SANDRA COSTA FERNANDEZ

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS:
UMA NOVA PLATAFORMA PARA O TRATAMENTO
E PROMOÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
Julho, 2019

RESUMO

O envelhecimento populacional, a maior prevalência de feridas crônicas na população idosa, bem como deficiência de protocolos e produtos eficazes para o tratamento das mesmas têm impulsionado a busca por inovações visando a melhoria da qualidade de vida do paciente, eficácia de produtos, a simplificação do tratamento e diminuição de custos para a saúde pública. Neste trabalho, com o objetivo de controlar o estresse oxidativo, a contaminação microbiana e melhorar a cicatrização cutânea, foram desenvolvidos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) modificados com polímeros bioadesivos para a coencapsulação e coadministração de compostos com atividade antioxidante e antimicrobiana. Os CLNs foram obtidos pelo método de ultrassonicação, e compostos pelos lipídios manteiga de carité e óleo de argan, adicionados de tensoativo (Span[®] 80), antioxidantes (vitamina E, quercetina) e antimicrobiano (óleo de melaleuca); como fase aquosa foi utilizada dispersão de poloxamer 407 e Tween[®] 80. A adição de polímeros bioadesivos à fase aquosa originou as dispersões NCQ (com quitosana), NCA (com alginato de sódio) e NCHA (com ácido hialurônico). O diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial zeta dos CLNs sem ativos foram: 342.0 ± 15.1 nm, 0.28 ± 0.01 , -23.2 ± 2.2 mV (NCA), 309.8 ± 8.6 nm, 0.27 ± 0.01 e $+16.1 \pm 4.3$ mV (NCQ) e 312.1 ± 0.9 nm, 0.25 ± 0.0 e -26.7 ± 1.3 mV (NCHA); estes parâmetros se mantiveram estáveis durante 1 mês, exceto para NCHA, que foi removida do estudo. Utilizando microscopia de varredura foi observado que as nanopartículas apresentaram formato esférico e superfície aparentemente lisa. Utilizando ensaios calorimétricos, foi demonstrada a capacidade da matriz de proteger o óleo de melaleuca contra evaporação, embora a matriz de NCQ tenha se mostrado menos organizada. A adição dos ativos não promoveu alterações pronunciadas nas características físico-químicas dos CLN por 2 meses, e não foram observadas diferenças na penetração cutânea da quercetina e vitamina E entre NCA e NCQ na pele de orelha de porco *in vitro* com barreira comprometida (utilizada como modelo), sugerindo que o polímero utilizado e a carga conferida aos nanocarreadores não influenciaram a penetração. O efeito antimicrobiano da melaleuca a 5% foi evidenciado nos ensaios com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando que a encapsulação do óleo não inibe sua atividade antimicrobiana. Como NCA demonstrou menor potencial irritativo que NCQ em ensaio de HET-CAM, esse nanocarreador foi selecionado para ensaios de migração de fibroblastos através de Transwell[®], sendo observado um aumento neste parâmetro quando do tratamento com NCA vazio e contendo os ativos. Esses resultados demonstram que NCA pode ser uma nova alternativa para melhorar o processo de cicatrização de feridas.

Palavras-chave: cicatrização de feridas, nanocarreadores, pele, antioxidantes.

ABSTRACT

Population aging, the higher prevalence of chronic wounds in the elderly population, and the shortage of effective products and protocols to treat them have driven the search for innovations to improve patient quality of life and product performance, to simplify treatment and reduce costs for public health. To control oxidative stress, microbial contamination and improve cutaneous healing, nanostructured lipid carriers (NLCs) modified with bioadhesive polymers were developed for the co-encapsulation and co-administration of compounds with antioxidant and antimicrobial activity. The nanostructured lipid carriers were obtained by ultrasonication using shea butter and argan oil, added with surfactant (Span[®] 80), antioxidants (vitamin E, quercetin) and antimicrobial (tea tree oil) compounds; the aqueous phase was composed of aqueous dispersions of the surfactants poloxamer 407 and Tween[®] 80, and the bioadhesive polymers alginate (NCA), chitosan (NCQ) or hyaluronic acid (NCHA). The mean diameter PDI and zeta potential of the unloaded CLN were 342.0 ± 15.1 nm, 0.28 ± 0.01 , -23.2 ± 2.2 mV (NCA), 309.8 ± 8.6 nm, 0.27 ± 0.01 and 16.1 ± 4.3 mV (NCQ) and NCHA 312.1 ± 0.9 nm, 0.25 ± 0.0 e - 26.7 ± 1.3 mV. There were no pronounced variations in these parameters during 1 month, except for NCHA, which was excluded from the study. Addition of the active compounds did not increase size, PDI and zeta potential, which were stable for 2 months. Using electron scanning microscopy, it was observed that the nanoparticles demonstrated spherical shape and smooth surface. Calorimetry studies indicated that the lipid matrix protected tea tree oil against evaporation, and that NCQ matrix was less organized. No differences were observed in the penetration of quercetin and vitamin E comparing NCQ and NCA into and across porcine ears skin with compromised barrier (used as *in vitro* model), suggesting that the polymer used and the charge did not affect cutaneous delivery. The antimicrobial effect of 5% tea tree oil was evidenced in assays with *S. aureus* and *P. aeruginosa*, demonstrating that the encapsulation of the oil does not inhibit its antimicrobial activity. In the HET- CAM assay the superior safety profile of NCA was attested. Unloaded and loaded NCA were able to increase fibroblast migration. These studies demonstrate the potential of NCA as a new alternative for management of wounds.

Keywords: wound healing, nanocarriers, skin, anti-oxidants.

2 INTRODUÇÃO

Feridas são consideradas um problema de saúde pública. Embora não exista uma fonte única para dados referentes à epidemiologia de feridas no Brasil, estima-se que sejam gastos aproximadamente US\$ 1 bilhão ao ano com feridas crônicas (Margolis, 2013). No Reino Unido 1% da população adulta é afetada por úlceras crônicas; já na população idosa, acima de 65 anos, este número cresce para 5%, tendendo a um aumento cada vez maior devido ao envelhecimento e aumento da incidência de diabetes e obesidade nessa população, fatores geralmente associados ao desenvolvimento de feridas crônicas (Pop and Almquist, 2017). Feridas são consideradas por muitos autores um problema devastador, já que leva muitas vezes à imobilidade, ansiedade, depressão e, em muitos casos, à amputação dos membros afetados (Pop and Almquist, 2017).

As feridas agudas também são um grande problema; só nos últimos anos os Estados Unidos, reportaram aproximadamente 40 milhões de procedimentos cirúrgicos de complexidade variada e 31,5 milhões de cirurgias ambulatoriais (Sen *et al.*, 2009; Boyko *et al.*, 2018). Em um estudo de 2013, com base na população americana, a incidência de infecções da pele e dos tecidos moles diagnosticadas clinicamente era de aproximadamente 500 episódios por 10.000 pessoas por ano (Ray *et al.*, 2013; Linder *et al.*, 2017). O tratamento dessas lesões varia de acordo com a gravidade, podendo ocorrer internação do paciente ou acompanhamento ambulatorial. Não foi encontrado um sistema que classificasse essas lesões, o que leva a uma abordagem muito variada de tratamento, que pode envolver tratamentos ambulatoriais e antimicrobianos intravenosos para as feridas infeccionadas (Ray *et al.*, 2013; Linder *et al.*, 2017). Embora a etiologia da infecção não seja bem estabelecida, microorganismos como o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus β -hemolíticos* são frequentemente encontrados em feridas infectadas.

O custo total médio de tratamento quando se inclui antimicrobiano é de aproximadamente US\$ 13.313 para pacientes internados e US\$ 413 para pacientes ambulatoriais (Ray *et al.*, 2013; Linder *et al.*, 2017). Dentre as feridas crônicas, pés diabéticos representam um exemplo de comprometimento e preocupação uma vez que podem levar à amputação do membro. Em um estudo mundial de 2008, foi projetado um crescimento de pessoas com diabetes de 197 milhões para 366 milhões até o ano de 2030 (Nauta *et al.*, 2011).

Com isso, o mercado para desenvolvimento de novos produtos que ajudem na cicatrização de feridas tem crescido devido a urgência para melhora dos tratamentos; 15,3 milhões de dólares é o que representou este mercado mundial em 2010 (Singer and Clark, 1999; Sen *et al.*, 2009; Wong and Gurtner, 2012; Zhou *et al.*, 2017).

2.1. PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Conhecer o processo fisiopatológico da cicatrização é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias que possam vir a ser usadas como meio para diminuir danos causados por falhas na cicatrização da pele. Três fases que podem se sobrepor estão envolvidas na cicatrização de uma ferida (Singer and Clark, 1999).

1. Fase inflamatória
2. Fase proliferativa
3. Fase da Maturação ou remodelação

A primeira fase, inflamatória, **Figura 1**, ocorre imediatamente após o dano tecidual, e uma série de eventos biológicos é ativada a fim de evitar-se infecções. Entre esses eventos, estão a ativação do sistema imunológico, a cascata de coagulação e as vias inflamatórias a fim de evitar a perda de sangue e fluidos e remover parte de tecidos mortos ou desvitalizados. Nestes casos, os neutrófilos são um dos primeiros tipos celulares a chegar (1º e 2º dias de lesão) na tentativa de prevenir a infecção (Singer and Clark, 1999; Gurtner *et al.*, 2008). Após o 2º-3º dia, a presença de monócitos é geralmente detectada, os quais se diferenciam em macrófagos e são fundamentais para a coordenação dos processos subsequentes na cicatrização. Alguns estudos sugerem que a deficiência de macrófagos e neutrófilos, ou de ambas as células, pode levar à exacerbação do processo, ou ainda à uma cicatrização deficiente (Singer and Clark, 1999; Gurtner *et al.*, 2008; Zielins *et al.*, 2014).

Figura 1. Evolução da cicatrização após 3 dias. Diversos fatores de crescimento necessários para migração das células nas feridas são mostrados. Adaptado de (Singer and Clark, 1999).

Entre o 2º e 10º dia ocorre a segunda fase do processo, a fase proliferativa, também chamada de fase de reepitelização (**Figura 2**). Nesta fase ocorre a proliferação celular, com migração de diversos tipos de células, incluindo os fibroblastos e queratinócitos, cujas funções envolvem a recuperação da função barreira do epitélio. Ocorre ainda a formação de novos vasos sanguíneos em um processo denominado angiogênese, que juntamente com fibroblastos e macrófagos, irá levar à substituição da matriz de fibrina por tecido de granulação (Gurtner *et al.*, 2008; Zielins *et al.*, 2014).

O processo de remodelação, que corresponde à terceira fase do processo de cicatrização, se inicia entre a 2ª e 3ª semanas após a lesão, e pode durar 1 ano ou mais. Nesta fase, a maioria das células endoteliais, macrófagos e fibroblastos sofrem apoptose, formando uma massa consistente, principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular (Singer and Clark, 1999; Gurtner *et al.*, 2008). Vale ressaltar que o tecido lesionado não terá a mesma forma anterior à lesão, uma vez que evolutivamente, a prioridade do nosso organismo é o fechamento rápido da ferida e não a reorganização para que o tecido assuma a mesma forma.

Figura 2. Fase de reepitelização, referente à cicatrização de ferida 5 dias após a lesão. Os vasos sanguíneos emergem do coágulo de fibrina à medida que as células epidérmicas surgem da ferida. Algumas das proteínas consideradas necessárias para a migração das células estão mostradas na figura adaptada (Singer and Clark, 1999).

2.2. FERIDAS AGUDAS, CRÔNICAS E TRATAMENTOS

Feridas agudas podem ser intencionais, quando ocorrerem em pós-operatórios, ou ocasionais, como queimaduras, lacerações, mordeduras e etc (Blanes, 2014). As feridas crônicas podem se originar a partir de um processo agudo, onde poderá ocorrer perda de tecido. Elas não seguem o processo de cicatrização normal, se prolongam por períodos maiores que quatro semanas e têm como um exemplo típico a úlcera de pé diabético (Blanes, 2014).

As reações inflamatórias diferem entre si a depender da existência de feridas crônicas ou agudas. Em feridas agudas, a função da inflamação consiste na preparação do leito da ferida (removendo tecido necrótico, detritos, contaminação bacteriana), recrutamento celular e ativação de fibroblastos (Menke *et al.*, 2007).

Em condições normais, a inflamação é autolimitada, enquanto que nas feridas crônicas, há exacerbação do processo. Em feridas agudas, os neutrófilos são praticamente inexistentes após 72 horas, mas nas crônicas, se mantém presentes

durante todo o processo de cicatrização. Algumas explicações para isso se baseiam no recrutamento e ativação contínua em razão da lesão tecidual por pressão, supercrescimento bacteriano, aprisionamento de leucócitos ou lesão de reperfusão isquêmica (Menke *et al.*, 2007).

Pode-se inferir que o diferencial entre feridas agudas e crônicas está justamente em sua taxa de cura, até porque nestas últimas o tempo de cicatrização será mais longo, ocorrendo, inclusive, a possibilidade de que as feridas se agravem ao vez de melhorarem em razão do microambiente com elevado nível de proteases (Menke *et al.*, 2007).

Estratégias variadas têm sido empregadas para o tratamento de ambas as feridas, buscando acelerar o processo de cicatrização, reduzir a ocorrência de infecções e complicações do processo, implementando qualidade de vida ao paciente (Hafner *et al.*, 2014). Dentre essas estratégias, ressaltamos os diversos tipos de agentes farmacológicos. A agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos – *Food and Drug Administration* – FDA, tem aprovado o uso de produtos originalmente utilizados por via sistêmica para o tratamento tópico de feridas devido ao alto grau de complicações que podem ocorrer (Smith, 2010). Entre estes tratamentos, os anestésicos, antibióticos e até fatores de crescimento podem ser utilizados. Esse tipo de tratamento é chamado *off-label prescription medication* (Smith, 2010; Anvisa, 2013). O misoprostol, lidocaína, nifedipina, gentamicina e metronidazol são exemplos deste tipo de medicamento, sendo prescritos pra o tratamento de feridas nas formulações em creme, comprimidos macerados, gel e *spray* dentro do conceito de *prescrição off-label* (Smith, 2010).

Há também diversos tipos de dispositivos/curativos a base de hidrogéis, filmes (Jandera *et al.*, 2000a), engenharia de tecido (Wong and Gurtner, 2012), adesivos, implantes poliméricos e matrizes de desintegração lenta, cujo objetivo é a manutenção da hidratação da ferida, proteção e promoção da cicatrização (Dingler *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2007; Souto *et al.*, 2007; Pardeike, Hommoss and Müller, 2009; Kuchler *et al.*, 2010; Mitri *et al.*, 2011; Hafner *et al.*, 2014; Keck *et al.*, 2014; Pyo *et al.*, 2016).

Algumas feridas crônicas continuam difíceis de serem tratadas em decorrência de problemas com curativos, incluindo intumescimento e flexibilidade insuficientes, necessidade frequente de reaplicação/troca e custo elevado tanto para

o paciente quanto para o serviço médico-hospitalar. Estes obstáculos têm estimulado a pesquisa e inovações capazes de trazer benefícios com tratamentos mais seguros, eficazes, de baixo custo e acessíveis a um número maior de pacientes. Com base nesses fatos, neste estudo, desenvolvemos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com componentes de baixo custo para a administração de combinações de ativos antioxidantes e antimicrobianos com a finalidade de auxiliar o tratamento e promoção da uma cicatrização adequada.

2.3. PAPEL DE ANTIOXIDANTES EM FERIDAS

Como já pontuado, a cicatrização de feridas envolve uma série de eventos graduais e coordenados que tem como objetivo restaurar a função barreira e a integridade mecânica da pele (Schultz *et al.*, 2011). Os neutrófilos são as primeiras células imunes a chegar, seguido de monócitos que irão se diferenciar em macrófagos (Schafer and Werner, 2008). São essas células imunes inatas que secretam as enzimas proteolíticas e citocinas pró-inflamatórias, produzem e secretam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são necessárias para a proteção contra bactérias invasoras e outros microrganismos.

Em um processo normal de cicatrização, essas bactérias e os detritos celulares serão posteriormente removidos por fagocitose (Dipietro, 1995; Gurtner *et al.*, 2008; Schafer and Werner, 2008).

EROs são produzidos em todos os seres aeróbicos como intermediários em reações de oxirredução que levam O_2 e H_2O (Gutteridge and Halliwell, 1992; Rochette *et al.*, 2014), em processos metabólicos normais e na cadeia respiratória. NADPH oxidases são produtores de EROs, como o superóxido e peróxido de hidrogênio. Suas isoformas são encontradas em todos os tecidos, tendo papel fundamental na homeostase celular normal e nas respostas celulares a diversos estressores.

Quando há lesão do tecido e inflamação, há uma grande quantidade de EROs produzida por NADPH oxidase (Schafer and Werner, 2008; Perez-Matute *et al.*, 2009; Rudolf *et al.*, 2017), o que é essencial para regular o equilíbrio redox celular, desempenhando papéis importantes na fisiologia e fisiopatologia da pele. Por exemplo, EROs é importante para redução do fluxo sanguíneo relacionado à vasoconstrição, promoção da agregação plaquetária, formação de trombo,

recrutamento celular, migração e prevenção de infecções, todos estes considerados eventos essenciais para a cicatrização (Goitre *et al.*, 2012; Palmieri *et al.*, 2017).

No entanto, enquanto a produção de EROs é essencial para o início do processo de cicatrização, seu excesso é deletério. O desbalanço entre EROs e mecanismos antioxidantes de defesa pode levar à produção excessiva de metabólitos de oxigênio, levando ao chamado “estresse oxidativo” (Halliwell and Gutteridge, 1984; Gutteridge and Halliwell, 1992). Em outras palavras, caso a retirada de EROs seja insuficiente ou se EROs for produzido excessivamente, pode ocorrer dano celular grave, envelhecimento prematuro ou mesmo transformação neoplásica. De fato, o estresse oxidativo é considerado uma das principais causas da falha do processo de cicatrização, e estudos clínicos sugerem que as feridas crônicas mantêm ambiente de estresse oxidativo (Cano Sanchez *et al.*, 2018). Os graus de estresse oxidativo podem ser avaliados por diferentes biomarcadores, como catalase, EROs, glutathione redutase, GSH-redutase, glutathione peroxidase, produtos da peroxidação lipídica (Wagener *et al.*, 2013; Fabre *et al.*, 2015).

Diversos estudos *in vivo* vêm demonstrando a relação entre estresse oxidativo, redução da migração celular em modelos de animais hiperglicêmicos e o comprometimento da cicatrização em animais diabéticos (Giacco and Brownlee, 2010; Almeida *et al.*, 2016). Há evidências da redução de níveis de antioxidantes em animais diabéticos, como a glutathione, o que foi associado à maior dificuldade de cicatrização (Mudge *et al.*, 2002; Schafer and Werner, 2008).

Com base em estudos que evidenciaram redução da concentração de antioxidantes em feridas crônicas e/ou de animais diabéticos, tem sido sugerido a suplementação com estes compostos para promoção do equilíbrio redox e melhora da cicatrização (Schafer and Werner, 2008; Palmieri *et al.*, 2017). Foi observado que a administração de antioxidantes pode ajudar a prevenir os efeitos deletérios da diabetes na expressão de citocinas no crescimento celular e na homeostase alterada da matriz extracelular em cultura *in vitro* e em modelos animais de diabetes (Scott and King, 2004; De Oliveira *et al.*, 2013; Pessoa, A. F. M. *et al.*, 2016), bem como melhorar a disfunção endotelial em modelo animal de diabetes (Scott and King, 2004). O uso de α -tocoferol em modelos de cicatrização de ferida tardia mostrou-se capaz de reduzir os níveis plasmáticos e locais de manodialdeído (MDA) e redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) acelerando o processo de

cicatrização (Musalmah *et al.*, 2002; Park and Lim, 2011; Pessoa, A. F. M. *et al.*, 2016).

A redução nos níveis de antioxidantes foi relatada também em outras condições e outros tipos de feridas, até mesmo nas agudas. Foi demonstrado que os níveis de vitamina E, ascorbato e glutathione diminuíram 60-70% em feridas agudas em comparação com a pele íntegra, e somente os níveis de glutathione voltaram ao grau de normalidade em 14 dias após o ferimento (Shukla *et al.*, 1997; Rasik and Shukla, 2000; Schafer and Werner, 2008; Akihisa *et al.*, 2010; Grando *et al.*, 2016). Estudo comparando ratos idosos e jovens (Rasik and Shukla, 2000) demonstrou menores níveis de vitamina E e ascorbato nos ratos idosos, o que foi correlacionando com o fechamento tardio de feridas nesses animais. De forma análoga, a comparação entre ratos imunossuprimidos e imunocompetentes demonstrou níveis mais altos de vitamina E, glutathione e ascorbato na pele ferida de ratos imunocompetentes (Gupta *et al.*, 2002; Schafer and Werner, 2008). Com base nesses estudos, a suplementação de antioxidantes também em outros tipos de condições de feridas pode ser benéfica para melhorar o processo de cicatrização.

2.4. ATIVOS SELECIONADOS NESTE ESTUDO: VITAMINA E, QUERCETINA E ÓLEO DE MELALEUCA.

Neste estudo, foram utilizados dois antioxidantes: a vitamina E e a quercetina. A vitamina E ou alfa-tocoferol é um antioxidante de lipídios poli-insaturados (Golli and Azzi, 2010) com peso molecular de 431 g/mol, logPc= 7,8 e pKa>10, o que demonstra sua lipofilicidade e alta probabilidade da molécula ficar retida no estrato córneo após administração tópica, prejudicando a sua penetração nas camadas viáveis da pele (Cichewicz *et al.*, 2013a). As estruturas químicas dos tocoferóis - α , β , γ e δ podem ser visualizadas na **Figura 3**:

A vitamina E atua na membrana celular evitando a peroxidação lipídica e preservando a sua integridade (Azzi, 2007; Galli *et al.*, 2017). O acetato de vitamina E é mais utilizado em produtos dermatológicos devido à menor lipofilicidade, sendo transformando em vitamina E na pele por enzimas específicas (Zampieri *et al.*, 2010). Em nossos estudos foi utilizado o α -tocoferol (SigmaPharma).

R ₁	R ₂	
CH ₃	CH ₃	α
CH ₃	H	β
H	CH ₃	γ
H	H	δ

Figura 3. Estrutura química dos tocoferóis – α, β, γ e δ. Fonte: (Azzi, 2007)

O uso de combinações de agentes antioxidantes, capazes de potencializar as ações uns dos outros, tem sido explorado para maximizar a proteção da pele. Como exemplo, foram estudadas as combinações de vitamina E e ácido lipoico (Cichewicz *et al.*, 2013b), vitamina C e alfa-tocoferol (Branka *et al.*, 2009) e ácido ascórbico e licopeno (Pepe *et al.*, 2012b). Embora estudos mecanísticos sejam raros, o efeito de potencialização antioxidante parece resultante da promoção da regeneração de antioxidantes quando combinados (Goupy *et al.*, 2007; Fabre *et al.*, 2015). O efeito sinérgico dos antioxidantes permite aumentar a atividade antioxidante sem a necessidade de aumentar a quantidade encapsulada desses compostos individualmente. Com base nesses fatos, propusemos a co-encapsulação da quercetina e vitamina E no nanocarreador.

A quercetina (3,3', 4', 5,7-pentahidroxi flavona) é um flavonol, subclasse dos flavonoides, que pode ser encontrada em frutas e vegetais, como cebolas, maçãs, e

uvas vermelhas (Bose *et al.*, 2013). A molécula apresenta peso molecular de 302,24g/mol e pKa de 7,10; sua estrutura química pode ser visualizada na **Figura 4** (Herrero-Martínez *et al.*, 2005).

Figura 4. Estrutura química da quercetina (3,3', 4',5,7-pentahidroxiflavona). Fonte:(Bose and Michniak-Kohn, 2013)

A quercetina tem propriedades antioxidantes e inúmeros efeitos biológicos e farmacológicos, que inclui propriedades quelantes, anticancerígenas, cardioprotetoras e bacteriostáticas (Harwood *et al.*, 2007; Vetrova *et al.*, 2017). Mostra-se, ainda, capaz de retardar o processo de oxidação por meio da eliminação de radical oxigênio e inibição da peroxidação lipídica *in vitro* e *in vivo* (Decharneux *et al.*, 1992; Gomathi *et al.*, 2003; Hatahet *et al.*, 2016).

Em estudo recente, pesquisadores demonstraram a capacidade da quercetina de acelerar o processo de cicatrização quando feridas excisionais foram produzidas em ratos e tratadas por meio de um suporte impregnado com esse ativo (Vedakumari *et al.*, 2017). Em estudo semelhante, filmes de colágeno contendo quercetina se mostraram capazes de aumentar a contração das feridas, com redução de até 80% na sua área superficial, comparado a filmes sem o ativo, que promoveram a redução de até 60% na área superficial da ferida (Gomathi *et al.*, 2003).

Além destes antioxidantes, foi também proposto neste estudo a incorporação de óleo da melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) como agente antimicrobiano.

Este composto pertence à família das mirtáceas *Myrtaceae*, uma espécie nativa da Austrália, que tem sido utilizada há décadas por suas propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas e antibacterianas de amplo espectro (Carson and Riley, 2001; Cox *et al.*, 2001; Benelli *et al.*, 2013). Possui mais de 100 compostos na sua composição, sendo rico em terpine-4-ol, α -terpineno, γ -terpineno, 1,8-cineol, pKa 3,26 para o terpine-4-ol, responsáveis pelas propriedades de interesse. A estrutura

química de seus componentes mais abundantes pode ser visualizada na **Figura 5**.

Figura 5. Estrutura química dos principais compostos presentes no óleo essencial de *M. alternifolia*, óleo de melaleuca. Fonte: (Sánchez-Navarro *et al.*, 2011).

Apesar do mecanismo de ação do óleo de melaleuca não ser esclarecido, estudos prévios sugerem que sua eficácia antimicrobiana decorre da permeabilização da membrana bacteriana e alteração da estrutura e função da parede celular (Carson *et al.*, 2002; Rothenberger *et al.*, 2016; Shapira *et al.*, 2016). Estudo realizado por Cox e colaboradores utilizando *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, demonstrou, por meio de ensaios de viabilidade e absorção de iodeto de propídio, a capacidade do óleo de danificar estruturas da membrana celular (Cox *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001). Considerando que a membrana citoplasmática atua como uma barreira que controla a passagem de pequenos íons (como H^+ , K^+ , Na^+ e Ca^{+2}) e permite que células e organelas controlem a entrada e saída de diferentes compostos, a perda da integridade da membrana pode levar a um desbalanço da concentração iônica celular (incluindo perda de íons potássio), que inibe a atividade respiratória (Cox *et al.*, 2001).

Tais evidências sugerem que o uso do óleo de melaleuca pode evitar a contaminação da ferida, um dos fatores que dificulta a cicatrização, afastando a preocupação recorrente com o uso excessivo de antibióticos em tratamentos que poderiam levar ao desenvolvimento de resistência (Hammer *et al.*, 2012; Langridge *et al.*, 2017).

Corroborando a potencial aplicação desse óleo no tratamento de feridas, recentemente pesquisadores demonstraram que o óleo de melaleuca promoveu redução do tempo de cicatrização de 9 em 10 pacientes submetidos ao estudo (Chin and Cordell, 2013). Dentre os microorganismos mais comuns em feridas e que apresentaram susceptibilidade à ação do óleo de melaleuca estão incluídos o *Staphylococcus aureus* (incluindo as cepas resistentes à meticilina), estreptococos, estafilococos coagulase negativos e coliformes (Loughlin *et al.*, 2008; Edmondson *et al.*, 2011; Catanzano *et al.*, 2015).

2.5. CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COMO PLATAFORMA PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS

A indústria em geral tem se ampliado para o uso da nanotecnologia e o campo farmacêutico não é diferente. De acordo com um relatório da *BBC research* o valor do mercado de nanomedicina no ano de 2010 e 2011 foi de US\$ 43,2 bilhões e US\$ 50,1 bilhões respectivamente. Inexistem dados quantitativos para 2019, porém esta mesma pesquisa havia projetado para EUA, Japão, Alemanha, França, Reino Unido, Itália e Espanha em 2016 um faturamento próximo de US\$ 96,9 bilhões (Hafner *et al.*, 2014).

Dentre os nanocarreadores com aplicação na área médica/biomédica, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que se distinguem pela composição da matriz lipídica. Os CLN são considerados a segunda geração de NLS. A nanopartícula lipídica sólida é produzida substituindo um lipídio líquido de uma emulsão óleo/água por um lipídio sólido, ou ainda uma mistura de lipídios sólidos, e permanecem sólidos tanto à temperatura ambiente, quanto à temperatura corporal (Muller *et al.*, 2007; Pardeike, Hommoss and Müller, 2009). Sua faixa de tamanho varia de 40 a 1000 nm

No entanto, problemas de estabilidade são recorrentes durante o armazenamento dos NLS e geralmente associados ao aumento do tamanho das partículas, fenômenos de geleificação e expulsão do fármaco da matriz lipídica, o que é atribuído à cristalização do lipídio (Pardeike, Hommoss and Muller, 2009; Müller *et al.*, 2011).

Durante a preparação de NLS, a fusão do lipídio é seguida pelo resfriamento e solidificação progressiva, ou cristalização, originando cristais lipídicos de graus de organização tridimensional variados; em outras palavras, são geradas as diferentes

formas polimórficas α , β , β_i e β' . É a organização tridimensional das cadeias hidrocarbonadas da matriz lipídica em sua forma solidificada que define o grau de cristalinidade das nanopartículas. A forma hexagonal (α) é a menos estável e de menor ponto de fusão, enquanto a forma β é a mais estável e de maior ponto de fusão (Muller *et al.*, 2002; Souto *et al.*, 2004b) (**Figura 6**). É no armazenamento que as formas polimórficas mais instáveis podem se transformar em formas ordenadas e perfeitas, caracterizadas por menor energia e maior cristalinidade (β), levando à expulsão ou/e mudanças no perfil de liberação dos fármacos (Muller *et al.*, 2002; Attama *et al.*, 2006; Souto *et al.*, 2007; Souto, 2011; Gainza *et al.*, 2015). Em outras palavras, a expulsão decorre da transformação da forma de alta energia, caracterizada por muitas imperfeições, em formas β , formando uma matriz cristalina perfeita, sem espaço para fármacos (Muller *et al.*, 2002; Souto *et al.*, 2004a).

Figura 6. (A) Mecanismo de expulsão dos ativos da NLS durante a estocagem (B) transição para cristal lipídico perfeitamente ordenado. Figura baseada em Muller *et al.*, 2002 e Souto *et al.*, 2004^a.

Nos CLNs a matriz lipídica é constituída por lipídios sólidos e lipídios líquidos, e podem originar diferentes tipos de estruturas (**Figura 7**). No primeiro tipo, a mistura de moléculas diferentes (sólidas e líquidas) cria imperfeições na matriz sólida, permitindo a incorporação de fármacos nessas imperfeições.

No segundo tipo, a partícula solidifica no resfriamento, mas não recristaliza e permanece em um estado amorfo. No terceiro tipo, nanocompartimentos oleosos líquidos são formados na matriz quando a concentração do lipídio líquido excede sua solubilidade no sólido (Muller *et al.*, 2002; Souto *et al.*, 2004b; Attama *et al.*, 2006).

Figura 7. Diferenças da matriz lipídica de NLS e CLN. A) Formação de uma estrutura cristalina perfeita em NLS (nanopartícula lipídica sólida, carregamento de ativos limitados. B) CLN (nanocarreador lipídico estruturado) formação de uma partícula cristalina imperfeita, com maior capacidade de carga de ativo. Figura baseada em (Muller et al., 2002 e Detoni et al., 2012).

Como resultado, temos o aumento da quantidade de fármaco encapsulada e redução da sua expulsão.

Diversas características fazem com que esses sistemas tenham excelente aplicabilidade para uso tópico. O pequeno tamanho e elevada razão área superficial/volume garante um melhor contato com estrato córneo, o que favorece a transferência de maiores quantidades de fármaco para a pele. Devido à sua matriz lipídica sólida, a liberação modificada a partir destes carreadores é possível. Isso é fundamental quando se faz necessário fornecer o fármaco durante um período de tempo prolongado e se deseja reduzir a absorção sistêmica, e/ou quando o fármaco é irritante em altas concentrações (Muller *et al.*, 2002; Souto *et al.*, 2004a). Além disso, os CLNs podem ser formados a partir de lipídios biocompatíveis sendo, geralmente, bem tolerados e seguros (Pardeike, Hommoss and Muller, 2009).

De forma geral, a proposta de utilização de CLN se baseia nas seguintes vantagens/propriedades deste sistema:

- Possibilidade de obtenção com diversos tipos de lipídios considerados seguros e com propriedades de interesse para o processo cicatricial, como melhora da hidratação.
- Liberação sustentada: idealmente a frequência de troca/reaplicação do tratamento e curativos deve ser limitada para evitar danificar o tecido cicatricial. Devido à sua capacidade de formar depósitos na pele e prolongar a liberação do

composto encapsulado por até mesmo dias, o nanocarreador lipídico estruturado permite redução da frequência de administração (Jenning, Schäfer-Korting, *et al.*, 2000; Kuchler *et al.*, 2010).

- Possibilidade de proteção contra a degradação físico-química de ativos, o que é de interesse tendo em vista que propomos a encapsulação de ativos com propriedades antioxidantes e um óleo essencial, sensíveis à temperatura e/ou luz UV. Um exemplo dessa propriedade foi demonstrado por Muller *et al.* para o retinol; a concentração de retinol intacta em suspensão de nanopartículas lipídicas contendo 0,5% de retinol após três meses de armazenamento à temperatura de 40°C foi 60% da concentração inicial, enquanto que em emulsões de óleo/água, 40% do ativo permaneceu intacto (Muller *et al.*, 2007).

- Formação de filme e aumento da hidratação: esses sistemas são capazes de formar um filme na superfície da pele e, desta forma, contribuem para a oclusão e hidratação cutânea. Há de se destacar que a umidade no leito da ferida facilita o desbridamento, melhora a retenção de fatores de crescimento no local e acelera o processo cicatricial ao mesmo tempo em que reduz a formação de cicatrizes (Ousey *et al.*, 2016).

- Possibilidade de modificação da superfície e inclusão de compostos bioadesivos: a inclusão de compostos com propriedades bioadesivas pode aumentar a retenção das partículas na pele, aumentando a localização dos compostos ativos. O uso de sistemas de bioadesão tem como vantagem a capacidade de prolongarem o tempo que o fármaco permanece no local de ação, pois ficam mais tempo em contato com o tecido epitelial, diminuindo assim a frequência de administração (Carvalho *et al.*, 2013). Aqui propomos modificar a superfície dos sistemas com ácido hialurônico, alginato e quitosana; esses polímeros apresentam propriedades bioadesivas, mas cargas opostas. Um dos nossos objetivos é comparar o potencial bioadesivo e a penetração cutânea dos ativos veiculados em nanocarreadores modificados com esses três compostos.

- pH compatível com o pH fisiológico da pele (aproximadamente 5,5): pH moderado é recomendado, sendo que a proximidade do ponto isoelétrico da pele (pI ~ 4) é recomendada (Merino *et al.*, 1999; Marro *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2013). Além disso, é importante avaliar o pH no qual haja predominância da forma não-ionizada de ativos, sendo geralmente aceito que nessa forma as moléculas se difundem mais facilmente através da matriz intercelular do estrato córneo. Entretanto, a pele

apresenta carga residual negativa, tornando-se mais seletiva para o transporte de íons catiônicos (Marro *et al.*, 2001; Sapra *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2013). Ainda, as moléculas ionizadas podendo ainda formar pares com íons presentes na pele, o que as tornam capazes de se difundirem mais facilmente pela barreira cutânea (Nair *et al.*, 2013).

Neste estudo, desenvolvemos CLN bioadesivos para a coencapsulação de compostos antioxidantes e um ativo antimicrobiano como uma nova abordagem para melhorar o processo de cicatrização, limitando o custo à saúde pública. A **Figura 8** apresenta uma representação esquemática do nanocarreador proposto.

Figura 8. Representação esquemática do CLN com ativos, polímeros e tensoativos proposto em nosso estudo. O preenchimento em cor branca do nanocarreador representa o lipídio sólido, ao qual é adicionado o lipídio líquido (representado por quadrados e triângulos abertos). Fonte: Elaborada pelo autor.

7 CONCLUSÕES

A proporção de 7:3 de manteiga de carité e óleo de argan, respectivamente, foi selecionada para a formação do nanocarreador desejado. A adição de ativos líquidos (aumentando a proporção de lipídios líquidos no sistema contendo os ativos) influenciou a organização estrutural, principalmente NCQ, cuja matriz mostrou-se menos organizada na temperatura próxima à fusão do lipídio sólido comparado a NCA. Mesmo assim, não impediu que os nanocarreadores permanecessem sólidos à temperatura ambiente. Os CLNs produzidos pela técnica de emulsificação/sonicação apresentaram diâmetro médio em escala manométrica e potencial zeta dependentes do tipo de polímero bioadesivo utilizado. As análises com MEV demonstraram a formação de nanopartículas esféricas e de tamanho regular.

Com os ensaios de penetração dos antioxidantes vitamina E e quercetina, observamos que a penetração dos dois antioxidantes foi maior na epiderme viável em pele danificada mimetizando ferida, o que demonstra a importância do estrato córneo como barreira. Não observamos diferença pronunciada na penetração comparando NCQ e NCA.

Pensando no uso consciente de animais em experimentos, optamos por fazer o teste de HET-CAM para verificar a toxicidade dos sistemas. NCA não causou alterações perceptíveis na membrana, o que demonstra o perfil de segurança superior à NCQ. O aparecimento de lise ao redor de 5 minutos quando da encapsulação do óleo de melaleuca a 5% pode estar associado ao efeito promotor de absorção que alguns autores atribuem a esse óleo, e sugere cautela quanto ao uso de concentrações elevadas.

Observamos o efeito antimicrobiano do óleo de melaleuca a 5% em cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo demonstrado que polímero usado para recobrir a partícula não influenciou a atividade microbiana do óleo de melaleuca. A ausência de efeito quando da encapsulação do óleo de melaleuca a 1% sugere que essa concentração, embora possa ser mais segura, não é eficaz.

NCA vazio e com os ativos foram capazes de estimular a migração celular comparado ao FBS 10% (agente quimioatrativo, controle positivo), sendo que na

presença dos antioxidantes, a diferença foi mais pronunciada, o que sugere a importância da presença desses compostos.

Portanto, pode-se concluir que este trabalho possibilitou obter CLNs modificadas com quitosana ou alginato. Comparado a NCQ, NCA apresentou estabilidade físico-química superior, menor potencial irritativo e estrutura interna mais bem organizada, o que sugere seu potencial como uma nova estratégia para o tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D. J.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. Photon correlation spectroscopy. **Aaps Pharmsci**, v. 2, n. 2, p. U175-U188, 2000. ISSN 1522-1059.
- AKIHISA, T. et al. Triterpene Alcohol and Fatty Acid Composition of Shea Nuts from Seven African Countries. **Journal of Oleo Science**, v. 59, n. 7, p. 351-360, Jul 2010. ISSN 1345-8957. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000279189700002 >.
- ALBINI, A. et al. The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 563-571, 2004. ISSN 0214-6282. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000224180300022 >.
- ALMEIDA, M. E. S. et al. Hyperglycemia reduces integrin subunits alpha v and alpha 5 on the surface of dermal fibroblasts contributing to deficient migration. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 421, n. 1-2, p. 19-28, Oct 2016. ISSN 0300-8177. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000383665000002 >.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. Farmacotécnica – Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. **Farmacotécnica – Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**, p. p. 288-291, 2000.
- ANVISA, A. N. D. V. S. Uso off label: erro ou necessidade? , 2013. Available at: < http://www.scielo.br/pdf/rsp/v46n2/it_decit.pdf >.
- ATTAMA, A. A.; SCHICKE, B. C.; MULLER-GOYMANN, C. C. Further characterization of theobroma oil-beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 294-306, Nov 2006. ISSN 0939-6411. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000242502200005 >.
- AVSAR, U. et al. The Effects of Argan Oil in Second-degree Burn Wound Healing in Rats. **Ostomy Wound Management**, v. 62, n. 3, p. 26-34, Mar 2016. ISSN 0889-5899. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000394497400003 >.
- AZZI, A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 1, p. 16-21, Jul 2007. ISSN 0891-5849. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000247395000003 >.
- BARILE, F. A. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 61, n. 2, p. 136-45, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1873-488X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096797> >.
- BENELLI, G. et al. Biototoxicity of Melaleuca alternifolia (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psyttalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 596-603, Oct 2013. ISSN 0926-6690. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000326903600079 >.
- BLANES. **Prevenção e tratamento de úlcera por pressão**. Atheneu, São Paulo 2014.
- BONKOUNGOU, E. G. Monographie du karité, *Butyrospermum paradoxum* (Gaertn. f.) Hepper, espèce agroforestière à usages multiples. 1987.

BOSE, S. et al. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **Int J Pharm**, v. 441, n. 1-2, p. 56-66, Jan 2013. ISSN 1873-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23262430> >.

BOSE, S.; MICHNIAK-KOHN, B. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 3, p. 442-52, Feb 2013. ISSN 1879-0720. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246734> >.

BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. Review of the Current Management of Pressure Ulcers. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 7, n. 2, p. 57-67, Feb 2018. ISSN 2162-1918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29392094> >.

BRANKA, R. et al. Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. 69-75, May 2009. ISSN 0939-6411. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000265777400009 >.

BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. London: Chapman and Hall, 1988.

CANO SANCHEZ, M. et al. Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. **Antioxidants (Basel)**, v. 7, n. 8, Jul 2018. ISSN 2076-3921. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30042332> >.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 6, p. 1914-20, Jun 2002. ISSN 0066-4804. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019108> >.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Safety, efficacy and provenance of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil. **Contact Dermatitis**, v. 45, n. 2, p. 65-7, Aug 2001. ISSN 0105-1873. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553113> >.

CARVALHO, F. C. et al. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, Nov 2013. ISSN 0363-9045. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000325282400018 >.

CATANZANO, O. et al. Spray-by-spray in situ cross-linking alginate hydrogels delivering a tea tree oil microemulsion. **Eur J Pharm Sci**, v. 66, p. 20-8, Jan 2015. ISSN 1879-0720. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277680> >.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2^o edition. New York, Marcel Dekker: 2001.

CHIN, K. B.; CORDELL, B. The effect of tea tree oil (Melaleuca alternifolia) on wound healing using a dressing model. **J Altern Complement Med**, v. 19, n. 12, p. 942-5, Dec 2013. ISSN 1557-7708. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23848210> >.

CICHEWICZ, A. et al. Cutaneous delivery of alpha-tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 817-826, Jun 2013a. ISSN 0022-3573. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000318520200005 >.

Cutaneous delivery of alpha-tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 817-26, Jun 2013b. ISSN 2042-7158 (Electronic)0022-3573 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647675> >.

COLLETT, J.; MORETON, C. **Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada**. São Paulo, SP: Artmed, 2005.

COSTA-FERNANDEZ, S.; DARTORA, V.; LOPES, L. B. **Métodos em Farmacologia - In press**. São Paulo: Editora Payá, 2019.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, Jan 2000. ISSN 1364-5072. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000085840200019 >.

. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, n. 2, p. 87-91, Feb 2001. ISSN 1420-3049. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000166836100004 >.

DA SILVA, E. C.; DE PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. D. R. **Análise térmica aplicada à cosmetologia**. DE PAOLA, M. V. R. V. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 43, nº 3 2007.

DA SILVA, P. B. et al. Structural Features and the Anti-Inflammatory Effect of Green Tea Extract-Loaded Liquid Crystalline Systems Intended for Skin Delivery. **Polymers**, v. 9, n. 1, Jan 2017. ISSN 2073-4360.

DAMASCENO, E. A. **Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis**. Rev Cienc Farm Básica Apl 32:9-18 2011.

DE OLIVEIRA, B. F. et al. beta-Carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid: differential profile of antioxidant, inflammatory status and regulation of gene expression in human mononuclear cells of diabetic donors. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**, v. 29, n. 8, p. 636-645, Nov 2013. ISSN 1520-7560.

DE PAEPE, K. et al. Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. **Skin Res Technol**, v. 11, n. 1, p. 61-9, Feb 2005. ISSN 0909-752X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691261> >.

DECHARNEUX, T. et al. EFFECT OF VARIOUS FLAVONOIDS ON LYSOSOMES SUBJECTED TO AN OXIDATIVE OR AN OSMOTIC-STRESS. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 7, p. 1243-1248, Oct 1992. ISSN 0006-2952. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1992KT90400002 >.

DETONI, C. B. et al. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochem Photobiol**, v. 88, n. 4, p. 913-21, Jul-Aug 2012. ISSN 1751-1097 (Electronic)0031-8655 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443373> >.

DINGLER, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **J Microencapsul**, v. 16, n. 6, p. 751-67, 1999 Nov-Dec 1999. ISSN 0265-2048. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575627> >.

DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, n. 4, p. 233-40, Oct 1995. ISSN 1073-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564549> >.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm Res**, v. 23, n. 12, p. 2709-28, Dec 2006. ISSN 0724-8741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096184> >.

EDMONDSON, M. et al. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. **Int Wound J**, v. 8, n. 4, p. 375-84, Aug 2011. ISSN 1742-481X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21564552> >.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Detergent and skin irritation. **Clin Dermatol**, v. 14, n. 1, p. 15-21, 1996 Jan-Feb 1996. ISSN 0738-081X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901394> >.

EL ABBASSI, A. et al. Physicochemical characteristics, nutritional properties, and health benefits of argan oil: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 11, p. 1401-14, 2014. ISSN 1549-7852. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24580537> >.

ESPOSITO, E. et al. Nanosystems for skin hydration: a comparative study. **Int J Cosmet Sci**, v. 29, n. 1, p. 39-47, Feb 2007. ISSN 1468-2494. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489310> >.

FABRE, G. et al. Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. **Chemical Communications**, v. 51, n. 36, p. 7713-7716, 2015. ISSN 1359-7345. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000353218700031 >.

FINSY, R.; DEJAEGER, N. PARTICLE SIZING BY PHOTON-CORRELATION SPECTROSCOPY .2. AVERAGE VALUES. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 8, n. 3, p. 187-193, Sep 1991. ISSN 0934-0866. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1991GH86700003 >.

FLORENCE HENRY, L. D., GILLES PAULY, ZOUBIDA CHARROUF CESSIONÁRIO ORIGINAL BASF BEAUTY CARE SOLUTIONS FRANCE S.A.S. **Composition containing a plant extract and process for producing same**. <http://www.google.com.af/patents/US8815305>. France. US8815305 B2 2014.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 45, n. 3, p. 221-9, May 1998. ISSN 0939-6411. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653626> >.

FREITAS, C.; MULLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN (TM)) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221-229, Jun 1998. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000075141000011 >.

GAINZA, G. et al. Development and in vitro evaluation of lipid nanoparticle-based dressings for topical treatment of chronic wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 404-411, Jul 2015. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000356836700046 >.

GALLI, F. et al. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p. 16-36, Jan 2017. ISSN 0891-5849. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000392361200002 >.

GHATE, V. M. et al. Nanostructured lipid carriers for the topical delivery of tretinoin. **Eur J Pharm Biopharm**, Aug 9 2016. ISSN 1873-3441 (Electronic)0939-6411 (Linking).

GIACCO, F.; BROWNLIE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, Oct 2010. ISSN 0009-7330.

GILLERON, L. et al. Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. **Toxicology in Vitro**, v. 10, n. 4, p. 431-&, Aug 1996. ISSN 0887-2333. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996VK73600006 >.

GIOIA, F.; CELLENO, L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin Res Technol**, v. 8, n. 3, p. 178-86, Aug 2002. ISSN 0909-752X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12236888> >.

GOITRE, L. et al. Molecular Crosstalk between Integrins and Cadherins: Do Reactive Oxygen Species Set the Talk? **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 807682, 2012. ISSN 2090-1747. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203898> >.

GOLLI, F.; AZZI, A. Present trends in vitamin E research. **Biofactors**, v. 36, n. 1, p. 33-42, Jan-Feb 2010. ISSN 0951-6433. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000275021100005 >.

GOMATHI, K. et al. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. **Biomaterials**, v. 24, n. 16, p. 2767-2772, Jul 2003. ISSN 0142-9612. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000182913700011 >.

GOUPY, P. et al. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 6, p. 933-46, Sep 15 2007. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849 (Linking).

GRANDO, T. H. et al. Melaleuca alternifolia anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by Haemonchus contortus. **Exp Parasitol**, v. 170, p. 177-183, Nov 2016. ISSN 1090-2449. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27646626> >.

GU, Z.; ALEXANDRIDIS, P. **Osmotic stress measurements of intermolecular forces in ordered assemblies formed by solvated block copolymers**: Macromolecules. v.37: p.912-924 p. 2004.

GUO, Y. Y. et al. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 175-186, May 2013. ISSN 0928-0987. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000319639800010 >.

GUPTA, A.; SINGH, R. L.; RAGHUBIR, R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 241, n. 1-2, p. 1-7, Dec 2002. ISSN 0300-8177. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000178932900001 >.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-21, May 2008. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480812> >.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. COMMENTS ON REVIEW OF FREE-RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 93-95, 1992. ISSN 0891-5849. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1992HD52100011 >.

HAFNER, A. et al. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 1005-23, 2014. ISSN 1178-2013. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600222> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J**, v. 219, n. 1, p. 1-14, Apr 1984. ISSN 0264-6021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326753> >.

HAMMER, K. A. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: a review of efficacy, tolerability and potential modes of action. **Int J Antimicrob Agents**, v. 45, n. 2, p. 106-10, Feb 2015. ISSN 1872-7913. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465857> >.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 909-915, Feb 2012. ISSN 0066-4804. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000299658900042 >.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 11, p. 2179-205, Nov 2007. ISSN 0278-6915. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698276> >.

HATAHET, T. et al. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 108, p. 41-53, Nov 2016. ISSN 1873-3441. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27565033> >.

HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. et al. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, n. 10, p. 1886-95, May 2005. ISSN 0173-0835. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832299> >.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, Oct 2003. ISSN 0142-9612. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000184239500021 >.

HONFO, F. G. et al. Nutritional Composition of Shea Products and Chemical Properties of Shea Butter: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 673-686, Jan 2014. ISSN 1040-8398. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000327186000010 >.

HOSMER, J. M.; STEINER, A. A.; LOPES, L. B. Lamellar Liquid Crystalline Phases for Cutaneous Delivery of Paclitaxel: Impact of the Monoglyceride. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 3, p. 694-706, Mar 2013. ISSN 0724-8741.

HU, M. S.; LONGAKER, M. T. Dipeptidyl Peptidase-4, Wound Healing, Scarring, and Fibrosis. **Plast Reconstr Surg**, v. 138, n. 5, p. 1026-1031, Nov 2016. ISSN 1529-4242. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27782998> >.

ICCVAM; NIH. **Test method evaluation report: In vitro ocular toxicity test methods for identifying severe irritants and corrosives**. NO.06, N. P.: National Toxicology Program (NTP), NICEATM, NIEHS, NIH, U.S. Public Health Service, Department of Health and Human Services. 2006.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **Nomeclatura, Padrões e Apresentação dos Resultados em Análise Térmica**. 1980.

JANDERA, V. et al. Cooling the burn wound: evaluation of different modalities. **Burns**, v. 26, n. 3, p. 265-270, May 2000a. ISSN 0305-4179.

Cooling the burn wound: evaluation of different modalities. **Burns**, v. 26, n. 3, p. 265-70, May 2000b. ISSN 0305-4179. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741593> >.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **J Control Release**, v. 66, n. 2-3, p. 115-26, May 2000. ISSN 0168-3659. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742573> >.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **Int J Pharm**, v. 199, n. 2, p. 167-77, Apr 2000. ISSN 0378-5173. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802410> >.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, n. 88, Jun 2014. ISSN 1940-087X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000349290100010 >.

JÄRBRINK, K. et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Syst Rev**, v. 5, n. 1, p. 152, Sep 2016. ISSN 2046-4053. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27609108> >.

KAFEDJIISKI, K. et al. Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 48-58, Oct 2007. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000250060600008 >.

KECK, C. M. et al. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): the value of different alkyl polyglucoside surfactants. **Int J Pharm**, v. 474, n. 1-2, p. 33-41, Oct 2014. ISSN 1873-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108048> >.

KHALLOUKI, F. et al. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. **Eur J Cancer Prev**, v. 12, n. 1, p. 67-75, Feb 2003. ISSN 0959-8278. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548113> >.

KUCHLER, S. et al. 3D-Wound healing model: Influence of morphine and solid lipid nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 24-30, Jul 2010. ISSN 0168-1656. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000280028900004 >.

LAMERS, M. L. et al. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22865, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking).

LANGRIDGE, B. J.; RAMMAN, S.; TOFT, N. J. Embedded ring injury - a rare presentation with an atypical aetiology. **Int Wound J**, Apr 2017. ISSN 1742-481X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28448693> >.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. **Estabilidade de formulações cosméticas**. Int. J. Pharm. Compounding,, 2001.

LINDER, K. E.; NICOLAU, D. P.; NAILOR, M. D. Epidemiology, treatment, and economics of patients presenting to the emergency department for skin and soft tissue infections. **Hosp Pract (1995)**, v. 45, n. 1, p. 9-15, Feb 2017. ISSN 2154-8331. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055287> >.

LIPPACHER, A.; MULLER, R. H.; MADER, K. Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 227-230, Mar 2000. ISSN 0378-5173.

LOO, C. et al. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 13-22, 2013. ISSN 1178-2013 (Electronic)1176-9114 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293516> >.

LOPES, L. B. et al. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 209-215, Nov 2007. ISSN 0928-0987. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000250910200006 >.

LOUGHLIN, R. et al. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 428-433, Apr 2008. ISSN 0266-8254. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000254192600002 >.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food Chem Toxicol**, v. 23, n. 2, p. 287-91, Feb 1985. ISSN 0278-6915. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4040077> >.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. THE HET CAM TEST - AN ALTERNATIVE TO THE DRAIZE EYE TEST. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6-7, p. 495-496, Jun-Jul 1986. ISSN 0278-6915. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1986F052000010 >.

MACHADO, R. M. et al. Vaginal semisolid products: Technological performance considering physiologic parameters. **Eur J Pharm Sci**, v. 109, p. 556-568, Nov 15 2017. ISSN 1879-0720 (Electronic)0928-0987 (Linking).

MAGALDI, S. et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 39-45, Jan 2004. ISSN 1201-9712. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000223032300010 >.

MARANZ, S. et al. Nutritional values and indigenous preferences for shea fruits (*Vitellaria paradoxa* CF Gaertn. f.) in African agroforestry parklands. **Economic Botany**, v. 58, n. 4, p. 588-600, Win 2004. ISSN 0013-0001. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000227297600010 >.

MARGOLIS, D. J. **Measurements in wound healing**. USA: Mani, Raj, Romanelli, Marco, Shukla, Vijay, 2013.

MARRO, D.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 213-217, Jan 2001. ISSN 0168-3659. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000166774600019 >.

MATSHETSHE, K. I. et al. Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. **Int J Biol Macromol**, v. 118, n. Pt A, p. 676-682, Oct 2018. ISSN 1879-0003. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29959997> >.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012. ISSN 1744-683X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000299291900001 >.

MCKENZIE, B. et al. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **Int J Pharm**, v. 490, n. 1-2, p. 1-8, Jul 2015. ISSN 1873-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25980731> >.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, Dec 2012. ISSN 0169-409X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000312616700009 >.

MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 1, p. 19-25, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0738-081X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276197> >.

MERINO, V. et al. Electrorepulsion versus electroosmosis: Effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 5, p. 758-761, May 1999. ISSN 0724-8741. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000080405600025 >.

MILLER, D.; LOFFLER, M. Rheological effects with a hydrophobically modified polymer. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, n. 1-3, p. 165-169, Oct 2006. ISSN 0927-7757. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000240613200022 >.

MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **Int J Pharm**, v. 414, n. 1-2, p. 267-75, Jul 2011. ISSN 1873-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596122> >.

MOGHIMIPOUR, E.; RAMEZANI, Z.; HANDALI, S. Solid Lipid Nanoparticles as a Delivery System for Zataria multiflora Essential Oil: Formulation and Characterization. **Current Drug Delivery**, v. 10, n. 2, p. 151-157, Apr 2013. ISSN 1567-2018. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000316618600001 >.

MONTENEGRO, L. et al. Rosemary Essential Oil-Loaded Lipid Nanoparticles: In Vivo Topical Activity from Gel Vehicles. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, Dec 2017. ISSN 1999-4923. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000418792200012 >.

MU, L.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol). **J Control Release**, v. 80, n. 1-3, p. 129-44, Apr 2002. ISSN 0168-3659. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943393> >.

MUDGE, B. P. et al. Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 1, p. 52-58, Jan-Feb 2002. ISSN 1067-1927. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000175467700007 >.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, Jul 2000. ISSN 0939-6411. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000087823100012 >.

MULLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, Jul 2007. ISSN 0169-409X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000249543300013 >. MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, Nov 2002. ISSN 0169-409X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000179355800011 >.

MUSALMAH, M. et al. Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, p. S448-S451, Oct 2002. ISSN 0964-7058.

MÜLLER, C. R. et al. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 26, n. 3, p. 343-7, Mar 2000. ISSN 0363-9045. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10738652> >.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Curr Drug Discov Technol**, v. 8, n. 3, p. 207-27, Sep 2011. ISSN 1875-6220. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291409> >.

NAIR, A. et al. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 423-434, Jul-Sep 2013. ISSN 1984-8250. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000326653400004 >.

NAUTA, A.; GURTNER, G.; LONGAKER, M. T. Wound healing and regenerative strategies. **Oral Dis**, v. 17, n. 6, p. 541-9, Sep 2011. ISSN 1601-0825. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21332599> >.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de fisico-quimica: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre, RS, Brasil: Artmed, 2002. 299.

NG, W. Y. et al. Monoolein-alginate beads as a platform to promote adenosine cutaneous localization and wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1104-1111, Sep 2017. ISSN 0141-8130. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000406984300121 >.

NOWAK, J.; LAFFLEUR, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Preactivated hyaluronic acid: A potential mucoadhesive polymer for vaginal delivery. **Int J Pharm**, v. 478, n. 1, p. 383-9, Jan 2015. ISSN 1873-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445990> >.

OH, S. et al. Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 96, p. 477-83, Oct 2015. ISSN 1873-3441 (Electronic)0939-6411 (Linking).

ONO, S. et al. Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns. **Burns**, v. 41, n. 4, p. 820-4, Jun 2015. ISSN 1879-1409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25468471> >.

OUSEY, K. et al. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. **J Wound Care**, v. 25, n. 3, p. 122, 124-30, Mar 2016. ISSN 0969-0700 (Print)0969-0700 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26947692> >.

P.M.S.P et al. **Protocolo de Prevenção e Tratamento de Úlceras Crônicas e do Pé Diabético**. São Paulo 2010.

PALMIERI, B.; VADALÀ, M.; LAURINO, C. Review of the molecular mechanisms in wound healing: new therapeutic targets? **J Wound Care**, v. 26, n. 12, p. 765-775, Dec 2017. ISSN 0969-0700. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29244975> >.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 170-184, Jan 2009. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000262694100023 >.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **Int J Pharm**, v. 366, n. 1-2, p. 170-84, Jan 2009. ISSN 0378-5173. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992314> >.

PARK, N. Y.; LIM, Y. Short term supplementation of dietary antioxidants selectively regulates the inflammatory responses during early cutaneous wound healing in diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, Nov 2011. ISSN 1743-7075. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000297750200001 >.

PENG, J. et al. Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. **J Food Drug Anal**, v. 23, n. 4, p. 828-835, Dec 2015. ISSN 1021-9498. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911501> >.

PEPE, D. et al. Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. **Int J Pharm**, v. 434, n. 1-2, p. 420-428, Jun 9 2012a. ISSN 1873-3476 (Electronic)0378-5173 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22692080 >.

Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. **Int J Pharm**, v. 434, n. 1-2, p. 420-8, Sep 2012b. ISSN 1873-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22692080> >.

PEREZ-MATUTE, P.; ZULET, M. A.; MARTINEZ, J. A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 771-779, Dec 2009. ISSN 1471-4892. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000272445300015 >.

PESSOA, A. F. M. et al. Oral administration of antioxidants improves skin wound healing in diabetic mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 6, p. 981-993, Nov-Dec 2016. ISSN 1067-1927. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000392825000128 >.

POP, M. A.; ALMQUIST, B. D. Biomaterials: A potential pathway to healing chronic wounds? **Exp Dermatol**, Jan 2017. ISSN 1600-0625. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28094868> >.

PYO, S. M. et al. A novel concept for the treatment of couperosis based on nanocrystals in combination with solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 9-16, Aug 2016. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000380754300002 >.

RASIK, A. M.; SHUKLA, A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. **Int J Exp Pathol**, v. 81, n. 4, p. 257-63, Aug 2000. ISSN 0959-9673. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10971747> >.

RAY, G. T.; SUAYA, J. A.; BAXTER, R. Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 252, May 2013. ISSN 1471-2334. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721377> >.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704-1709, Dec 2003. ISSN 0036-8075. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000186970100033 >.

RITTHIDEJ, G. **Nasal Delivery of Peptides and Proteins with Chitosan and Related Mucoadhesive Polymers**. Peptide and Protein Delivery: by:Chris Van Der Walle Pages 47–68 p. 2011.

ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 9, p. 2709-29, Sep 2014. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905298> >.

ROTHENBERGER, J. et al. The Effect of Polyhexanide, Octenidine Dihydrochloride, and Tea Tree Oil as Topical Antiseptic Agents on In Vivo Microcirculation of the Human Skin: A Noninvasive Quantitative Analysis. **Wounds**, v. 28, n. 10, p. 341-346, Oct 2016. ISSN 1943-2704. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27768571> >.

RUDOLF, J. et al. NADPH Oxidases and Their Roles in Skin Homeostasis and Carcinogenesis. **Antioxidants & Redox Signaling**, Nov 2017. ISSN 1523-0864. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000417200800001 >.

SAPORITO, F. et al. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 175-186, 2018. ISSN 1178-2013. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000419077300002 >.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. **Aaps Journal**, v. 10, n. 1, p. 120-132, Mar 2008. ISSN 1550-7416. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000255198200013 >.

SCHAFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 165-171, Aug 2008. ISSN 1043-6618. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000260809400011 >.

SCHAFFAZICK, S. R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. POHLMANN, A. R.: Química Nova. Vol 26: p. 726 – 737 p. 2003.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006. ISSN 1660-5527. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864974> >.

SCHULTZ, G. S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 134-148, Mar-Apr 2011. ISSN 1067-1927. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000287878100222 >.

SCOTT, J. A.; KING, G. L. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. **Vitamin E and Health**, v. 1031, p. 204-213, 2004. ISSN 0077-8923.

SEN, C. K. et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair Regen**, v. 17, n. 6, p. 763-71, Nov-Dec 2009. ISSN 1524-475X (Electronic)1067-1927 (Linking).

SHAH, S. M. H. et al. FABRICATION AND EVALUATION OF SMART NANOCRYSTALS OF ARTEMISININ FOR ANTIMALARIAL AND ANTIBACTERIAL EFFICACY. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 1, p. 251-262, 2017. ISSN 0189-6016. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000393701400027 >.

SHAPIRA, S. et al. Terpinen-4-ol: A Novel and Promising Therapeutic Agent for Human Gastrointestinal Cancers. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0156540, 2016. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27275783> >.

SHI, F. et al. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2033-2043, 2012. ISSN 1178-2013. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000302955500001 >.

SHUKLA, A.; RASIK, A. M.; PATNAIK, G. K. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. **Free Radic Res**, v. 26, n. 2, p. 93-101, Feb 1997. ISSN 1071-5762. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257121> >.

SIGMA-ALDRICH. **Catalago de produtos** 2019.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v. 341, n. 10, p. 738-46, Sep 1999. ISSN 0028-4793. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461> >.

SMART, J. D. AN INVITRO ASSESSMENT OF SOME MUCOSA-ADHESIVE DOSAGE FORMS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 69-74, Jun 1991. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1991FX54700009 >.

The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 11, p. 1556-68, Nov 2005. ISSN 0169-409X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198441> >.

SMITH, R. G. Off-label Use of Prescription Medication: A Literature Review. **Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 22, n. 4, p. 78-86, Apr 2010. ISSN 1044-7946. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000276961400001 >.

SOUTO, E. B. **NANOPARTÍCULAS DE LIPÍDIOS SÓLIDOS MÉTODOS CLÁSSICOS DE PRODUÇÃO LABORATORIAL**. PINHO, S. C. São Paulo, SP: Quim. Nova. vol 34 2011.

SOUTO, E. B.; ALMEIDA, A. J.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN (R), NLC (R)) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 317-331, Dec 2007. ISSN 1550-7033. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000252406100002 >.

SOUTO, E. B. et al. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71-77, Jun 2004a. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000222091900006 >.

Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 83-90, Jul 2004b. ISSN 0939-6411. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000222726000012 >.

SPADARI, C. D.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. Potential Use of Alginate-Based Carriers As Antifungal Delivery System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, Jan 2017. ISSN 1664-302X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000392862000001 >.

STEILING, W. et al. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicol In Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-84, Apr 1999. ISSN 0887-2333. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654494> >.

STOTTS, N. A. et al. Sterile versus clean technique in postoperative wound care of patients with open surgical wounds: a pilot study. **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v. 24, n. 1, p. 10-8, Jan 1997. ISSN 1071-5754. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204846> >.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, n. 1, Feb 2010. ISSN 1468-6996. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000276907900005 >.

SUTER, F. et al. Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 304-309, Nov 2016. ISSN 0939-6411. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000388052600032 >.

SÁNCHEZ-NAVARRO, M. M. et al. Microencapsulation of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil as biocide for footwear applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 1722-1727, 2011. ISSN 0193-2691.

TANG, J. et al. Key structure of brij for overcoming multidrug resistance in cancer. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 2, p. 424-30, Feb 2013. ISSN 1526-4602. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311629> >.

TEILHARD DE CHARDIN, P. **O Fenômeno Humano**. São Paulo: Editora Pensamento-Cultrix Ltda, 1988.

TICHOTA, D. M. et al. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3855-3864, 2014. ISSN 1178-2013.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 621-630, 2002. ISSN 0363-9045. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000176824400001 >.

VEDAKUMARI, W. S. et al. Quercetin impregnated chitosan-fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials - Fabrication, characterization and in vivo analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 106-112, Jan 2017. ISSN 0928-0987. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000390699500013 >.

VETROVA, E. V. et al. A Simple Way for the Preparation of Natural Antioxidant Quercetin from Rutin by Subcritical Water. **J Nat Sci Biol Med**, v. 8, n. 2, p. 213-215, 2017 Jul-Dec 2017. ISSN 0976-9668. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28781490> >.

VIEIRA, L. F. A. et al. Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. **Nanoscale Res Lett**, v. 12, n. 1, p. 200, Dec 2017. ISSN 1931-7573. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28314368> >.

WAGENER, F. A.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D. M. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 5, p. 9126-67, Apr 2013. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624605> >.

WENDLANDT, W. W. Thermal analysis. **Anal Chem**, v. 58, n. 5, p. 1R-6R, Apr 1986. ISSN 0003-2700. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3521384> >.

WONG, V. W.; GURTNER, G. C. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. **Exp Dermatol**, v. 21, n. 10, p. 729-34, Oct 2012. ISSN 1600-0625. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742728> >.

WOODLEY, J. Bioadhesion - New possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p. 77-84, 2001. ISSN 0312-5963. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000167652900001 >.

XU, R. L. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112-115, Apr 2008. ISSN 1674-2001. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000256589100008 >.

YADAV, A. K.; MISHRA, P.; AGRAWAL, G. P. An insight on hyaluronic acid in drug targeting and drug delivery. **J Drug Target**, v. 16, n. 2, p. 91-107, Feb 2008. ISSN 1061-186X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274931> >.

YANG, Y. et al. Effects of Preheating and Storage Temperatures on Aroma Profile and Physical Properties of Citrus-Oil Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 35, p. 7781-7789, Sep 2017. ISSN 0021-8561. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000410255400022 >.

ZAMPIERI, N. et al. A prospective study in children: Pre- and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions. **Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 63, n. 9, p. 1474-1478, Sep 2010. ISSN 1748-6815. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000281513300022 >.

ZHAO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for sustained pulmonary delivery of Yuxingcao essential oil: Preparation, characterization and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1-2, p. 364-371, Jan 2017. ISSN 0378-5173. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000390437300039 >.

ZHOU, X. et al. Functional poly(ϵ -caprolactone)/chitosan dressings with nitric oxide-releasing property improve wound healing. **Acta Biomater**, Mar 2017. ISSN 1878-7568. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28285076> >.

ZIELINS, E. R. et al. Wound healing: an update. **Regen Med**, v. 9, n. 6, p. 817-30, 2014. ISSN 1746-076X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25431917> >.