/molecules21070899>
- Zarrintaj, P., Moghaddam, A. S., Manouchehri, S., Atoufi, Z., Amiri, A., Amirkhani, M. A., ... Mozafari, M. (2017). Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? the search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine*, 12(19), 2403–2422. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0173>
- Zhang, Y., Pu, C., Tang, W., Wang, S., & Sun, Q. (2019). Gallic acid liposomes decorated with lactoferrin: Characterization, in vitro digestion and antibacterial activity. *Food Chemistry*, 293, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.116>