

Carlota Maria Marques Nascimento

***Impacto na Migração de Queratinócitos por Modulação
das Enzimas LOX: Aplicabilidade em Formulações
Tópicas Cutâneas***

Orientador: Professor Nuno Saraiva

UNIVERSIDADE LUSÓFONA – Centro Universitário de Lisboa
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2023

Carlota Maria Marques Nascimento

Impacto na Migração de Queratinócitos por Modulação das Enzimas LOX: Aplicabilidade em Formulações Tópicas Cutâneas

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa no dia 2 de junho de 2023, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 253/2023, de 2 de maio de 2023, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^a. Doutora Ana Sofia Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor Nuno Saraiva

UNIVERSIDADE LUSÓFONA – Centro Universitário de Lisboa
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2023

Agradecimentos

O fim de um percurso. O fim dos melhores cinco anos da minha vida. Onde fui intensamente feliz com todos aqueles que se juntaram a mim ao longo desta jornada. A finalização desta etapa, com a entrega da Dissertação final, foi resultado de cinco anos de esforço e de dedicação, repletos de momentos bons e de alguns momentos maus, mas que em conjunto tornou tudo extremamente mais bonito.

Começando pelos meus orientadores, um obrigada gigante ao Professor Nuno Saraiva e à Professora Catarina Rosado. Por todo o acompanhamento, apoio e disponibilidade incansável ao longo deste longo caminho.

À minha família. Obrigada, aos meus pais e aos meus avós que sempre fizeram os possíveis e os impossíveis para chegar onde cheguei. Por nunca me deixarem desistir. Obrigada por fazerem parte de mim, por fazerem de mim a Mulher que sou hoje e por acreditarem em mim, sempre. Amo-vos!

Aos meus colegas e amigos de curso, a todos eles, mas em especial aos Pedros (Caracol e Magalhães), à Tita, à Vanessa, à Silva, Nês e Bitiz por estarem sempre comigo, alguns desde o início dos inícios. Obrigarem por fazerem parte da minha vida, por todas as gargalhadas, por todo o apoio em todos os momentos e obrigada por nunca deixarem de me dar na cabeça quando preciso. Obrigada, também aos meus meninos de 2021, pela vossa leveza e energia contagiante. Sem vocês todos não teria sido nem metade do que foi, e foi tão bom!

A todos os que se mantiveram e aos que entraram na minha vida e que a fizeram mais feliz, o meu maior OBRIGADA!!

O meu coração será para sempre roxo e amarelo! 💜💛

Resumo

Uma ferida cutânea é definida por qualquer alteração na integridade das camadas da pele. Estima-se que 2 milhões de europeus sofrem de lesões cutâneas sendo um importante fator influenciador da qualidade de vida do paciente. Aquando da disrupção da pele, o sistema tegumentar possui capacidade para se autorregenerar, processo esse designado de cicatrização de lesões cutâneas. Constitui um processo vital e fundamental que tem como principal objetivo a restauração da integridade e função normal da pele, onde estão envolvidos inúmeros componentes celulares como por exemplo, as enzimas LOX. Estas catalisam reações de reticulação de colagénio e elastina no tecido conjuntivo, permitindo a ligação cruzada entre estes dois compostos da matriz extracelular da pele, facilitando o processo de migração celular no processo de cicatrização de feridas.

De modo a otimizar tratamentos para maximizar a cura das feridas cutâneas, a presente dissertação teve como principal objetivo estudar o impacto de compostos selecionados, com atividade inibidora das enzimas LOX, na migração coletiva de queratinócitos, e posterior desenvolvimento de nanoformulações para aplicação cutânea, tendo em vista a otimização do processo de cicatrização de feridas cutâneas, contribuindo para melhoria de problemas relacionados com estas e podendo aumentar a qualidade de vida do paciente.

Usando um ensaio *in vitro*, o efeito dos compostos inibidores das enzimas LOX BAPN, EPCU e PN1 na migração coletiva de células HaCaT foi avaliado. Ao contrário do que seria de esperar, tendo em conta o efeito deste tipo de compostos noutras linhas celulares, observou-se que dois dos compostos aumentaram significativamente a migração celular coletiva, enquanto outro composto não teve qualquer impacto migração celular. Posteriormente, foram produzidas e desenvolvidas nanoformulações compostas por nanopartículas lipídicas sólidas contendo BAPN e avaliou-se a sua estabilidade ao longo do tempo assim como o seu impacto aquando da sua aplicação cutânea. De uma forma geral, as nanoformulações desenvolvidas apresentaram valores de pH, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão estáveis ao longo dos 30 dias de estudo. Os resultados do estudo *in vivo* indiciam uma boa compatibilidade cutânea das nanoformulações, mas não foram observadas diferenças relativamente ao controlo na sua eficácia, pelo que serão necessários estudos futuros com um painel mais alargado de voluntários.

Palavras-chave: enzimas LOX, cicatrização de feridas, ensaio de risco, migração celular coletiva, nanotecnologia, aplicação cutânea

Abstract

A skin wound is defined by any alteration in the integrity of the skin layers. It is estimated that 2 million Europeans suffer from skin lesions, which is an important factor influencing the patient's quality of life. When the skin is disrupted, the integumentary system has the capacity to self-regenerate, a process called healing of skin lesions. It constitutes a vital and fundamental process whose main objective is to restore the integrity and normal function of the skin, where numerous cellular components are involved, such as the LOX enzymes. These catalyze cross-linking reactions of collagen and elastin in connective tissue, thus allowing cross-linking between these two compounds in the extracellular matrix of the skin, facilitating the process of cell migration in the wound healing process.

In order to optimize treatments to maximize the healing of cutaneous wounds, the present dissertation had as main objective to study the impact of selected compounds, with inhibitory activity of LOX enzymes, in the collective migration of keratinocytes, and later development of nanoformulations for cutaneous application, having with a view to optimizing the healing process of cutaneous wounds, contributing to the improvement of problems related to these and possibly increasing the patient's quality of life.

Using an *in vitro* assay, the effect of LOX BAPN, EPCU-5 and PN1 inhibitor compounds on collective migration of HaCaT cells was evaluated. Contrary to what would be expected considering the effect of this type of compounds on other cell lines, it was observed that two of the compounds significantly increased collective cell migration, while another compound did not have any impact on cell migration. Subsequently, nanoformulations composed of solid lipid nanoparticles containing BAPN were produced and developed and their stability over time was evaluated, as well as their impact when applied to the skin. In general, the developed nanoformulations showed stable pH, hydrodynamic diameter and polydispersion index values over the 30 days of the study. The results of the *in vivo* study indicate a good cutaneous compatibility of the nanoformulations, but no differences were observed regarding the control in its effectiveness, so future studies with a larger panel of volunteers will be necessary.

Keywords: LOX enzymes, wound healing, risk assay, collective cell migration, nanotechnology, skin application

Abreviaturas

MEC	Matriz Extracelular
UV	Ultravioleta
TLRs	Recetores Toll-Like
LOX	Lisil Oxidase
LOXL1-4	LOX, LOX like-1, LOX like-2, LOX like-3 e LOX like-4
BAPN	Beta-aminopropionitrila
EPCU	8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone
PN1	7,15-isopimaradien-19-ol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
SLN	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
PDI	Índice de Polidispersão
NLC	Transportadores Lipídicos Nanoestruturados
A/O	Água em Óleo
O/A	Óleo em Água
NPs	Nanopartículas
DLS	Espectroscopia de Correlação Fotónica
°C	Graus Celcius
PTEA	Perda Transepidérmica de Água

Índice

Capítulo I – Introdução	1
1. Anatomia e Fisiologia da Pele.....	2
2. Moduladores da Integridade da Pele.....	6
3. Processo de Cicatrização de Feridas Cutâneas.....	8
4. Enzimas LOX na Regeneração da Pele.....	14
5. Impacto das Feridas na Saúde Humana e no Sistema de Saúde.....	17
6. Compostos Inibidores das LOX.....	19
7. Objetivo.....	21
Capítulo II – Modulação da atividade dos compostos inibidores das LOX e migração celular	22
1. Materiais e Métodos.....	23
1.1. Reagentes.....	23
1.2. Cultura Celular.....	23
1.3. Processo de Cultura de Células.....	23
1.4. Contagem Celular.....	23
1.5. Compostos.....	24
1.6. Ensaio de risco.....	24
2. Resultados e Discussão.....	25
Capítulo III - Desenvolvimento de Nanoformulações e Posterior Aplicação Cutânea	32
1. Contextualização Teórica.....	33
1.1. Administração Cutânea.....	33
1.2. Formas Farmacêuticas Tópicas.....	34
1.3. Nanotecnologia e Nanopartículas.....	36
1.4. Escolha do Tipo de Nanopartículas.....	39
2. Produção e Desenvolvimento das Nanoformulações.....	40
2.1. Materiais.....	40
2.2. Produção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	40
2.3. Estudo da Estabilidade das Nanoformulações.....	41
2.4. Resultados e Discussão.....	43
2.4.1. Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	43
2.4.2. Estudo da Estabilidade.....	44
3. Ensaio de Segurança e Eficácia – Aplicação Cutânea.....	50
3.1. Materiais.....	50
3.2. Métodos.....	50
3.3. Resultados e Discussão.....	51
Capítulo IV – Conclusão e Considerações Finais	55
Bibliografia	59
Bibliografia	60
Apêndices	67

Índice de Figuras

FIGURA 1 - ESQUEMA DA ESTRUTURA ANATÓMICA DAS CAMADAS DA PELE.	2
FIGURA 2 - ETAPAS DO PROCESSO FISIOLÓGICO DE CICATRIZAÇÃO E DE FERIDAS CUTÂNEAS.	9
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO INIBIDOR DAS ENZIMAS LOX, B-AMINOPROPIONITRILA.	20
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR COLETIVA DAS CÉLULAS HACAT QUANDO UTILIZADO PBS, BAPN 200 NM E BAPN 500 NM.	26
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR COLETIVA DAS CÉLULAS HACAT QUANDO UTILIZADO DMSO 10%, EPCU 5 MM, EPCU 10 NM E EPCU 20 NM.	28
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR COLETIVA DAS CÉLULAS HACAT QUANDO UTILIZADO DMSO 10%, PN1 50 MM, PN1 100 NM E PN1 150 NM.	29
FIGURA 7 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS SLN COM E SEM BAPN EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO À TEMPERATURA AMBIENTE.	45
FIGURA 8 - VARIAÇÃO DE PH DAS SLN COM E SEM BAPN EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO À TEMPERATURA AMBIENTE.	46
FIGURA 9 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E PH DAS SLN COM E SEM BAPN ANTES E APÓS OS TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA.	49
FIGURA 10 - VARIAÇÃO DA HIDRATAÇÃO, PTEA E ERITEMA SEM E COM A APLICAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES CONTENDO SLN, CONTROLO E SLN, PARA AVALIAR A SEGURANÇA DAS NANOFORMULAÇÕES.	52
FIGURA 11 - VARIAÇÃO DA HIDRATAÇÃO, PTEA E ERITEMA COM E SEM A APLICAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES CONTENDO SLN E CONTROLO.	53

Índice de Tabelas

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PREPARADAS SEM BAPN (CONTROLO) E COM BAPN.....	40
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS, DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E PH DAS SLN PRODUZIDAS COM E SEM BAPN.....	43
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS DAS SLN CONTROLO ANTES E APÓS TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	47

Capítulo I – Introdução

1. Anatomia e Fisiologia da Pele.

A pele é vista como um órgão fascinante. Em conjunto com as estruturas acessórias à pele, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas e as unhas, constitui o sistema tegumentar (VanPutte, Regan, & Russo, 2014). A pele, sendo vista como um órgão regenerador e dinâmico compreende 15% do peso corporal e consiste na principal estrutura de defesa do corpo humano.

A mesma desempenha várias funções vitais ao nosso organismo. Funciona como barreira contra agentes químicos e físicos estranhos ao organismo capazes, ou não, de provocar doenças. Evita a desidratação por perda transepidermica de água, está envolvida na termorregulação através da vascularização e através das glândulas sudoríparas, assim como na produção de hormonas, capacidade imunológica, excreção de pequenas quantidades de metabolitos e nos fenómenos de interação social. (J. Fisher & Rittie, 2015) .

Em termos de organização funcional, a pele é constituída por três camadas: camada subcutânea, derme e epiderme (J. Fisher & Rittie, 2015) que estão representadas na figura 1.

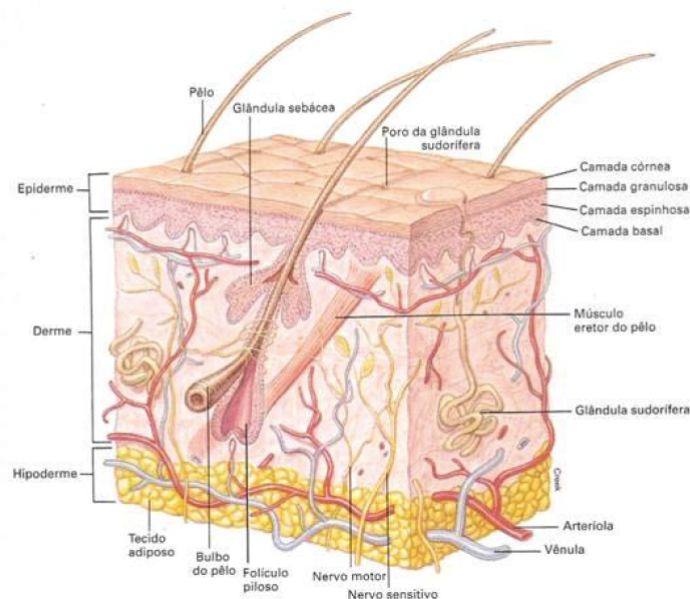


Figura 1 - Esquema da estrutura anatómica das camadas da pele. Adaptado de (VanPutte, Regan, & Russo, 2014).

A camada subcutânea é a camada mais profunda da pele, ligada à derme, constituída por tecido conjuntivo laxo, fibras de elastina e colagénio e células como macrófagos, leucócitos e fibroblastos (VanPutte, Regan, & Russo, 2014). No entanto, as células em maior quantidade são designadas de adipócitos que têm como principal função o armazenamento de nutrientes, mais especificamente lípidos, sob a forma de

triglicéridos, fazendo com que, desta forma, esta camada tenha a função de reserva energética e de isolamento térmico (J. Fisher & Rittie, 2015).

A derme, camada que se encontra entre a epiderme e a camada subcutânea, é constituída por tecido conjuntivo. Possui na sua constituição vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas, porém poucos elementos celulares estão na sua constituição como, por exemplo, fibroblastos e mastócitos. (Noblesse, et al., 2004). Os fibroblastos são o tipo de células mesenquimais mais abundantes nesta camada. (Roger, et al., 2019). São responsáveis pela produção de fibras colagêneas e de elastina, e assim esta camada é caracterizada por possuir uma matriz extracelular (MEC) abundante e rica em proteínas elásticas, colagêneas e reticulares. As proteínas elásticas são responsáveis por fornecer elasticidade à pele enquanto as fibras de colagénio contribuem para um aumento da sua resistência (Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020).

Por sua vez, a derme está dividida em duas subcamadas, papilar e reticular, a mais superficial e a mais profunda, respetivamente. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo laxo e possui na sua constituição projeções designadas papilas dérmicas que se estendem em direção à camada mais superficial, a epiderme. Para além destas projeções, esta subcamada possui pequenos vasos capilares que fazem com que seja possível o suporte da epiderme, fornecendo nutrientes e oxigénio à mesma. A camada reticular é a principal camada da derme e a mais profunda entrando em contacto com a camada subcutânea. É constituída por tecido conjuntivo denso, irregular e contém fibras de colagénio e elastina. Estas duas proteínas estão estruturalmente organizadas em redes de fibras o que confere à pele rigidez e elasticidade (VanPutte, Regan, & Russo, 2014). A função da pele e a sua estrutura dependem da expressão e da organização das células da MEC cuja sua composição é, maioritariamente, colagénio constituindo cerca de 90% do conteúdo da MEC dérmica. Este é o principal agente que determina a rigidez e força da pele, mas outros tipos de colagénio desempenham um papel crucial em vários processos como montagem da matriz, ancoragem celular, regeneração de feridas e sinalização de crescimento celular (Theocharidis & Connelly, 2019).

A camada mais superficial, designada epiderme, desempenha um papel crucial na função de barreira cutânea contra microrganismos e agentes químicos, contra a radiação solar e na regularização da perda transepidérmica da água. (J. Fisher & Rittie, 2015). É uma camada fina, constituída por epitélio pavimentoso estratificado escamoso que se renova de forma contínua. É desprovida de vasos sanguíneos pelo que a sua nutrição e oxigenação é feita através dos pequenos vasos sanguíneos encostados à junção dermoepidérmica (VanPutte, Regan, & Russo, 2014). As células que a

constituem em maior quantidade são os queratinócitos, que representam cerca de 80% das estruturas celulares epidérmicas. Os queratinócitos estão distribuídos pelos estratos basal, espinhoso, granuloso e córneo e estão sujeitos a um processo de diferenciação e maturação ao migrarem do estrato basal para o córneo. Nesse trajeto ocorrem alterações nas células que passam de células indiferenciadas para células com perda total da atividade metabólica, o que gera uma camada superficial de células sem núcleo e achatadas - os corneócitos. (Catarino, 2015). Estas células desempenham três funções principais: graças ao seu citoesqueleto e aos seus sistemas de junção, facilitam a coesão da epiderme; fornecem a função barreira entre o ambiente externo e o organismo graças à produção de queratina que confere rigidez à pele e, por fim, minimizam a perda hídrica (Prost-Squarcioni, 2006).

Para além destas células, a epiderme também é constituída, apesar de em menor quantidade, pelos melanócitos, que produzem melanina, as células de Langerhans, envolvidas na resposta imunitária do organismo aquando da invasão de um corpo estranho e células de Merkel, cuja função passa por detetar sensações como o tato, pressão superficial e dor (VanPutte, Regan, & Russo, 2014).

Esta camada, que serve como ponte de contacto entre o exterior e o organismo humano está organizada em 5 sub-estratos: estrato basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo sendo que, cada um possui uma constituição diferente (J. Fisher & Rittie, 2015).

Da camada mais profunda para a mais superficial, em primeiro lugar, localiza-se o estrato basal ou estrato germinativo. Consiste numa camada única de células colunares e cuboides, indiferenciadas e germinativas em constante divisão mitótica, constituída por desmossomas que conferem resistência unindo os queratinócitos. O estrato espinhoso consiste em 8 a 10 camadas de células multifacetadas onde há produção de fibras de queratina e corpos lamelares que se formam dentro dos queratinócitos. O estrato granuloso consiste numa subcamada epidérmica de células achatadas e orientadas paralelamente à superfície da pele, estão presentes grânulos proteicos de querato-hialina. Mais superficialmente encontra-se o estrato lúcido, uma camada intermédia, que está presente apenas na pele grossa, como nas palmas das mãos e dos pés. A camada mais superficial da epiderme é o estrato córneo, constituído por células escamosas que se sobrepõem umas às outras e estão unidas por corneodesmossomas. Possuem uma elevada quantidade de queratina, o que faz com que esta camada seja a mais rígida conferindo resistência estrutural ao órgão. É constituída por ceramidas que são as principais contributoras para a impermeabilidade cutânea, modulando a perda transepidérmica de água (Roger, et al., 2019).

O sistema tegumentar é também constituído por órgãos anexos à pele, os anexos cutâneos. São estes as glândulas, folículos pilosos e unhas.

As glândulas são órgãos secretores, constituídos por epitélio com uma rede de tecido conjuntivo. Podem ser classificadas em exócrinas ou endócrinas, com e sem ductos, respetivamente. Entre os tipos de glândulas exócrinas, a pele possui na sua constituição glândulas sebáceas e sudoríparas.

As glândulas sebáceas estão localizadas na derme, são glândulas com morfologia alveolar simples ou compostas cuja principal função é a produção e libertação de sebo, uma mistura oleosa constituída por vários tipos de lípidos. As glândulas encontram-se quase sempre unidas à parte superior do folículo piloso. O sebo é libertado através da lise da glândula, a partir do qual o sebo impregna-se no folículo piloso chegando à superfície da pele constituindo este um mecanismo importante para a saúde da pele assim como o equilíbrio do organismo. A produção e libertação do sebo mantem o pH da pele equilibrado, previne a desidratação por perda transepidérmica da água e protege a pele contra microrganismos.

As glândulas sudoríparas, écrinas ou apócrinas, são estruturas tubulares que libertam uma substância designada suor. As glândulas écrinas são as mais abundantes e encontram-se distribuídas por toda superfície corporal. Já as glândulas apócrinas encontram-se localizadas em zonas mais específicas do corpo humano como axilas, região genital e aureolas mamárias. Estas glândulas secretam suor, porém a sua constituição é diferente do suor écrino, este é constituído por lípidos e a sua secreção é desencadeado por estímulos hormonais como androgénio. O suor é inodoro, não obstante, a sua metabolização por parte de bactérias presentes na flora normal do organismo humano faz com que o suor apócrino seja responsável pelo odor corporal.

A presença de pêlos é uma característica de todos os mamíferos. Os folículos pilosos, estão localizados na pele fina e encontram-se pelo corpo todo. A total morfologia do folículo piloso é dividida em pêlo e folículo piloso. O pêlo é uma porção mais interna do total do folículo piloso e é dividido em duas partes principais, raiz e haste. A raiz encontra-se abaixo da superfície da pele, na derme, e forma o bolbo capilar local de origem do folículo. A haste é composta por células mortas e é organizada estruturalmente por três estruturas: medula, córtex e cutícula externa composto por queratina. O folículo piloso é uma invaginação em forma de tubo da epiderme que se estende até a derme. Na derme encontra-se a porção da bainha reticular dérmica, enquanto na epiderme localiza-se a porção da bainha reticular epidérmica. Ainda no interior do folículo existe a protuberância capilar onde se localizam as células tronco, epiteliais e melanócitos que conferem cor ao pêlo. Os pêlos têm a capacidade de crescer em ciclos que envolvem o estado de crescimento e de repouso. É um processo dinâmico

que se divide em três fases. A anagénesse pode durar entre 3 a 10 anos, sendo, portanto, a fase onde os pêlos têm um crescimento ativo e constante. Posteriormente a esta fase ocorre a catagénesse onde há uma paragem do crescimento do pêlo, morte celular por apoptose, paragem mitótica da raiz e da produção da melanina. Por fim, ocorre a telogénese, a fase final de repouso onde não há produção ativa de pêlo.

O último anexo são as unhas. Estruturas epiteliais queratinizadas, constituídas por células mortas e localizadas na extremidade dos dedos das mãos e dos pés, auxiliam o manuseamento de objetos e aumentam a sensibilidade ao toque (VanPutte, Regan, & Russo, 2014).

2. Moduladores da Integridade da Pele

Entre as várias funções da pele, destaca-se a função de barreira (Oliveira M. H., 2021). Todos os dias, a nossa pele, encontra-se em contacto direto com potenciais agentes agressores químicos, físicos e mecânicos. Todos estes podem ser prejudiciais à integridade da pele e, conseqüentemente, resultar no aparecimento de desequilíbrios fisiológicos e outras conseqüências mais ou menos graves. Desta forma, a funcionalidade de todas as camadas da pele deve ser restaurada o mais rapidamente possível de modo a manter a homeostasia do organismo humano (Netto, 2009).

Diferenças entre géneros, exposição à radiação ultravioleta (UV), alterações ambientais, traumas e o envelhecimento, tanto fisiológico como cutâneo, são alguns dos fatores que alteram a integridade da pele fazendo com que esta fique mais suscetível a alterações fisiológicas e funcionais (Menoita, Santos, & Santos, 2013).

Todos os dias somos expostos às UV que penetram na nossa pele interagindo de maneira diferente com diferentes tipos de células provocando também diferentes alterações. As radiações UVA, com comprimento de onda mais curtos, são absorvidas na epiderme e afetam, predominantemente, os queratinócitos. Já as UVB, com comprimentos de onda maiores, penetram mais profundamente, afetando os fibroblastos da derme. Estas radiações são prejudiciais por gerarem um aumento da produção de radicais livres, aumentam os processos de degradação de proteínas como por exemplo, o colagénio, e causam a apoptose dos fibroblastos (Battie & Verschoore, 2012) (Bragazzi, Sellami, Conic, Kimak, & Pigatto, 2019). Para além do risco de desenvolvimento de cancro de pele, uma maior exposição às radiações UV provoca um envelhecimento cutâneo mais rápido e precoce (Battie & Verschoore, 2012; D'Orazio, Jarrett, Amaro-Ortiz, & Scott, 2013).

Os fatores ambientais, como os agentes agressores físicos, como por exemplo, temperatura, causam alterações à integridade da pele alterando os valores da hidratação da mesma e por conseqüência, alteram também a função barreira da pele

(Camilion , Khanna, Anasseri, Laney, & Mayrovitz, 2022). Outro aspeto que altera toda a estrutura anatómica e fisiológica da pele é o envelhecimento cutâneo. O envelhecimento é visto como um processo normal e fisiológico, dinâmico e progressivo de todos os indivíduos, inevitável, no qual há mudanças a nível morfológico e fisiológico do organismo e da pele. Com o avançar da idade, a pele perde elasticidade, diminui também a sua produção normal de sebo, assim como a produção de suor pelas glândulas sebáceas e sudoríparas, respetivamente. Por sua vez, há uma perda gradual da capacidade de adaptação do individuo ao ambiente externo o que se transmite numa maior vulnerabilidade e maior incidência de patologias e comorbilidades (Farage M. , Miller, Elsner, & Maibach, 2008). Assim, a pele também perde espessura e torna-se mais fina, sendo caracterizada pela diminuição do tamanho dos queratinócitos, assim como pela diminuição da proliferação celular no estrato basal. Há uma menor adesão entre a epiderme e a derme devido à fragilidade das junções entre estas, devido à perda de fibras elásticas na papila dérmica e também pela sua quebra. O colagénio e a elastina também sofrem alterações. A sua quantidade na MEC dérmica é menor, pois há uma diminuição do número de células que as produzem e um aumento da sua degradação pela ação proteolítica (Farage M. A., Miller , Elsner, & Maibach, 2013).

Ao envelhecer, o individuo torna-se mais vulnerável e a sua capacidade de cicatrização diminui e os riscos de aparecimento de patologias crónicas. Com o normal envelhecimento de toda a população mundial, aumenta o número de indivíduos com maior risco para quebra e rutura da barreira cutânea (Menoita, Santos, & Santos, 2013). Quando a integridade da pele é alterada, esta fica mais frágil e há uma maior suscetibilidade para sofrer ferimentos. Quando a barreira protetora é rompida por trauma, lesão térmica ou química há uma rutura da pele originando uma lesão cutânea ou ferida cutânea (Oliveira M. H., 2021). Uma ferida cutânea é definida por qualquer alteração na integridade da pele ou da mucosa (Farage M. , Miller, Elsner, & Maibach, 2008). As feridas podem ser causadas por agentes agressores da pele, não obstante surgem feridas adjacentes a patologias, como doenças vasculares ou diabetes, ou após algum tipo de intervenção cirúrgica (Herman & Bordoni, 2022).

Estas podem ser classificadas de acordo com a sua forma, tamanho, profundidade ou cronicidade. Independentemente da etiologia das lesões, as feridas têm impacto substancial que muitas vezes não é reconhecido tanto pelos próprios, como pelos cuidadores ou pelos profissionais de saúde. De facto, o fenómeno das feridas tem sido designado como uma 'Epidemia Silenciosa', e viver com uma ferida, especialmente crónica, pode ter um efeito profundo na qualidade de vida do doente (Lindholm & Searle, 2016).

De acordo com a profundidade, as feridas podem ser classificadas como superficiais e agudas ou profundas e crônicas. Uma ferida aguda é definida como uma lesão cutânea que surge após um momento particular, indicável no tempo e no espaço. São decorrentes de cortes, queimaduras ou acidentes (O'Flynn, 2015), normalmente feridas superficiais que afetam a epiderme e a derme. Estas passam por um processo de cicatrização e regeneração oportuno e ordenado levando à restauração total da integridade funcional e anatômica da pele (Lazarus, et al., 1994). As feridas profundas e crônicas são aquelas cujo processo de cicatrização demora mais de um ano a ser completado. Este tipo de feridas surge associado ao envelhecimento do indivíduo e geralmente são decorrentes de outras patologias. São mais suscetíveis à infecção, portanto, podem surgir complicações posteriores que afetam muito a qualidade de vida do indivíduo (Blanco-Fernandez, Castaño, Mateos-Timoneda, Engel, & Perez-Amodio, 2021), no entanto também podem surgir quando o processo de cicatrização normal de uma ferida aguda é interrompido ou é lento (O'Flynn, 2015).

O tempo de reparação e cicatrização completa de uma ferida é diferente para cada tipo de lesão. É expectável que uma ferida mais superficial, que atinge as primeiras camadas da pele, não demore muito tempo para cicatrizar e por isso estas podem ser regeneradas através do processo fisiológico de cicatrização da pele sem necessidade de tratamento. Já as feridas crônicas e mais profundas não conseguem levar a cabo o processo normal o que leva a uma maior necessidade de melhores cuidados e tratamentos médicos (Lazarus, et al., 1994).

3. Processo de Cicatrização de Feridas Cutâneas.

Graças a anos de evolução, a nossa pele é o órgão do corpo humano mais multifuncional que possui processos dinâmicos e complexos de autorreparação que permitem uma cicatrização rápida e eficiente no caso de disrupção da mesma. Apesar desta capacidade inata de reparação de feridas, estes processos podem sofrer alterações que provocam menor eficiência assim como menor rapidez no processo de cicatrização comprometendo a integridade da pele a longo prazo, provocado por alterações patológicas ou pelo envelhecimento fisiológico (Wilkinson & Hardman, 2020).

Aquando de uma lesão cutânea é necessário restaurar o equilíbrio fisiológico o mais depressa possível (Wang, Huang, Horng, Yeh, & Chen, 2018). A cicatrização de lesões cutâneas é um processo fisiológico fascinante (Sorg, Tilkorn, Hager, & Mirastschijski, 2017). É um processo vital e fundamental que tem como principal objetivo a restauração da arquitetura assim como a integridade e função normal da pele (Cappiello, Casciaro, & Mangoni, 2018). Esta cascata de acontecimentos abrange processos que se sobrepõem espacial e temporalmente. Normalmente, a cicatrização

de feridas resulta num tecido sem apêndices cutâneos. Os processos complexos e inatos de autorreparação da pele levam a que a integridade da mesma seja reposta aquando de um ataque externo, porém este processo pode ser desfavorável. As cicatrizes formadas após a lesão são distintas da pele original e por isso pode gerar consequências estéticas e psicológicas devastadoras, reduzindo a qualidade de vida do indivíduo. Consequentemente, a formação de cicatrizes impede a recuperação completa da função da pele. Assim, a capacidade de a restaurar para alcançar o seu estado original é altamente valorizada na área da saúde (Takeo, Lee, & Ito, 2015).

As camadas da pele são compostas por MEC que consiste numa estrutura tridimensional composta por diversas proteínas como colagénio, elastina, na sua maioria, e outras proteínas estruturais, em minoria. É uma estrutura importante nos tecidos do organismo humano pois possui várias funções como auxílio na adesão e ancoragem celular, sinalização e recrutamento de células (Diller & Tabor, 2022). Aquando de um dano a nível cutâneo too um processo cascata é ativado, designado cicatrização de feridas que é constituído por quatro fases: coagulação, inflamação, proliferação e remodelação (Profyris, Tziotzios, & Do Vale, 2012), esquematizadas na figura 2.

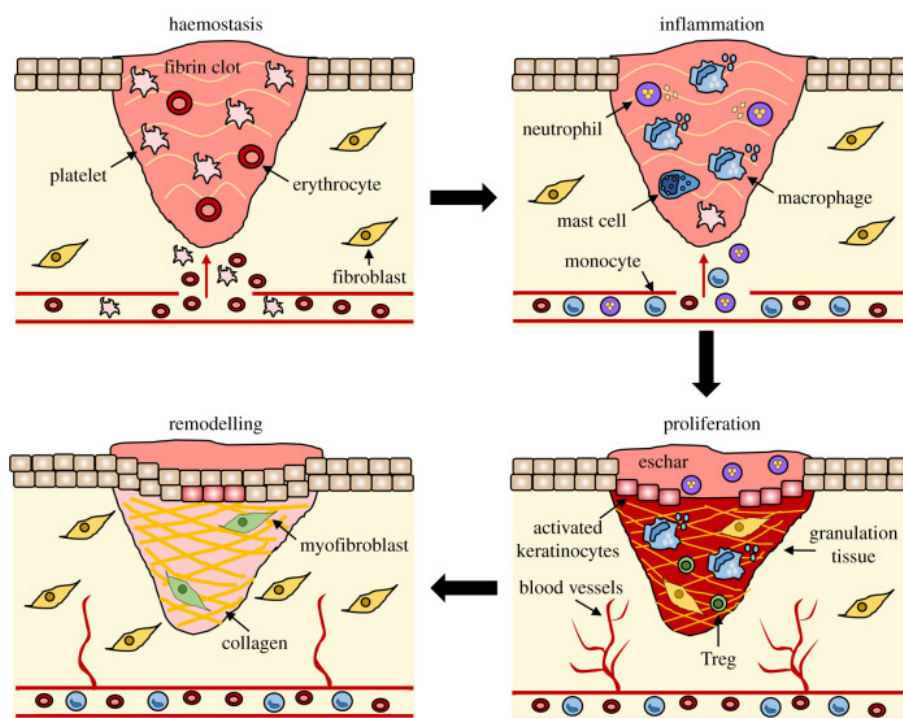


Figura 2 - Etapas do processo fisiológico de cicatrização e de feridas cutâneas. Adaptado de (Wilkinson & Hardman, 2020)

Se a lesão cutânea causar rutura da integridade epitelial da pele e alcançar a derme existe o rompimento dos vasos sanguíneos e, por sua vez, uma hemorragia o que faz

com que a prioridade principal seja a paragem da hemorragia (Profyris, Tziotzios, & Do Vale, 2012). Assim, imediatamente após a lesão, ocorre a primeira fase do processo de cicatrização das feridas cutâneas, a fase de coagulação. (Takeo, Lee, & Ito, 2015). A coagulação consiste na contração dos vasos sanguíneos danificados e agregação de trombócitos e plaquetas numa rede de fibrina (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). Forma-se, então, um tampão hemostático constituído por fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina em prol da paragem da hemorragia. As plaquetas também possuem um papel ativo na prevenção da infeção bacteriana no local da ferida. Estas expressam vários recetores toll-like (TLRs) que regulam a produção de péptidos antimicrobianos (Wang, Huang, Horng, Yeh, & Chen, 2018). Além de fornecer uma barreira contra microrganismos invasores, o coágulo sanguíneo também serve como matriz para células invasoras e como reservatório de fatores de crescimento necessários durante as etapas posteriores do processo de cicatrização (Werner & Grose, 2003). Uma vez que o coágulo é formado, o processo de coagulação já não é mais necessário, e a agregação plaquetária passa a ser inibida pela prostaciclina, a antitrombina III vai inibir a trombina e os fatores de coagulação são degradados pela proteína C reativa. As paredes dos vasos sanguíneos lesionados são reparadas por células musculares lisas e células endoteliais (Wilkinson & Hardman, 2020).

Assim que o perigo de hemorragia é diminuído, a prioridade passa a ser a remoção do tecido necrótico e a prevenção da infeção (Profyris, Tziotzios, & Do Vale, 2012). Inicia-se a segunda fase do processo de cicatrização de feridas, a fase inflamatória, sendo esta uma resposta complexa modulada por múltiplos fatores extrínsecos e intrínsecos. As respostas imunes devem ser adequadas para que seja possível uma cicatrização da lesão cutânea eficaz e rápida, pois uma resposta inflamatória excessiva e descontrolada retarda o processo, levando mais tempo para a ferida cicatrizar completamente, por outro lado, o recrutamento insuficiente das células necessárias a esta fase dificulta a reparação das lesões cutâneas. A resposta imune é iniciada por sinais que ativam as células imunes residentes como os mastócitos, neutrófilos, macrófagos, células T e células de Langerhans que se ligam a recetores para induzir as vias inflamatórias (Sorg, Tilkorn, Hager, & Mirastschijski, 2017). É uma resposta rápida que origina edema e eritema no local da lesão. Normalmente, a resposta celular é estabelecida nas primeiras 24 horas e estende-se até três dias (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016).

Os neutrófilos são as primeiras células imunológicas a entrar na zona da lesão recrutados pelos vasos sanguíneos danificados através da produção citocinas inflamatórias pelas plaquetas e células endoteliais (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). Estes desempenham um papel fundamental realizando a

desgranulação plaquetária (Miguel, 2013), produção de espécies reativas de oxigênio, atuam como agentes de limpeza através da degradação de tecido morto e fagocitam as bactérias locais de modo a fornecer um ambiente asséptico para a boa cicatrização da ferida (Wang, Huang, Horng, Yeh, & Chen, 2018).

Com a inflamação controlada, os neutrófilos são eliminados por apoptose, necrose ou fagocitose (Wilkinson & Hardman, 2020). Também os leucócitos migram juntamente com um gradiente crescente de quimiocinas até chegarem ao local da lesão (Sorg, Tilkorn, Hager, & Mirastschijski, 2017). 48 horas após o início da lesão, intensifica-se a migração de monócitos de vasos sanguíneos vizinhos para o local da lesão que se diferenciam posteriormente em macrófagos (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). Os macrófagos residentes na pele, bem como aqueles diferenciados de monócitos, são ativados por padrões moleculares específicos de patogênicos e padrões moleculares associados a danos. Ocorre a diferenciação de macrófagos em dois subconjuntos: macrófagos pró-inflamatórios e macrófagos anti-inflamatórios. Os primeiros estão associados à atividade fagocitária, eliminando neutrófilos e tecido morto, bem como a produção de mediadores pró-inflamatórios a fim de evitar mais danos ao local da ferida em fases posteriores de cicatrização. Mais tarde, os macrófagos pró-inflamatórios transformam-se em macrófagos anti-inflamatórios, que estão envolvidos na síntese de mediadores anti-inflamatórios (Sorg, Tilkorn, Hager, & Mirastschijski, 2017). Os macrófagos secretam fatores de crescimento necessários à formação de novo tecido na área danificada, conferindo-lhes um papel fundamental na transição da fase exsudativa para a fase proliferativa (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016) a fim de evitar mais danos ao local da ferida em fases posteriores de cicatrização (Sorg, Tilkorn, Hager, & Mirastschijski, 2017).

Além dessas funções de defesa, as células inflamatórias também são uma importante fonte de fatores de crescimento e citocinas, que iniciam a fase proliferativa da reparação de feridas (Werner & Grose, 2003). O objetivo da terceira etapa do processo de cicatrização de lesões cutâneas é diminuir a área do tecido danificado estabelecendo uma barreira epitelial viável para a ativação celular (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). Verifica-se uma extensa ativação e migração de diversas células como fibroblastos, queratinócitos e macrófagos, assim como células endoteliais para coordenar o fecho da ferida, a deposição da matriz extracelular e a angiogênese. Esta etapa inicia-se após os primeiros 3 dias, estendendo-se até ao vigésimo primeiro dia após o início da lesão (Wilkinson & Hardman, 2020).

Com a proliferação de fibroblastos há um aumento da síntese de colagênio com o objetivo de repor o tecido danificado (Peng-Hui, Ben-Shian, Huann-Cheng, Chang-Ching, & Yi-Jen, 2018). Forma-se um tecido de granulação para substituir o tampão

hemostático de fibrina. Este é composto por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais e é formado por mecanismos como o aumento da proliferação fibroblástica; biossíntese de colagénio que cria uma rede extracelular tridimensional de tecido conjuntivo (Wang, Huang, Horng, Yeh, & Chen, 2018).

A re-epitelização é essencial para o restabelecimento da integridade tecidual. Os queratinócitos adjacentes à borda da ferida e nos folículos pilosos sofrem desdiferenciação o que permite que migrem para superfície da ferida libertando proteínas da MEC de modo a reconstituí-la. Quando os queratinócitos das bordas opostas juntam-se, a migração termina com a formação de uma camada epitelial fina, com os queratinócitos a formar novas adesões à matriz subjacente (Profyris, Tziotzios, & Do Vale, 2012). Como a síntese de colagénio aumenta, a proliferação de fibroblastos diminui e atinge-se o equilíbrio entre a degradação e a síntese de MEC (Rodrigues, Kosaric, Bonham, & Gurtner, 2019). No sentido da restauração de toda a estrutura das camadas da pele, é necessário restaurar os vasos sanguíneos que outrora foram danificados. Esta etapa designa-se por angiogénese e ocorre na MEC através da migração e estimulação mitogénica das células endoteliais (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). Novos vasos sanguíneos são criados durante este processo para atender às necessidades metabólicas do tecido de cicatrização altamente proliferativo (Wilkinson & Hardman, 2020). A boa irrigação das bordas da ferida é essencial para a sua cicatrização, pois permite o aporte adequado de nutrientes e oxigénio (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016) (Wilkinson & Hardman, 2020).

Por último, a fase de remodelação da matriz extracelular inicia-se 3 semanas após a lesão podendo-se estender até um ano. Na pele humana existem variados tipos de colagénios que constituem uma família de proteínas que fazem parte da MEC. Todos eles desempenham um papel crucial na integridade estrutural das camadas da pele. A biossíntese de colagénio é um processo complexo envolvendo diversas etapas (Rodriguez-Pascual & Slatter, 2016). O colagénio do tipo I é o predominante em adultos. As outras proteínas, que compõem a MEC numa minoria, são a laminina, fibronectina, vitronectina e tenascina, bem como proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs) (Diller & Tabor, 2022). A composição do colagénio da pele adulta não lesionada é de aproximadamente 80% de colagénio tipo I e 10% de tipo III. Em contraste, o tecido de granulação compreende predominantemente o colagénio tipo III com apenas 10% de tipo I (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). À medida que a cicatrização progride, o colagénio tipo III é substituído pelo do tipo I, aumentando diretamente a resistência à tração da cicatriz em formação. A integridade e a arquitetura da cicatriz nunca retornam totalmente à da pele não ferida, sendo que o tecido cicatricial da ferida confere apenas até 80% da força pré-lesão (Wilkinson & Hardman, 2020).

Nesta fase é imperativo um equilíbrio preciso entre a apoptose das células existentes e a produção de novas células, ou seja, a degradação gradual da MEC, do colagénio tipo III imaturo e, posteriormente, a formação do colagénio tipo I maduro é crítico nessa fase. Qualquer aberração nesta fase pode levar à cicatrização excessiva ou ferida crónica (Wang, Huang, Horng, Yeh, & Chen, 2018). O objetivo principal da etapa é atingir a resistência à tração máxima por meio da reorganização, degradação e síntese da MEC. Nessa fase final da cicatrização da lesão, ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, sendo que este vai sendo gradualmente remodelado, formando um tecido cicatrizante com menos componentes celulares, mas que, apresenta cada vez mais uma MEC rica em fibras colagénicas (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016).

Há, então, um amadurecimento dos elementos com alterações profundas na MEC e resolução da inflamação inicial. Assim que a superfície da lesão é coberta por uma monocamada de queratinócitos, a sua migração epidérmica cessa e uma nova epiderme é restabelecida. Nesta fase, há uma deposição da matriz e posterior alteração da composição. Com o fechamento da ferida, o colagénio tipo III é degradado e a síntese de colagénio tipo I aumenta. Na fase final, as fibras colagenéas tornam-se mais espessas e são colocadas em paralelo, resultando em maior resistência à tração do tecido. Esta etapa é essencial para a restauração da funcionalidade e da aparência normal do tecido lesionado. Os fibroblastos transformam-se em miofibroblastos, células que promovem a compactação do tecido conjuntivo levando à contração da ferida diminuindo a superfície da cicatriz. A resposta angiogénica diminui, assim como o fluxo sanguíneo e a atividade metabólica da lesão (Miguel, 2013). Durante os processos de maturação e remodelação, a maioria dos vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem da área da ferida (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016). A cicatriz remodela-se no ano seguinte, tornando-se macia e ligeiramente mais clara do que a restante pele ao seu redor (Profyris, Tziotzios, & Do Vale, 2012).

Em todos os processos citados acima, é importante ressaltar que fatores exógenos e endógenos podem modular tais eventos e influenciar no processo de cicatrização, como por exemplo situações patológicas, ou agentes externos como estilos de vida não saudáveis que podem provocar o aparecimento de cicatrizes hipertróficas e queloides (Gonzalez, Costa, Andrade, & Medrado, 2016).

As lesões cutâneas agudas passam por um processo de cicatrização normal e ordenado que irá levar a uma regeneração do local afetado e assim restaurar a integridade anatómica e funcional do órgão. Já as feridas crónicas possuem várias complicações que dificultam todo o processo fisiológico de cicatrização e por isso o

tempo de reparação da ferida é distinto entre os dois tipos de feridas (Lazarus, et al., 1994).

O processo de cicatrização de uma ferida crónica caracteriza-se por uma fase inflamatória prolongada, com infeções persistentes, assim como um aumento das protéases e espécies reativas de oxigénio. Nestas feridas, os queratinócitos e os fibroblastos são caracterizados por apresentarem anormalidades no seu fenótipo, e por isso não respondem a estímulos reparadores externos. As protéases aumentam o que fazem com que haja uma maior destruição das células dérmicas e epidérmicas assim como destruição da matriz extracelular, que é também destruída pelas espécies reativas de oxigénio que são formadas. Assim, não é possível formar o tecido de granulação, nem há deposição de matriz extracelular, impedindo-se a cicatrização e regeneração da ferida (Blanco-Fernandez, Castaño, Mateos-Timoneda, Engel, & Perez-Amodio, 2021). A presença de feridas manifesta-se no doente por dor, isolamento social, internamentos prolongados, ansiedade e comorbilidades crónicas. Estas feridas que não seguem o processo padrão e fisiológico de regeneração, causam uma diminuição bastante significativa na qualidade de vida do doente, assim como aumentam a carga de custos sobre o sistema de saúde (Lindholm & Searle, 2016).

4. Enzimas LOX na Regeneração da Pele.

Compreende-se, então, que vários fatores estão envolvidos na cicatrização de feridas cutâneas e que estes podem influenciar a diferenciação celular, o seu crescimento e metabolismo. Qualquer alteração no processo normal de cicatrização modifica, também, a duração de cada etapa, podendo levar a uma cicatrização tardia ou incorreta da ferida. Muitas terapias disponíveis atualmente não podem garantir uma cura eficaz, prolongando assim o tempo de recuperação e aumentando a possibilidade de recorrência (Szauter, Cao, Boyd, & Csiszar, 2005).

Uma estratégia promissora para promover a cicatrização de feridas cutâneas é a administração de moduladores da atividade das enzimas Lisil oxidase (LOX), visto que sua expressão é conhecida por ter um impacto significativo neste processo (Szauter, Cao, Boyd, & Csiszar, 2005). As enzimas LOX constituem uma família oxidases de aminas constituída por 5 proteínas semelhantes entre si designadas LOX, LOX like-1, LOX like-2, LOX like-3 e LOX like-4 (LOXL1-4) e responsáveis pelas ligações cruzadas entre o colagénio e a elastina. Contribuindo assim para a manutenção da estabilidade da matriz extracelular assim como a funcionalidade do tecido conjuntivo (Cai, Xiong, Kong, & Xie, 2017). Estas proteínas contêm uma região C-terminal, local de ligação à molécula cobre, e uma região N-terminal que é diferente para cada proteína que determina a sua função e a sua distribuição nos tecidos (Wang, Wang, Yao, & Huang,

2022). Estas enzimas são expressas tanto a nível extracelular como intracelular, como núcleo e citoplasma (Wang, Wang, Yao, & Huang, 2022). Ao nível do organismo humano estão localizadas em vários cromossomas humanos e cada LOX é expressa a níveis diferentes em tecidos diferentes (Li, et al., 2018). As LOX são encontradas em várias partes do corpo humano como cérebro, fígado, coração, musculo esquelético (Wang, Wang, Yao, & Huang, 2022) e na pele. Na epiderme são sintetizadas pelos queratinócitos basais e cumprem funções relacionadas com a montagem e manutenção da lamina basal. Já na derme, são mais expressas pelos fibroblastos e contribuem para a síntese e estabilização do colagénio e fibras elásticas (Cai, Xiong, Kong, & Xie, 2017).

As LOX são inicialmente sintetizadas como pré-proteínas de 46 kDa pelos miofibroblastos e posteriormente pelos fibroblastos. A sequência do peptídeo N-terminal é removida no retículo endoplasmático e o domínio propeptídico é N-glicosilado no complexo de Golgi, após esse processamento intracelular, é secretada a pró-LOX, uma pró-proteína de 50 kDa onde irá ser clivada entre os resíduos Gly168 e Asp169 pela procologénio C-proteinase transformando-a na proteína ativa (Trackman, 2018). Mais tarde, a LOX ativa migra para a MEC para exercer a sua função na reticulação de proteínas extracelulares (Cai, Xiong, Kong, & Xie, 2017).

As enzimas LOX desempenham inúmeras funções no organismo humano, porém a sua função primordial é mediar as ligações cruzadas entre o colagénio e a elastina na matriz extracelular (Wang, Wang, Yao, & Huang, 2022). As LOX oxidam resíduos de peptidil-lisina (Pomilio, Ciprian Ollivier, & Vitale, 2016), através da transferência de eletrões de e para a molécula de oxigénio, realizado pelo cofator cobre (Kumari, Panda, & Pradhan, 2016), e hidroxilisina e de lisina para originar resíduos de aldeídos como o peptidil α -aminoalípico- δ -semialdeído. Posteriormente, estes aldeídos são altamente reativos e condensam com petialdeídos vizinhos e com grupos de amina de modo a formar as ligações covalentes de colagénio e lisina insolúveis (Pomilio, Ciprian Ollivier, & Vitale, 2016). No final, formam-se fibrilhas de colagénio e de elastina maduras que aumentam a resistência à tração da MEC (Li, et al., 2018) maximizando a integridade estrutural do tecido conjuntivo da pele (Wang, Wang, Yao, & Huang, 2022).

Após uma lesão, a barreira cutânea fica comprometida e é necessário a reparação da mesma o mais rapidamente possível com a participação de numerosos mediadores químicos, fatores sanguíneos e vários elementos da MEC. Assim, a MEC é destruída o que faz com que seja necessário a síntese de novos tecidos e deposição de colagénio e elastina para que a matriz seja restaurada. Para que haja uma cicatrização favorável é crucial um equilíbrio entre a degradação e a síntese dos componentes da MEC. Numa pele saudável, o colagénio do tipo I é o mais abundante, mas isso não se verifica numa lesão cutânea onde o colagénio tipo III é o colagénio predominante. Este

aumento de colagénio do tipo III é mediado pela expressão das LOX. Porém, o colagénio tipo III fornecem menos força e à medida que o processo de reparação avança é degradado e sintetizado colagénio do tipo I o que proporciona uma maior resistência mecânica. Mais importante ainda, a proporção de fibras de colagénio I para colagénio do tipo III e seu grau de arquitetura maturada influenciam significativamente a rapidez da remodelação do tecido e a força resultante da ferida recém-formada (Cai, Xiong, Kong, & Xie, 2017). A diferença na cicatrização entre os vários tipos de feridas, agudas ou crónicas, é resultado das diferenças na matriz extracelular, ou seja, a acumulação de colagénio, contração da cicatriz e reticulação excessiva de colagénio (Brasselet, et al., 2005).

Cada uma das enzimas LOX desempenha um papel significativo no processo de cicatrização. A LOXL-1 localiza-se especificamente nos locais de elastogénese e serve como um elemento do andaime para garantir a deposição espacialmente definida e a homeostase das elastinas. A LOXL-2 funciona para a formação de ligações cruzadas derivadas da lisina e desempenha um papel funcional na manutenção da integridade estrutural dos tecidos conjuntivos. A ligação cruzada do colagénio é mediada pela LOXL-3 e está associada à remodelação da MEC cardíaca. E a LOXL-4, o último membro da família LOX, também funciona como uma amina oxidase como outros membros da família para promover a formação de ligações cruzadas derivadas da lisina (Laczko & Csiszar, 2020).

Como uma parte importante da resposta imune inata, a inflamação aguda é a resposta inicial à lesão. Até certo ponto, a própria inflamação aguda serve como uma ferramenta para os tecidos manterem a integridade mecânica da MEC e retornar o tecido danificado a um estado normal. Várias citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, moléculas de adesão e células estão em estreita cooperação entre si, modulando assim as respostas das LOXs e outros constituintes da MEC e, conseqüentemente, estimulando a regeneração da MEC. Assim, as LOXs são reguladas por esses componentes e desempenham um papel essencial no período inicial da resposta cicatricial, ou seja, na fase inflamatória (Liburkin-Dan, Toledano, & Neufeld, 2022). Na terceira fase do processo de cicatrização, como já foi discutido, forma-se o tecido de granulação, sintetizado pelos queratinócitos em conjunto com os fibroblastos. Uma vez no centro da ferida, os fibroblastos começam a produzir colagénio, bem como outros componentes da MEC para desenvolver um tecido fibroso. A rigidez, integridade e resistência do tecido de granulação aumenta durante este processo. Eventualmente, o tecido de granulação anterior é substituído e a transição é alcançada com sucesso juntamente com a reticulação de colagénios. As LOX estão envolvidas na maturação do tecido de granulação (Yang, Cao, Yin, Zhou, & Mao, 2020).

Quando o tecido de granulação contém MEC suficiente, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos que estão repletos de feixes de actina ao longo da face citoplasmática da membrana plasmática e têm grandes habilidades migratórias e contráteis. Mediada por ligações cruzadas entre colagénio e elastina, dá-se um processo fisiológico designado de contração da ferida onde há uma diminuição da espessura da ferida, levando ao fechamento total da mesma. Esta contração é, efetivamente, dependente das enzimas LOX e por isto, estas desempenham um papel crucial na remodelação construtiva do processo de regeneração de feridas cutâneas (Lin, Xu, & Li, 2020). Nesta fase de remodelação tecidual, há grandes alterações a nível dos componentes estruturais da MEC proteínas danificadas ou velhas quebram-se e novas proteínas são sintetizadas neste processo, ocorrendo o equilíbrio entre a degradação e síntese de componentes. Em grande parte, a rede de colagénio é estabilizada por meio de reações cruzadas dependente das LOXs. Portanto, são intermediários críticos responsáveis pela remodelação durante o processo de cicatrização (Cai, Xiong, Kong, & Xie, 2017). Assim, as enzimas LOX atuam como moléculas integrantes nas reações de ligações cruzadas de colagénio e elastina, ligações essas que determinam as propriedades mecânicas da matriz extracelular e dos tecidos conjuntivos. Portanto, a desregulação da expressão ou atividade das enzimas LOX pode estar na base do aparecimento e progressão de múltiplas patologias que afetam o tecido conjuntivo, como processos fibróticos, progressão tumoral, e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Kumari, Panda, & Pradhan, 2016).

5. Impacto das Feridas na Saúde Humana e no Sistema de Saúde

Feridas cutâneas têm um impacto socioeconómico bastante importante nos países desenvolvidos assim como na qualidade de vida dos indivíduos (Blanco-Fernandez, Castaño, Mateos-Timoneda, Engel, & Perez-Amodio, 2021). Estima-se que 2 milhões de europeus sofrem de lesões cutâneas agudas ou crónicas. Estas feridas são normalmente tratadas em hospitais assim como em cuidados de saúde comunitários, como farmácias e centros de saúde, e o seu tratamento constitui uma parte muito importante no orçamento total gasto em saúde. Estima-se que o custo total no tratamento de feridas é 3% de todas as despesas de saúde (Lindholm & Searle, 2016).

No Reino Unido, foram realizados estudos em hospitais, assim como em locais de cuidados de saúde comunitários, como farmácias comunitárias e hospitalares, onde se observou que a prevalência de doentes com, pelo menos, uma ferida aguda ou crónica foi de 3,7 por 1.000 habitantes. Deste mesmo estudo, 79% dos doentes foram tratados em farmácias ou cuidados domiciliários e 21% no hospital. Assim, o custo do

tratamento de feridas foi estimado em 2,5–3,1 milhões de dólares por 100.000 habitantes. Em Portugal, foi realizado um estudo no ano de 2004 e de 2005 numa amostra de 148 centros de saúde, onde foram identificados 1.115 pacientes com feridas cujo tratamento foi realizado em casa ou em farmácias. Já os estudos nos Estados Unidos afirmam que as lesões cutâneas afetam cerca de 8,2 milhões de indivíduos e o custo anual é de 28 mil milhões na moeda americana. Incluindo os diagnósticos secundários, o custo anual do tratamento de feridas cutâneas pode variar entre os 31,7 mil milhões e os 96,8 mil milhões de dólares, assim como o custo anual para tratamentos realizados em ambientes ambulatoriais é de 32 mil milhões de dólares (Nussbaum , et al., 2017).

Independentemente da etiologia da ferida e dos fatores intrínsecos, como, por exemplo, idade ou comorbilidades individuais, levam a diversas consequências na saúde do paciente sejam físicas, sociais ou mentais. Desta forma, têm um grande impacto na qualidade de vida do doente, sendo um assunto relevante e que muitas vezes é negligenciado (Lindholm & Searle, 2016). Um bom cuidado de feridas é importante para evitar contaminações bacterianas, o que inibe o processo normal de cicatrização e, por consequência, impede o fecho da ferida. As feridas que não conseguem cicatrizar no tempo normal têm maior risco de complicações como perda de função do indivíduo, perda de qualidade de vida do mesmo e podem levar a morte. As complicações associadas a uma má cicatrização de feridas estão associadas a um tratamento mais intensivo e longo, assim como internamentos prolongados, intervenções cirúrgicas que, por sua vez, leva a um aumento das despesas tanto para o doente e para o setor da saúde (Posnett, Gottrup, Lundgren, & Saal, 2009). No sentido de aumentar a qualidade de vida do paciente reduzindo, ao mesmo tempo, os custos totais dos tratamentos destas feridas, é necessário reduzir o tempo de cicatrização das mesmas com tratamentos mais eficazes, aumentar a frequência de troca do material de penso e limpeza da área afetada para ajudar a prevenir complicações (Lindholm & Searle, 2016).

Para além disto, pensa-se também que o custo na gestão e tratamento das feridas cutâneas é apenas uma pequena percentagem do custo total e por isso é necessário incluir custos adicionais como custos relacionados com o material que é utilizado no auxílio da cura como por exemplo, pensos ou antissépticos. No entanto, a maior parte do custo é despendido no tempo dos profissionais de saúde, assim como nos internamentos mais prolongados associados ao aparecimento de feridas crónicas nos doentes. (Blanco-Fernandez , Castaño, Mateos-Timoneda, Engel, & Perez-Amodio, 2021). Assim, de modo a reduzir, efetivamente e de forma eficaz, os gastos totais do sistema de saúde com o tratamento de feridas é necessário um foco na otimização do

tratamento de feridas com medicamentos mais específicos e mais eficazes de modo a reduzir o tempo de cura das feridas (Nussbaum, et al., 2017).

6. Compostos Inibidores das LOX.

De modo a otimizar tratamentos para maximizar a cura das feridas cutâneas, e tendo em conta que as enzimas LOX estão envolvidas no processo fisiológico da regeneração de feridas cutâneas, foram desenvolvidos e estudados vários compostos inibidores destas enzimas para perceber qual o seu papel aquando da modulação das enzimas e qual o seu efeito na cicatrização de feridas (Wang, Wang, Yao, & Huang, 2022).

Ao longo dos séculos, plantas e produtos naturais derivados de plantas têm sido a base da medicina tradicional. Atualmente, os medicamentos à base de plantas têm desempenhado um papel importante na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Eles também são amplamente empregados em várias práticas de saúde pública, pois são seguros, econômicos e possuem diversidade química única (Ntungwe, et al., 2021).

Como já foi referido, as enzimas LOX desempenham um papel fundamental no processo de regeneração da pele (Wang, Wang, Yao, & Huang, 2022) catalisando a ligação cruzada entre colagénio e elastina facilitando o processo de migração celular no processo de cicatrização de feridas. Há compostos que inibem a atividade destas enzimas fisiologicamente e que interrompem a formação das ligações cruzadas entre os dois componentes da MEC impedindo a migração celular, comprometendo a cicatrização de feridas (Ferreira, Saraiva, Rijo, & Fernandes, 2021). São modeladores das mesmas e têm um efeito importante na regeneração de tecido conjuntivo mais especialmente em feridas cutâneas (Miana, et al., 2015). Neste trabalho foram utilizados três compostos com atividade inibidora das enzimas LOX.

- Beta-Aminopropionitrila (BAPN)

O composto β -aminopropionitrila (BAPN, figura 3), é um composto orgânico com grupos funcionais amina e nitrilo. Foi extraído, pela primeira vez, da ervilha-de-cheiro, da planta *Lathyrus* (H., 2004-2018). Este composto foi o primeiro a ser descrito como um inibidor das enzimas LOX. O BAPN é um inibidor inespecífico das LOX, podendo inibir qualquer uma das amina oxidases, interrompendo a ligação cruzada entre colágeno e elastina (Sawada, Beckner, Ito, Daugherty, & Lu, 2022).

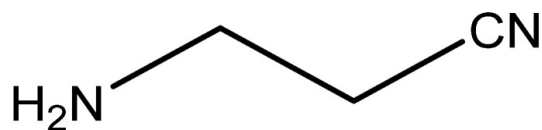


Figura 3 - Estrutura química do composto inibidor das enzimas LOX, β -aminopropionitrila (BAPN). Adaptado de (Ferreira, Saraiva, Rijo, & Fernandes, 2021).

O seu mecanismo de ação passa pela ligação covalente à enzima inibindo-a especificamente. Após esta ligação entre o BAPN e a enzima, o cobre não é alterado na enzima e o BAPN não é processado num aldeído livre. Estes dois formam um complexo irreversível a partir de um entre um nucleófilo enzimático e uma cetenimina formada a partir de BAPN (Ferreira, Saraiva, Rijo, & Fernandes, 2021). Assim, o BAPN inibe a reticulação entre a elastina e o colagénio impedindo a maturação destes dois componentes da matriz extracelular da pele (Zheng, Rong, Ye, Lu, & Wang, 2020).

- 8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone (EPCU)

Plectranthus L'Herit é uma planta da família *Lamiaceae* que tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional devido aos seus diterpenos e triterpenos bioativos que são, posteriormente, extraídos da mesma e que têm um amplo interesse em medicina. A maior parte das plantas desta família são rasteiras, semi-suculentas ou arbustos e os seus caules raízes e folhas são utilizados para a extração de compostos com vista ao tratamento de várias doenças (Ntungwe, et al., 2021). A partir da *Plectranthus*, é extraído o composto 8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone (EPCU), composto natural, diterpenoide do tipo abietano que possui atividade anti tumoral, antifúngica e inseticida (Abdissa, Frese, & Sewald, 2017). A atividade inibidora da LOXL2 deste composto foi determinada por um dos membros do nosso grupo (não publicado).

- 7,15-isopimaradien-19-ol (PN1)

Este composto é um diterpeno tricíclico de esqueleto abietano (Ferreira, Saraiva, Rijo, & Fernandes, 2021) que pode ser extraído várias plantas como *Lamiaceae* (*Aeollanthrus rydingianus*). (Miana, et al., 2015). Atualmente, os diterpenóides do tipo pimarano possuem um interesse científico e terapêutico significativo devido a várias atividades biológicas relatadas, como anti tumoral, atividade anti-inflamatória e analgésica e como um inibidor da proteína tirosina fosfatase (Isca V. , et al., 2020). A atividade inibidora da LOXL2 deste composto foi determinada por um dos membros do nosso grupo (não publicado).

7. Objetivo

A função de barreira da pele é talvez a mais importante para a proteção do corpo humano (VanPutte, Regan, & Russo, 2014). Uma ferida cutânea é definida como uma interrupção da estrutura anatômica normal das camadas da pele que resulta numa lesão simples da integridade epitelial da pele ou numa mais profunda envolvendo o tecido subcutâneo, estendendo-se a tendões, músculos, vasos, nervos e ossos (Ruggeri, et al., 2020). O processo fisiológico de cicatrização de feridas que é normalmente rápido e eficaz, porém dependente do tipo de ferida. É considerado um processo dinâmico e complexo, uma cascata de etapas e eventos rigorosamente coordenados em prol da manutenção do sistema tegumentar do ser humano a fim de o proteger de todos os agentes estranhos externos (Diller & Tabor, 2022).

As feridas têm um impacto negativo na qualidade de vida do doente que as acarreta pois causam mau estar, dor, incapacidade de andar, possuem impactos negativos a nível social por isso tem efeitos desagradáveis a nível da saúde física e mental do doente (Ruggeri, et al., 2020)

O processo inadequado de cicatrização de feridas é muitas vezes a causa de muitas complicações funcionais e problemas estéticos, e as terapias tradicionais muitas vezes acabam por ter uma eficácia limitada no tratamento. (Rosinczuk, Taradaj, Dymarek, & Sopol, 2016). Embora estejam disponíveis várias opções de tratamento e prevenção como, por exemplo, curativos convencionais e avançados, implantes até enxertos de pele, nenhuma delas é geralmente reconhecido como um tratamento eficaz a longo prazo. Neste contexto, surge a necessidade de terapias eficazes, capazes de otimizar o tempo de cicatrização da ferida e conseqüentemente melhorar a qualidade de vida da população (Ruggeri, et al., 2020). Uma estratégia promissora para promover a cicatrização de feridas cutâneas poderá passar pela administração de moduladores da atividade das enzimas LOX, visto que sua expressão é conhecida por ter um impacto significativo neste processo (Szauter, Cao, Boyd, & Csiszar, 2005) e assim é importante perceber qual o impacto da modulação da atividade destas enzimas (Brasselet, et al., 2005).

Deste modo, a presente dissertação teve como principal objetivo estudar o impacto de compostos selecionados, com atividade inibidora das enzimas LOX, na migração coletiva de queratinócitos, e posterior desenvolvimento de nanoformulações para aplicação cutânea, tendo em vista a otimização do processo de cicatrização de feridas cutâneas, contribuindo para melhoria de problemas relacionados com estas e podendo aumentar a qualidade de vida do paciente.

Capítulo II – Modulação da atividade dos compostos inibidores das LOX e migração celular

1. Materiais e Métodos

1.1. Reagentes

O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) e o soro fetal bovino foram ambos adquiridos à Biowest (Nuaille, França). A tripsina, a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e o PBS foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

1.2. Cultura Celular

As células utilizadas na presente investigação foram as células HaCaT, uma linha celular de queratinócitos humanos imortalizados (Blanchard, Pich, & Hohl, 2022). Estas desempenham um papel crucial na regeneração do tecido epidérmico, uma vez que possuem características semelhantes às dos queratinócitos epidérmicos. Assim, esta linha celular pode ser explorada como um modelo *in vitro* (García, et al., 2010).

As células HaCaT, foram cultivadas em meio de cultura completo composto por meio DMEM com 4,5 g / L de glicose e 2 mM de L-glutamina, e suplementado com 10% de soro fetal bovino e pen-strep (CLS Product Information: HaCaT).

1.3. Processo de Cultura de Células

As células HaCaT foram incubadas em fracos que permitiam a proliferação das mesmas até a sua confluência desejada. De forma a perpetuar a utilização da linha celular escolhida, foi necessário passar as células para outros fracos para as mesmas proliferarem. Assim, a passagem celular foi realizada numa camara de fluxo laminar. Após a desinfeção, com álcool, de todo o local de trabalho assim como do material necessário ao processo, abriu-se o frasco T₇₅ e destacaram-se as células com recurso a tripsina, que foi de seguida inativada usado meio completo. Posteriormente, armazenou-se o frasco com as células numa estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e atmosfera húmida.

1.4. Contagem Celular

De modo a efetuar a contagem das células pipetou-se 10 µL de meio com as células HaCaT para uma câmara de Neubauer. Com recurso a um microscópico ótico, na objetiva de 10x, procedeu-se à contagem das mesmas. A contagem foi feita em 3

quadrantes da câmara de Neubauer, no final calculou-se a média e multiplicou-se o valor por 10^4 , o que resulta no número de células por mL.

1.5. Compostos

Foram utilizados três compostos neste ensaio. Os compostos $8\alpha,9\alpha$ -epoxycoleon-U-quinone (EPCU), 7,15-isopimaradien-19-ol (PN1) foram extraídos e sintetizados no laboratório CBIOS da Universidade Lusófona enquanto o composto beta-aminopropionitrila (BAPN) foi adquirido à Sigma.

1.6. Ensaio de risco

O ensaio de risco, também designado por ensaio de cicatrização de feridas monitorizado por microscopia ótica, é um ensaio simples (Jonkman, et al., 2014) utilizado para avaliar a migração celular coletiva aquando da necessidade da avaliação da bioatividade de compostos (De Ieso & Pei, 2018).

Neste ensaio, feito em ambiente estéril numa câmara de fluxo laminar vertical, foram colocados 2×10^5 células HaCaT por mL de meio apropriado ao crescimento das mesmas numa placa de 12 poços (De Ieso & Pei, 2018). Em cada um dos poços foi criada uma área livre de células através da remoção de uma monocamada das mesmas por exclusão física (Jonkman, et al., 2014). A lacuna foi criada com a ponta de uma micropipeta de modo a criar um ambiente com condições semelhantes a uma ferida cutânea. Nesta etapa, e apesar da simplicidade do método, é necessário um rigor associado para que, posteriormente, as conclusões dele retiradas sejam as mais fidedignas possíveis o que faz com que seja necessária uma força linear e rigorosa aquando da criação dos riscos em cada um dos poços para que todas as feridas sejam as mais lineares possíveis, finas e sem detritos celulares (Jonkman, et al., 2014).

Após a lavagem das células com PBS para retirar as que ficaram em suspensão, adicionou-se o meio DMEM, adequado ao crescimento dos queratinócitos, mas desta vez com apenas 2% de FBS para reduzir a proliferação celular em conjunto com 50 μ l de compostos selecionados em cada poço, BAPN 200 nM, BAPN 500 nM, EPCU 5 nM, 10 nM, 20 nM e 50 nM, PN1 50 nM, 100 nM, 150 nM e 200 nM, sendo que num dos poços foi adicionado DMSO 10% e noutro PBS apenas, constituindo os controlos. Estas concentrações foram avaliadas por membros do laboratório CBIOS da Universidade Lusófona para perceber qual o seu impacto na viabilidade das células HaCaT, pelo que foram utilizadas apenas concentrações que não reduziam significativamente a viabilidade celular. Os compostos possuíam um IC50 de inibição da LOXL2 de 200 μ M para o

composto BAPN, 66,25 μM para EPCU e 174,40 μM para PN1. Estes valores foram obtidos por um outro membro do nosso grupo.

A migração coletiva dos queratinócitos imortalizados foi monitorizada através do microscópio ótico invertido com camara acoplada (Olympus, CKX41) durante um dia e fotografias foram tiradas às 0, 5, 8 e 24 horas para análise posterior. A avaliação da migração celular é feita através da análise das fotografias de cada poço. Em cada fotografia tirada foi medida, por 3 vezes, a largura da área livre de células, calculou-se a média dessas três medições e posteriormente realizou-se uma análise estatística comparando a sua percentagem de fecho. A percentagem de fecho de ferida foi obtida através do cálculo às 0 horas sendo que a percentagem a esta hora é de 0% (100 % de ferida aberta) e através de uma regra de três simples conseguiu-se obter a percentagem de fecho da ferida nas restantes horas registadas.

2. Resultados e Discussão

Para a avaliação da migração celular, foram escolhidos três compostos, BAPN, EPCU e PN1, que têm como função a inibição das enzimas LOX. Foram realizados 3 ensaios de risco para esta avaliação.

A percentagem do fecho de ferida foi calculada no final do ensaio de risco com recurso a um microscópio equipado com camara digital para tirar fotografias com o auxílio do software IC Capture 2.5. e as imagens foram, posteriormente, analisadas através do software Fiji (ImageJ) (Rasband, 1997-2018).

- Impacto do BAPN na Migração Celular

O impacto do composto BAPN na modulação da atividade das enzimas LOX já tinha sido alvo de estudo até mesmo para outros fins como por exemplo na inibição destas enzimas para impedir a angiogénese e a migração de células cancerígenas (Shi, et al., 2018). Por esta razão, foi interessante estudar o impacto deste, e de outros compostos inibidores destas enzimas, na migração celular coletiva dos queratinócitos.

A figura 4 representa os resultados da evolução da migração coletiva de queratinócitos, em termos de médias e desvios padrão, dos poços que contêm PBS (controlo positivo) e BAPN a concentrações 200 nM e 500 nM. No painel A da figura 4, é possível verificar que o fecho de ferida vai aumentando à medida que o tempo aumenta, sendo visível um quase total fecho da área livre de células quando comparado as fotografias das 0 h com as das 30 h, no final do ensaio. O poço que continha o composto BAPN a uma concentração mais reduzida apresenta um fecho da ferida mais acentuado quando comparando com as outras duas situações. Analisando o gráfico do painel B da

mesma figura, de forma geral, podemos confirmar que a migração das células HaCaT possui um comportamento linear ao longo do tempo, ou seja, quanto maior é o tempo (h) maior é a percentagem de fecho de ferida.

Comparando as colunas correspondentes aos poços que contem o composto BAPN a concentrações diferentes, o poço cuja contração de BAPN é mais reduzida apresenta uma maior percentagem de fecho de ferida ao longo de todo o ensaio. No final do ensaio, às 30 h, o poço com BAPN a uma concentração mais reduzida apresenta 80% de fecho de ferida em comparação com aproximadamente 60% de fecho de ferida do poço contendo BAPN a concentrações mais elevadas. Comparando o poço com BAPN com o poço que constitui o controlo positivo, apresentam uma diferença relativa de fecho de ferida, porém não significativa. Não significativo também são as diferenças de fecho de ferida do controlo positivo em comparação com o BAPN a 500 nM. Como é possível de verificar, às 30 h, ambas as colunas apresentam percentagens de fecho de ferida muito semelhantes, aproximadamente 60%.

Assim, apesar de ser complexo encontrar uma linearidade sobre a modulação deste composto na migração celular, o BAPN a concentrações mais baixas parece ter uma atividade promotora da migração celular numa fase inicial da migração, uma vez que nessas condições a alteração observada é estatisticamente significativa.

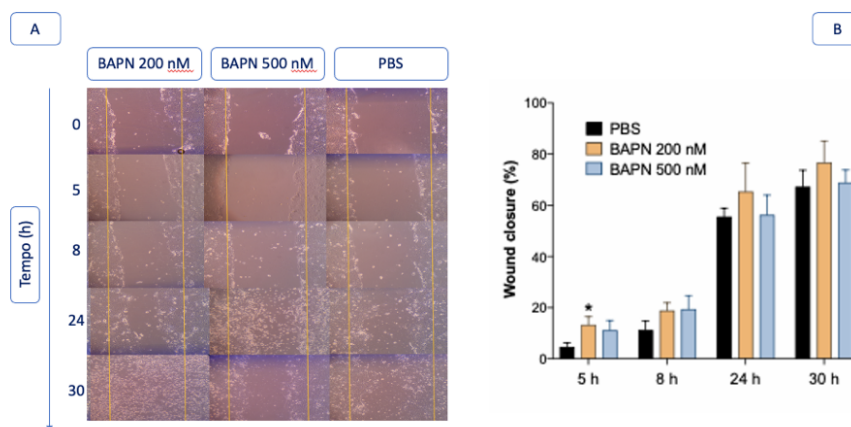


Figura 4 - Avaliação da migração celular coletiva das células HaCat quando utilizado PBS, BAPN 200 nM e BAPN 500 nM. As células HaCaT foram semeadas numa placa de 12 poços. Num dos poços foi adicionado PBS, que constituía o controlo positivo, noutros dois poços adicionaram-se o composto BAPN a diferentes concentrações. Criaram-se 2 riscos em cada poço para avaliar a migração celular coletiva. A migração foi avaliada com o auxílio do software Fiji (imageJ) fotografando cada poço após 0 h, 5 h, 8 h, 24 h e 30 h após a adição dos compostos (A). A percentagem de fecho de ferida é representada no gráfico (B) comparando os dois compostos com o controlo ao mesmo tempo (h). Os dados são apresentados como médias dos dois riscos com o respetivo desvio padrão e a análise estatística foi feita pelo teste T-Student e o nível de significância para os testes entre amostras é $*p < 0,05$.

- Impacto do EPCU na Migração Celular

Relativamente à figura 5, estão demonstrados os resultados relativos à utilização do composto EPCU na migração celular. Analisando visualmente as fotografias capturadas de cada poço ao longo do ensaio, painel A da figura 5, é notório o fecho da lacuna criada quando comparadas as fotografias de todos os poços às 0 h e no final do ensaio às 30 h. mais uma vez verifica-se, então, linearidade na migração celular coletiva, que aumenta com o aumento do tempo do ensaio. Adicionalmente, verifica-se um total fecho de ferida nos poços do controlo negativo e no poço onde se adicionou o composto EPCU a 5 nM.

No painel B, está representada a análise estatística dos resultados da migração celular aquando da utilização do composto EPCU. Percebe-se que a percentagem de fecho da ferida do poço que contem o composto EPCU a 5 nM é sempre maior em relação à migração das células dos outros poços, que contêm o mesmo composto em concentrações mais elevadas. Comparando a migração do poço com EPCU a 5 nM com o poço com veículo (DMSO a 10%), verifica-se uma diferença de fecho de ferida significativo ($*p < 0,05$) o que leva a concluir que este composto a estas concentrações tem um impacto positivo na migração das células HaCaT. A concentrações mais elevadas, a 10 nM e 20 nM, esta tendência não se mantém. É importante realçar que o composto EPCU a uma concentração de 50 nM não obteve resultados válidos pois a percentagem de fecho da ferida reflete um efeito negativo ao nível da morfologia celular. No final do ensaio, o poço com esta concentração de EPCU apresentava células mais destacadas e com uma morfologia mais esférica. Isto sugere que houve morte celular impedindo a migração e posterior fecho da ferida e por isso não foi utilizado para a estatística.

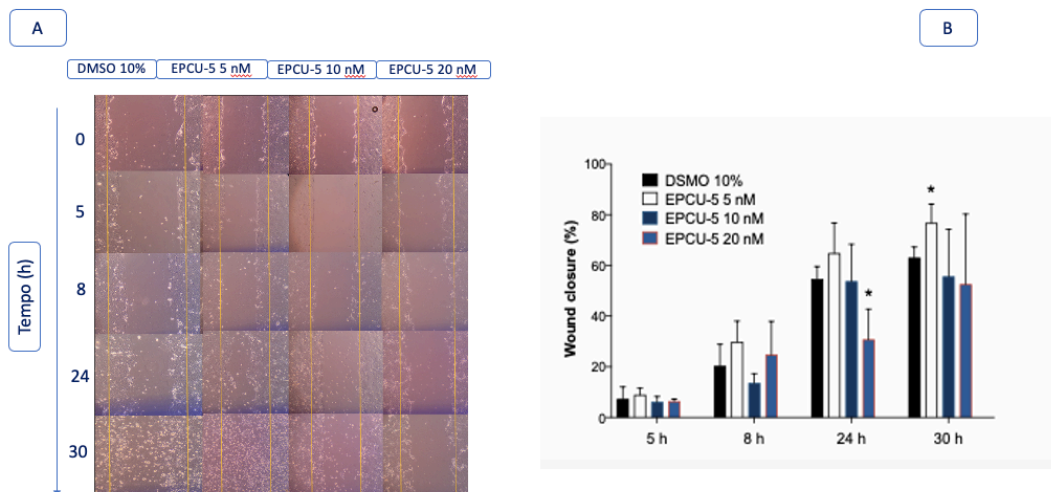


Figura 5 - Avaliação da migração celular coletiva das células HaCaT quando utilizado DMSO 10%, EPCU 5 mM, EPCU 10 nM e EPCU 20 nM. As células HaCaT foram semeadas numa placa de 12 poços. Num dos poços foi adicionado DMSO 10%, que constituía o controlo negativo, noutros três poços adicionou-se o composto EPCU a diferentes concentrações. Criaram-se 2 riscos em cada poço para avaliar a migração celular coletiva. A migração foi avaliada com o auxílio do software Fiji (imageJ) fotografando cada poço após 0 h, 5 h, 8 h, 24 h e 30 h após a adição dos compostos (A). A percentagem de fecho de ferida é representada no gráfico (B) comparando os dois compostos com o controlo ao mesmo tempo (h). Os dados são apresentados como médias dos dois riscos com o respetivo desvio padrão e a análise estatística foi feita pelo teste T-Student e o nível de significância para os testes entre amostras é * $p < 0,05$.

- Impacto do PN1 na Migração Celular

Por último, a figura 6 inclui os resultados referentes ao impacto do composto PN1 na migração celular utilizando concentrações de 50 nM, 100 nM, 150 nM e 200 nM. Analisando o painel A da figura 6, verifica-se que o fecho de ferida, foi mais acentuado nos poços com DMSO 10%, controlo negativo, e no poço com concentrações mais baixas do composto em questão. Nos outros poços, o fecho de ferida não é tao acentuado e a diferença, visualmente, não é significativa. Esta teoria pode-se confirmar através da análise estatística representada no painel B da figura 5 onde a relação entre a percentagem de fecho de ferida e o aumento do tempo (h) não é linear pelo que a utilização de um composto é inconclusiva no que toca à modulação da proliferação e migração coletiva de queratinócitos. Nenhuma das alterações observadas é estatisticamente significativa.

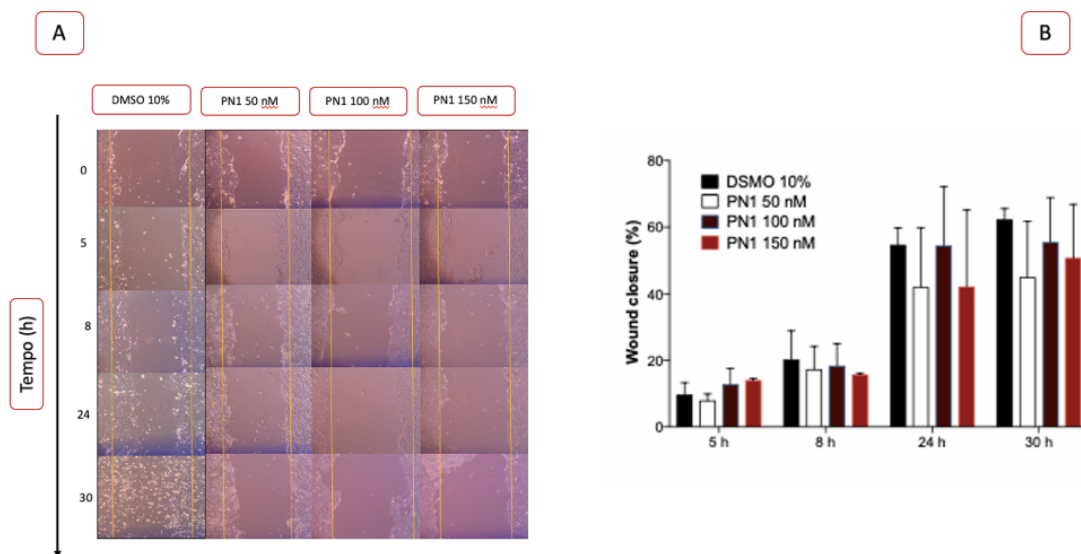


Figura 6 - Avaliação da migração celular coletiva das células HaCaT quando utilizado DMSO 10%, PN1 50 mM, PN1 100 nM e PN1 150 nM. As células HaCat foram semeadas numa placa de 12 poços. Num dos poços foi adicionado DMSO 10%, que constituía o controlo negativo, noutros três poço adicionou-se o composto PN1 a diferentes concentrações. Criaram-se 2 riscos em cada poço para avaliar a migração celular coletiva. A migração foi avaliada com o auxílio do software Fiji (imageJ) fotografando cada poço após 0 h, 5 h, 8 h, 24 h e 30 h após a adição dos compostos (A). A percentagem de fecho de ferida é representada no gráfico (B) comparando os dois compostos com o controlo ao mesmo tempo (h). Os dados são apresentados como médias dos dois riscos com o respetivo desvio padrão e a análise estatística foi feita pelo teste T-student e o nível de significância para os testes entre amostras é $*p < 0,05$.

O objetivo deste ensaio é avaliar o impacto que compostos naturais têm na proliferação e migração de queratinócitos. Os resultados da inibição das enzimas LOX na migração de queratinócitos não são conclusivos. Em termos de inibição das enzimas através do composto EPCU, a concentração mais reduzida (EPCU 5 nM) aumenta a migração coletiva dos queratinócitos quando comparada com o controlo negativo como seria de esperar tendo em conta o que está descrito para a atividade da LOXL2 (Ferreira, Saraiva, Rijo, & Fernandes, 2021). Porém este padrão não se repete quando da utilização de concentrações mais elevadas levando a uma diminuição da migração e que, em concentrações mais elevadas provoca toxicidade. Já o composto PN1 não parece ter qualquer impacto na migração celular. À medida que a concentração aumenta pode-se verificar uma maior percentagem de fecho da ferida podendo concluir que concentrações mais elevadas deste composto têm uma ação estimulante da migração de queratinócitos pela inibição das enzimas LOX. No entanto, estas conclusões não são significativas pois, quando comparado com o controlo negativo,

este aumento não é assim tao grande pelo que aquando da utilização de DMSO 10% o aumento da migração é maior, resultando numa percentagem de ferida maior no final do ensaio. Quando utilizado o composto BAPN, conclusões são ainda mais complexas já que, quando utilizado numa concentração mais reduzida, a inibição das enzimas LOX proporciona um aumento da migração celular. Tendo em conta o que está descrito para o impacto deste composto relativamente à migração celular, sabe-se que a inibição das enzimas LOX utilizando o composto BAPN leva a uma diminuição da migração de células endoteliais quando estudado para avaliar o seu impacto noutras doenças como, por exemplo, vários tipos de cancro (Ferreira, Saraiva, Rijo, & Fernandes, 2021). No cancro, as LOX são reguladas positivamente e, por esta razão, estas enzimas estão envolvidas na proliferação de células cancerígenas, estimulando-as (Shi, et al., 2018). Nestes estudos o BAPN demonstrou ter um efeito contrário ao que se verificou nesta dissertação, ao usar o BAPN como inibidor das enzimas LOX verificou-se uma diminuição da migração celular coletiva (Liu, et al., 2022).

Existem vários fatores podem danificar ou comprometer a integridade da barreira cutânea. Quando isso acontece aquilo que o consumidor pretende é encontrar algo que seja eficaz e seguro, ou seja, uma formulação capaz de aumentar a regeneração da pele mais rapidamente minimizando o tempo gasto para curar a lesão cutânea, diminuindo os custos com a mesma e desta forma melhorar a qualidade de vida do paciente. Tendo isto em conta, e com o conhecimento adquirido através deste projeto, uma formulação ideal seria uma que tivesse na sua constituição substâncias ativas ou compostos orgânicos que aumentassem a proliferação celular e regeneração das lesões cutâneas em tempos otimizados.

Sendo assim, o composto com melhores resultados foi o EPCU nas concentrações 5 nM. Este inibidor das enzimas LOX conseguiu atingir uma média de percentagem de fecho de ferida elevada quando comparada com a percentagem de fecho de ferida do controlo. O composto BAPN também proporciona um aumento da migração celular coletiva possivelmente através da inibição das enzimas LOX, à semelhança do composto EPCU em concentrações mais reduzidas. Desta forma, percebe-se que inibir as enzimas LOX poderá ter efeitos positivos na regeneração de feridas, otimizando o tempo de cura das mesmas por um aumento da migração de queratinócitos. Desta forma, o composto escolhido para possível introdução do mesmo em formulações para a regeneração da pele seria o EPCU, mais especificamente a concentrações mais reduzidas e BAPN no mesmo padrão.

Outros trabalhos anteriores avaliavam a atividade de compostos, diferentes dos que foram utilizados neste estudo, ou fármacos inibidores das enzimas LOX. Nestes estudos ao invés de utilizarem células HaCaT em feridas cutâneas, utilizavam células

tumorais para avaliar qual o impacto da inibição das enzimas LOX na migração das células tumorais em cancros (Da-Costa-Rocha, 2021). De forma semelhante a análise feita aqui também avalia semelhança a este projeto, estes estudos também utilizavam o método de ensaio de risco para avaliar a migração celular coletiva (Zhao, et al., 2020). Os autores concluíram que os compostos tinham eficácia a inibir as enzimas LOX. Ao contrário deste trabalho, a inibição das LOX levou a uma diminuição da migração celular. Isto sugere que diferentes compostos têm diferentes impactos nas enzimas LOX, pode inibir as enzimas ou aumentar a sua expressão. Ambas as consequências são benéficas dependendo do objetivo do estudo. No caso dos estudos encontrados, a diminuição da migração das celular coletiva é benéfico pois há uma diminuição da proliferação do cancro, reduzindo as metástases, porém neste projeto, um aumento da proliferação dos queratinócitos provocada pela inibição das enzimas LOX é benéfico pois aumenta a capacidade de cicatrização da pele o que leva a uma otimização do tempo de cura das lesões cutâneas que é, efetivamente, o que se pretendia com o uso dos compostos inibidores das LOX, neste caso (Xia, et al., 2021).

O rigor na execução dos riscos em cada um dos poços é extremamente importante. Riscos com tamanhos diferentes levam a que o tempo de fecho de ferida não seja tao regular e seja maior. Riscos maiores levam mais tempo a fechar ao contrário de riscos mais finos. Assim, mais estudos devem ser realizados para que as conclusões sejam mais rigorosas e fidedignas.

Capítulo III - Desenvolvimento de Nanoformulações e Posterior Aplicação Cutânea

1. Contextualização Teórica

1.1. Administração Cutânea

Apesar de ser um órgão principalmente vocacionado para a função de barreira, muitos profissionais de saúde na indústria farmacêutica tentam encontrar estratégias para a administração segura e eficaz de fármacos através da pele (Wester & Maibach, 1983).

A utilização da via transcutânea pressupõe a administração de fármacos através da pele. Estes podem pertencer a dois grandes grupos terapêuticos: os que estão destinados a exercer uma ação local, onde a substância ativa permanece e exerce o seu efeito apenas na pele ou em tecidos próximos do local de aplicação, e os que são para uma ação sistémica, em que as substâncias ativas alcançam a derme ou a camada subcutânea penetrando nos vasos capilares, entrando na corrente sanguínea e exercendo, posteriormente, o seu efeito (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020).

A administração de fármacos pela via cutânea consiste numa via de interesse para o tratamento de várias doenças dermatológicas, no entanto constitui um desafio na formulação de medicamentos eficazes no tratamento destas doenças devido às suas limitações. Com a evolução na área da dermatologia e de tecnologia, novas moléculas chegam ao mercado com um grande potencial terapêutico, porém requerem uma atenção especial e é necessário ter em consideração inúmeros fatores importantes para maximizar a eficácia destes fármacos (Tran, 2013).

Esta via de administração apresenta diversas vantagens e diferenças quando comparadas com as vias de administração mais comuns, como a via oral e a parentérica. Normalmente, é uma via não invasiva, indolor, prática e conveniente, o que aumenta a adesão ao tratamento. Evita o metabolismo de primeira passagem, fornece administração controlada por longos períodos de tempo e pode permitir concentrar as substâncias ativas no local da patologia, evitando efeitos adversos sistémicos (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020). As principais desvantagens estão relacionadas com a função de barreira, que normalmente apenas permite uma baixa permeabilidade dos fármacos quando administrados por esta via, o que poderá resultar em níveis sub-terapêuticos; assim como a possibilidade de reações adversas, como irritações locais (Wester & Maibach, 1983).

A capacidade de um fármaco penetrar na pele depende de várias propriedades físico químicas (como o seu tamanho, peso molecular, pKa, coeficiente de partilha) assim como do veículo em que este é incorporado (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020) Atualmente, os fármacos que conseguem ultrapassar de forma significativa o estrato

córneo possuem características muito específicas. Devem apresentar um peso molecular menor do que 500 Da, um logP entre 1 e 3, e deverão ter também elevada potência farmacológica. Porém, nem todos os fármacos utilizados na terapêutica possuem estas características. Fármacos hidrofílicos de alto peso molecular são, muitas vezes, as únicas alternativas eficazes e, por esta razão, são necessárias novas abordagens para maximizar a sua veiculação eficaz (Tran, 2013).

1.2. Formas Farmacêuticas Tópicas

Medicamentos tópicos são todas as formulações que são aplicadas na pele e que possuem uma ação local, ou seja, a substância ativa permanece e exerce o seu efeito nas camadas da pele ou nos tecidos adjacentes à zona de aplicação (Ueda , et al., 2009).

Assim, a eficácia clínica de um medicamento tópico necessita de uma entrega suficiente e eficiente do princípio ativo através das camadas da pele. Para transportar a substância ativa, o veículo deverá ser suficientemente semelhante ao fármaco, para favorecer a solubilidade em prol da estabilidade de toda formulação, mas não em demasia para que o fármaco se consiga libertar do veículo e penetrar no estrato córneo (Weiss, 2012).

Diferentes formulações cutâneas foram desenvolvidas para a administração de fármacos na pele, dividindo-se em formulações sólidas, líquidas ou semissólidas, sendo, estas últimas, as mais utilizadas no mercado. Podem distinguir-se vários tipos de preparações cutâneas: pomadas, pastas, cremes, geles e emplastos medicamentosos que, consoante a sua composição e propriedades, exercem diferentes comportamentos e entregam, de forma distinta, a substância ativa na pele. As bases para formulação de pomadas podem ser classificadas em quatro categorias: hidrófobas, absorventes, hidrossolúveis e miscíveis A/O ou O/A. A escolha da base da pomada irá influenciar a biodisponibilidade do fármaco a nível tópico (Garg, Rath, & Goyal, 2014).

As preparações semissólidas, ou pomadas, são interessantes devido a sua ação emoliente e protetora. Apresentam um aspeto homogêneo e possuem um comportamento viscoelástico capazes de modificar a sua forma quando aplicada uma força mecânica, o que permite adaptarem-se à superfície da pele. São compostas por um ou mais excipientes no qual são dissolvidas as substâncias ativas (Oliveira A. Z., 2009).

As pomadas propriamente ditas são utilizadas devido ao seu potencial protetor e emoliente (Gupta & Garg, 2022) pois são barreiras oclusivas que impedem a perda transepidérmica de água, apresentam uma aparência translúcida ou opaca. Não

obstante, são bastante gordurosas, o que pode comprometer a adesão à terapêutica (Weiss, 2012).

As pastas são constituídas por uma base semissólida com elevada proporção de material sob a forma de pó (Ueda , et al., 2009). A sua textura é muito viscosa, é menos gordurosa do que as pomadas propriamente ditas, mas é pouco fluida, o que dificulta o processo de espalhamento na pele, mas permite uma ação protetora (Gupta & Garg, 2022).

Os cremes são formas farmacêuticas semissólidas, designados também por emulsões pois são constituídos por duas fases distintas, uma fase oleosa e uma aquosa. (Marçalo, 2013). As substâncias ativas são incorporadas numa das fases de acordo com a sua afinidade, ou seja, substâncias ativas lipofílicas são incorporadas na fase oleosa e as hidrofílicas na fase aquosa (Oliveira A. Z., 2009). Podem distinguir-se dois tipos de emulsões: água em óleo (A/O), quando a fase aquosa é a fase dispersa e a fase oleosa é a fase contínua, e óleo em água (O/A), no caso inverso. Apresentam uma consistência e textura macia e suaves, são fáceis de aplicar na pele devido à sua facilidade em espalharem-se pela mesma (Ueda , et al., 2009) e podem ser aplicados pelos efeitos emolientes, refrescantes e hidratantes que apresentam (Weiss, 2012). No entanto, apresentam também desvantagens como instabilidade físico química por serem sistemas bifásicos, o que torna necessário a adição de agentes estabilizantes que impedem coalescência, designados surfactantes (Ueda , et al., 2009). Estas formas farmacêuticas tópicas são muitas vezes preferidas por apresentarem uma aparência elegante e por serem pouco gordurosos (Weiss, 2012).

Os geles constituem formas farmacêuticas coloidais que são formados por uma rede de pequenas gotículas inorgânicas ou macromoléculas orgânicas dispersas num líquido, designados agentes gelificantes (Ueda , et al., 2009). Os geles podem ser transparentes ou opacos, polares hidroalcoólicos ou apolares (Garg, Rath, & Goyal, 2014). Podem ser classificados quanto à origem da sua base, como hidrogeles ou oleogeles (Gupta & Garg, 2022). Nos oleogeles os excipientes utilizados na sua formulação são de origem lipídica sendo, por isso mais gordurosos. Os hidrogeles possuem um aspeto transparente, não oleoso, de fácil aplicação, não oclusivo sendo bem tolerados pela pele e apresentam uma sensação de frescura muito bem aceite pelo público. Porém estas formas farmacêuticas semissólidas não permitem normalmente ao princípio ativo grande capacidade de penetração da pele tendo em conta o tamanho das moléculas coloidais e dos seus excipientes (Oliveira A. Z., 2009). Por outro lado, são facilmente removidos da pele quando lavados ou pela transpiração (Weiss, 2012).

Os excipientes utilizados na formulação de formas farmacêuticas para a administração cutânea podem ser de origem natural ou sintética, monofásicos ou

multifásicos o que faz com que possam ter propriedades tanto lipofílicas como hidrofílicas (Oliveira A. Z., 2009). A escolha dos excipientes adequados para cada uma das formas farmacêuticas semissólidas é de extrema importância pois irá influenciar a absorção do princípio ativo e, conseqüentemente, o seu efeito, terapêutico. Uma ampla gama de matérias-primas está disponível para a preparação de uma forma farmacêutica semissólida. Assim, a escolha dos excipientes adequados para o desenvolvimento de uma formulação tópica é realizada tendo em conta requisitos de entrega da substância ativa nas camadas da pele pretendidas, assim como na necessidade de conferir todas as características e qualidades medicinais da formulação (Gupta & Garg, 2022).

Com o objetivo de conseguir uma administração de fármacos bem-sucedida com resultados viáveis no tratamento de doenças dermatológicas, novas estratégias estão a ser desenvolvidas, sendo que uma área promissora é a área da nanotecnologia. O interesse na entrega de substâncias ativas encapsuladas em nanopartículas através das camadas da pele tem vindo a crescer no setor da saúde pois têm demonstrado ter uma maior capacidade de penetração nas camadas da pele, permitindo uma maior eficácia no tratamento de várias doenças cutâneas, nomeadamente as feridas quando a barreira cutânea está comprometida (Marçalo, 2013).

1.3. Nanotecnologia e Nanopartículas

A área da nanotecnologia consiste num ramo da ciência assente na construção, conceção e manipulação de sistemas de tamanho nano. A veiculação de substâncias ativas através da pele, como já foi referido, constitui um desafio para a indústria farmacêutica devido à baixa permeabilidade do estrato córneo da epiderme. Com o objetivo de desenvolver uma entrega de fármacos mais controlada, e para que estes consigam penetrar mais facilmente nas camadas superficiais da pele, surgem as nanopartículas. No âmbito da nano escala, estas partículas (Marçalo, 2013) possuem múltiplas aplicações promissoras na área da medicina e têm atraído vários grupos de investigação a nível mundial devido ao seu poder de aplicação transversal em várias áreas da ciência por diversas razões (Ruggeri, et al., 2020). A nanotecnologia tem-se mostrado uma área promissora na administração de fármacos direcionados ao tratamento de várias doenças dermatológicas (Walsh, Allen, & Desai, 2015).

Em formulações tópicas para aplicação cutânea, os materiais mais utilizados são compostos lipídicos, uma vez que a composição das camadas mais superficiais da pele tem por base componentes lipídicos. Assim, há uma maior afinidade para estas camadas, o que favorece a partilha da substância ativa do veículo para a pele. As

nanopartículas lipídicas são, então, ferramentas bastante relevantes para a indústria farmacêutica no que diz respeito à libertação e entrega de fármacos. Estas caracterizam-se por ter tamanhos muito reduzidos e o seu diâmetro varia, aproximadamente, entre os 40 nm e os 1000 nm. O desafio passa por otimizá-las, tornando-as moléculas de qualidade, seguras e eficazes a nível terapêutico (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020). As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com as suas propriedades químicas dividindo-as em NPs orgânicas, inorgânicas e à base de carbono. As nanopartículas orgânicas, por sua vez, subdividem-se em nanossistemas vesiculares e nanopartículas lipídicas (Jeevanandam, Barhoum, Chan, & Danquah, 2018). Os lipossomas são os nanossistemas vesiculares mais utilizados, caracterizam-se por esferas compostas por um núcleo revestido por uma bicamada de fosfolípidos. Estes nanossistemas são amplamente utilizados pois aumentam a solubilidade da substância ativa que é incorporada, melhoram o efeito terapêutica reduzindo os efeitos adversos da mesma (Gaurab, Dattatrya, Amit, & Kundu Gopal, 2014). Já as nanopartículas lipídicas dividem-se em dois tipos, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC).

As SLN apresentam uma forma esférica (Duan, et al., 2020) com uma matriz constituída por lípidos sólidos à temperatura ambiente assim como à temperatura corporal (Weber, Zimmer, & Pardeike, 2014), onde as substâncias ativas são incorporadas (Kumar & Randhawa, 2013). Estes lípidos, que podem ser triglicéridos, glicéridos parciais, ceras ou esteroides (Manjunath, Suresh Reddy, & Venkateswarlu, 2005), constituem entre 0,1% a 30% dessa matriz, dispersos em meio aquoso revestidos por tensioativos que compreendem entre os 0,5% e 5%, atuando como agentes estabilizadores do sistema (Weber, Zimmer, & Pardeike, 2014).

Para a formulação de um sistema de administração de nanopartículas ideal, é imperativo que este apresente variadas características importantes. Em primeiro lugar, sendo este o fator mais importante a ter em conta, está a capacidade de encapsulação das nanopartículas. Estas devem ser capazes de incorporar tanto fármacos lipofílicos como hidrofílicos, pequenas moléculas, assim como macromoléculas ou material genético. As nanopartículas são reconhecidas pela sua capacidade de transportar o fármaco especificamente até ao local alvo, controlando a sua libertação e exercendo, assim, um máximo efeito terapêutico. Assim, com a formulação destes novos sistemas revolucionários, o objetivo das SLN é aumentar a biodisponibilidade e a eficácia dos fármacos para um tratamento bem-sucedido e eficaz (Duan, et al., 2020).

Estes nanossistemas possuem várias vantagens, como serem formulações fáceis de produzir devido à elevada disponibilidade de lípidos disponíveis para o mesmo (Ueda, et al., 2009), serem biocompatíveis e não tóxicas, e permitirem uma libertação

controlada e sustentada da substância ativa (Parhi & Suresh, 2012), mantendo as concentrações de fármaco constantes ao longo do tempo (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020). Também protegem os fármacos da degradação e possuem facilidade em atravessar barreiras membranares devido ao seu tamanho reduzido e à sua lipofilia, o que fornece uma maior especificidade para o alvo diminuindo os potenciais efeitos adversos associados (Parhi & Suresh, 2012).

De acordo com todas as vantagens que os sistemas de transporte de fármacos nano particulados apresentam, tornam-se sistemas de interesse e ideais para o uso em formulações semissólidas tópicas (Duan, et al., 2020). Devido à matriz sólida lipídica das nanopartículas, estas têm uma afinidade maior para a matriz extracelular conseguindo penetrar mais facilmente no estrato córneo, assim como também devido ao seu tamanho nano. Por outro lado, quando em contacto com a pele, as SLN formam um filme protetor, garantindo um maior e mais resistente contacto com o estrato córneo (Kumar & Randhawa, 2013). Apresentam melhor penetração dérmica, mas uma maior resistência ao ultrapassar as camadas da pele, permitindo mais tempo de ação tópica (Musielak, Feliczak-Guzik, & Nowak, 2022).

Porém, apesar das suas vantagens serem muito tentadoras, estas apresentam também algumas limitações como dificuldade de conservação e fenómenos de instabilidade física (Kumar & Randhawa, 2013). Ao mesmo tempo estas são mais propensas a sofrer maturação da sua estrutura cristalina podendo levar à expulsão do fármaco para o meio. Assim, e para contornar as desvantagens das SLN, surge uma segunda geração de nanopartículas designadas de transportadores lipídicos nanoestruturados, as NLC. Estas possuem na sua constituição um lípido líquido à temperatura ambiente e um lípido sólido, estabilizado com um agente tensoativo. A presença destes dois lípidos faz com que a matriz da nanopartícula seja desorganizada evitando a expulsão do fármaco da matriz, aumentando a capacidade de carga de fármaco assim como a sua estabilidade física e química ao longo do tempo (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020).

Estas provaram ser sistemas de libertação de fármacos versáteis e seguros, capazes de melhorar a eficácia dos mesmos assim como o seu perfil farmacocinético aquando de encapsulação (Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020) sendo já utilizados no mercado cosmético (filtros solares, cremes de dia, formulações antienvhecimento) e no tratamento de doenças de pele quando esta está comprometida (Kumar & Randhawa, 2013). Assim, ao longo dos últimos anos, tem havido um foco muito maior nestes sistemas de entrega e desenvolvimento dos mesmos para a administração de fármacos através da pele para o tratamento de várias doenças dermatológicas, assim como em casos de feridas cutâneas (Musielak, Feliczak-Guzik, & Nowak, 2022).

1.4. Escolha do Tipo de Nanopartículas

Nesta investigação, o objetivo fulcral debruçou-se sobre o desenvolvimento de nanoformulações compostas por nanopartículas lipídicas sólidas de modo a veicular o composto BAPN para a posterior aplicação cutânea.

A escolha das nanopartículas foi feita de acordo com as vantagens que as SLN apresentam aquando da sua utilização em formulações tópicas (Müller, Radtke, & Wissing, 2002). Um sistema de administração de fármaco ideal deve ser carregado de fármaco suficiente, ser estável em condições ambientais, ser seletivo para o local de ação, biodegradável, não tóxico, não imunogénico, proporcionar libertação controlada e direcionada especificamente para o alvo, permitir produção e encapsulamento fácil e ser barato (Kumar & Randhawa, 2013).

Como já foi referido num capítulo anterior, as SLN são constituídas por uma matriz sólida lipídica cuja composição é compatível com as características da epiderme, o que permite maior penetração das nanopartículas da formulação nas camadas da pele e posterior libertação da substância ativa (Müller, Radtke, & Wissing, 2002).

Para além da sua composição lipídica, estes nanossistemas são capazes de encapsular moléculas de grandes dimensões, o que permite encapsular BAPN de modo a maximizar a sua entrada na pele, aumentando a biodisponibilidade do mesmo. A encapsulação molecular permite, por sua vez, proteger a substância ativa de possíveis degradações como, por exemplo, reações de oxidação e hidrólise (Bonifacio, et al., 2013).

Por último, o seu tamanho nano também constitui uma característica bastante relevante na escolha do nano sistema. Com o seu tamanho reduzido, as SLN possuem uma maior área de superfície que permite um maior contacto entre as nanopartículas e o estrato córneo. Assim, as nanopartículas com o composto ativo encapsulado conseguem, mais uma vez, penetrar nas camadas da pele até ao seu local alvo, libertando a substância ativa para exercer o seu efeito (Villafuerte R., García F., Garzón S., Hernández L., & Vázquez R, 2008).

Ao desenvolver nanopartículas lipídicas, é imperativo obter nanoformulações para a aplicação cutânea com qualidade, eficazes e seguras. Após a sua produção, é necessário medir alguns parâmetros de modo a avaliar a sua segurança e eficácia para posterior aplicação cutânea, parâmetros esses como o tamanho da partícula, índice de polidispersão e pH das nanoformulações (Andonova & Peneva, 2017).

2. Produção e Desenvolvimento das Nanoformulações

2.1. Materiais

Para a produção das nanopartículas lipídicas sólidas foi utilizado Gelucire® 43/01 gentilmente cedido pela Gattefossé (França), e Tween® 80 ambos os materiais obtidos na Sigma-Aldrich (Saint Loius, MO, EUA) e água bidestilada. A substância ativa utilizada foi o composto BAPN.

2.2. Produção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Na presente investigação foram desenvolvidas duas nanoformulações diferentes, SLN controlo (sem a incorporação de BAPN) e as SLN com BAPN incorporado, ambas produzidas em triplicado. Estas foram preparadas de acordo com as composições quantitativas e qualitativas descritas na tabela seguinte.

Tabela 1 - Composição das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas sem BAPN (controlo) e com BAPN.

Componentes	SLN controlo (% m/V)	SLN com BAPN (% m/V)
BAPN	0	0,1
Gelucire® 43/01	5	5
Tween® 80	3	3
Água Bidestilada	q.b.p. 100	q.b.p. 100

Em tubos de formulações diferentes, foram pesadas rigorosamente as matérias-primas para a preparação das SLN. No primeiro tubo de formulação foram pesadas as substâncias que constituíam a fase oleosa - Gelucire® 43/01, o composto BAPN e o Tween® 80 enquanto num outro tubo de formulação colocou-se água bidestilada, a fase aquosa. Cada tubo de formulação foi colocado num banho de água a 60 °C até os componentes da fase oleosa fundirem completamente. Quando as duas fases se

encontravam à mesma temperatura, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa e procedeu-se à emulsificação de ambas as fases através do método de ultra-sonicação a 70% de amplitude durante cinco minutos. Finalmente, as formulações foram mantidas à temperatura ambiente até completo arrefecimento.

2.3. Estudo da Estabilidade das Nanoformulações

O estudo da estabilidade das formulações desenvolvidas teve uma duração de 30 dias, no qual se avaliaram as características organoléticas, diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e o seu índice de polidispersão, assim como o pH, nos dias 0, 7, 15 e 30.

2.3.1. Avaliação das Características Organoléticas

A avaliação das características organoléticas consistiu na análise visual da homogeneidade e da consistência das nanoformulações, assim como da sua coloração, com o objetivo de avaliar a qualidade das preparações de forma rápida e simples em prol da deteção de alterações macroscópicas possíveis.

2.3.2. Determinação do pH

A determinação do pH das nanoformulações desenvolvidas foi realizado através do método potenciométrico utilizando equipamento adequado. O pH de cada uma das formulações foi medido em triplicado.

2.3.3. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico e o Índice de Polidispersão

Para a determinação destes parâmetros utilizou-se o equipamento *Delsa*TM Nano C através do método de espectroscopia de correlação fotónica (DLS). Analisaram-se as três replicas de cada nanoformulação sendo que estas foram, previamente, diluídas em água destilada.

2.3.4. Testes de estabilidade acelerada

Para avaliar a estabilidade das formulações quando sujeitas a condições extremas realizaram-se testes de estabilidade acelerada, nomeadamente através da aplicação de stress mecânico por meio de centrifuga e através da aplicação de stress térmico pelo aumento gradual da temperatura. No primeiro teste, transferiu-se 2 mL de cada uma das formulações para um eppendorf e procedeu-se à centrifugação a 3000 RPM durante 30 minutos. No final do teste procedeu-se à avaliação das características organoléticas da nanoformulação, nomeadamente quanto à presença de separação de fases. O teste

de aumento gradual da temperatura consistiu em colocar as SLN em banho-maria a 40 °C durante uma hora, aumentando a temperatura em 10 °C a cada trinta minutos até se alcançar os 80 °C. Posteriormente, as formulações arrefeceram à temperatura ambiente e prosseguiu-se com a medição do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e a avaliação visual das características organolépticas

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Após o desenvolvimento e produção das SLN sem (controlo) e com BAPN avaliaram-se parâmetros físico-químicos como características organoléticas das nanoformulações, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão assim como o pH das mesmas, estando os resultados obtidos resumidos na tabela 2.

Tabela 2 - Características organoléticas, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e pH das SLN produzidas com e sem BAPN.

FORMULAÇÃO	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS	DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (NM)	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	PH
SLN CONTROLO		241 ± 5	0,28 ± 0,02	4,82 ± 0,2
SLN COM BAPN		229 ± 11	0,29 ± 0,01	5,82 ± 0,12

Após o desenvolvimento e produção das SLN sem (controlo) e com BAPN avaliaram-se os seguintes parâmetros: características organoléticas, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e pH das mesmas, estando os resultados obtidos resumidos na Tabela 2.

As nanoformulações desenvolvidas apresentaram características organoléticas semelhantes entre elas, com e sem o composto BAPN, apresentavam um aspeto branco leitoso e homogêneo como se pode verificar através da análise visual das fotografias da Tabela 2 .

O diâmetro hidrodinâmico é um parâmetro que está relacionado com o tamanho das partículas, já o índice de polidispersão (PDI) está relacionado com a heterogeneidade do tamanho das partículas. De acordo com a literatura, os valores aceites são < 400 nm e $< 0,3$, respetivamente, para cada parâmetro, para que as nanopartículas sejam eficazes na permeação da pele (Naseri, Valizadeh, & Zakeri-Milani, 2015). Na presente investigação os resultados obtidos foram inferiores a 300 nm assim como inferiores a 0,3 de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, respetivamente, pelo que as SLN desenvolvidas apresentaram características promissoras para a aplicação cutânea.

Em termos de pH, as formulações apresentaram valores compreendidos entre 4 e 6, o que se situa dentro dos valores de pH da pele (Ali & Yosipovitch, 2013). As formulações para aplicação cutânea devem possuir valores de pH dentro desta gama para assegurar uma boa compatibilidade cutânea e, assim, minimizar o impacto na função barreira da pele (Clares, et al., 2014). No que toca às formulações desenvolvidas, os seus valores de pH estão entre os valores aceites, o que significa que, apesar de serem necessários estudos de segurança, as nanoformulações desenvolvidas têm boas perspectivas de biocompatibilidade.

2.4.2. Estudo da Estabilidade

- Características Organoléticas

As nanoformulações foram submetidas a testes de estabilidade durante 30 dias à temperatura ambiente. Mantiveram o seu aspeto branco leitoso e homogêneo durante toda a duração do estudo e não apresentaram alterações macroscópicas visíveis, tanto as SLN controlo, como as SLN com BAPN.

- Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão

Na figura 7 está representada a variação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão de ambas nanoformulações de SLN ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

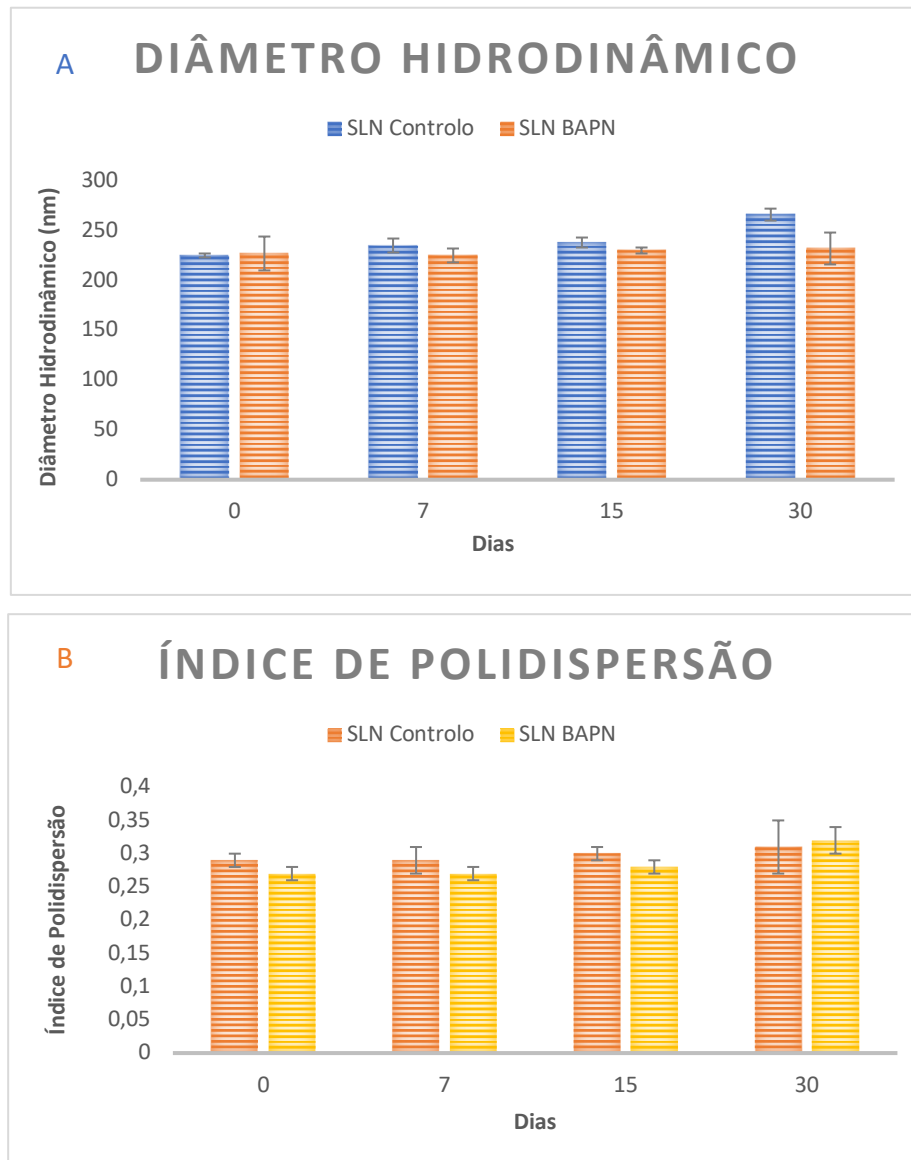


Figura 7 - Variação do diâmetro hidrodinâmico (A) e do índice de polidispersão (B) das SLN com e sem BAPN em função do tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

O diâmetro hidrodinâmico assim como o índice de polidispersão de formulações constituídas por nanopartículas são parâmetros físicos a ter em conta aquando do seu desenvolvimento pois afetam propriedades das formulações como o seu desempenho, o processo de produção em si, a estabilidade do produto final e a sua aparência macroscópica (Danaei, et al., 2018). Como tal, é imperativo analisar os seus efeitos na estabilidade das formulações ao longo do tempo assim como perceber qual a sua influência que na penetração das nanopartículas na pele assim como na libertação da substância ativa (Uchechi, Ogbonna, & Attama).

Relativamente aos resultados obtidos (Figura 7), as SLN controlo apresentaram um ligeiro aumento do tamanho das partículas ao longo do tempo, ao contrário das SLN com BAPN incorporado em que o tamanho se manteve praticamente constante. De

acordo com a literatura, as nanopartículas precisam de possuir um tamanho inferior a 400 nm para que as vantagens das SLN sejam maximizadas (Müller, Radtke, & Wissing, 2002). Este tamanho foi, efetivamente, alcançado na presente investigação conseguindo-se assim um tamanho reduzido, o que dá origem a uma superfície de contacto elevada para as nanopartículas interagirem com o estrato córneo, que favorece a permeação através das camadas da pele

Quanto ao índice de polidispersão, verifica-se uma tendência de aumento em particular ao dia 30, sendo este aumento mais acentuado no caso das SLN com BAPN. O ligeiro aumento do valor de índice de polidispersão significa que ocorreu uma ligeira variação de homogeneidade da distribuição de tamanhos, mas deve ser salientado que os valores aceites são aqueles inferiores a 0,3. (Danaei, et al., 2018). Como os resultados máximos obtidos se situam à volta de 0,3, pode-se considerar que a distribuição do tamanho de partícula se manteve razoavelmente homogénea durante o período de armazenamento. O índice de polidispersão pode ser influenciado por fatores como agitação, temperatura ou quantidade de agente dispersante aquando da produção das nanoformulações. Durante o armazenamento as partículas isoladas podem se fundir na dispersão, agregando-se, o que é evitável usando um tensoativo adequado (Danaei, et al., 2018).

- Avaliação do pH

Na figura 8 estão representados os valores da variação de pH de ambas as nanoformulações desenvolvidas ao longo do tempo de estudo quando armazenadas à temperatura ambiente.

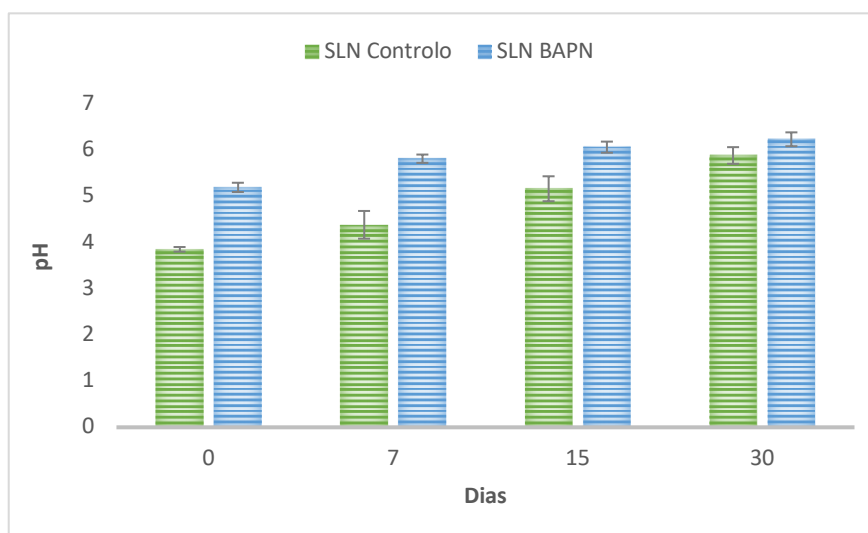


Figura 8 - Variação de pH das SLN com e sem BAPN em função do tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

O pH em formulações com SLN é um parâmetro relevante a ser considerado aquando do estudo de estabilidade das mesmas, pois, este poderá influenciar outros parâmetros, como o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão, que, por sua vez, podem alterar a estabilidade das nanoformulações (Ali & Yosipovitch, 2013). De acordo com a análise dos resultados, ambas as nanoformulações sofreram um aumento do seu pH ao longo do tempo do estudo. Inicialmente (dia 0), as SLN controlo apresentaram um valor próximo de 4 e as SLN com BAPN um valor próximo de 6. As SLN com BAPN em todo o estudo apresentaram valores de pH superiores aos das SLN controlo, o que pode ser atribuído às propriedades físico-químicas do BAPN. No final do estudo as SLN com BAPN apresentaram um valor médio de pH igual a 6,23 enquanto as SLN controlo um valor de 5,88. Nos dois casos, os valores de pH mantêm-se dentro dos aceitáveis para a aplicação cutânea (Clares, et al., 2014).

- Testes de Estabilidade Acelerada

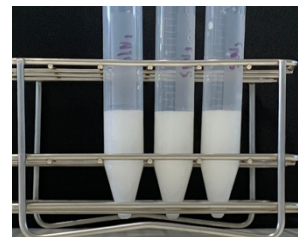
As nanoformulações foram submetidas a testes de estabilidade acelerada através do método relativo ao stress mecânico por centrifuga e pelo método relativo ao aumento gradual da temperatura, de modo a avaliar o impacto de condições extremas nos parâmetros anteriormente avaliados para caracterizar as nanoformulações, como características organoléticas, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão assim como o pH.

A variação das características organoléticas das nanoformulações controlo estão representadas na Tabela 3 . Analisando visualmente as formulações, conclui-se que não houve alterações macroscópicas significativas, pois não se observou separação de fases depois da realização dos dois testes.

Tabela 3 - Características organoléticas das SLN controlo antes e após testes de estabilidade acelerada.

	Teste Stress Mecânico por Centrifuga	Teste Aumento Gradual da Temperatura
Antes		

Depois



Na figura 9 está representada a variação dos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e pH de ambas as nanoformulações desenvolvidas antes e após os testes de estabilidade acelerada.

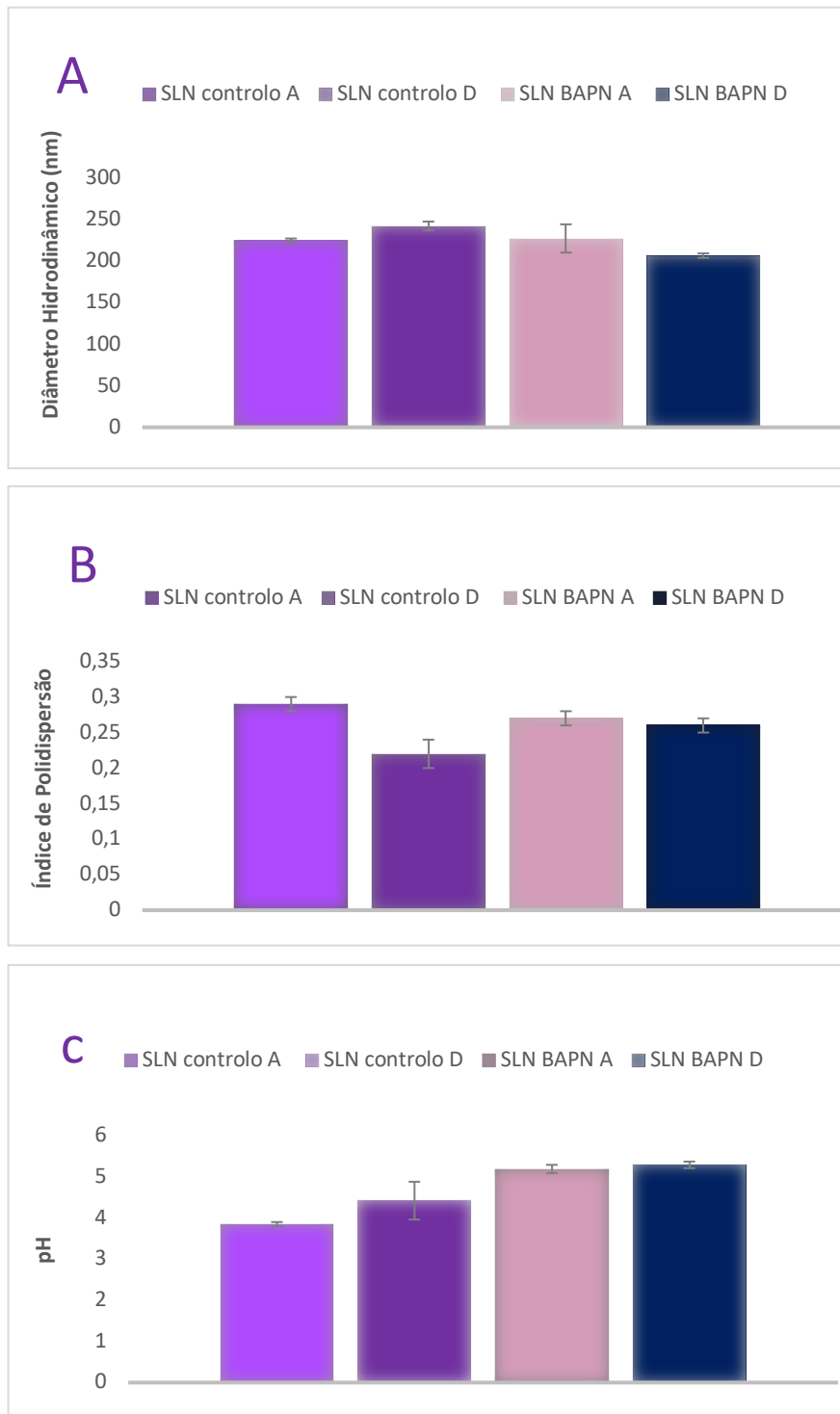


Figura 9 - Variação do diâmetro hidrodinâmico (A), índice de polidispersão (B) e pH (C) das SLN com e sem BAPN antes e após os testes de estabilidade acelerada.

Os testes de estabilidade acelerada são realizados sujeitando as nanoformulações a condições extremas com o objetivo de analisar se estas mantêm a sua estabilidade e se são seguras para a aplicação tópica.

Tendo em conta a análise dos resultados, os valores do diâmetro hidrodinâmico aumentaram após o teste do aumento gradual da temperatura para as SLN controle. No

entanto, verifica-se uma diminuição dos valores das SLN que contêm BAPN. Apesar do comportamento inverso, em ambas as nanoformulações, a diferença não é pronunciada uma vez que as nanopartículas não ultrapassam os valores de 400 nm. Assim, as nanoformulações mantêm-se adequadas para aplicação cutânea.

Tendo em conta os valores de índice de polidispersão das nanoformulações que contêm SLN sem substância ativa percebe-se que há uma redução dos valores deste parâmetro após o teste de estabilidade acelerada. Quanto às nanoformulações com BAPN, o valor de índice de polidispersão manteve-se semelhante. O índice de polidispersão oferece informação sobre a homogeneidade nos tamanhos das nanopartículas. Valores reduzidos indicam que há uma maior homogeneidade. Dado que os resultados não ultrapassam os 0,3, pode considerar-se que as nanoformulações estão adequadas e mantêm a sua estabilidade também neste parâmetro.

Numa última análise, observou-se uma tendência de aumento dos valores de pH em ambas as nanoformulações testadas. Apesar do aumento do pH poder significar uma menor estabilidade, nestes resultados esta diferença é muito pouco pronunciada e os valores mantiveram-se entre 4 e 6, sendo, portanto, compatível com o pH da pele.

3. Ensaio de Segurança e Eficácia – Aplicação Cutânea

3.1. Materiais

Foram utilizadas as nanoformulações compostas por SLN desenvolvidas no capítulo acima.

Utilizaram-se equipamentos adequados para a medição de parâmetros fisiológicos cutâneos: eritema (parâmetro a^* do sistema CIE LAB) - Chromameter CR-300 (Minolta, Japão), perda transepidermica de água (PTEA) - Tewameter® TM300 e hidratação – Corneometer CM825 (ambos da Courage & Khazaka, Alemanha).

3.2. Métodos

No estudo participaram 15 voluntários saudáveis de ambos os sexos, com média de idades de $23,27 \pm 3,63$ anos. O ensaio decorreu de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e emendas posteriores.

- Patch test

O método de *Single application patch test* foi utilizado para avaliar a segurança das nanoformulações aquando da sua aplicação na pele (Wagemaker, et al., 2015). No

antebraço de cada um dos voluntários foram delineadas duas zonas: uma zona de controlo, com aplicação de água destilada, e uma zona destinada à aplicação da nanoformulação composta por SLN. Mediram-se os parâmetros basais de hidratação, PTEA e eritema da pele com os equipamentos adequados. Foram depois usadas câmaras especiais de alumínio (Finn Chambers® on Scanpor, Epitest Ltd Oy, Finlândia) para aplicação da água ou nanoformulação de SLN em cada zona respetiva durante 24 h. Após esse tempo, mediram-se novamente os três parâmetros e registaram-se os resultados

- Tape Stripping

O método de *Tape-Stripping* foi utilizado para avaliar a eficácia das nanoformulações aquando da sua aplicação na pele (Rosado & Rodrigues, 2003). No braço esquerdo, de cada um dos voluntários, foram delineadas duas zonas, uma zona de controlo, não tratada, e outra zona destinada à aplicação da nanoformulação composta por SLN, tendo sido medidos os valores basais de hidratação, PTEA e eritema. Usando fita adesiva foram removidas 20 camadas sucessivas de estrato córneo em cada uma das zonas, de forma a induzir uma alteração da integridade da pele, voltando a medir-se os 3 parâmetros cutâneos. A seguir, a nanoformulação foi aplicada através de adesivo, durante 24 h. Após esse período mediram-se os mesmos parâmetros nos sítios controlo e tratado e registaram-se os resultados.

3.3. Resultados e Discussão

Na figura 10 estão representados os valores da variação dos parâmetros de hidratação, PTEA e eritema na avaliação da segurança das nanoformulações desenvolvidas. Os resultados foram tratados através do rácio do valor final, após 24 h, sobre o valor inicial, dia 0, para cada parâmetro.

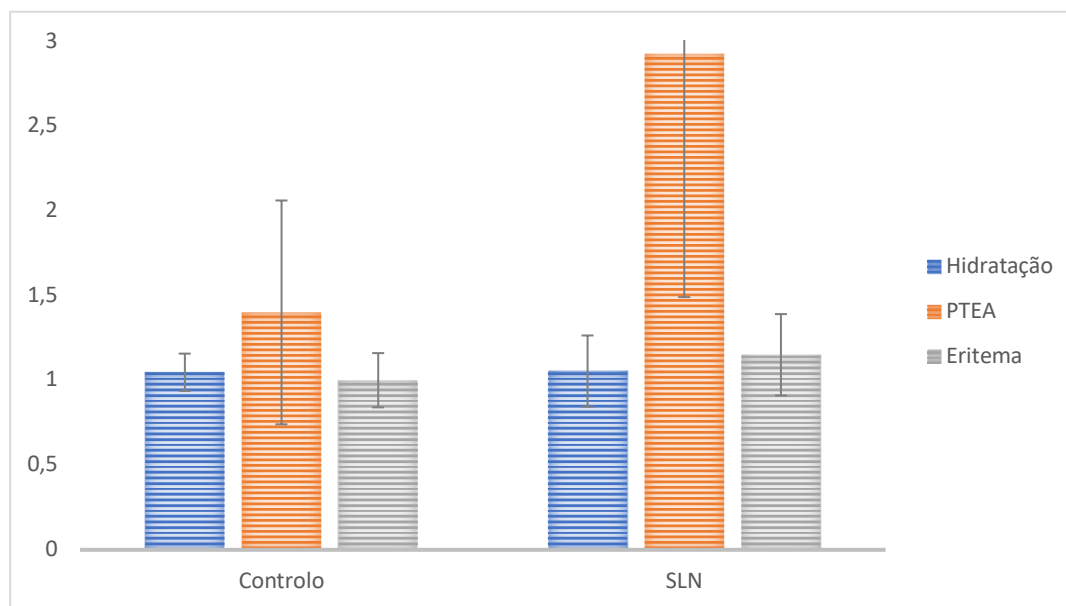


Figura 10 - Variação da hidratação, PTEA e eritema sem e com a aplicação das nanoformulações contendo SLN, Controlo e SLN, respetivamente, para avaliar a segurança das nanoformulações.

Para que uma formulação tópica seja segura para a aplicação cutânea esta deverá ser biocompatível com a pele. Os resultados que se esperava obter eram próximos de 1, o que seria indicativo de que não teria ocorrido uma variação significativa das propriedades da pele após aplicação das formulações.

De acordo com a figura 10, nos valores da hidratação para as duas zonas, controlo e tratada com a nanoformulação, não houve uma variação significativa neste parâmetro, de acordo com os resultados esperados. Os valores de eritema também se encontram próximos de 1, logo, verificou-se uma biocompatibilidade entre as nanoformulações desenvolvidas e a pele, não provocando alterações ou efeitos adversos como reações irritativas ou alérgicas. No entanto, o mesmo não se verificou para os valores de PTEA, em que após as 24 h de contacto os valores na zona de aplicação da nanoformulação são aproximadamente de 3, resultado este muito diferente do esperado. Uma explicação para esta subida de valores de PTEA pode ser o fator de oclusão provocado pela aplicação das nanoformulações com SLN, criando, assim, uma acumulação de água no estrato córneo no local de medição dos parâmetros. Esta, ao ser libertada quando a oclusão cessa, é detetada pelo equipamento, que não é capaz de discriminar as moléculas de água quanto à sua origem. Assim, criou-se um viés que levou a um aumento dos resultados no momento da medição deste parâmetro. O mesmo não se observou no local controlo, embora a média tenha sido um pouco superior a 1. Deve notar-se que, em ambos os casos, a variabilidade de resultados foi elevada, o que também poderá estar associado às dificuldades na utilização deste

equipamento, em que a sudorese é um forte interferente (Pinnagoda, Tupker, Agner, & Serup, 1990).

Apesar dos resultados menos favoráveis do parâmetro de PTEA pode-se perceber que a nanoformulação desenvolvida é biocompatível com a pele, pois o valor do parâmetro de eritema não possui uma variação significativa. No entanto, dada a grande variabilidade interindividual observada, são necessários mais estudos com um maior painel de voluntários para se conseguir obter resultados mais rigorosos sobre o impacto das nanoformulações desenvolvidas aquando da aplicação cutânea.

Na figura 11 estão representados os valores da variação dos parâmetros de hidratação, PTEA e eritema na avaliação da eficácia das nanoformulações desenvolvidas. Os resultados foram tratados através do rácio do valor final, após 24 h, sobre o valor inicial, dia 0, para cada parâmetro.

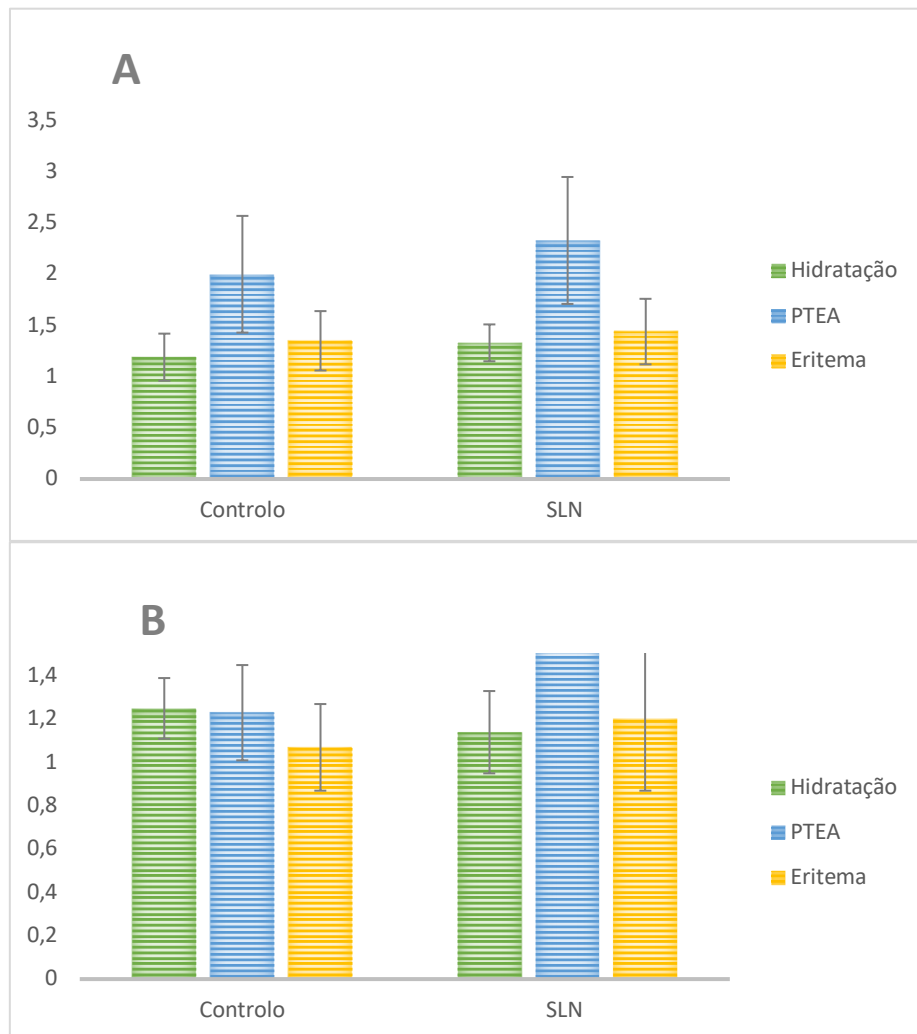


Figura 11 - Variação da hidratação, PTEA e eritema com e sem a aplicação das nanoformulações contendo SLN e controlo. No painel A do gráfico, a variação dos parâmetros é realizada através do rácio entre a medição dos parâmetros antes e depois do tape-stripping. No painel B, a variação dos parâmetros é realizada através do rácio entre a medição dos parâmetros depois do tape-stripping e após as 24 horas.

No painel A, os resultados são alusivos à variação dos três parâmetros após a realização de *tape-stripping*. Os valores do parâmetro de hidratação estão próximos de 1. No entanto, o mesmo não se verificou nos resultados dos parâmetros de PTEA e eritema. A PTEA é um parâmetro importante que está relacionado com a integridade da barreira cutânea, que por sua vez, impede a perda de água através da pele quando está intacta (Alves, Rijo, Rodrigues, & Rosado, 2019). Assim, quando esta sofre alterações na sua integridade, a PTEA é maior. Dado que os valores deste parâmetros foram superiores a 1, como expectável, na zona controlo e de aplicação da nanoformulação, comprova-se que o tratamento infligido danificou a barreira. O mesmo se observa com o parâmetro eritema.

No painel B da figura 6, os resultados são alusivos à variação dos parâmetros basais e 24 h após a aplicação da nanoformulação composta por SLN. Os rácios dos valores do parâmetro de hidratação mantêm-se próximos de 1, não havendo uma variação significativa neste parâmetro após as 24 h de aplicação da nanoformulação e controlo, à semelhança do que foi descrito anteriormente. Relativamente aos valores de eritema, estes também se encontram próximos de 1, porém notou-se uma diminuição clara após as 24 h deste parâmetro podendo significar que existiu uma recuperação da barreira cutânea no final do estudo nas duas zonas. Verificou-se uma diminuição dos valores de PTEA para a zona de controlo 24h após o *tape-stripping*, com uma média dos rácios de cerca de 1,2. No entanto, na zona de aplicação da nanoformulação os rácios foram ligeiramente superiores (cerca de 1,4). Estes resultados indicam que esta não conseguiu proporcionar uma melhor recuperação na função de barreira. No entanto, deve observar-se que neste protocolo foi aplicada a nanoformulação com recurso a um *patch* oclusivo. Assim, a oclusão exercida pelo adesivo pode ter levado a uma acumulação de água no estrato córneo, o que explica os valores mais elevados de PTEA observados. Para evitar este viés nos resultados e para que as conclusões deste ensaio pudessem ser mais claras, sugere-se uma alteração ao protocolo, em que a zona de controlo também fosse coberta com adesivo com água destilada, de modo que fossem criadas iguais condições nas duas zonas e para que fosse possível, no final do estudo, fazer comparações mais rigorosas entre ambas as situações.

Capítulo IV – Conclusão e Considerações Finais

A presente investigação teve como objetivo principal avaliar o impacto de compostos inibidores das enzimas LOX na migração de queratinócitos em lesões cutâneas para posterior desenvolvimento e avaliação de nanoformulações para aplicação cutânea.

A pele está sujeita a inúmeros agentes agressores que podem alterar a integridade da mesma (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019). Para que a integridade cutânea seja recuperada é necessário que ocorra um processo complexo e bem regulado designado de regeneração e cicatrização da pele (Han & Ceilley, 2017) (Masson-Meyers, et al., 2020). As enzimas LOX, expressas na pele humana, estão envolvidas no processo de regeneração celular (Cai, Xiong, Kong, & Xie, 2017).

Numa primeira fase desta investigação, foi avaliado o impacto de compostos inibidores das enzimas LOX no processo de migração celular (Matriz, et al., 2021). Este ensaio representa uma técnica *in vitro* muito utilizada para avaliar o impacto de diversos compostos na migração celular coletiva. (Bobadilla, et al., 2019). É de notar que este método apresenta desvantagens como, por exemplo, dificuldade na criação de riscos lineares, a acumulação de células na lacuna criada e nos bordos do risco e o facto de constituir um processo demoroso (Mouritzen & Jenssen, 2018). Para contornar estas desvantagens, podem ser utilizadas novas abordagens como realizar ensaio de risco com a indução da ferida em forma de círculo ao invés de ferida em linha reta. Assim, permite uma análise mais precisa ao criar lesões circulares mais limpas, lineares e uniformes gerando resultados mais fidedignos (Catarino, 2015). Utilizaram-se três compostos inibidores das enzimas LOX - BAPN, EPCU e PN1.

As conclusões retiradas deste estudo são complexas devido à diversidade de resultados que se obteve. Sabe-se que os três compostos são utilizados pelas suas propriedades anti-tumorais (Abdissa, Frese, & Sewald, 2017) (Isca V., et al., 2020), na literatura o BAPN ao inibir as enzimas LOX leva a uma diminuição da migração celular coletiva (Liu, et al., 2022). Os resultados desta investigação contrariam, em certo ponto, o padrão inibidor deste composto, sendo que para o caso de dois dos compostos se observou uma estimulação da migração celular. Porém é uma conclusão complexa pois este padrão só se verificou para concentração mais baixa utilizada enquanto, na concentração mais elevada, diminuiu a migração celular. No caso do EPCU, a concentração mais reduzida aumenta significativamente a migração celular coletiva, porém a concentrações mais elevadas, demonstrou causar toxicidade o que se transmitiu em morte celular. Os resultados obtidos nesta investigação no que toca a migração celular parecem ser positivos e poderão, efetivamente, ser resultado da inibição das enzimas LOX. É, no entanto, importante salientar que a seletividade destes compostos não está determinada, pelo que é possível que a estimulação da migração

celular ocorra como resultado de outro mecanismo celular não identificado. No entanto, os compostos não impactaram significativamente a viabilidade celular e, para além disso, não se deve excluir a hipótese de outros processos celulares que ocorrem, efetivamente, no progresso normal e fisiológico da cicatrização de feridas. O processo de regeneração celular, em feridas cutâneas, é um processo dinâmico e complexo que envolve muito mais do que apenas a estimulação da migração através das enzimas LOX (Martin, 2020). Há uma série de processos e etapas com inúmeros componentes celulares à mistura que não se conseguiu reproduzir neste ensaio o que torna as conclusões do mesmo não tão fidedignas (Takeo, Lee, & Ito, 2015) (Han & Ceilley, 2017).

O estudo da fisiopatologia de lesões cutâneas assim como todo o processo da sua cicatrização é importante para otimizar tratamentos assim como obter melhores resultados e qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, foi interessante estudar a aplicação destes compostos em formulações tópicas para cicatrização da pele, podendo potencialmente diminuir o tempo de cura das feridas assim como diminuir os custos no tratamento das mesmas e melhorar significativamente a qualidade de vida dos indivíduos que sofrem desta condição (Masson-Meyers, et al., 2020).

Os nano sistemas de transportes de fármacos são alvo de grande interesse por parte da indústria farmacêutica nas últimas décadas. Para administrar fármacos através da pele são necessárias estratégias para ultrapassar a barreira cutânea, tendo surgido novas abordagens para maximizar a permeabilidade formulações tópicas através das camadas da pele, aumentando a biodisponibilidade das substâncias ativas (Attama & Umeyor, 2015). As nanopartículas lipídicas sólidas são nano sistemas de transportes de fármacos (Üner & Yener, 2007), amplamente utilizadas devido às suas inúmeras vantagens (Marcato, 2009). Os benefícios do uso destas nanopartículas são interessantes, podendo ser utilizadas para uma libertação da substância ativa de forma sustentada e promissora (Attama & Umeyor, 2015) aumentando assim a sua biodisponibilidade aquando da sua utilização em formulações dermatológicas (Souto & Müller, 2008).

Tendo em conta os resultados obtidos, as nanoformulações desenvolvidas na presente investigação apresentaram uma boa estabilidade ao longo do tempo de estudo. As características organolépticas mantiveram-se intactas e os resultados dos parâmetros medidos mantiveram-se dentro dos valores aceites para a aplicação na pele. Os valores de pH e tamanho das nanopartículas corresponderam ao esperado para a aplicação cutânea. Aquando da aplicação destas nanoformulações na pele, estas mostraram ter uma boa compatibilidade, mas não foram obtidos resultados muito reveladores da sua eficácia na promoção da regeneração cutânea.

As formulações tópicas constituídas por nanopartículas lipídicas são uma oportunidade para melhorar a veiculação da substância ativa através da pele maximizando os seus efeitos terapêuticos (Joun , Nixdorf, & Deng, 2022). Assim, os esforços e o interesse na pesquisa de novas abordagens de tratamento para maximizar a cicatrização é elevado devido aos impactos económicos que esta “epidemia silenciosa” acarreta (Han & Ceilley , 2017).

Apesar dos resultados não serem tão promissores quanto gostaríamos, obtiveram-se resultados interessantes no que toca à modulação destes compostos na atividade enzimática das LOX no processo de cicatrização. Deste modo, seria interessante continuar este trabalho com algumas mudanças na abordagem experimental. Em termos de demonstração da eficácia das nanoformulações, deverão ser realizados mais estudos e numa população maior de voluntários, para que se obtenham resultados mais conclusivos. Os estudos *in vitro* podem ser direcionados para avaliar a atividade dos compostos a nível celular, mas idealmente devem ser também realizados ensaios *in vivo* em pacientes que efetivamente sofram desta condição e, conseqüentemente, retirar conclusões mais alargadas da eficácia das formulações. Neste contexto, a biologia e fisiologia dos processos complexos que a cicatrização das feridas envolve devem ser levados em consideração no desenvolvimento de tratamentos de feridas cutâneas (Veith, Henderson , Spencer, Sligar, & Baker, 2020).

Bibliografia

Bibliografia

- Ueda, C. T., Shah, V. P., Derdzinski, K., Ewing, G., Flynn, G., Maibach, H., . . . Yacobi, A. (2009). Topical and Transdermal Drug Products. *The United States Pharmacopeial Convention, Inc*, 750-764.
- Üner, M., & Yener, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 289-300.
- Abdissa, N., Frese, M., & Sewald, N. (2017). Antimicrobial Abietane-Type Diterpenoids from *Plectranthus punctatus*. *molecules*, 19-22.
- Ali, S. M., & Yosipovitch, G. (2013). Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Department of Dermatology, Wake Forest University Baptist Medical Center, Winston-Salem, USA*, 261-270.
- Alves, E., Rijo, P., Rodrigues, L. M., & Rosado, C. (2019). Determination of relevant endpoints to evaluate the in vivo barrier function in cutaneous health. *Journal Biomedical an Biopharmaceutical Reserch*, 80-88.
- Andonova, V., & Peneva, P. (2017). Characterization Methods for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *Current Pharmaceutical Design*.
- Attama, A. A., & Umeyor, C. E. (2015). *The use of solid lipid nanoparticles for sustained drug release*. Therapeutic Delivery .
- Barker, K. (1998). *At the Bench: A Laboratory Navigator*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Battie, C., & Verschoore, M. (2012). Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. *Indian Journal of Dermatology, Venerology and Leprology*, 9-14.
- Blanchard, G., Pich, C., & Hohl, D. (2022). HaCaT cells as a model system to study primary cilia in keratinocytes. *Experimental Dermatology*.
- Blanco-Fernandez, B., Castaño, O., Mateos-Timoneda, M. A., Engel, E., & Perez-Amodio, S. (2021). Nanotechnology Approaches in Chronic Wound Healing. *Advance Wound Care*.
- Bobadilla, A. V., Arevalo, J., Sarro, E., Byrne, H. M., Philip, M. K., Carraro, T., . . . Alarcon, T. (2019). In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *The Royal Society Interface*.
- Bonifacio, B. V., Bento da Silva, P., Ramos, M. A., Negri, K. M., Bauab, T. M., & Chorilli, M. (2013). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International Journal of NanoMedicine*, 9-14.
- Bragazzi, N. L., Sellami, M., Conic, R., Kimak, M., & Pigatto, P. D. (2019). Fasting and Its Impact on Skin Anatomy, Physiology, and Physiopathology: A Comprehensive Review of the Literature. *Nutrients*, 249.
- Brasselet, C., Durand, E., Addad, F., Al Haj Zen, A., Smeets, M. B., Laurent-Maquin, D., . . . Lafont, A. (2005). Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury. *American Physiology Society - Heart and Circulatory Physiology*, 228-233.
- Cai, L., Xiong, X., Kong, X., & Xie, J. (2017). The Role of the Lysyl Oxidases in Tissue Repair and Remodeling: A Concise Review. *Tissue Eng Regen Med*.
- Cai, L., Xiong, X., Kong, X., & Xie, J. (2017). The Role of the Lysyl Oxidases in Tissue Repair and Remodeling: A Concise Review. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15-30.

- Camilion , J. V., Khanna, S., Anasseri, S., Laney, C., & Mayrovitz, H. N. (2022). Physiological, Pathological, and Circadian Factors Impacting Skin Hydration. *Cureus*, 266-276.
- Cañedo-Dorantes , L., & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*.
- Cappiello, F., Casciaro, B., & Mangoni, M. L. (2018). A Novel In Vitro Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration. *Journal of Visualized Experiments*.
- Catarino, C. M. (2015). Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana biopolimérica. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo.
- Chambers, E. S., & Vukmanovic-Stejc, M. (2020). Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, 116-125.
- Clares, B., Calpena, A. C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., & Fangueiro , J. F. (2014). Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 591-8.
- CLS Product Information: HaCaT. (s.d.). Obtido de Cell Lines Service: <https://www.clsgmbh.de/pdf/hacat.pdf>
- Da-Costa-Rocha, I. (2021). In Vitro Effects of Selective COX and LOX Inhibitors and Their Combinations with Antineoplastic Drugs in the Mouse Melanoma Cell Line B16F10. *International Journal of Molecular Sciences*, 64-88.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Davarani, F. H., Javanmard, R., Dokhani, A., . . . Mozafar, M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 57.
- De lesos, M. L., & Pei, J. V. (2018). An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. *Bioscience Reports*, 31-38.
- Diller, R. B., & Tabor, A. J. (2022). The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics*, 87.
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz , A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12222–12248.
- Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., . . . Vekariya, R. L. (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Advances*, 26777–26791.
- Farage , M. A., Miller , K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2013). Characteristics of the Aging Skin. *Advances in Wound Care*, 87-95.
- Farage , M., Miller, K., Elsner, P., & Maibach, H. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 5-10.
- Ferreira, S., Saraiva, N., Rijo, P., & Fernandes, A. S. (2021). LOXL2 Inhibitors and Breast Cancer Progression. *Antioxidants*, 312.
- García, J. L., Asadinezhad, A., Pacherník, J., Lehocky, M., Junkar, I., Humpolíček, P., . . . Valásek, P. (2010). Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment. *Molecules*, 2845-2856.
- Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2014). Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery. *Drug Delivery*, 969-987.
- Gaurab, R., Dattatrya, S., Amit, Y., & Kundu Gopal, C. (2014). Nanomedicine: Therapeutic applications and limitations. *Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering*, 64-89.

- Gonzalez, A. d., Costa, T. F., Andrade, Z. d., & Medrado, A. R. (2016). Wound healing - A literature review. *Brazilian Society of Dermatology*, 614–620.
- Gupta, P., & Garg, S. (2022). Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application. *Pharmaceutical Technology*.
- H., K. (2004-2018). 3 *Aminopropionitrile*. Obtido de ScienceDirect : <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/3-aminopropionitrile>
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 599-610.
- Herman, T. F., & Bordoni, B. (2022). Wound Classification. *National Library of Medicine*.
- Isca, V. M., Andrade, J., Fernandes, A. S., Paixao, P., Uriel, C., Gomez, A. M., . . . Rijo, P. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane- Type Diterpenoids. *molecules*, 42-50.
- Isca, V., Andrade, J., Fernandes, A. S., Paixão, P., Uriel, C., Gómez, A. M., . . . Rijo, P. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane-Type Diterpenoids. *Molecules*.
- J. Fisher, G., & Rittie, L. (2015). Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin. *NCBI*, 315-370.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y., & Danquah, M. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 1050–1074.
- Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion and Migration*, 440-451.
- Joun, I., Nixdorf, S., & Deng, W. (2022). Advances in lipid-based nanocarriers for breast cancer metastasis treatment. *Frontiers in Medical Technology*, 30-56.
- Kumar, S., & Randhawa, J. K. (2013). High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering*, 1842-1852.
- Kumari, S., Panda, T. K., & Pradhan, T. (2016). Lysyl Oxidase: Its Diversity in Health and Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*.
- Laczko, R., & Csiszar, K. (2020). Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules*.
- Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Pecoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of Dermatology*.
- Li, T., Wu, C., Gao, L., Qin, F., Wei, Q., & Yuan, J. (2018). Lysyl oxidase family members in urological tumorigenesis and fibrosis. *Oncotarget*.
- Liburkin-Dan, T., Toledano, S., & Neufeld, G. (2022). Lysyl Oxidase Family Enzymes and Their Role in Tumor Progression. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Lin, W., Xu, L., & Li, G. (2020). Molecular Insights Into Lysyl Oxidases in Cartilage Regeneration and Rejuvenation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.
- Lindholm, C., & Searle, R. (2016). Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*.
- Lindholm, C., & Searle, R. (2016). Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*.

- Liu, Y., Zhang, Y., Tan, Z., Wang, J., Hu, Y., Sun, J., . . . Zheng, C. (2022). Lysyl oxidase promotes anaplastic thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis mediated via BMP1. *Gland Surgery*, 245-257.
- Müller, R., Radtke, M., & Wissing, S. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advance Drug Delivery Reviews*, S132-S154.
- Manjunath, K., Suresh Reddy, J., & Venkateswarlu, V. (2005). Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*.
- Marçalo, A. R. (2013). Nanotecnologia na Dermocosmética: Aplicação a formulações antienvhecimento . Faro, Portugal.
- Marcato, P. D. (2009). Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*.
- Martin, R. F. (2020). Wound Healing. *Elsevier Public Health Emergency Colletcion* .
- Masson-Meyers, D. S., Andrade, T. A., Caetano , G. S., Guimaraes, F. R., Leite, M. N., Leite, S. N., & Frade, M. A. (2020). Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*.
- Matriz, J., Myles, I. A., Alishahedani, M. E., Yadav, M., McCann, K. J., Gough, P., & Castillo, C. R. (2021). Therapeutic candidates for keloid scars identified by qualitative review of scratch assay research for wound healing. *Plos One*.
- Menoita, E., Santos, V., & Santos, A. S. (2013). SKIN IN THE ELDERLY. *Journal of Aging and Innovation*.
- Miana, M., Galan, M., Martinez-Martinez, E., Varona , S., Jurado-Lopez, R., Bausa-Miranda, B., . . . Cachafeiro, V. (2015). The lysyl oxidase inhibitor β -aminopropionitrile reduces body weight gain and improves the metabolic profile in diet-induced obesity in rats. *Disease Models and Mechanisms*.
- Miguel, S. A. (Junho de 2013). Development of a novel hydrogel for skin regeneration. Covilhã, Portugal: UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR.
- Montoto, S. S., Muraca, G., & Ruiz, M. E. (2020). Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences*.
- Mouritzen, M. V., & Jenssen, H. (2018). Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *Journal of Visualized Experiments*.
- Musielak, E., Feliczak-Guzik, A., & Nowak, I. (2022). Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis. *Molecules*.
- Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2015). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advance Pharmaceutical Bulletin*.
- Netto, O. J. (2009). Estudo de cicatrização de pele em dorso de ratos induzida pelaresina acrílica quimicamente ativada e desenvolvimento de gel acrílico. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco.
- Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel , A., Gleyzal, C., Peyrol, S., . . . Damour, O. (2004). Lysyl Oxidase-Like and Lysyl Oxidase Are Present in the Dermis and Epidermis of a Skin Equivalent and in Human Skin and Are Associated to Elastic Fibers. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Ntungwe, E., Domínguez-Martín , E. M., Teodósio, C., Teixidó-Trujillo, S., Capote, N. A., Saraiva, L., . . . Rijo, P. (2021). Preliminary Biological Activity Screening of

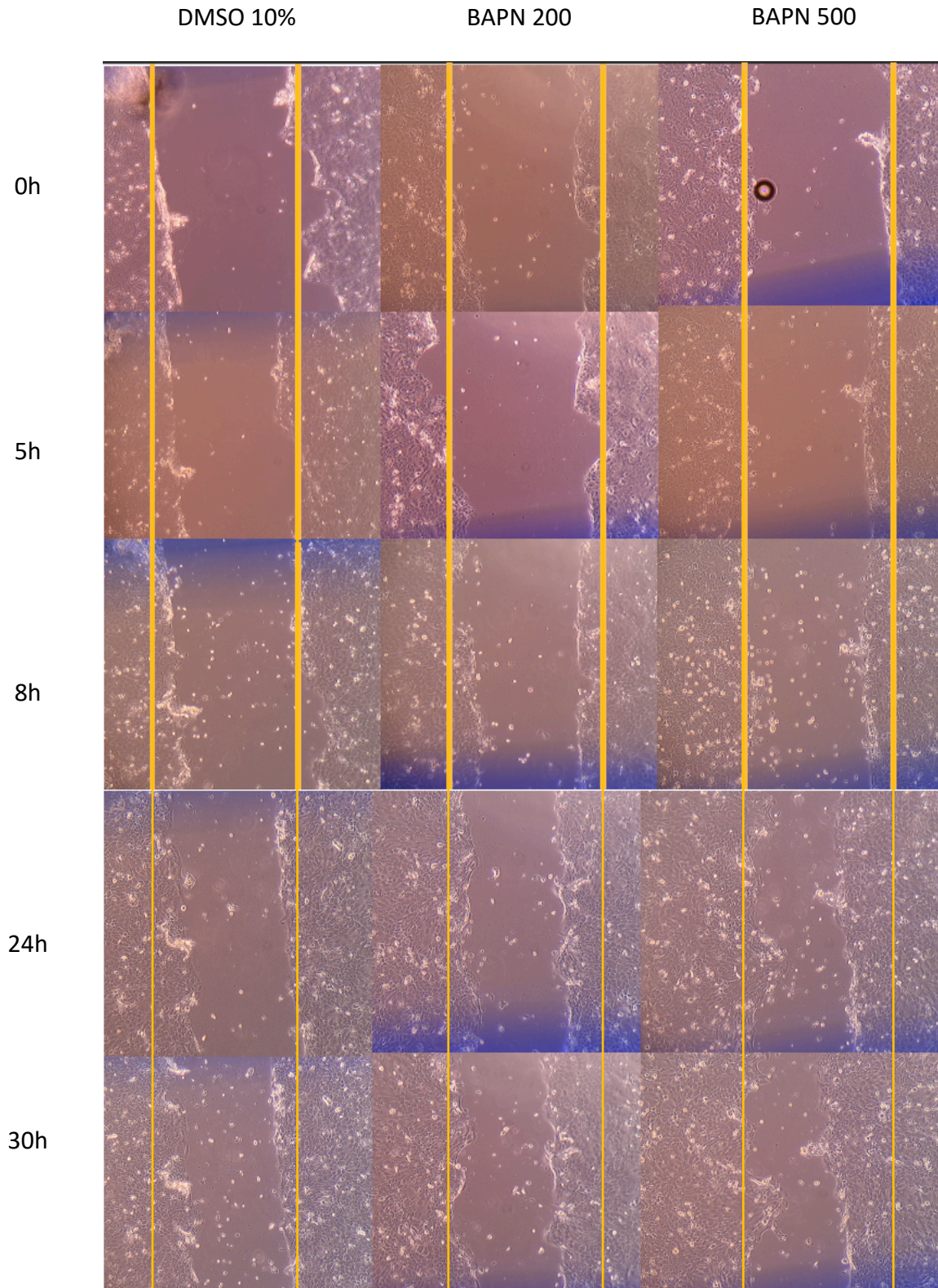
- Plectranthus spp. Extracts for the Search of Anticancer Lead Molecules. *Pharmaceuticals*.
- Nussbaum, S. R., Carter, M. J., Fife, C. E., Haught, R., Nusgart, M., Cartwright, D., & DaVanzo, J. (2017). An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *ISPOR Career Center*.
- O'Flynn, L. (2015). The impact of minor acute wounds on quality of life. *Journal of Wound Care*.
- Oliveira, A. Z. (Dezembro de 2009). DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO. Porto, Portugal.
- Oliveira, M. H. (Fevereiro de 2021). Modelagem Matemática da Cicatrização de Feridas Cutâneas com Base em Modelo Biológico em Ratos. *Modelagem Matemática da Cicatrização de Feridas Cutâneas com Base em Modelo Biológico em Ratos*. São Paulo, Brasil.
- Parhi, R., & Suresh, P. (2012). Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles-A Review. *Current Drug Discovery Technologies*.
- Peng-Hui, W., Ben-Shian, H., Huann-Cheng, H., Chang-Ching, Y., & Yi-Jen, C. (2018). Wound healing. *Journal of Chinese Medical Association*.
- Pinnagoda, J., Tupker, R. A., Agner, T., & Serup, J. (1990). Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 164-172.
- Pomilio, A. B., Ciprian Ollivier, J., & Vitale, A. (2016). Función e importancia clínica de la enzima lisil-oxidasa / Role and clinical significance of the lysyl oxidase enzyme / Funções e importância clínicas da enzima lisil-oxidase. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*.
- Posnett, J., Gottrup, F., Lundgren, H., & Saal, G. (2009). The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. *Journal Wound Care*.
- Profyris, C., Tziotzios, C., & Do Vale, I. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). Histologie de la peau et des follicules pileux. *Medicine Sciences*.
- Rasband, W. (1997-2018). ImageJ. *National Institutes of Health*. Bethesda, Maryland, USA.
- Rodrigues, M., Kosaric, K., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*.
- Rodriguez-Pascual, F., & Slatter, D. A. (2016). Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix. *Scientific Reports*.
- Roger, M., Fullard, N., Costelo, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., . . . Ba. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*.
- Rosado, C., & Rodrigues, L. M. (2003). In vivo study of the physiological impact of stratum corneum sampling methods. *International Journal of Cosmetic Science*, 37-44.
- Rosinczuk, J., Taradaj, J., Dymarek, R., & Sopol, M. (2016). Mechanoregulation of Wound Healing and Skin Homeostasis. *BioMed Research International*.
- Ruggeri, M., Bianchi, E., Rossi, S., Vigani, B., Bonferoni, M. C., Caramella, C., . . . Ferrari, F. (2020). Nanotechnology-Based Medical Devices for the Treatment of Chronic Skin Lesions: From Research to the Clinic. *Pharmaceutics*.

- Ruggeri, M., Bianchi, E., Rossi, S., Vigani, B., Bonferoni, M. C., Caramella, C., . . . Ferrari, F. (2020). Nanotechnology-Based Medical Devices for the Treatment of Chronic Skin Lesions: From Research to the Clinic. *Pharmaceutics*.
- Saraiva, N. (04 de junho de 2021). Protocolo HaCat WHA. Lisboa , Portugal .
- Sawada, H., Beckner, Z. A., Ito, S., Daugherty, A., & Lu, H. S. (2022). β -Aminopropionitrile-induced aortic aneurysm and dissection in mice. *JVS - Vascular Science*.
- Shi, L., Zhang , N., Liu, H., Zhao, L., Liu, J., Wan, J., . . . Han, M. (2018). Lysyl oxidase inhibition via β -aminopropionitrile hampers human umbilical vein endothelial cell angiogenesis and migration in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 5029–5036.
- Sorg, H., Tilkorn, D., Hager, S., & Mirastschijski , U. (2017). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*.
- Souto, E. B., & Müller, R. H. (2008). Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®). *International Journal of Cosmetic Science*.
- Szauter, K. M., Cao, T., Boyd, C. D., & Csiszar, K. (2005). Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. La lysyl-oxydase au cours du d veloppement, du vieillissement et despathologies cutanes. *ScienceDirect*.
- Takeo, M., Lee, W., & Ito, M. (2015). Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Theocharidis, G., & Connelly, J. T. (2019). Minor collagens of the skin with not so minor functions. *Journal of Anatomy*.
- Trackman, P. C. (2018). Functional importance of lysyl oxidase family propeptide regions. *Journal of Cell Communication and Signalling*.
- Tran, T.-N. T. (2013). Cutaneous Drug Delivery: An Update. *The Society of Investigative Dermatology*.
- Uchechi, O., Ogbonna, J. D., & Attama, A. A. (s.d.). Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* .
- VanPutte, C. L., Regan, J. L., & Russo, A. (2014). *Anatomia e Fisiopatologia de Seeley*. AMGH Editora Ltda.
- Veith, A. P., Henderson , K., Spencer, A., Sligar, A. D., & Baker, A. B. (2020). Therapeutic Strategies for Enhancing Angiogenesis in Wound Healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97-125.
- Villafuerte R., L., García F., B., Garzón S., M., Hernández L., A., & Vázquez R, M. L. (2008). Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*.
- Wagemaker, T. A., Rijo, P., Rodrigues, L. M., Maia Campos, P. M., Fernandes, A. S., & Rosado, C. (2015). Integrated approach in the assessment of skin compatibility of cosmetic formulations with green coffee oil. *International Journal of Cosmetic Science*.
- Walsh, L. A., Allen, J. L., & Desai, T. A. (2015). Nanotopography applications in drug delivery. *Expert Opin Drug Delivery*.
- Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., & Chen, Y.-J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*.
- Wang, W., Wang, X., Yao, F., & Huang, C. (2022). Lysyl Oxidase Family Proteins: Prospective Therapeutic Targets in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Weber , S., Zimmer, A., & Pardeike, J. (2014). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

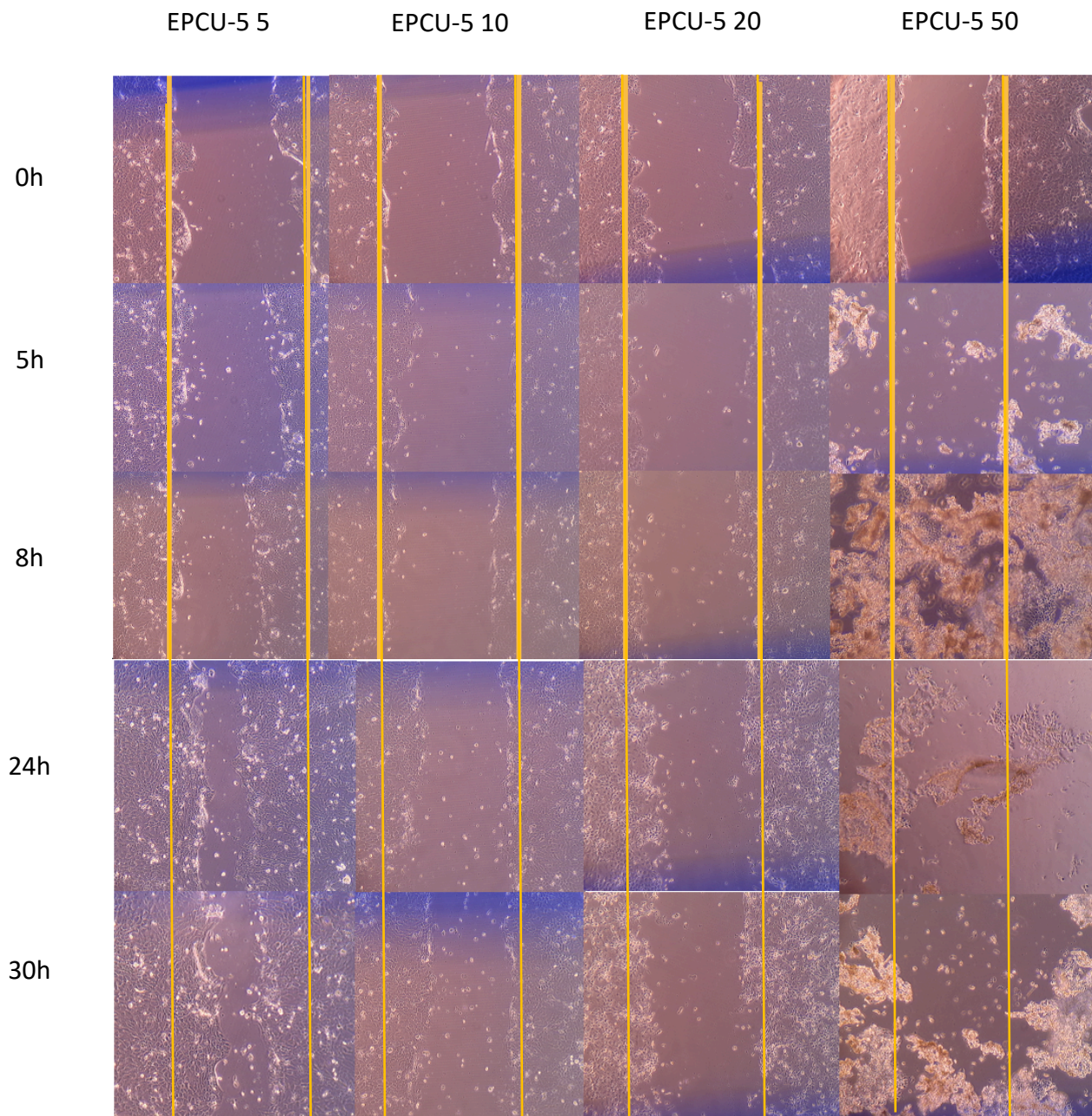
- Weiss, S. C. (2012). Conventional topical delivery systems. *Dermatologic Therapy*.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *American Physiological Society - Physiological Reviews*.
- Wester, R. C., & Maibach, H. I. (1983). Cutaneous Pharmacokinetics: 10 Steps to Percutaneous Absorption. *Drug Metabolism Reviews*.
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*.
- Xia, C., Sadeghi, L., Straat, K., Marrien, M., Wright, A. P., Sander, B., . . . Claesson, H.-E. (2021). Intrinsic 5-lipoxygenase activity regulates migration and adherence of mantle cell lymphoma cells. *Elsevier*.
- Yang, N., Cao, D.-F., Yin, X.-X., Zhou, H.-H., & Mao, X.-Y. (2020). Lysyl oxidases: Emerging biomarkers and therapeutic targets for various diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Zhao, Y., He, K., Zheg, H., Sun, M., Shi, T., Zheng, X., . . . Chen, L. (2020). Berberine Inhibits the Apoptosis-Induced Metastasis by Suppressing the iPLA2/LOX-5/LTB4 Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Onco Targets and Therapy*.
- Zheng, H.-q., Rong, J.-b., Ye, F.-m., Lu, H. S., & Wang, J.-a. (2020). Induction of thoracic aortic dissection: a mini-review of β -aminopropionitrile-related mouse models*. *Journal of Zhejiang University Science B*.

Apêndices

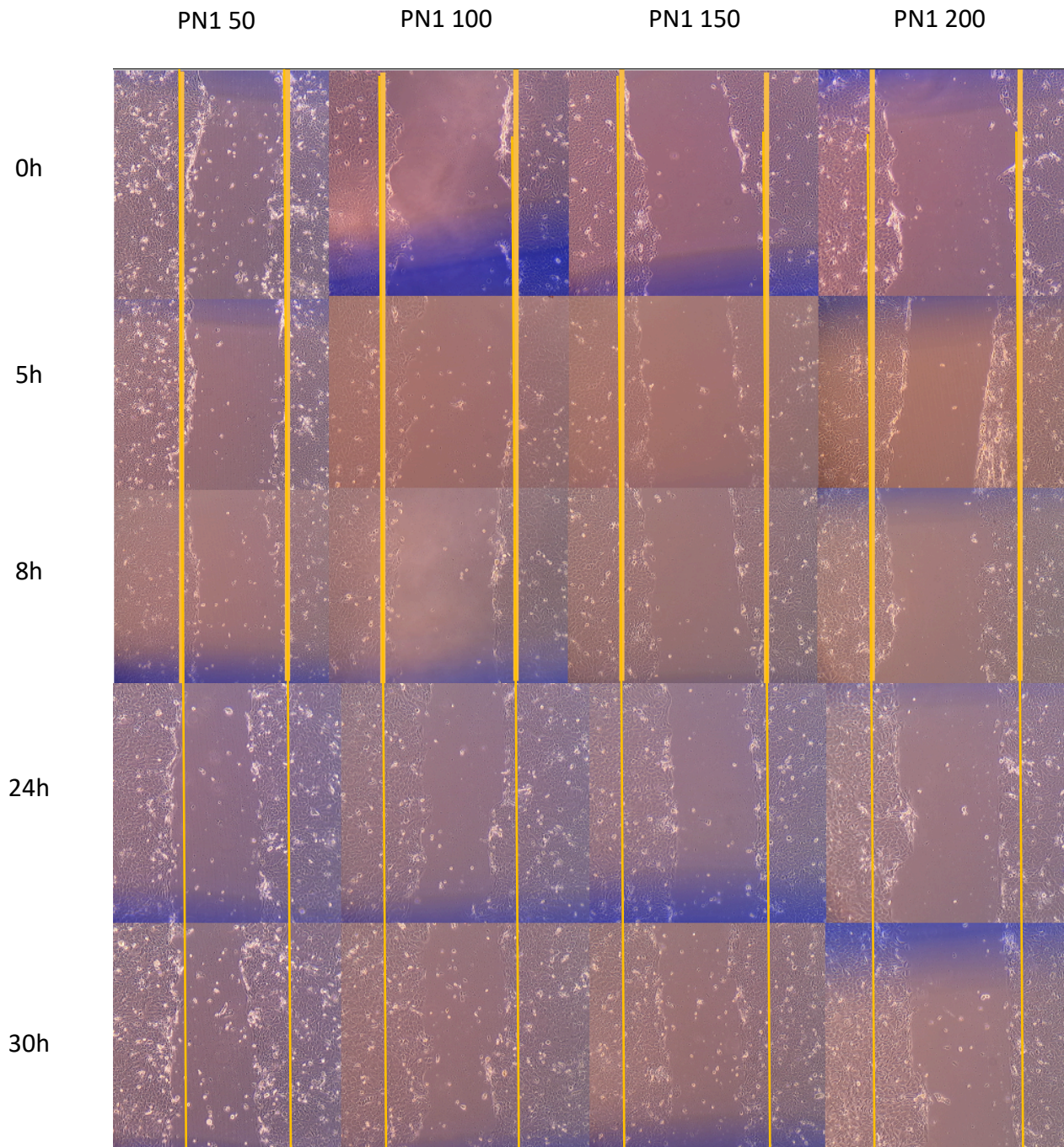
Anexo 1 – Ensaio de risco n2



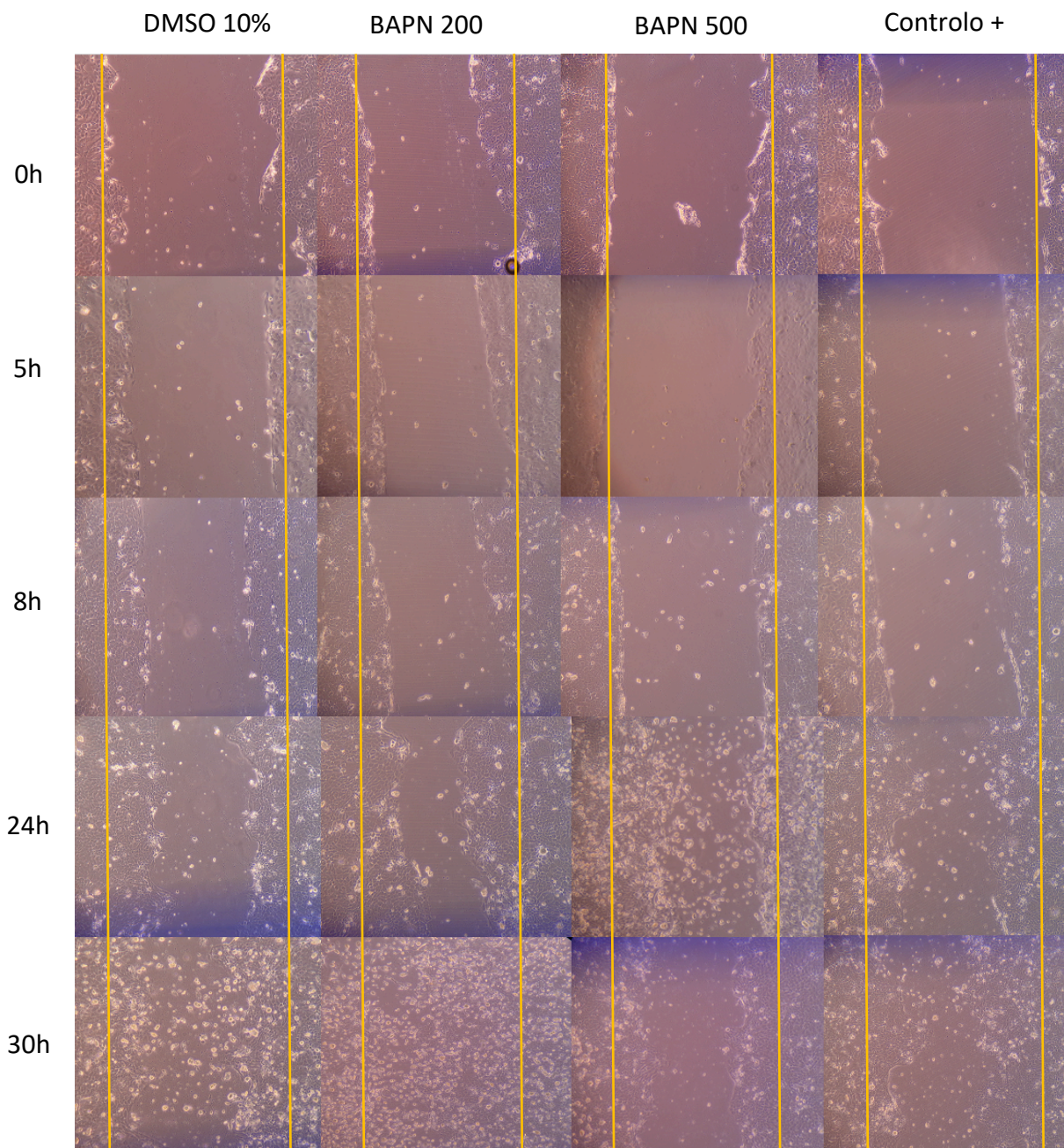
Anexo 1 – Ensaio de risco n2 (continuação)



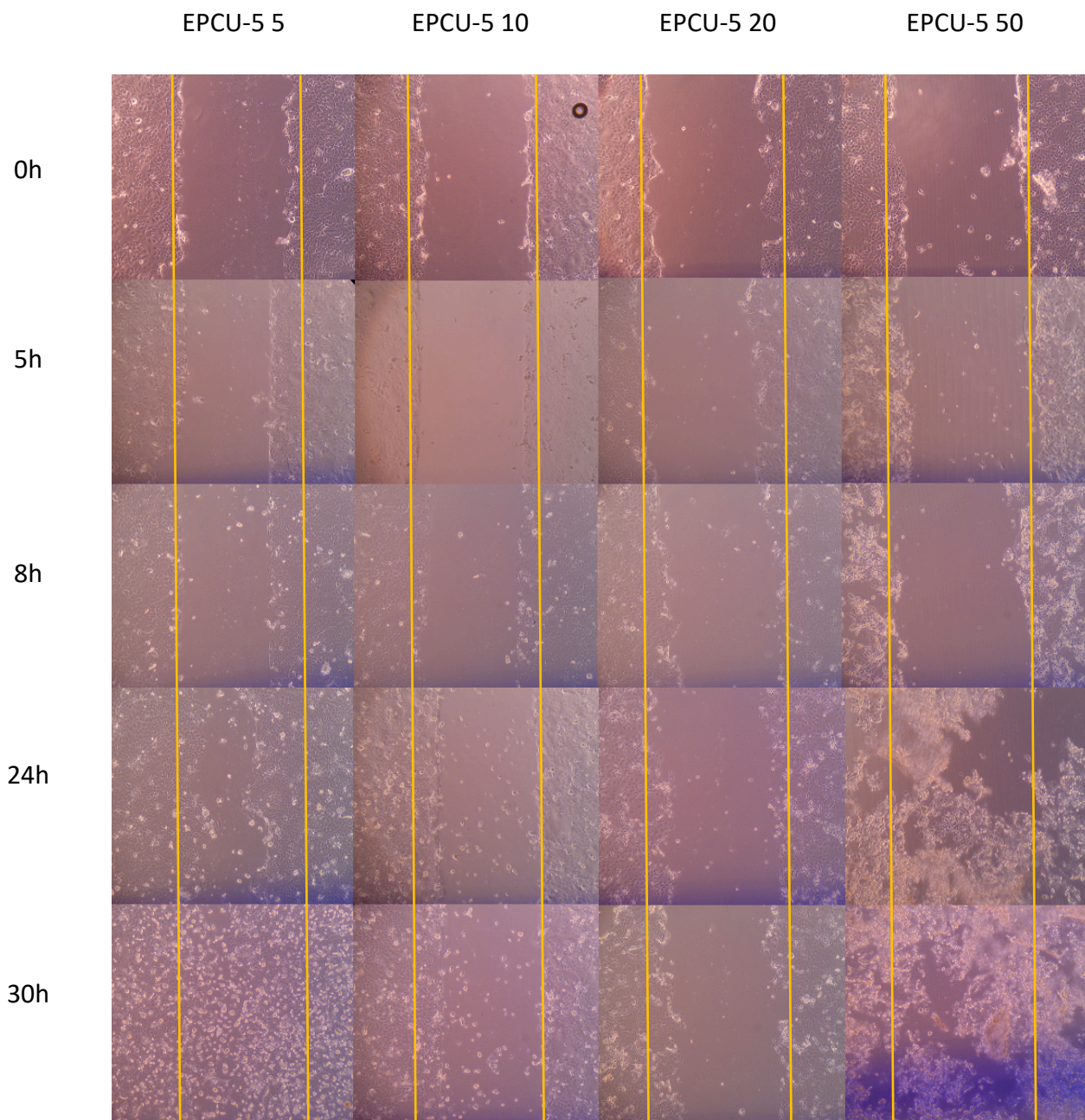
Anexo 2 – Ensaio de risco n2 (continuação)



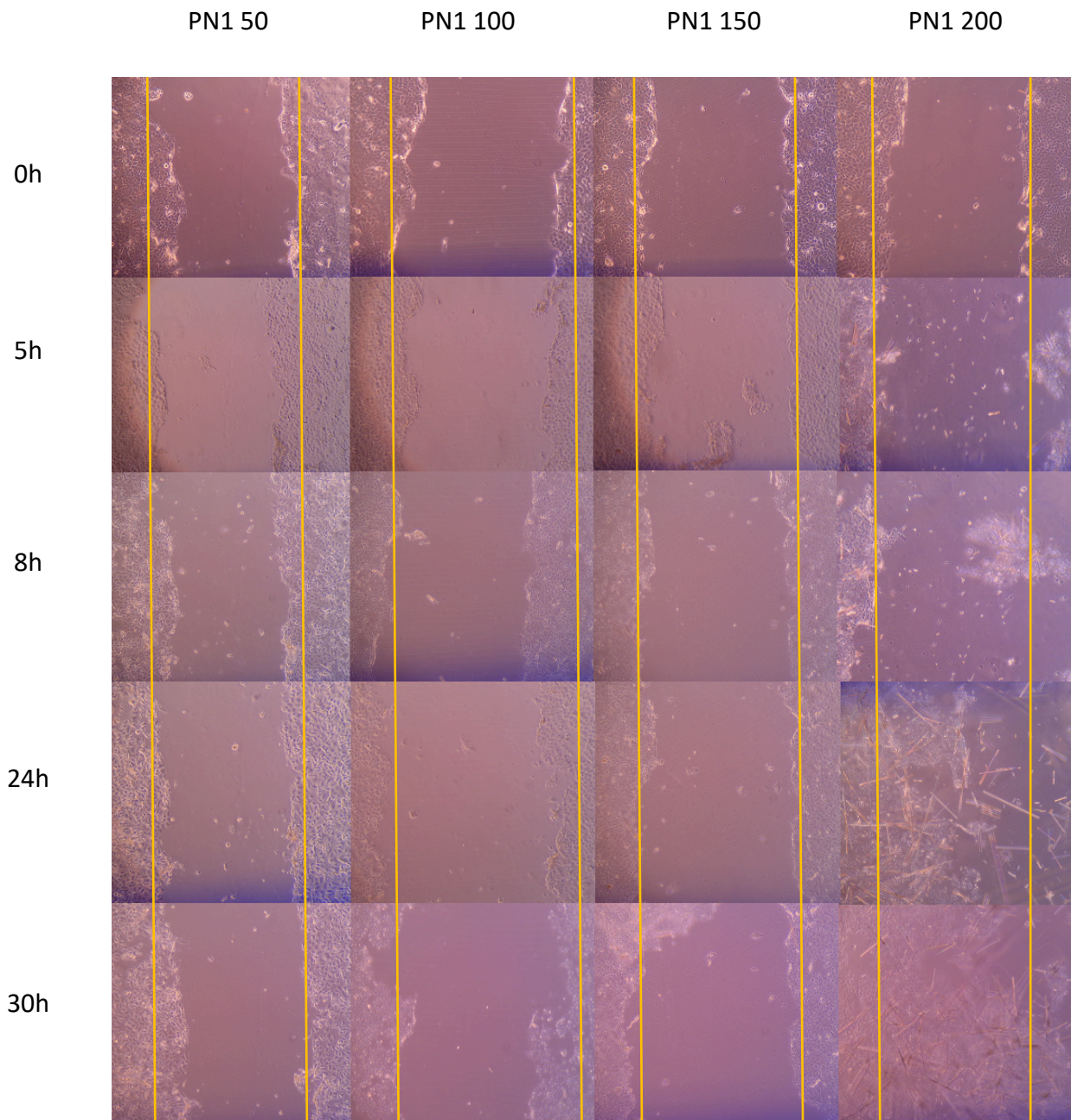
Anexo 1 – Ensaio de risco n3



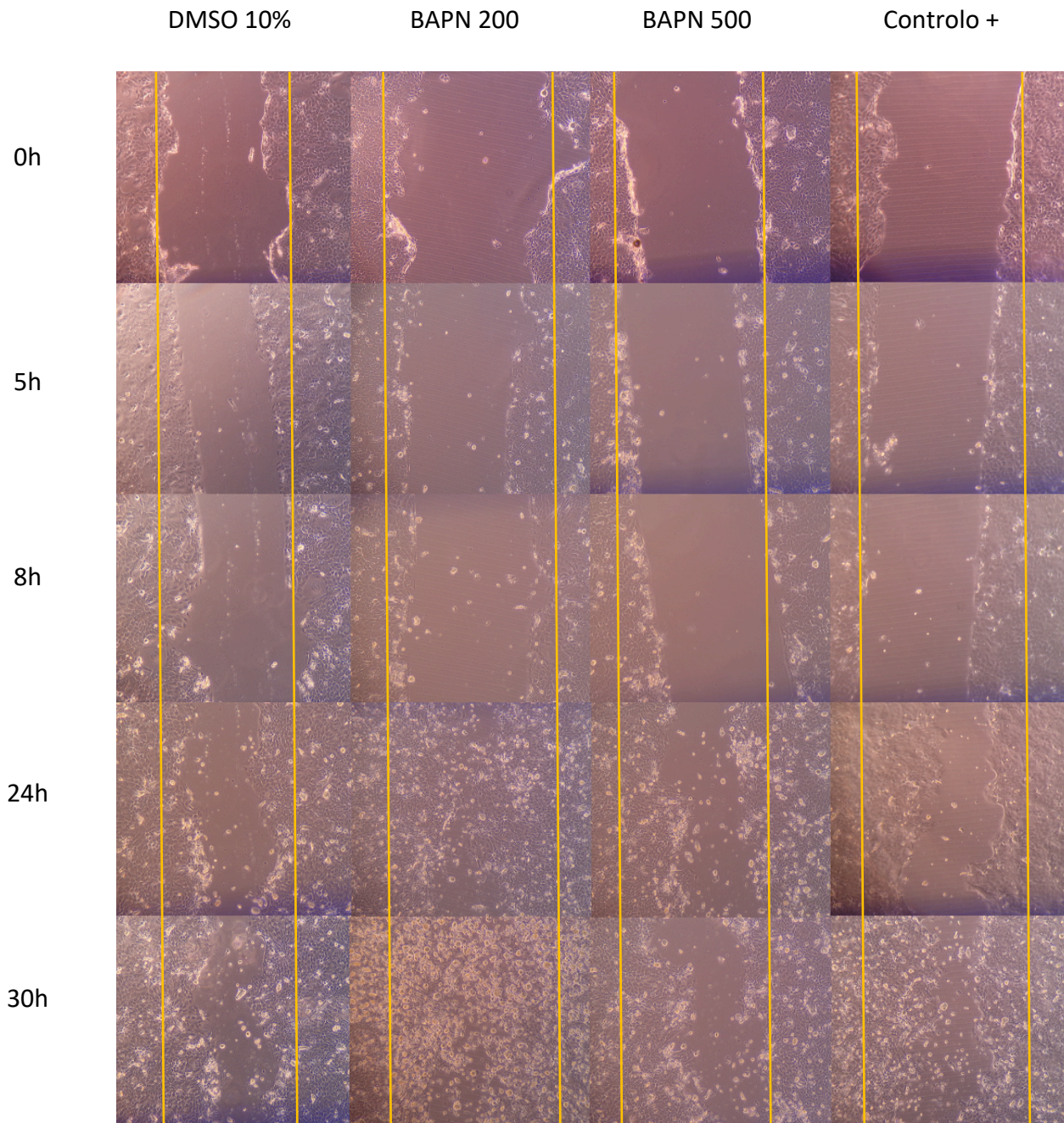
Anexo 2 – Ensaio de risco n3 (continuação)



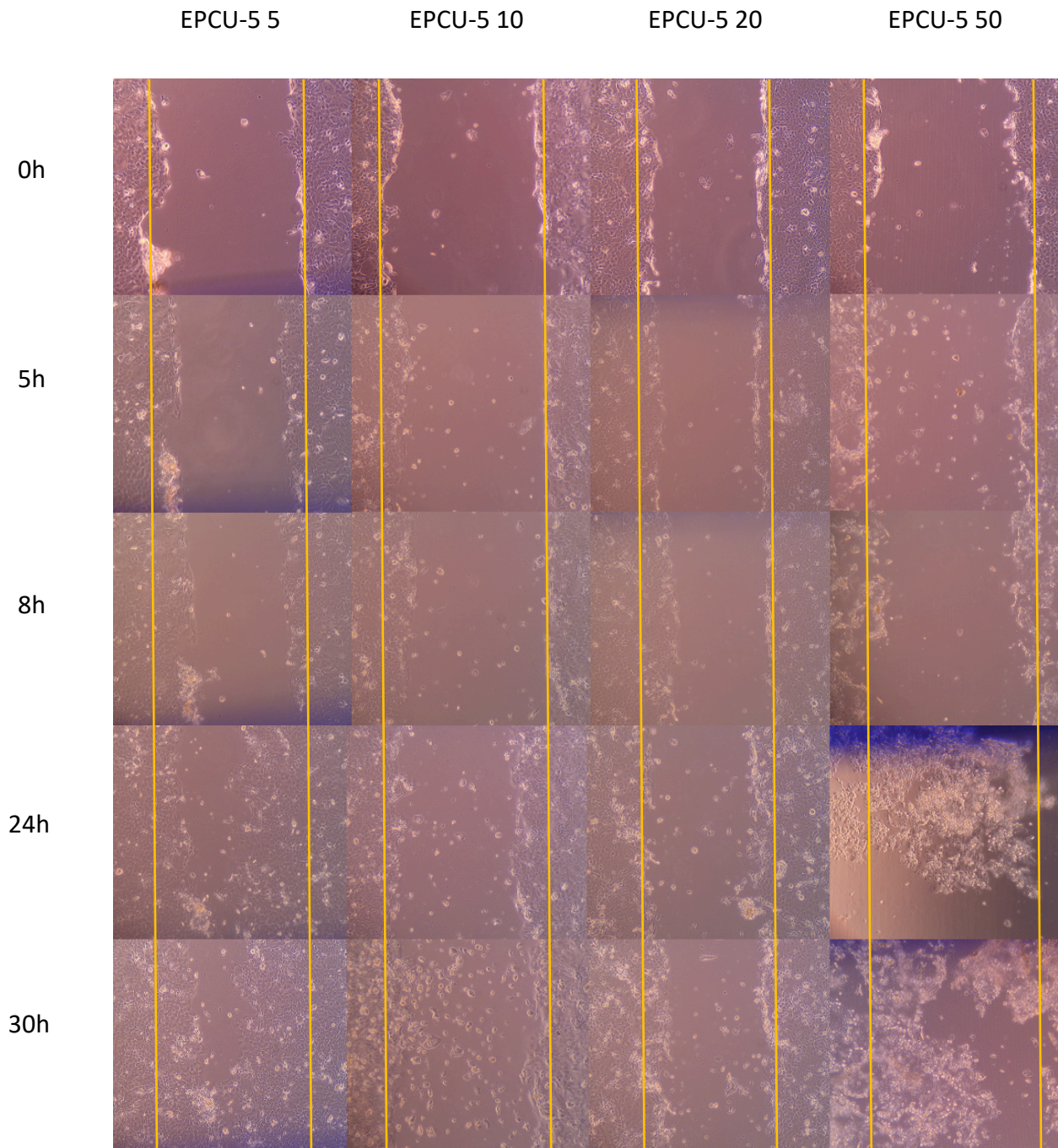
Anexo 2 – Ensaio de risco n3 (continuação)



Anexo 3 – Ensaio de risco n4



Anexo 3 – Ensaio de risco n4 (continuação)



Anexo 3 – Ensaio de risco n4 (continuação)

