



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOLOGIA MOLECULAR**

**VIVIANE LOPES ROCHA CORRÊA**

---

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
MISTAS DE QUITOSANA E LECITINA CONTENDO MELATONINA PARA O  
TRATAMENTO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS**

---

**TESE DE DOUTORADO**

**GOIÂNIA – 2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação       Tese

#### 2. Nome completo do autor

Viviane Lopes Rocha Corrêa

#### 3. Título do trabalho

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MISTAS DE QUITOSANA E LECITINA CONTENDO MELATONINA PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS.

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Lopes Rocha, Biomédico**, em 27/10/2020, às 19:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 28/10/2020, às 09:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1634490** e o código CRC **433C3F75**.

---

Referência: Processo nº 23070.031744/2020-08

SEI nº 1634490



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

Viviane Lopes Rocha Corrêa

#### 3. Título do trabalho

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MISTAS DE QUITOSANA E LECITINA CONTENDO MELATONINA PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS.

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **VIVIANE LOPES ROCHA, Usuário Externo**, em 24/04/2023, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 24/04/2023, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3508513** e o código CRC **5CC57BD9**.

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOLOGIA MOLECULAR**

---

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
MISTAS DE QUITOSANA E LECITINA CONTENDO MELATONINA PARA O  
TRATAMENTO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS**

---

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal de Goiás,  
como requisito para obtenção do título de  
Doutor em Genética e Biologia Molecular.**

**Candidata: Viviane Lopes Rocha Corrêa  
Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral  
Coorientadora: Profa. Dra. Liliana Borges de Menezes Leite**

**GOIÂNIA – 2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lopes Rocha Corrêa, Viviane  
Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Mistas de Quitosana e Lecitina Contendo Melatonina para o Tratamento de Feridas em Ratos Diabéticos [manuscrito] / Viviane Lopes Rocha Corrêa. - 2020.  
70 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral; co-orientadora Dra. Liliana Borges de Menezes Leite.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Nanopartículas. 2. Diabetes. 3. Cicatrização. 4. Quitosana. 5. Lecitina. I. Corrêa Amaral, André, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº **26** da sessão de Defesa de Tese de **Viviane Lopes Rocha Corrêa** que confere o título de Doutor(a) em Genética e Biologia Molecular.

Ao/s **dezenove dias do mês de agosto de 2020**, a partir da(s) **13h30**, por videoconferência, seguindo portaria CAPES no. 36 de 16 de março de 2020 e recomendação da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE LECITINA E QUITOSANA CONTENDO MELATONINA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS**”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **ANDRÉ CORRÊA AMARAL (UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) **ANAMÉLIA LORENZETTI BOCCA (UNB)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **ANTÔNIO CLÁUDIO TEDESCO (USP)**, membro titular externo, Professor(a) Doutor(a) **DANIELLE GUIMARÃES ALMEIDA DINIZ (UFG)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **MARINA PACHECO MIGUEL (UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca sugeriram alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **ANDRÉ CORRÊA AMARAL**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **dezenove dias do mês de agosto de 2020**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MISTAS DE QUITOSANA E LECITINA CONTENDO MELATONINA PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS.



Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2020, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Pacheco Miguel, Chefa**, em 19/08/2020, às 18:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Guimarães Almeida Diniz, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2020, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Alves Parente Rocha, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 21/08/2020, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1498074** e o código CRC **4FEBF92D**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.031744/2020-08

SEI nº 1498074

A conclusão deste doutorado é, para mim, a maior conquista da minha vida profissional e acadêmica. É a coroação de uma longa e difícil jornada. E chegar até aqui só foi possível por causa de duas pessoas: meus pais, Vilma e Leonel.

Foram eles quem me deram sempre o melhor que tinham em si. Foram eles quem me proporcionaram as melhores oportunidades que podiam. Foram eles os primeiros a acreditarem em mim e na minha educação.

Mãe... Lembra todos os lanches e cafés que você já me preparou enquanto eu estudava, ou das inúmeras orações que você já fez pra que eu tivesse bons resultados nas minhas provas? Lembra todos os uniformes limpos e cheirosos e todos os materiais que você sempre me proporcionou, com todo o cuidado do mundo?

Pai... Lembra aquele desconto que você foi humildemente pedir lá naquele colégio particular, pra que eu pudesse fazer um bom terceiro ano do ensino médio e tivesse a chance de entrar em uma universidade pública? Lembra todas as vezes que você me disse que estudar era o melhor caminho?

Pois é... Valeu a pena! Tudo valeu a pena.

Essa conquista só existe porque vocês existem e ela só poderia ser dedicada a vocês. Vocês são a razão de tudo. Vocês me trouxeram até aqui.

Eternamente, obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas lerão esta tese. As que me conhecem sabem que não só por ela, mas por tudo o que há na minha vida, eu sempre irei agradecer a Deus, em primeiro lugar. É Ele quem me guia, quem me sustenta, quem me direciona para todas as situações necessárias, sejam elas boas ou ruins, pra que eu me torne um ser melhor e evolua.

Mesmo tendo dedicado esta tese a eles, preciso citar novamente meus pais, e agradecê-los mais uma vez, por todos os motivos aqui já ditos, por tanto amor e tanto orgulho que sentem por mim; sentimentos que me impulsionam e me fazem querer ir além. Aqui cito também minha única irmã, Vanessa, minha parceira desde o início, minha menina que me ama e apoia sempre, mesmo sendo exatamente o meu oposto. E por ser tão o meu avesso é que aprendemos tanto uma com a outra, e vivemos em um processo contínuo de evolução, onde aprender a respeitar as atitudes e vontades do próximo parece ser nossa principal lição conjunta; lição esta que foi fundamental no meu processo de doutoramento, pois nem todas as coisas aconteceram conforme a minha vontade e nem todas as pessoas tiveram as mesmas opiniões que eu. E minha irmã está neste mundo pra me mostrar que não há nada de errado nisso. Que a vida é assim.

Meu esposo, André França Corrêa, é também um dos responsáveis pela minha chegada até aqui. Meu amigo, meu companheiro, meu exemplo de ser humano, foi também o pesquisador que me inspirou desde o início, que me mostrou ideias e soluções sem as quais esta tese não existiria, que tem e sempre terá a minha admiração. Obrigada André. Obrigada por ter chegado até aqui comigo. Os primeiros anos do nosso casamento foram também os anos do meu doutorado. E nós dois sabemos que não foi fácil. Mas só eu sei que teria sido muito mais difícil se eu não tivesse tido você ao meu lado sempre.

Agora vou contar aqui uma história que precisa ficar registrada. Meus filhos precisam ler isso quando tudo estiver dando errado e eles tiverem vontade de desistir. Quando o professor André Corrêa Amaral me aceitou como aluna de doutorado, eu havia também me tornado técnica do laboratório coordenado por ele, o LANAB (Laboratório de Nano e Biotecnologia), há poucos meses. Eu estava saindo de uma fase muito complicada profissionalmente, havia lidado com muitos problemas, estava decepcionada com a pesquisa e minha vontade de cursar o doutorado ainda existia apenas por motivos financeiros. Meu desânimo era tamanho que ao entrar no gabinete dele para pedir a oportunidade de fazer a prova e tê-lo como orientador, pensava apenas que aquilo precisava ser feito, por que eu ainda não havia perdido minha crença no “tentar”; porém eu

já estava preparada para ouvir um não. Surpreendentemente, aquele professor que não sabia quase nada sobre mim e que estava trabalhando comigo há pouquíssimo tempo, me disse um sim e acreditou que eu seria capaz.

Ele provavelmente não imagina isso, mas naquele dia, o professor André Correa Amaral me fez voltar a acreditar que meu trabalho poderia fazer sentido, que eu poderia crescer e ser útil à Universidade. Dali em diante, eu comecei a entender que todos os tropeços que eu havia dado e todas as decepções que eu havia enfrentado foram absolutamente necessárias para que eu chegasse em um lugar melhor, profissionalmente e pessoalmente; o lugar que faria desabrochar em mim a vontade de ser uma pesquisadora. Fui orientada, porém ao mesmo tempo em que meu orientador me guiava, ele me dava também a liberdade de pensar, criar e tomar decisões sozinha. Respeitava meu tempo. Nesse percurso eu fui me apaixonando por cada descoberta e cada êxito que eu obtinha por mim mesma, e me sentia cada vez mais capaz.

São quase cinco anos de convivência sem conflito algum.. Pra mim, isso é incrível. Aprendi com o professor André que a relação aluno-orientador pode ser feita de forma humanizada, que ela não precisa ser cruel, ditadora ou estressante para que funcione. Na verdade, aprendi que se é assim, com certeza não está funcionando. Hoje, a menor das conquistas que virão com meu título de doutora é a gratificação financeira. A maior delas é o meu orgulho em olhar no espelho e me sentir uma pesquisadora, saber que amo meu trabalho, que encontrei meu caminho. Obrigada André! Por ser essa pessoa que fez tanto por mim, que significou tanto e que, como se não bastasse, me presenteou com sua amizade.

Professora Liliana Borges de Menezes Leite, minha coorientadora, outro exemplo de ser humano, de orientadora, pesquisadora e professora. Obrigada por tudo. Por ter sido sempre tão paciente, tão solícita, tão compreensiva e prestativa. Obrigada por tratar a mim e a todos os seus alunos como filhos. Por conseguir ser amável até quando é preciso corrigir.

Professora Marina Pacheco Miguel, que maravilhosa você é! Obrigada por me auxiliar quando precisei modificar meu projeto, no meio do curso do meu doutorado, e me deixar aventurar com você no universo da sua tão querida melatonina. Sei que você fez isso por confiar em mim e serei grata sempre.

Prof. José Daniel Gonçalves Vieira é outro professor que aprendi a admirar. Que veio de presente no pacote quando me juntei ao “time do anexo”. O Daniel me mostrou

que às vezes as pessoas mais excêntricas e incompreendidas são aquelas que carregam mais amor no peito. São aquelas que enxergam além e que veem os outros sob um filtro de justiça, de ética e de sonhos. Um professor que tem alunos que são leves, e que sabe que são eles, o que há de mais importante na universidade. Obrigada por tanto exemplo, Daniel.

Agradeço também minhas “fiéis escudeiras”. Minhas companheiras de trabalho e, muito mais que isso, minhas amigas: Elaine Jacob da Silva Carmo, Maysa Paula da Costa Reis e Nathália Almeida de Sousa Gândara; muito, muito obrigada! Por todo o suporte que me deram quando precisei, por cada palavra animadora, por cada almoço compartilhado, por cada bom dia e por todos os abraços que me ajudaram a nunca desistir e que tornaram essa jornada muito mais leve. Espero tê-las para sempre!

Agradeço também à minha equipe de trabalho: Tainara Ribeiro de Souza, Juliana Assis Martins, Gabriel de Castro Nunes Rincon e Reidner Paulino Borges. Deixo meu agradecimento especial à Tainara, que de colega de trabalho se tornou uma amiga. Uma grande amiga. Com certeza nunca nos esqueceremos desta fase, e nem do quanto foi maravilhoso termos uma a outra para nos ajudarmos. Com você eu solidifiquei a ideia de que podemos aprender sempre, com pessoas mais velhas, mas também com pessoas mais novas. Ah! Você não imagina o quanto me ensinou e nem o quanto me fazia feliz quando eu percebia que também lhe ensinava. Obrigada!

Por fim, agradeço aos diretores do IPTSP, que estiveram no cargo durante o meu processo de doutoramento, e que sempre valorizaram e priorizaram o mesmo, permitindo-me colocar minhas atividades necessárias a este processo sempre como prioridade. Professora Flávia Aparecida de Oliveira e Professor José Clecildo Barreto Bezerra, meu muito obrigada!

“Coloque Deus no início, e Ele cuidará do fim.”

(Autor desconhecido)

## RESUMO

A cicatrização de feridas em diabéticos é um problema mundial que pode causar desde complicações simples a danos graves para a saúde do paciente como amputações dos membros comprometidos e até mesmo levar à morte. Este trabalho teve como objetivo produzir nanopartículas de lecitina e quitosana contendo melatonina (MEL-NP) e avaliar uma formulação tópica contendo essas partículas para cicatrização de feridas em modelo animal para diabetes. Para a produção das nanopartículas, uma solução etanólica contendo lecitina de soja e melatonina foi injetada diretamente em uma solução aquosa de quitosana sob sonicação. As nanopartículas produzidas foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas e quanto à toxicidade utilizando o modelo *Galleria mellonella*. As MEL-NP apresentaram tamanho e potencial zeta em torno de 160 nm e 25 mV, respectivamente. A eficiência de encapsulação da melatonina nas nanopartículas foi de 27%. As feridas tratadas com MEL-NP apresentaram reepitelização anterior aos demais tratamentos avaliados, o que indica que essas nanopartículas contribuíram para o processo de cicatrização. Além disso, as MEL-NP alcançaram o efeito terapêutico pretendido, pois foram capazes de induzir a proliferação de fibroblastos e a angiogênese. Observou-se também uma deposição expressiva de colágeno nas feridas dos animais tratados com MEL-NP. De acordo com os resultados obtidos, as MEL-NP produzidas neste estudo podem ser utilizadas no desenvolvimento de estratégias promissoras para a cicatrização de feridas em indivíduos diabéticos.

Palavras-chave: Nanopartículas. Diabetes. Cicatrização. Quitosana. Lecitina.

## ABSTRACT

Wound healing in diabetic patients remains a worldwide problem that can cause amputations and even lead to death. This work aimed to produce melatonin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles (MEL-NP) and to evaluate a topical formulation containing these particles for healing in an *in vivo* animal model for diabetes. For the production of nanoparticles, an ethanolic solution containing soybean lecithin and melatonin was dropwise added to an aqueous solution of chitosan under sonication. The nanoparticles were physical-chemical characterized and evaluated *in vivo* for toxicity using the *Galleria mellonella* model and its potential for wound healing in diabetic rats. The MEL-NP were around 160 nm in size and had a zeta potential around 25 mV. The melatonin entrapment efficiency was 27%. Our results demonstrated that treatment with MEL-NP improved wound healing demonstrated by a wound closure earlier than the other treatments evaluated. An appreciated therapeutic effect was achieved by MEL-NP in the induction of fibroblasts and angiogenic proliferation. In addition, it was accompanied by an expressive collagen deposition. Taking the observed data, the MEL-NP produced could be used in the development of promising strategies for wound healing in diabetic people.

Keywords: Nanoparticles. Diabetes. Healing. Chitosan. Lecithin.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura – Número total estimado de adultos entre 20 e 79 anos com diabetes mellitus em 2019.....   | 16 |
| Figura 2 – Percentual mundial de pessoas em fase produtiva entre 20 e 60 anos que morreram por diabetes mellitus e suas complicações em 2019..... | 18 |
| Figura 3 – Número de mortes em adultos causadas por diabetes mellitus e suas complicações, por idade e sexo, em 2019.....                         | 18 |
| Figura 4 – Representação esquemática da perda lenta e progressiva da massa de células $\beta$ -pancreáticas durante o desenvolvimento DMT1.....   | 20 |
| Figura 5 – Estágios da cicatrização normal de feridas.....  | 24 |
| Figura 6 – Diabetes e cicatrização.....   | 26 |
| Figura 7 – Estrutura química da melatonina.....   | 28 |
| Figura 8 – Perfil circadiano das concentrações plasmáticas da melatonina.....   | 29 |
| Figura 9 – Morfologia e estrutura de nanopartículas de lecitina e quitosana.....  | 35 |
| Figura 10 – Desacetilação da quitina em meio contendo hidróxido de sódio.....   | 36 |
| Figura 11 – Mecanismos de ação antimicrobiana de biomateriais constituídos por quitosana.....   | 37 |
| Figura 12 – Mecanismo hemostático da quitosana.....   | 38 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

DM Diabetes mellitus

DMT1 Diabetes mellitus tipo 1

DMT2 Diabetes mellitus tipo 2

IDF Federação Internacional de Diabetes (do inglês *International Diabetes Federation*)

MMPs Metaloproteinases de Matriz (do inglês *matrix metalloproteinases*)

TIMPs Inibidores Teciduais das Metaloproteinases (do inglês *tissue inhibitors of metalloproteinases*)

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO 1.....  | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 14 |
| 1.1 DIABETES MELLITUS.....                                     | 14 |
| 1.1.1 Aspectos gerais da diabetes mellitus.....                | 14 |
| 1.1.2 Epidemiologia da DM.....                                 | 15 |
| 1.1.3 DMT1 e DMT2.....   | 19 |
| 1.1.4 Complicações da DM: a problemática da cicatrização ..... | 22 |
| 1.2 A MELATONINA.....  | 27 |
| 1.2.1 Propriedades gerais da melatonina.....                   | 27 |
| 1.2.2 A melatonina e o seu potencial na cicatrização.....      | 30 |
| 1.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....                            | 33 |
| 1.4 O POTENCIAL CICATRIZANTE DA QUITOSANA.....                 | 35 |
| 2 JUSTIFICATIVA.....   | 41 |
| 3 OBJETIVOS.....   | 42 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....                                       | 42 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                 | 42 |
| CAPÍTULO 2 .....   | 43 |
| MANUSCRITO.....  | 43 |
| CAPÍTULO 3 .....   | 45 |
| PUBLICAÇÕES DURANTE O DOUTORADO.....                           | 45 |
| 4 CONCLUSÕES.....  | 48 |
| REFERÊNCIAS.....   | 50 |

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

### 1.1.1 Aspectos gerais da diabetes mellitus

A diabetes mellitus (DM) é uma síndrome constituída por um grupo de sinais e sintomas crônicos causados pela hiperglicemia (TUOMI et al., 2014) e pode ser considerada como um agravo de saúde de abrangência mundial, afetando indivíduos de países desenvolvidos e em desenvolvimento (ZIMMET et al., 2016). As formas mais comuns da DM são a DM tipo 2 (DMT2), DM tipo 1 (DMT1) e DM gestacional, embora existam outras formas menos frequentes (TUOMI et al., 2014).

Os métodos utilizados no diagnóstico da DM compreendem três testes. São eles: (1) avaliação dos níveis de glicose plasmática em jejum de 8 horas, (2) teste oral de tolerância à glicose, e (3) avaliação dos níveis de hemoglobina glicada. É considerado diabético o indivíduo que apresentar valores  $\geq 126$  mg/ dL (7,0 mmol/ L) no teste para avaliar os níveis de glicose plasmática em jejum;  $\geq 200$  mg/ dL (11,1 mmol/ L) no teste oral de tolerância à glicose; e  $\geq 48$  mmol/ mol no teste da hemoglobina glicada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019; REPORT; CONSULTATION, 2011; WHO/IDF, 2006). A avaliação dos níveis de hemoglobina glicada pode indicar hiperglicemia crônica, apesar de não atestar diretamente altos níveis de glicose plasmática (Bonora & Tuomilehto 2011). Considera-se o teste oral de tolerância à glicose mais preciso que a avaliação da glicose plasmática de jejum e dos níveis de hemoglobina glicada (KIM et al., 2016). No entanto, valores acima de 200 mg/ dL no teste de tolerância oral à glicose podem indicar tolerância à glicose diminuída, não caracterizando a DM. Assim, para o diagnóstico correto da DM, o ideal é que sejam utilizados mais de um dos testes recomendados (KHAN et al., 2019).

O caráter crônico da doença exige cuidados médicos intermitentes, bem como o controle dos níveis da glicemia. Além disso, a fim de evitar complicações de médio e longo prazo, portadores da DM devem evitar hábitos como tabagismo e ingestão de álcool, realizar exercícios físicos regularmente e manter uma dieta saudável e equilibrada (Melmer & Laimer 2016). Todos esses cuidados são necessários por que a hiperglicemia crônica não tratada pode, a longo prazo, trazer graves danos ao organismo causando até mesmo falência de órgãos. Olhos, rins e coração são os principais órgãos afetados, mas, os distúrbios no metabolismo de carboidratos,

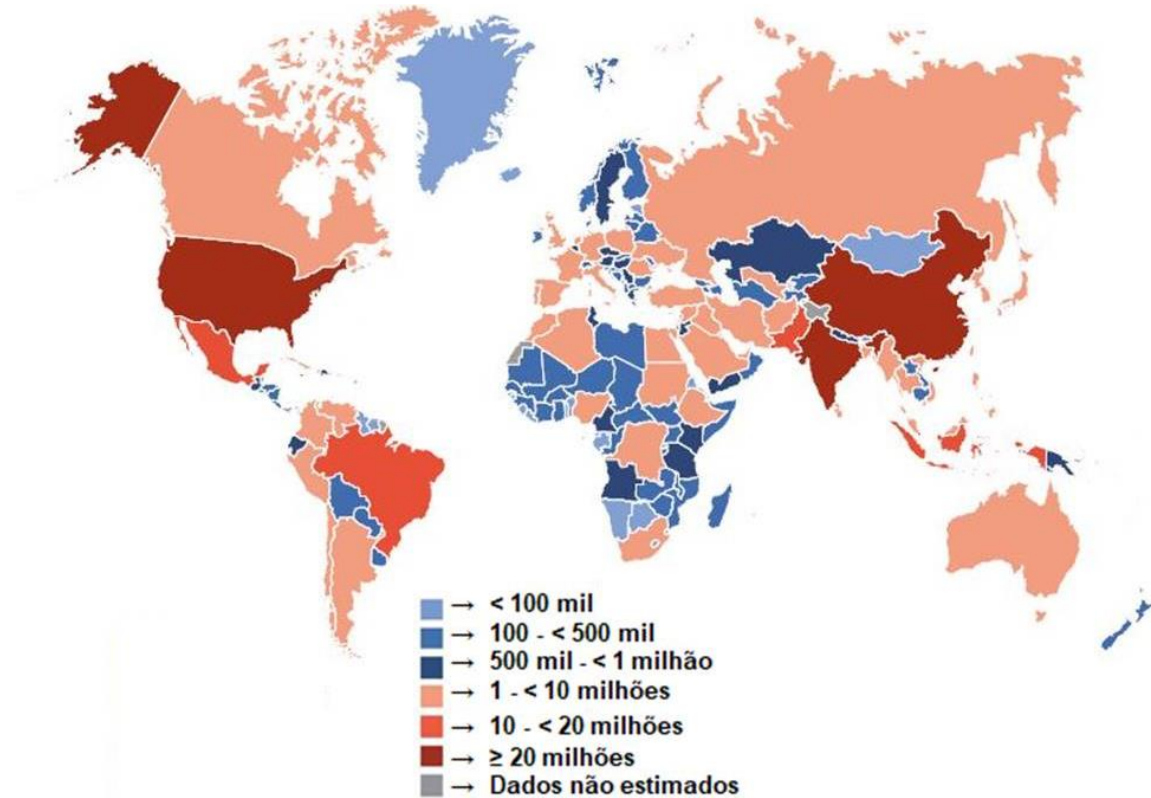
lipídeos e proteínas decorrentes deste quadro crônico podem afetar também o sistema nervoso e vascular (WHO/IDF, 2006).

### 1.1.2 Epidemiologia da DM

Mundialmente, a DM é um dos maiores problemas de saúde pública do século XXI (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019). A cada dois anos, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) atualiza os dados referentes à prevalência e incidência mundiais da diabetes. As estimativas consideram adultos entre 20 e 79 anos e incluem as DM tipo 1 e tipo 2, diagnosticadas e não-diagnosticadas. Segundo a IDF, em 2019 haviam 463 milhões de pessoas portadoras de DM (Figura 1), indicando uma prevalência mundial da doença de 9,3%. Dentre essas pessoas, 111,3 milhões tinham entre 65 e 79 anos e 351,7 milhões tinham entre 20 e 64 anos. A estimativa é de que 578 milhões de indivíduos estarão diabéticos em 2030 e 700 milhões em 2045 (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019). A prevalência da diabetes é mais baixa em adultos que estão entre os 20 e 24 anos (1,4%) enquanto, em idosos com idade entre 75 e 79 anos, esse número aumenta consideravelmente (19,9%). Considerando toda a faixa etária analisada (indivíduos entre 20 e 79 anos), a prevalência da diabetes em mulheres é ligeiramente menor em relação aos homens, sendo 9,0% e 9,6% respectivamente (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019).

Apesar dos números serem alarmantes há indicadores de que estes ainda estão subestimados. Isso se deve ao fato de que pouquíssimos países em desenvolvimento têm dados nacionais confiáveis acerca da prevalência e distribuição da DM, devido à falta de diagnóstico (ZIMMET et al., 2016). Estimou-se que em 2019, 50,1% dos indivíduos portadores da DM não sabiam que tinham a doença (DALL et al., 2014). Esse cenário prejudica os sistemas de saúde, que terão custos maiores a longo prazo (DALL et al., 2014), e dificulta os estudos acerca da prevalência e incidência da DM.

**FIGURA 1 – NÚMERO TOTAL ESTIMADO DE ADULTOS (20 A 79 ANOS) COM DIABETES EM 2019.** Estados Unidos da América, Índia e China apresentam a maior quantidade de adultos diabéticos, na faixa etária analisada ( $\geq 20$  milhões). O Brasil encontra-se na faixa anterior, possuindo entre 10 e  $< 20$  milhões de habitantes portadores da diabetes. Países considerados de média e baixa renda concentram juntos a maioria da população mundial (79,4%) portadora desta síndrome.



Fonte: Adaptado de International Diabetes Federation (2019, p.34).

A questão da escassez de dados acerca da prevalência da DM em países em desenvolvimento está, aos poucos, se tornando melhor. Em 2015, Makaroff e Cavan relataram que apenas 57% dos países possuíam levantamentos de prevalência da DM de alta qualidade (Makaroff & Cavan 2015). Apesar disso, o último levantamento da IDF contou com dados nacionais de 65% dos países, todos atendendo aos critérios de inclusão estabelecidos. Os países restantes (35%) tiveram suas estimativas calculadas com base em dados da prevalência em países semelhantes em termos de etnia, idioma, classificação de renda per capita e proximidade geográfica (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019).

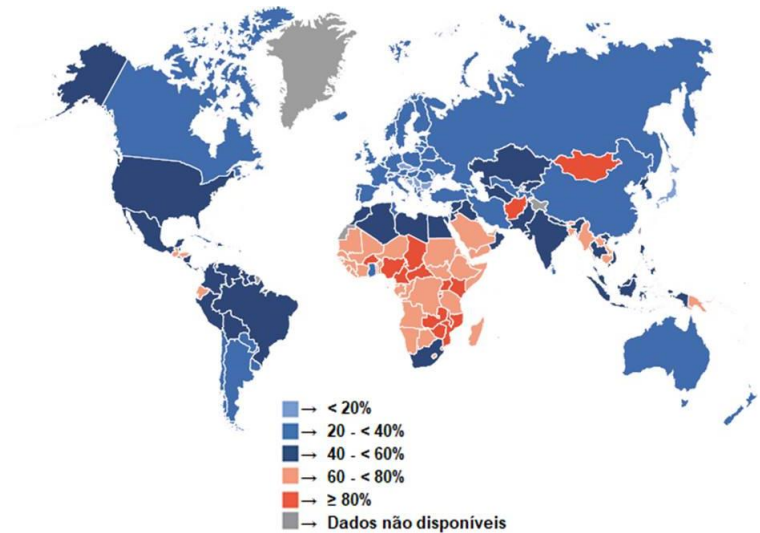
Dados acerca da incidência mundial da DM são ainda mais escassos, pois requerem mais estudos que aqueles necessários para estimar dados sobre prevalência. No entanto, a avaliação da incidência é extremamente necessária para se entender se o risco da população de desenvolver DM está mudando ao longo do

tempo (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019). Em revisão sistemática sobre a incidência da diabetes (total e DMT2) publicada em 2019, foi relatado que, entre 2006 e 2014, 27% da população investigada tiveram incidência estável da doença. Observaram também que 36% apresentaram declínio, enquanto outros 36% tiveram um aumento na incidência da DM. O estudo, no entanto, ilustra a problemática da escassez de dados epidemiológicos mundiais acerca da DM, já que apenas 19% da população incluída no estudo era não-europeia e 4% pertencia a países de média ou baixa renda (MAGLIANO et al., 2019).

Outro desafio é avaliar taxas de mortalidade relacionadas à DM. A utilização de atestados de óbito para essa avaliação é algo redundante no caso desta síndrome, já que pacientes portadores de DM, em geral, falecem de uma das suas complicações (GOLDACRE, 1993), como insuficiência cardíaca e renal, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral ou doença renal terminal (GREGG; SATTAR; ALI, 2016). Desta forma, nos atestados de óbito consta como causa da morte, na maior parte dos casos, uma das complicações e a síndrome não é nem mesmo mencionada como fator contribuinte para o óbito (GOLDACRE, 1993). Essa avaliação, no entanto, parece estar se tornando um pouco mais fidedigna à medida que os dados coletados começam a considerar também as mortes causadas por complicações causadas pela DM em suas estatísticas. Essa conduta já tem sido utilizada nos levantamentos publicados pela IDF.

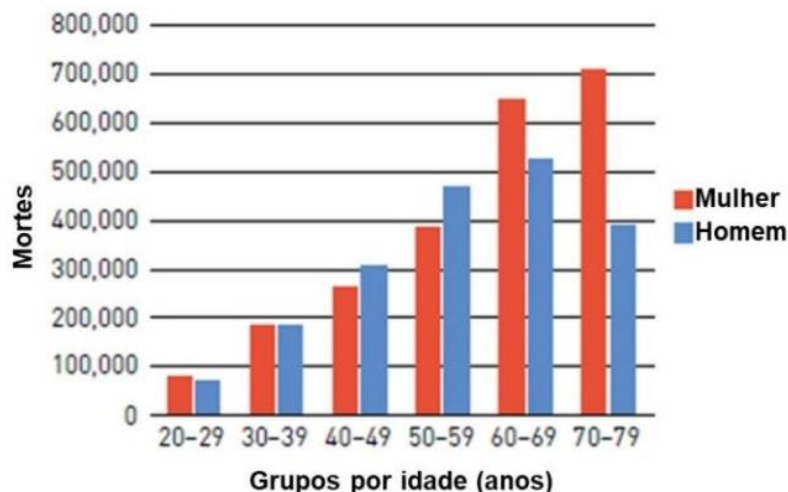
A estimativa mundial é de que em 2019, 4,2 milhões de adultos tenham morrido devido à DM e suas complicações e, deste total, 2,3 milhões são mulheres (Figura 2). Além disso, sabe-se que a DM está associada com 11,3% de todos os óbitos em pessoas adultas. Considerando adultos em fase produtiva (20 – 60 anos), 46,2% das mortes estão associadas à DM e suas complicações (Figura 3) (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019).

**FIGURA 2 – PROPORÇÃO(%) MUNDIAL DE PESSOAS EM FASE PRODUTIVA (20 – 60 ANOS) QUE MORRERAM POR DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES EM 2019.** A África concentra a proporção mais alta de mortes em adultos dentro da faixa etária analisada, tendo uma média de 73,1% para todos os países. Em ordem crescente, os cinco países com maior proporção, todos pertencentes à África, são: Zimbábue (86,4%); Swatini (87,7%); Uganda (88,0%), Quênia (88,4%) e Moçambique (91,1%). A região europeia possui os números mais baixos. De todas as mortes causadas pela diabetes nesta região, apenas 31,4% ocorreram em pessoas em fase produtiva. Em ordem crescente, os países que possuem as proporções mais baixas são: Japão (15,8%), Macedônia do Norte (15,8%), Eslováquia (17,3%), Sérvia (17,7%) e Bulgária (17,9%).



Fonte: Adaptado de Internation Diabetes Federation (2019, p.55).

**FIGURA 3 – NÚMERO DE MORTES EM ADULTOS CAUSADAS POR DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES, POR IDADE E SEXO, EM 2019.** Figura. 3 Número de mortes em adultos causadas por diabetes e suas complicações, por idade e sexo, em 2019. As mortes associadas à diabetes ocorrem em maior proporção em mulheres (2,3 milhões em 2019) que em homens (1,9 milhões em 2019). Nas mulheres, os maiores números se concentram na faixa etária de 60-79 anos enquanto que nos homens a faixa etária de 50-69 anos é a que concentra os maiores números.



Fonte: Adaptado de Internation Diabetes Federation (2019, p.54).

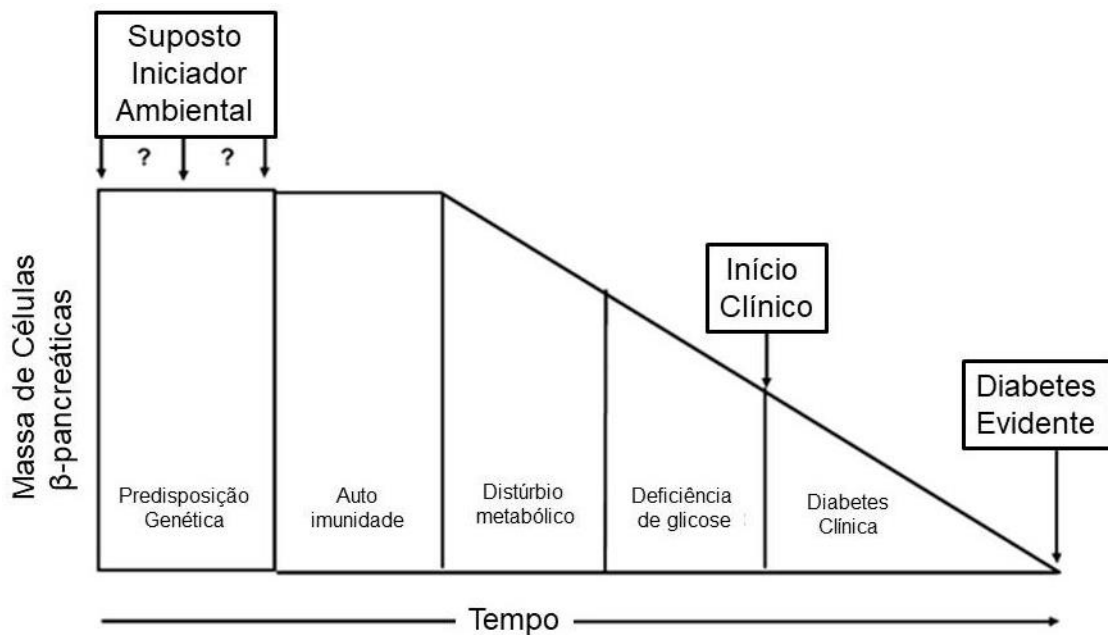
### 1.1.3 DMT1 e DMT2

A DMT1 é uma das doenças crônicas mais comuns na infância (GALE, 2005) e a manifestação dos sintomas clássicos da doença ocorre entre os 5 e 7 anos de idade e também na puberdade (HARJUTSALO; SJÖBERG; TUOMILEHTO, 2008). São eles: poliúria, polidipsia e perda de peso, além da cetoacidose que ocorre em cerca de um terço das crianças e adolescentes (DABELEA et al., 2014). No entanto, a DMT1 pode se manifestar em qualquer idade, mas cerca de 50% dos casos ocorre em adultos (THOMAS et al., 2018). Nestes, porém, realizar o diagnóstico correto é mais complicado, haja vista esta faixa etária apresentar sintomas semelhantes àqueles da DMT2 (LYNAM et al., 2020).

O desenvolvimento da DMT1 é um processo considerado autoimune, que envolve fatores genéticos, imunológicos e ambientais (ACHARJEE et al., 2013). Neste tipo de DM ocorre uma deficiência na secreção de insulina causada pela destruição das células  $\beta$ - pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018) e, como consequência, torna-se necessário a administração exógena desse hormônio. Em crianças, o curso da DMT1 desenvolve-se mais rapidamente quando comparado aos adultos, nos quais a destruição das células  $\beta$ - pancreáticas ocorre lenta e progressivamente (Figura 4).

Diagnosticar a DMT1 é algo complexo, pois não há um sinal clínico que caracterize perfeitamente este subtipo da síndrome ou que o distinga dos outros subtipos da DM (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018). O diagnóstico da DMT1 depende da análise cuidadosa dos fatores de risco relacionados a este subtipo juntamente com características físicas do paciente, como idade e índice de massa corporal. Além disso, considera-se também a análise de biomarcadores, como autoanticorpos contra proteínas específicas das células  $\beta$ -pancreáticas (SHIELDS et al., 2015). Cerca de 90% das pessoas diagnosticadas com DMT1 apresentam níveis mensuráveis destes autoanticorpos, a exemplo anti-insulina, anti-Znt8, anti-ilhota e anti-tetraspanina 7 (MCLAUGHLIN et al., 2016).

**FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PERDA LENTA E PROGRESSIVA DA MASSA DE CÉLULAS  $\beta$ -PANCREÁTICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA DMT1.** O processo envolve predisposição genética e autoimunidade com consecutivos distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Seguidamente, há a deficiência progressiva de secreção de insulina gerando um quadro de pré-diabetes e, finalmente, diabetes evidente.



Fonte: Adaptado de (Skyler 2004, p. 4114).

A DMT2 é a forma de DM presente na maior parte dos indivíduos acometidos por esta síndrome (90 a 95% dos casos) (SBD, 2015). Na DMT2 ocorre deficiência de insulina causada por disfunção da célula  $\beta$ -pancreática e por resistência insulínica em órgãos alvo (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017), como fígado e coração (PANDEY; CHAWLA; GUCHHAIT, 2015). Um dos mais importantes desafios da DMT2 é a baixa responsividade das células  $\beta$ -pancreáticas a medicamentos (TAYLOR; AL-MRABEH; SATTAR, 2019). Estima-se que, no momento em que a DMT2 é diagnosticada, 50% da quantidade considerada normal de células  $\beta$ -pancreáticas já tenha sido perdida (HOLMAN et al., 2008), provavelmente por apoptose (BUTLER et al., 2010; RAHIER et al., 2008), e essa perda continua a ocorrer linearmente ao longo do tempo (RUDENSKI et al., 1988).

O desenvolvimento da resistência à insulina está fortemente relacionado a fatores como má alimentação, sedentarismo e, principalmente, obesidade. A produção contínua de glicose é uma das principais funções do fígado e é regulada pela insulina (TAYLOR; AL-MRABEH; SATTAR, 2019). O hábito de se ingerir

calorias em excesso leva, ao longo do tempo, à esteatose hepática que, por sua vez, desenvolve resistência à insulina. A produção contínua de glicose pelo fígado causa um pequeno aumento nos níveis da glicose plasmática em jejum, desencadeando um aumento na produção de insulina. Concentrações de insulina acima das taxas de normalidade, por sua vez, estimulam a conversão de carboidratos em gordura, e assim, um ciclo vicioso é estabelecido (TAYLOR, 2008).

As células  $\beta$ -pancreáticas também podem ter sua função prejudicada pelo excesso de gordura no fígado. Sabe-se que esse acúmulo pode aumentar a absorção de gordura em diversos tecidos, sendo um deles o tecido pancreático (TAYLOR; AL-MRABEH; SATTAR, 2019). Desta forma, apesar de fatores genéticos estarem envolvidos na patogênese da DMT2, outros fatores como a obesidade e o sedentarismo podem ser considerados gatilhos iniciadores deste tipo de DM (GRARUP et al., 2014).

Assim como na DMT1, no tratamento da DMT2 os níveis de glicose precisam ser monitorados e mantidos o mais próximo possível dos níveis normais. Para isso são necessárias mudanças no estilo de vida, como a adoção de uma alimentação saudável, prática regular de exercícios e perda de peso. Em alguns casos, essas mudanças não são suficientes para serem mantidos os níveis de glicose em parâmetros adequados. Quando isso ocorre, a administração de medicamentos é indicada e, se necessário, de insulina exógena (VIGGIANO, 2007; VIJAN, 2015). Realizar o tratamento e acompanhamento da DMT2 é de extrema importância já que esta síndrome pode gerar complicações secundárias graves, principalmente, as cardiopatias (GO et al., 2014; PANDEY; CHAWLA; GUCHHAIT, 2015).

Em suma, a DM é uma síndrome que, na maioria das vezes, gera sérias complicações que vão se acumulando ao longo do curso patológico da doença, diminuindo cada vez mais a qualidade de vida do portador. A doença arterial periférica é uma das cardiopatias mais comuns em diabéticos (INTERNATION DIABETES FEDERATION, 2019) e, além dessas, outras complicações frequentes são a retinopatia, nefropatia (que pode vir acompanhada da necessidade de realização de diálises ou, até mesmo, de transplante renal), neuropatias sensorial periférica e autonômica (BOULTON, 2013; JUPITER et al., 2015) e a formação de úlceras crônicas, em geral nos membros inferiores (BOULTON, 2013).

#### 1.1.4 Complicações da DM: a problemática da cicatrização

A formação de úlceras crônicas em pacientes diabéticos é resultado de uma combinação de fatores de risco característicos da DM (BOULTON, 2013). Vários são esses fatores, que podem ser agrupados em três categorias: alterações patofisiológicas, deformidades anatômicas e influências ambientais (DINH; VEVES, 2005). Os membros inferiores, principalmente os pés, são os locais em que essas feridas são mais frequentes (PATEL et al., 2019) sendo responsáveis, mundialmente, por aproximadamente 50 a 70% das amputações desses membros. (VIJAYAKUMAR et al., 2019).

A patofisiologia da DM é complexa e ainda não está totalmente compreendida. No entanto, sabe-se que o estresse oxidativo, causado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesas antioxidantes (BETTERIDGE, 2000; HALLIWELL, 1994), é um dos principais mecanismos envolvidos na formação de feridas crônicas em diabéticos (KUNKEMOELLER; KYRIAKIDES, 2017). Os radicais livres possuem importantes funções fisiológicas no processo normal de cicatrização, como a produção de citocinas, o recrutamento celular e a angiogênese (SCHÄFER; WERNER, 2008; SEN; ROY, 2008) . Em condições de hiperglicemia, principal característica da DM, ocorre uma produção exacerbada dessas espécies, sendo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) a principal delas (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Este radical é resultante da oxidação da glicose e, em altos níveis, interfere em mecanismos envolvidos na cicatrização, como a via do poliol e da hexosamina (PATEL et al., 2019). Além disso, o estresse oxidativo causa danos ao DNA e estimula vias pró-oxidativas como a via dos produtos de glicação final avançada e da proteína quinase C (CHUNG et al., 2003; IGHODARO, 2018; ROLO; PALMEIRA, 2006).

A neuropatia sensorial periférica e a doença vascular periférica, também são importantes alterações patofisiológicas que ocorrem na DM e que prejudicam o curso normal da cicatrização. (DINH; VEVES, 2005). Há ainda o comprometimento do sistema imunológico onde células inflamatórias como os neutrófilos, monócitos e células T apresentam-se em desreguladas. Como resultado, são produzidos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$  (PATEL et al., 2019).

Na categoria das deformidades anatômicas, a neuropatia motora e a neuropatia de Charcot são as duas entidades que mais contribuem para a formação

das deformidades nos pés (DINH; VEVES, 2005). Por fim, na categoria dos fatores externos que levam à ocorrência do trauma estão inclusos eventos como fricção causada pelo uso de sapatos inadequados, esforços repetitivos em determinadas partes do pé e traumas acidentais (DOSHI; MOISSINAC; HARWANT, 2001).

O processo de cicatrização de uma ferida inicia-se logo após o surgimento do trauma e pode perdurar por anos, sendo um evento dinâmico e finamente regulado por mecanismos celulares, moleculares e humorais (Reinke & Sorg 2012). Esse processo compreende diferentes fases até a completa reepitelização (homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento) e, em cada fase participam diferentes tipos celulares (Figura 5) que precisam atuar em perfeita harmonia (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014).

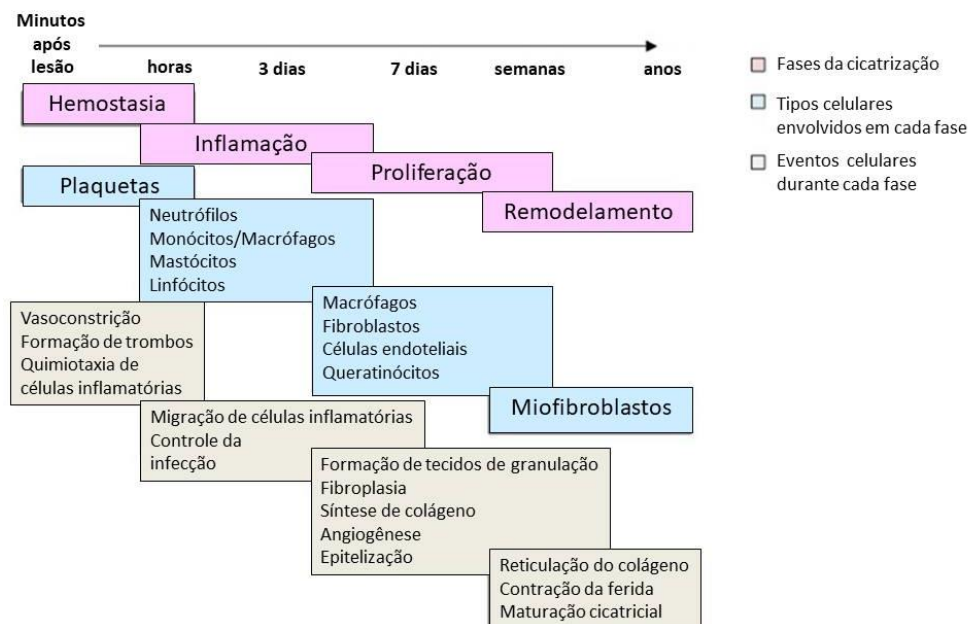
A primeira fase do processo é a hemostasia, em que as plaquetas são ativadas e promovem a coagulação, seguida da conversão do fibrinogênio em fibrina e resultando na formação da matriz extracelular provisória (Blakytyn & Jude 2006). As plaquetas secretam proteínas que induzem a migração e adesão de neutrófilos, monócitos e de fatores de crescimento (FALANGA, 2005), dando início à inflamação, segunda fase do processo de cicatrização. Nesta, os neutrófilos realizam a limpeza da lesão, eliminando detritos, secretando proteases que matam bactérias presentes no local e degradando o tecido necrosado (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). Posteriormente, os monócitos se diferenciam em macrófagos, que realizam a fagocitose dos microrganismos e restos celulares presentes na lesão, e também secretam fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (PROFYRIS; TZIOTZIOS; DO VALE, 2012; REINKE; SORG, 2012; TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012). As fases de hemostasia e inflamação perduram, em geral, por 72 horas (WANG et al., 2018).

A fase inflamatória se sobrepõe à próxima fase do processo de cicatrização, que é a proliferativa. Nesta, um novo tecido começa a ser formado, constituído por diversas células (fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais) e tecido conjuntivo abundante. É também nesta fase que ocorre a angiogênese e a construção de uma nova matriz extracelular, constituída por um tecido de granulação composto por proteoglicanas, ácido hialurônico, colágeno e elastina, e que irá substituir o coágulo formado inicialmente (CHEN et al., 2010; PATEL et al., 2019).

O remodelamento é a última fase do processo de cicatrização e também se sobrepõe à fase inflamatória (SORG; KRUEGER; VOLLMAR, 2007). As células

envolvidas no processo de formação do tecido de granulação começam a sofrer apoptose até que esse tecido deixa de existir. A irrigação sanguínea para o local da lesão também diminui progressivamente. O colágeno tipo III, produzido na fase proliferativa, é substituído pelo colágeno tipo I, com fibras se apresentando em feixes mais organizados e espessos, resultando em um tecido cicatricial rígido e resistente (JEFFCOATE; PRICE; HARDING, 2004; REINKE; SORG, 2012). Nesta fase, é fundamental que haja um equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno, que ocorrem continuamente. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são as enzimas responsáveis pela manutenção desse equilíbrio e também coordenam a degradação de componentes não-colagenosos da matriz extracelular (TSOURDI E, BARTHEL A, RIETZSCH H, REICHEL A, 2013).

**FIGURA 5 – ESTÁGIOS DA CICATRIZAÇÃO NORMAL DE FERIDAS.** Em cada estágio do processo de cicatrização (hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento) há tipos celulares específicos que atuam em eventos chave de cada etapa.



Fonte: Adaptado de (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014, p. 819).

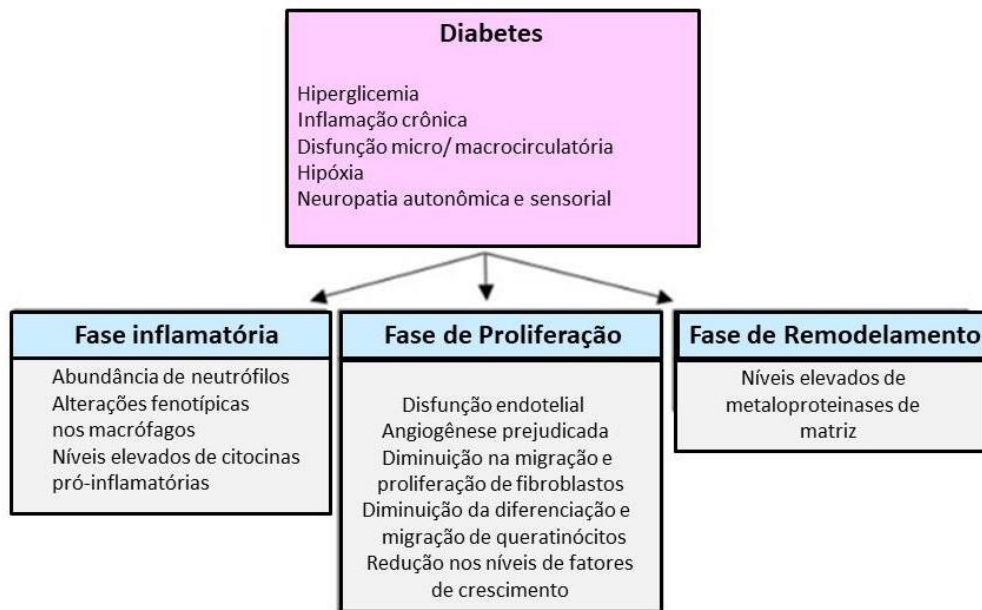
Apesar de ser no remodelamento em que as MMPs exercem sua mais importante função (Falanga 2005; Blakytyn & Jude 2006; Pradhan et al. 2009; Baltzis et al. 2014), pode-se encontrá-las atuando desde o início do processo de cicatrização contribuindo na limpeza inicial da ferida, pois promovem a remoção de

tecidos mortos, atuando na angiogênese e na epitelização durante a fase inflamatória (Kähäri & Saarialho-Kere 1997; Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A 2013). A atuação das MMPs é coordenada pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), sendo necessário que os níveis dessas duas enzimas estejam balanceados e em harmonia para que o curso da cicatrização transcorra de forma adequada (TSOURDI E, BARTHEL A, RIETZSCH H, REICHEL A, 2013; VAALAMO; LEIVO; SAARIALHO-KERE, 1999). A fase de remodelamento pode durar de uma semana a seis meses após a lesão (TSOURDI E, BARTHEL A, RIETZSCH H, REICHEL A, 2013).

A DM atrasa o processo de cicatrização por acarretar prejuízos em todas essas fases (Figura 6) (PATEL et al., 2019), levando à formação de feridas crônicas (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Nestas, o curso da cicatrização é interrompido no início da inflamação e resiste à progressão das fases seguintes (OCHOA; TORRES; SHIREMAN, 2007). Estudos de tecidos coletados de feridas crônicas indicam uma competição contínua entre sinais inflamatórios e anti-inflamatórios, gerando um desequilíbrio que impede a cicatrização adequada da ferida (BEIDLER et al., 2009; EMING et al., 2010). Além disso, as disfunções micro e macro circulatórias características da DM contribuem para que a formação do tecido de granulação seja prejudicada ou não ocorra, podendo levar à isquemia, outro importante fator contribuinte na cronificação da ferida (ALAVI et al., 2014; DINH; VEVES, 2005; GALKOWSKA; WOJEWODZKA; OLSZEWSKI, 2006).

Juntamente com a isquemia, as neuropatias e infecções constituem as três principais causas de atraso na cicatrização em pacientes diabéticos (BRUHN-OLSZEWSKA et al., 2012; YANG et al., 2017). Nestes, a possibilidade de desenvolvimento de uma infecção é aumentada devido aos fatores característicos da DM. Um deles é a redução na quimiotaxia de leucócitos (Wysocki et al. 1992; Blakytyn & Jude 2006) e migração inadequada de neutrófilos e macrófagos (Delamaire et al. 1997; Blakytyn & Jude 2006). Além disso, pacientes diabéticos apresentam níveis elevados de óxido nítrico, quadro que prejudica a atividade dos macrófagos contra infecções e inibe a angiogênese (Blakytyn & Jude 2006).

**FIGURA 6 – DIABETES E CICATRIZAÇÃO.** Em cada fase da cicatrização há desajustes provocados pelas complicações da diabetes, como a hiperglicemia e o processo inflamatório crônico.



Fonte: Adaptado de (BALTZIS; ELEFThERiADOU; VEVES, 2014, p. 821).

O desequilíbrio das proteases e de seus inibidores constitui outro fator que contribui fortemente para o atraso na cicatrização de feridas em diabéticos (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Sabe-se que nestas feridas, as MMPs são encontradas em altos níveis enquanto que as TIMPs estão presentes, porém em níveis baixos (LOBMANN et al., 2002). Esse cenário traz consequências prejudiciais ao curso da cicatrização como aumento da atividade proteolítica que, por sua vez, leva a degradação de fatores de crescimento (GREENHALGH, 2003). Desta forma, feridas em pacientes diabéticos estão propensas a maiores complicações tais como cronificação, infecções e desenvolvimento de isquemia podendo levar a amputação do membro afetado.

O controle rigoroso da glicemia bem como o extremo cuidado e limpeza da ferida fazem parte do esquema de tratamento; no entanto, o prognóstico para a cura destas lesões ainda é bastante complicado (CHELLAPPAN et al., 2017; GREENHALGH, 2003). Atualmente, há várias opções de medicamentos e curativos para o tratamento de feridas crônicas no mercado. No entanto, grande parte desses produtos tem um alto custo e, considerando que o tempo terapêutico é longo, o acesso a eles torna-se muitas vezes inacessíveis para muitos pacientes (FERREIRA et al., 2003). Além disso, mesmo com todas as opções terapêuticas disponíveis, o

número de pacientes diabéticos acometidos por úlceras crônicas, principalmente nos membros inferiores, cresce a cada ano (NAIR, 2018).

O desenvolvimento de novas opções terapêuticas, com menores custos, torna-se necessário. Como estratégia, podem ser usadas substâncias que auxiliem o organismo a melhorar a cicatrização. Uma das moléculas que têm sido testadas com este objetivo é a melatonina. Diversos estudos vêm demonstrando a influência positiva da melatonina na cicatrização de diferentes tipos de feridas, tornando-a uma molécula promissora para ser utilizada em novas estratégias nesta área (CROOKE et al., 2015; DROBNIK, 2012; HALICI et al., 2010; KAYAPINAR et al., 2015; PUGAZHENTHI et al., 2008; RAMÍREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

## 1.2 A MELATONINA

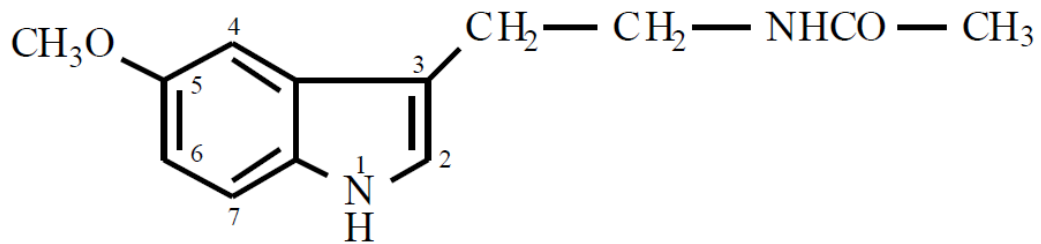
### 1.2.1 Propriedades gerais da melatonina

Derivada do triptofano, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina constituída quimicamente por um heterociclo indol e duas cadeias laterais, nomeadas grupo 5-metoxi e grupo 3-aminoacetil (Figura 7) (TAN et al., 2002). O heterociclo indol é rico em elétrons com alta estabilidade de ressonância e eletroreatividade conferindo à melatonina uma de suas principais características que é a capacidade de captar de radicais livres (POEGGELER et al., 1993; TAN et al., 2002). Os grupos 5-metoxi e 3-aminoacetil estão conectados nas posições C5 e C3 do heterociclo indol da molécula, respectivamente, sendo também importantes na captação de radicais livres e na determinação das características físicas da melatonina (TAN et al., 2002). São esses grupos que tornam a melatonina uma molécula anfifílica, com altas lipofilicidade e hidrofobicidade, algumas das características que permitem que ela atravesse as membranas celulares com facilidade (TAMURA et al., 2012).

Uma das principais funções da melatonina é a manutenção do ritmo circadiano celular (TORDJMAN et al., 2017). A síntese de melatonina na glândula pineal é controlada pela exposição dos olhos à luz (SHARMA et al., 2015). As informações sobre período e intensidade dessa exposição são transmitidas para a glândula pineal por meio do núcleo supraquiasmático do hipotálamo (BRZEZINSKI, 1997), que realiza a sincronização do ciclo claro-escuro (Singh & Jadhav 2014). Assim, a síntese de melatonina é inibida durante o dia, e estimulada durante a noite (SHARMA et al., 2015). Por este motivo, a concentração da melatonina no plasma

de mamíferos é variável; as concentrações noturnas se encontram entre 80 e 100 pg/ mL, enquanto as concentrações diurnas são bem menores, entre 10 e 20 pg/ mL (Figura 8) (SIMONNEAUX, 2003).

**FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MELATONINA.** Os grupos 5-metoxi e 3-aminoacetil estão conectados nas posições 5 e 3 do heterociclo indol da molécula, respectivamente.



Fonte: TAN et al., 2002

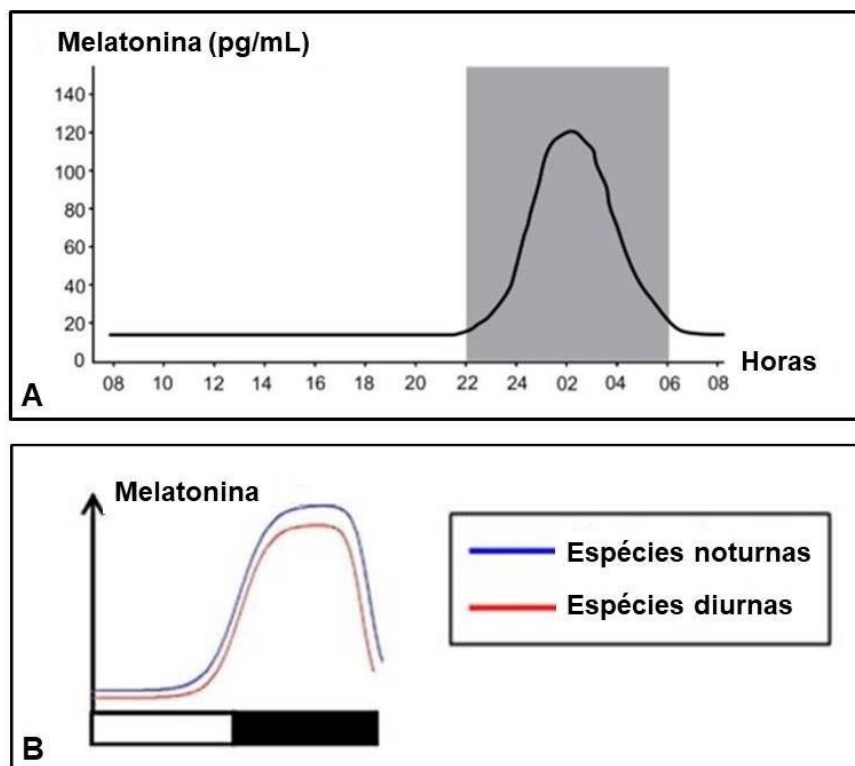
Devido aos seus efeitos sedativos nos seres humanos (BURCHAKOV; USPENSKAYA, 2019; KUMAR JHA; CHALLET; KALSBECK, 2015a) e à sua eficiência no tratamento de alguns distúrbios do sono, a melatonina também é chamada de “hormônio do sono”(KUMAR JHA; CHALLET; KALSBECK, 2015a). Esta denominação, no entanto, é correta apenas quando se trata de espécies diurnas, uma vez que em doses fisiológicas, não é capaz de promover o sono em animais noturnos quando estes estão despertos (KUMAR JHA; CHALLET; KALSBECK, 2015b). Isso ocorre porque a melatonina é uma exceção ao esquema de reversão de 12 horas dos ritmos hormonais, que ocorre entre espécies diurnas e noturnas. Mesmo em espécies com hábitos noturnos, como os ratos, a melatonina é secretada pela glândula pineal durante o período escuro astronômico (Figura 8) (Pevet & Challet 2011).

A melatonina é considerada um hormônio neuroendócrino e imunomodulador devido a sua capacidade de estimular monócitos e citocinas. Assim, pode influenciar na proliferação de fibroblastos, interferir positivamente na angiogênese e, por seu efeito antioxidante, possuir também propriedades antiinflamatórias (ALLEGRA et al., 2003; RAMÍREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; REITER et al., 2006, 2009; RODRIGUEZ et al., 2004; TAN et al., 2003). Além disso, a melatonina contribui com a manutenção da saúde do sistema ósseo, pois promove a diferenciação de osteoblastos e atua limitando a atividade dos osteoclastos (YILDIRIMTURK et al., 2016).

A característica lipofílica da melatonina permite que ela seja capaz de permear a membrana celular sem a necessidade de se ligar a receptores específicos, portanto, é considerada uma molécula que pode atuar independentemente (TAROCCO et al., 2019). No entanto, a melatonina também atua via receptores, que se localizam na superfície das células (REPPERT et al., 1995) e pertencem a uma família de proteínas conhecida como 'receptores acoplados à proteína G' (VON GALL; STEHLE; WEAVER, 2002). Existem dois receptores específicos para a melatonina, com alto grau de homologia entre eles: receptor de melatonina 1 (MT1) e receptor de melatonina 2 (MT2) (REPPERT et al., 1995; REPPERT; WEAVER; EBISAWA, 1994).

**FIGURA 8 – PERFIL CIRCADIANO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MELATONINA.**

Em (A), o pico de concentração da melatonina, que ocorre entre 1h e 3h, é representado. O período de escuridão está marcado em cinza. Em (B), observa-se que o perfil de liberação da melatonina é o mesmo em espécies diurnas e noturnas, ocorrendo durante a noite, representada pela barra preta no eixo x.



Fonte: (B) Adaptado de (KUMAR JHA; CHALLET; KALSBECK, 2015b, p. 10) (A) Adaptado de (TORDJMAN et al., 2017, p. 435).

Além de atuar via receptores específicos ou independente, a melatonina tem a capacidade de estimular receptores específicos de outras moléculas. Já foi demonstrado que os receptores da insulina e os receptores do fator de crescimento semelhante à insulina, ambos com alto grau de homologia, podem ser estimulados pela melatonina. Desta forma, esta indolamina interfere também na regulação do crescimento e diferenciação de células  $\beta$ -pancreáticas, por exemplo, via receptores não-específicos (PICINATO et al., 2008).

### 1.2.2 A melatonina e o seu potencial na cicatrização

Já se sabe que a melatonina interfere em diferentes fases da cicatrização. Na fase inflamatória, ela atua regulando alguns alvos farmacológicos, como a ciclooxigenase-2 e a óxido nítrico-sintase induzida, e algumas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (Lin & Karin 2003; Pourhanifeh et al. 2019). Na proliferação e migração celular, a melatonina atua positivamente ao ativar a via de sinalização ERK1/2 (GE et al., 2019; MARIA et al., 2018; NIU et al., 2016; XU et al., 2020). Por fim, sabe-se que a melatonina aumenta os níveis de expressão do fator de transcrição relacionado ao *runt2*, gene essencial na diferenciação de osteoblastos e que estimula diretamente a produção de colágeno tipo I (PARK et al., 2011; VIRDI et al., 1998).

Alcançar o objetivo desejado ao empregar a melatonina no tratamento de feridas requer a avaliação prévia de vários fatores, como a dose a ser aplicada e as características do tecido alvo (DROBNIK, 2012). Em 2008, Pugazhenthhi e colaboradores mostraram que uma dose de melatonina de 1,2 mg/ kg, aplicada por via intradérmica, melhorou o processo de cicatrização de feridas incisionais. As análises histológicas realizadas neste estudo mostraram que as fibras de colágeno presente nas feridas tratadas com melatonina foram semelhantes às fibras de colágeno de uma pele intacta (PUGAZHENTHI et al., 2008).

Uma das propriedades da melatonina que favorece o processo de cicatrização é o seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante da melatonina deve-se provavelmente a duas ações principais desempenhadas por esta indolamina: estimulação da superóxido dismutase, uma metaloenzima antioxidativa e inibição da enzima óxido nítrico sintase (Poeggeler et al. 1993; Reiter et al. 2000, 2001; Cuzzocrea & Reiter 2001).

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no processo de cicatrização. No entanto, a produção em excesso destas moléculas pode prejudicar e/ ou inibir este processo (NIETHAMMER et al., 2009). Quando as espécies reativas de oxigênio estão presentes em excesso, ocorre senescência dos fibroblastos, além de interferir de modo negativo na sua contração (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005). A melatonina atua minimizando esses eventos, pois estabiliza as membranas das células e torna-as mais resistentes aos ataques oxidativos (Poeggeler et al. 1993; Reiter et al. 2000, 2001; Cuzzocrea & Reiter 2001).

A angiogênese é outro processo de crucial importância na cicatrização e também influenciado pela melatonina (PUGAZHENTHI et al., 2008). Administrações intradérmicas de melatonina favorecem a formação de novos vasos sanguíneos ao influenciar os níveis de moléculas envolvidas nesse processo. Um exemplo é o fator de crescimento endotelial vascular, o mais importante na angiogênese, que tem sua concentração aumentada durante a administração de melatonina. Já foi demonstrado que, durante o tratamento com melatonina, os níveis deste fator de crescimento começam a aumentar no primeiro dia após a lesão e atingem o pico no sétimo dia (PUGAZHENTHI et al., 2008).

Em modelo experimental de privação de melatonina utilizando ratos pinealectomizados observou-se que o processo de cicatrização foi significativamente mais lento em comparação aos animais não submetidos à pinealectomia (BEŞKONAKH et al., 2000; OZLER et al., 2010). Além disso, o retardo no tempo de cicatrização foi revertido quando os animais pinealectomizados receberam melatonina (Beşkonakh et al. 2000; Drobniak & Dabrowski 2000). O benefício da melatonina na cicatrização já tem sido apresentado até mesmo em ensaios de cicatrização de feridas epiteliais na córnea. Foi demonstrado que neste tipo de ferida a taxa de cicatrização destas feridas em coelhos tratados apenas com solução salina foi de aproximadamente 75 µm/ hora. Já em coelhos com o mesmo tipo de lesão e tratados com aplicação de dose única de melatonina sobre as feridas (10 nm em 10 mL) tiveram sua taxa de cicatrização expressivamente aumentada para 110 µm/ hora (CROOKE et al., 2015).

A dificuldade na cicatrização de feridas, um dos maiores problemas decorrentes das complicações da diabetes, confere um estímulo adicional aos estudos com melatonina envolvendo esta doença. Song e colaboradores, em 2016, mostraram que queratinócitos cultivados com altos níveis de glicose diminuía a

expressão de RNA mensageiro de citocinas pró-inflamatórias, quando tratados com melatonina (SONG et al., 2016). Neste mesmo estudo, foi observado também que o tratamento com melatonina reduziu o estresse oxidativo nos queratinócitos cultivados com excesso de glicose. Por fim, estes queratinócitos tiveram sua proliferação e migração aumentadas pela melatonina e ainda tiveram as taxas de apoptose reduzidas (SONG et al., 2016).

Em outro estudo recente envolvendo diabetes e cicatrização, o efeito da melatonina foi avaliado na cicatrização óssea de ratos diabéticos e o tratamento com esta indolamina demonstrou efeitos histológicos positivos nos estágios iniciais da cicatrização. Além disso, foram avaliados níveis plasmáticos de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e os resultados confirmaram o papel da melatonina como captadora de radicais livres, também em animais diabéticos (YILDIRIMTURK et al., 2016).

A melatonina, apesar de seus vários pontos favoráveis ao processo de cicatrização, apresenta algumas características que dificultam sua utilização. Entre os principais obstáculos para se atingir uma dose terapêutica desse hormônio estão a sua curta meia-vida plasmática (HARPSØE et al., 2015), sua alta sensibilidade à oxidação e sua baixa solubilidade (KUMAR YADAV et al., 2017). Quando o objetivo é utilizar a melatonina em formulações para uso tópico, há ainda um obstáculo adicional, que é a fotolabilidade desta molécula (TURSILLI et al., 2006).

Além disso, a melatonina apresenta extenso metabolismo de primeira passagem sendo a enzima CYP 1A2, pertencente à família das enzimas do citocromo P-450 (CYP-450), a principal responsável por esse processo (MA et al., 2005). As concentrações plasmáticas de melatonina após sua passagem pelo fígado correspondem a apenas 15% (em média) da concentração total produzida ou administrada, conferindo a essa molécula uma baixa biodisponibilidade (HARPSØE et al., 2015).

A melatonina, portanto, desempenha diversas e importantes ações no processo de cicatrização de feridas, como supressão da inflamação, atenuação do estresse oxidativo, estímulo à proliferação e migração de queratinócitos e aumento da produção de colágeno. No entanto, a utilização desta molécula para fins terapêuticos encontra alguns obstáculos que inviabilizam sua aplicação isoladamente. A integração da melatonina a um sistema carreador de fármacos, como as nanopartículas, constitui uma valiosa estratégia para transpor esses

obstáculos e ainda oferece possibilidades de aumentar o potencial terapêutico desta molécula, a depender dos compostos utilizados na construção desse sistema.

### 1.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas são partículas com diâmetro compreendido entre 10 e 1000 nm (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007) e são utilizadas como sistemas carreadores de fármacos (RIZVI; SALEH, 2018). Um dos principais atrativos das nanopartículas é a sua capacidade alcançar alvos moleculares específicos, aumentando as chances de entrega do composto ativo no local de ação pretendido (Pandey & Khuller 2004; Nagpal et al. 2010), além de diminuir a toxicidade deste composto livre em órgãos que não são alvo do tratamento (DE JONG; BORM, 2008). As nanopartículas também promovem a liberação controlada de fármacos e podem ser utilizadas como alternativas para melhorar a estabilidade e biodisponibilidade do composto encapsulado (RIZVI; SALEH, 2018).

As nanopartículas podem ser fabricadas com diversos materiais, entre eles, os polímeros. Nanopartículas poliméricas podem ser constituídas por polímeros sintéticos, naturais ou semissintéticos (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010). O polímero ideal para se produzir uma nanopartícula deve apresentar método de síntese relativamente simples, ter preço acessível, e ser biocompatível, biodegradável, não imunogênico e atóxico (Pandey & Khuller 2004).

Os polímeros naturais ou biopolímeros têm sido cada vez mais utilizados na produção de nanopartículas devido às suas excelentes propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade (Sahana & Rekha 2018). São moléculas orgânicas sintetizadas por organismos vivos e constituídas por uma sequência repetida de aminoácidos, monossacarídeos, nucleotídeos ou ésteres mantidos por ligações covalentes para formar peptídeos, polissacarídeos, polifenóis ou poliésteres (Sahana & Rekha 2018). Exemplos de biopolímeros utilizados na preparação de nanopartículas são o alginato, a quitosana, a albumina e a gelatina (ZHANG et al., 2013).

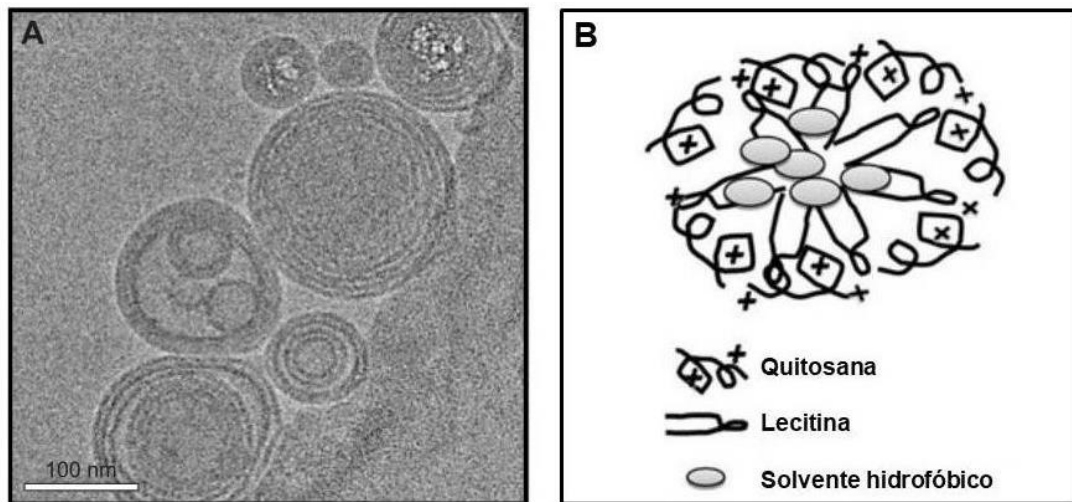
A quitosana é um dos polímeros naturais mais utilizados na preparação de nanopartículas e pode também ser utilizada para a estabilização de micro e nanoemulsões, em que lipídeos atuam como agentes emulsificantes. O recobrimento de nanoestruturas lipídicas com a quitosana aumenta sua estabilidade e confere a elas propriedades mucoadesivas (SONVICO et al., 2006).

Assim como os biopolímeros, os lipídeos também possuem grande potencial para serem empregados na produção de sistemas carreadores de fármacos, pois são biocompatíveis, biodegradáveis e seguros (GERELLI et al., 2008). A combinação de fosfolipídeos, que são negativamente carregados, com a quitosana tem sido utilizada na produção de nanopartículas carreando fármacos diversos como a insulina (LIU et al., 2016) e o tamoxifeno (agente anti-tumoral) (BARBIERI et al., 2013). Um dos compostos lipídicos mais utilizados nestas preparações é a lecitina, constituída principalmente por fosfolipídeos (GERELLI et al., 2008; SONVICO et al., 2006).

A precipitação eletrostática é uma das técnicas mais utilizadas na preparação de nanopartículas compostas por quitosana e lecitina (PAN et al., 2018). Nela, as nanopartículas são obtidas após uma injeção direta de uma solução alcoólica de lecitina em uma solução aquosa de quitosana, resultando em uma estrutura auto-organizada (GERELLI et al., 2008). A estrutura e morfologia destas partículas já foram descritas em alguns trabalhos (GERELLI et al., 2008; HAAS et al., 2014; LIU et al., 2016; SONVICO et al., 2006). Sabe-se que elas possuem um núcleo vazio, preenchido por solvente aquoso e rodeado por multicamadas. Estas, por sua vez, são compostas por bicamadas lipídicas e as regiões intercalantes contêm água e quitosana (Figura 9) (GERELLI et al., 2008; HAAS et al., 2014; LIU et al., 2016; SONVICO et al., 2006). O tamanho final da partícula formada depende do número de bicamadas lipídicas que ela possui e este número varia conforme a proporção de quitosana e lecitina utilizada (GERELLI et al., 2008).

As nanopartículas de quitosana têm sido produzidas e estudadas para serem utilizadas em diversas aplicações. Alguns exemplos são as nanopartículas de quitosana que atuam como sistemas carreadores de agentes anti-tumorais (HOSSEINZADEH et al., 2012; PRABAHARAN, 2015) e de agentes antimicrobianos (ONG et al., 2017). A extensa utilização da quitosana na preparação de nanopartículas deve-se às inúmeras características promissoras que este biopolímero apresenta, como o potencial cicatrizante.

**FIGURA 9 – MORFOLOGIA E ESTRUTURA DE NANOPARTÍCULAS DE LECITINA E QUITOSANA.** Morfologia de nanopartículas de lecitina e quitosana obtida por crio-microscopia eletrônica de transmissão (A). Na imagem observa-se a presença de partículas compostas por estruturas multilamelares compostas por várias bicamadas circundando um núcleo vazio. Ilustração de possível organização esquemática das nanopartículas de lecitina e quitosana (B). O solvente hidrofóbico utilizado na preparação destas nanopartículas entrelaça-se com a lecitina formando um núcleo hidrofóbico. A quitosana encontra-se na periferia da nanopartículas, revestindo-a.



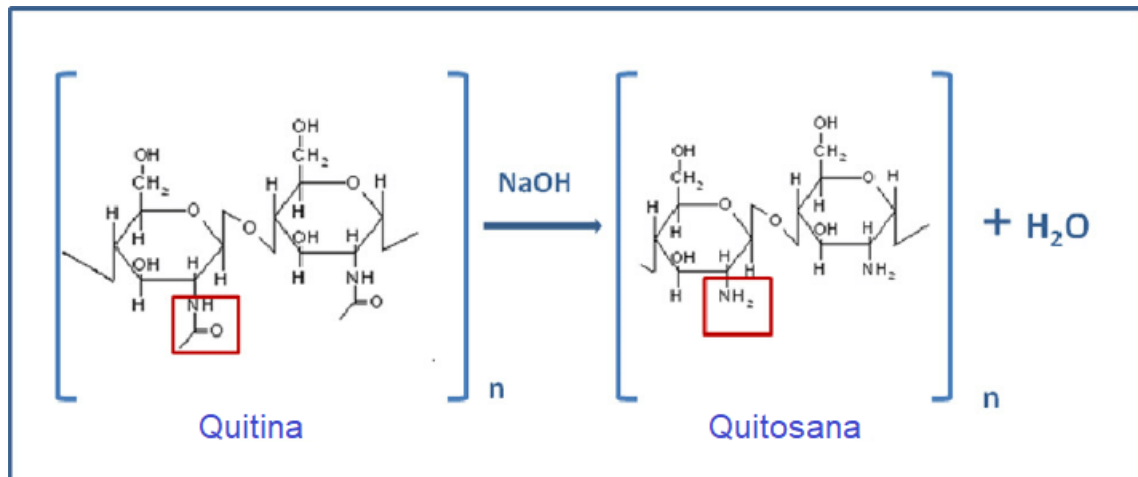
Fonte: (A) Adaptado de (LIU et al., 2016, p. 765). (B) Adaptado de (HAAS et al., 2014, p. 8).

#### 1.4 O POTENCIAL CICATRIZANTE DA QUITOSANA

Alguns dos biopolímeros mais utilizados como terapia na cicatrização são o colágeno, a celulose, a quitosana e o alginato. Estes, por possuírem potencial antibacteriano, anti-inflamatório, ou outras ações específicas, desempenham um papel eficiente na cicatrização. De todos estes, no entanto, poucos reúnem tantas qualidades e facilidades de preparação quanto a quitosana (Park et al. 2018; Sahana & Rekha 2018).

A quitosana é o mais importante derivado da quitina (BANO et al., 2017; FAN et al., 2018) e é encontrada principalmente em crustáceos, mas está presente também no exoesqueleto de moluscos e insetos, além de ser sintetizada por alguns fungos. A desacetilação alcalina da quitina dá origem à quitosana (Figura 10), e a diferenciação entre esses dois compostos é feita com base no grau de desacetilação obtido. Grau de desacetilação superior a 50% caracteriza a quitosana, enquanto quando este parâmetro é inferior a 50%, o polímero ainda é considerado quitina. A quitosana é composta por moléculas de N-acetilglicosamina unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1–4) e uma das suas principais e relevantes características é seu caráter catiônico (Kozen et al. 2008; Croisier & Jérôme 2013; Ahmed & Ikram 2016).

FIGURA 10 – DESACETILAÇÃO DA QUITINA EM MEIO CONTENDO HIDRÓXIDO DE SÓDIO.



Fonte: Adaptado de (Rhoades & Rastall 2015, p. 543).

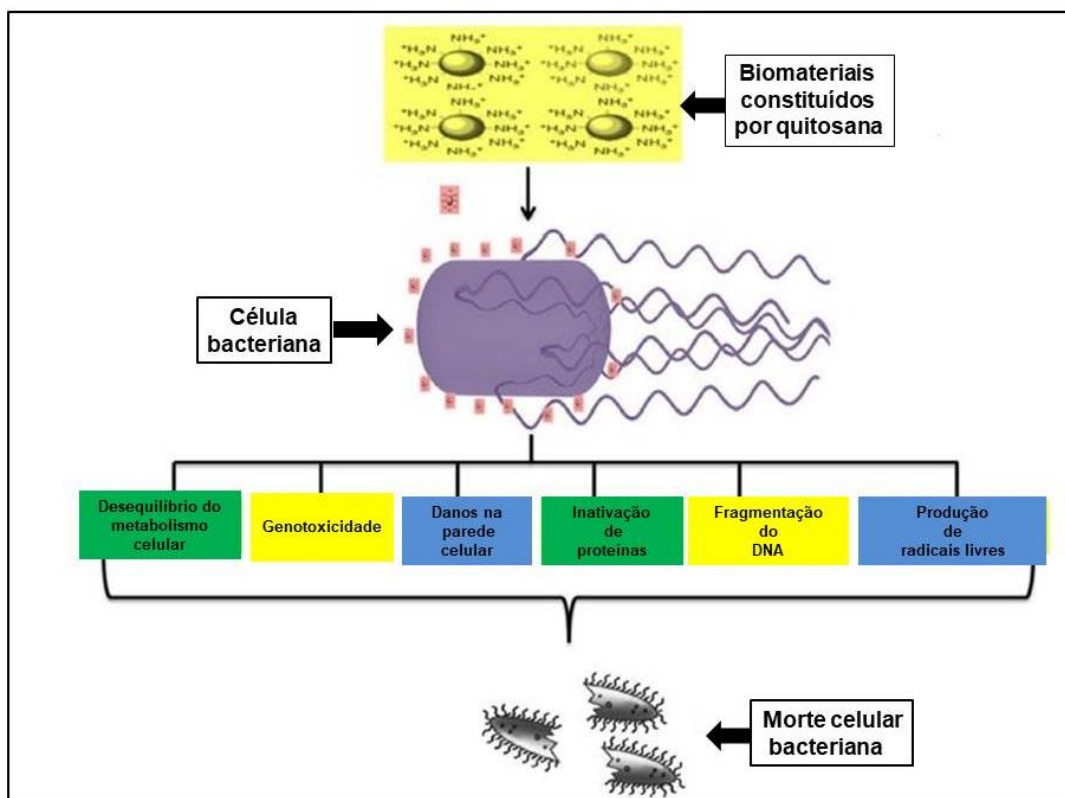
O grau de desacetilação da quitosana é extremamente relevante na determinação das propriedades físico-químicas e biológicas deste polímero e interfere diretamente na determinação do seu caráter catiônico. Quando solubilizada em meio aquoso acidificado os grupos amina livres da quitosana são protonados e o polímero então adquire cargas positivas (DAI et al., 2011). A quantidade de grupos amina disponíveis na quitosana é diretamente proporcional ao seu grau de desacetilação. Sendo assim, quanto mais desacetilada for a quitosana, maior também será sua cationicidade (EL KNIDRI et al., 2018; LORENZINI et al., 2009). Outros fatores que também são influenciados pelo grau de desacetilação da quitosana são solubilidade, hidrofiliabilidade, cristalinidade e resposta celular (EL KNIDRI et al., 2018).

Dentre todos os biopolímeros, a quitosana é o único com caráter catiônico, uma das principais características que motivam sua utilização em diversas aplicações biomédicas (BANO et al., 2017). Os grupos amina positivamente carregados da quitosana podem se ligar a uma variedade de moléculas negativamente carregadas, como DNA e RNAs de interferência (MAO; SUN; KISSEL, 2010). A cationicidade da quitosana confere a ela algumas propriedades potencialmente interessantes na cicatrização de feridas tais como suas ações antimicrobiana e hemostática (BANO et al., 2017; KHAN; MUJAHID, 2019; POSTNOVA et al., 2018).

A atividade antimicrobiana da quitosana se dá por meio da ligação dos grupos amino deste polímero com a superfície negativamente carregada de vários

microrganismos. Esse evento resulta no extravasamento dos constituintes intracelulares do microrganismo afetado e consequente morte celular (Figura 11) (GANAN; CARRASCOSA; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2009). Exemplos de estruturas com carga negativa e que podem se ligar a quitosana são os lipopolissacarídeos, presentes nas bactérias Gram negativas e o ácido teicoico, presente nas bactérias Gram positivas (RAAFAT et al., 2008).

**FIGURA 11 – MECANISMOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE BIOMATERIAIS CONSTITUÍDOS POR QUITOSANA.** As cargas positivas conferidas pelos grupos amino da quitosana permitem que os biomateriais constituídos por este polímero se liguem à microorganismos que possuem carga superficial negativa. Essa ligação causa vários distúrbios na superfície da célula, como danos na parede celular, fragmentação do DNA, entre outros. A somatória destes eventos perturbadores da homeostasia do microrganismo afetado leva à morte celular do mesmo.



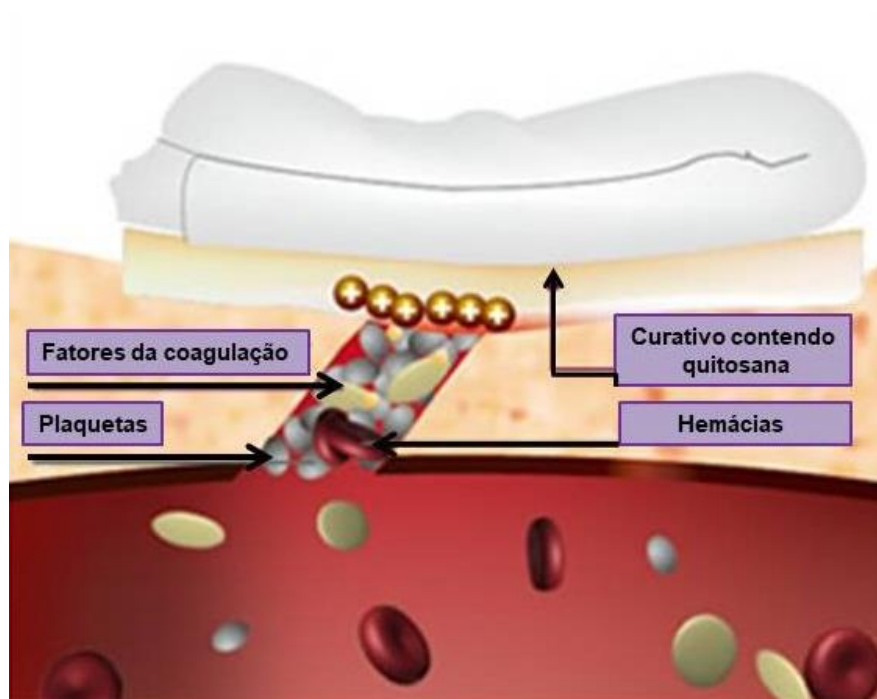
Fonte: Adaptado de (RIAZ RAJOKA et al., 2019).

Estudos já demonstraram a atividade antimicrobiana da quitosana em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (PARK et al., 2018) e *Pseudomonas aeruginosa* (BANO et al., 2017). Além da atividade antimicrobiana que a quitosana exerce, esta ainda pode ser aumentada com a adição de outros fármacos à

formulação. Como exemplo, podemos citar a adição de vancomicina e daptomicina a filmes de quitosana, preparos que se mostraram bons candidatos para o tratamento de infecções adquiridas após fraturas ósseas (SMITH et al., 2010; ZHAO et al., 2014).

A atuação da quitosana na hemostase ocorre devido à interação dos grupos amina deste biopolímero com as cargas negativas das plaquetas e dos eritrócitos. O caráter aniônico destas células é conferido pelo ácido siálico, nas plaquetas, e pela fosfatidilcolina, nos eritrócitos. Essa interação promove a agregação plaquetária e consequente formação de coágulos, interrompendo ou evitando hemorragias (Figura 12). Quanto maior for o grau de desacetilação da quitosana maior será, portanto, o seu potencial para interagir com plaquetas e hemácias, devido ao maior número de grupamentos amina disponíveis (Millner et al. 2009; Gu et al. 2016; Khan & Mujahid 2019). Adicionalmente, a quitosana aumenta a atividade das células inflamatórias e ativa os fibroblastos, que irão formar uma nova matriz de colágeno no local onde o dano tecidual ocorreu (BEANES et al., 2003; PARK et al., 2018).

**FIGURA 12 – MECANISMO HEMOSTÁTICO DA QUITOSANA.** A figura ilustra uma ferida sendo tratada com curativo cujo principal constituinte é a quitosana. As cargas positivas da quitosana ligam-se às cargas negativas das plaquetas e hemácias auxiliando o processo de coagulação e formação do tampão plaquetário.



Fonte: Adaptado de (Biotextiles 2017. *Hemostatic Wound Dressings*).

A ação antifúngica da quitosana também já foi descrita. Sabe-se que fungos que possuem ácidos graxos livres e poli-insaturados em sua membrana são sensíveis à quitosana. Nestes, ela atua aumentando o estresse oxidativo intracelular levando à permeabilização da membrana e consequente morte. Exemplos de fungos sensíveis à ação antifúngica da quitosana são *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *N. crassa* (Lopez-Moya & Lopez-Llorca 2016; Felipe et al. 2018). A ação antimicrobiana e a ação antifúngica presentes em um mesmo composto conferem à quitosana uma natureza única que eleva seu potencial para ser utilizada no tratamento de feridas (BANO et al., 2017). Há ainda a expectativa de que a quitosana tenha ação biocida podendo ser utilizada como agente de controle parasitário contra *Lernaea cyprinacea*, parasita frequentemente encontrado em peixe-dourado (*Carassius auratus*) (ABU-ELALA; ATTIA; ABD-ELSALAM, 2018).

O processo de degradação da quitosana ocorre principalmente pela ação da lisozima, enzima presente nos fluidos e tecidos do corpo humano (PARK et al., 2018). Sabe-se que esse processo ocorre primeiramente no plasma, células hepáticas, rins e urina (Onishi & Machida 1999; Naveed et al. 2019). A mucoadesividade é outra característica promissora da quitosana, também conferida pelo seu caráter catiônico. A quitosana pode se aderir a mucinas e a proteínas glicosiladas aniônicas encontradas em altas concentrações nas superfícies mucosas (JENNINGS et al., 2015; KARN et al., 2011) fazendo com que esse biopolímero seja cada vez mais utilizado em diversas áreas da saúde (ortopedia, odontologia, oftalmologia) e, principalmente nos processos de cicatrização de feridas (BANO et al., 2017).

Os monômeros da quitosana também atuam aumentando a síntese de ácido hialurônico e auxiliando a deposição ordenada de colágeno no local da ferida. Além disso, ela promove a ativação de macrófagos favorecendo o recrutamento destas células que irão interromper a atividade anormal de crescimento. Essas ações resultarão em menor tempo para cicatrização bem como prevenção da formação de cicatriz (RIBEIRO et al., 2009). Por fim, pode-se dizer que a quitosana é um biomaterial com potencial para ser utilizado como terapia no tratamento de feridas crônicas em pacientes diabéticos, questão que ainda é um desafio para a saúde pública.

Nosso grupo de pesquisa tem investigado a atuação das nanopartículas de quitosana na cicatrização de feridas, utilizando o rato como modelo animal para a

DM (RIBEIRO et al., 2020). Considerando as potenciais propriedades cicatrizantes da melatonina, já citadas anteriormente, supomos que a adição desta molécula a nanopartículas de quitosana resultaria em um sistema promissor para também ser avaliado acerca de seu potencial na cicatrização dessas feridas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Há uma variedade de medicamentos disponível no mercado para o tratamento de feridas em pacientes diabéticos (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014; DINH; ELDER; VEVES, 2011). Além disto, há muitas pesquisas com diferentes compostos em desenvolvimento visando melhorar o processo de cicatrização dessas feridas (AIJAZ et al., 2015; AZEVEDO et al., 2016; LIMA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2020). Apesar disso, estudos em busca de terapias mais eficazes e acessíveis são necessários, já que a dificuldade de cicatrização de feridas em indivíduos com diabetes ainda gera a necessidade de ações extremas como a amputação de membros acometidos por estas lesões (JUPITER et al., 2015; VAN NETTEN; BABA; LAZZARINI, 2017).

A versatilidade da quitosana somada às suas características promissoras no processo de cicatrização e as amplas propriedades benéficas da melatonina já inspiraram pesquisadores a unir estes dois compostos para serem utilizados em diferentes fins como o tratamento de câncer (KUMAR YADAV et al., 2017), atenuação da toxicidade de medicamentos (GHASSEMI-BARGHI, 2018) e para melhorar o processo de cicatrização (BLAŽEVIĆ et al., 2016; ROMIĆ et al., 2016). No entanto, até o momento não há na literatura relatos de estudos com nanopartículas de quitosana e melatonina no tratamento de feridas em diabéticos.

Em sistema nanoparticulado carreador de melatonina, composto por lecitina e quitosana (HAFNER et al., 2009) verificou-se que a mucoadesividade, conferida pela quitosana, se manteve nesse sistema. Além disso, a integração da melatonina a sistemas carreadores de fármacos já mostrou ser capaz de driblar obstáculos como a fotoestabilidade (TURSILLI et al., 2006) e a meia-vida plasmática curta desta molécula (KUMAR YADAV et al., 2017). Apesar de dados sobre as nanopartículas de lecitina e quitosana contendo melatonina influenciarem positivamente o processo de cicatrização em feridas saudáveis (BLAŽEVIĆ et al., 2016), não há relatos de testes *in vivo*, em feridas de indivíduos portadores da DM.

Este estudo apresenta, pela primeira vez, um ensaio *in vivo*, utilizando o rato como modelo experimental para diabetes, objetivando esclarecer se a melatonina encapsulada em nanopartículas de quitosana e lecitina pode interferir positivamente na cicatrização de feridas neste animal. As informações geradas serão relevantes para o avanço nesta linha de pesquisa.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de uma formulação de nanopartículas de lecitina e quitosana encapsulando melatonina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Preparar um sistema de nanopartículas mistas de quitosana e lecitina contendo a melatonina;

3.2.2 Caracterizar as nanopartículas produzidas em relação ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e percentual de encapsulação da melatonina;

3.2.3 Avaliar a toxicidade das nanopartículas produzidas em modelo experimental *Galleria mellonella*;

3.2.4 Padronizar o protocolo de indução de diabetes em ratos Wistar utilizando estreptozotocina;

3.2.5 Comparar macroscopicamente e microscopicamente os efeitos das formulações preparadas no tratamento de feridas em ratos diabéticos.

# **CAPÍTULO 2**

# **MANUSCRITO**



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

# Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats

Viviane Lopes Rocha Correa<sup>a</sup>, Juliana Assis Martins<sup>a</sup>, Tainara Ribeiro de Souza<sup>b</sup>, Gabriel de Castro Nunes Rincon<sup>b</sup>, Marina Pacheco Miguel<sup>b</sup>, Liliana Borges de Menezes<sup>b</sup>, Andre Correa Amaral<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Nano & Biotechnology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-050, Brazil

<sup>b</sup> Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-050, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 June 2020

Received in revised form 19 July 2020

Accepted 4 August 2020

Available online 8 August 2020

## Keywords:

Galleria mellonella

Nanotechnology

Polymeric nanoparticles

Lecithin

Diabetes mellitus

Healing

## ABSTRACT

Wound healing in diabetic patients remains a worldwide problem that can cause amputations and even lead to death. This work aimed to produce lecithin-chitosan nanoparticles loaded with melatonin (MEL-NP) incorporated in a topical formulation to be evaluated for healing in the *in vivo* animal model for diabetes. To produce nanoparticles, an ethanolic solution containing soybean lecithin and melatonin was added dropwise to an aqueous solution of chitosan under sonication. The nanoparticles were physicochemical characterized and evaluated *in vivo* for toxicity using the *Galleria mellonella* model and its potential for wound healing in diabetic rats. The MEL-NPs presented a particle size of 160 nm and a zeta potential of 25 mV. The melatonin entrapment efficiency was 27%. Our results indicated that treatment with MEL-NP improved wound healing demonstrated by wound closure earlier than the other treatments evaluated. A desired therapeutic effect was achieved by MEL-NP in the induction of fibroblast and angiogenic proliferation. In addition, it was accompanied by an expressive collagen deposition. Considering the observed data, the MEL-NP developed could be used as a proof of concept to develop a promising strategy for the healing of diabetic wound.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a syndrome characterized by chronic hyperglycemia caused by low insulin levels [1]. Currently, almost half a billion people worldwide are affected by this disease, which is among the top 10 causes of death [2]. The damage caused by DM is diverse, including retinopathy, nephropathy, neuropathy, increased risk of cardiovascular diseases, and delayed healing. When neuropathy affects the distal nerves of the feet, in addition to micro and macrovascular damage [3], there is a predisposition for the formation of non-healing ulcers, a condition known as diabetic foot [2]. The general prevalence of complications related to diabetic foot is 6.4% [2] and it is estimated that every 30 s a lower limb is amputated due to DM [4].

There are many options of medicines and dressings available for the treatment of wounds in diabetic patients. Some examples are hydrocolloid dressings, calcium alginate dressings, sulfa drugs and platelet-derived growth factors [5]. However, even with so many options, wound healing in diabetic patients remains a challenge [6], especially

when the wounds become deep and exudative [5]. The search for new treatment options, combined with advances in nanotechnology has generated new therapeutic options. A range of substances has been combined with biomaterials to create structures such as nanofibers [7], nanoparticles [8], and nanocomposites [9] to accelerate the healing process.

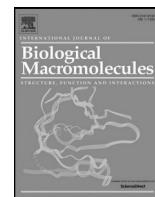
Biopolymers, which are organic molecules synthesized by living organisms [10], are a type of biomaterial widely used as nanocarriers. Chitosan, an active and deacetylated form of chitin, has been used in healing medicines, as it offers several properties that can favor this process. It is known that chitosan acts positively in haemostasis and tissue regeneration [11,12], stimulates the production of fibroblasts [13] and has antifungal and antimicrobial effects [14,15]. In addition, chitosan is a biocompatible and biodegradable polymer [16] exhibiting mucoadhesive properties [17].

Melatonin is an indolamine produced mainly by the pineal gland, but also by other tissues, such as retina, gastrointestinal tract, and skin [18]. It is considered an antioxidant molecule because of its ability to neutralize free radicals and reactive oxygen species (ROS) [19]. It has been reported that melatonin influences the activity of keratinocytes and confers anti-inflammatory and neuroprotective effects [20]. These properties motivated this molecule to be tested for its ability to promote the healing process, especially in DM. Some *in vivo* studies have already

\* Corresponding author at: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brazil.

E-mail address: [andre\\_amaral@ufg.br](mailto:andre_amaral@ufg.br) (A. Correa Amaral).

CAPÍTULO 3  
PUBLICAÇÕES DURANTE  
O DOUTORADO



## Improving peptide quantification in chitosan nanoparticles

Maycon Carvalho Ribeiro <sup>a</sup>, Viviane Lopes Rocha Corrêa <sup>a</sup>, Francenya Kelley Lopes da Silva <sup>a</sup>,  
Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto <sup>b</sup>, Ariádine Amorim Casas <sup>a</sup>,  
Liliana Borges de Menezes <sup>c</sup>, André Corrêa Amaral <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Nano & Biotechnology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-050, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Quality Control of Medicine, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-220, Brazil

<sup>c</sup> Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-050, Brazil



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 June 2018

Received in revised form 18 July 2018

Accepted 19 July 2018

Available online 20 July 2018

#### Keywords:

Chitosan

Biomolecules quantification

Nanoparticles

### ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate different methodologies for peptide quantification in the supernatant of chitosan nanoparticles by removing the unliked polymer in the suspension. The ionic gelation method was used to prepare the chitosan nanoparticles encapsulating a 5.3 kDa peptide. Three different methodologies for the processing of the solutions were compared before subjecting the samples to the Bradford protocol or Qubit® kit for protein detection. For the quantification, it was necessary to create a standard peptide curve using different peptide concentrations. The suitable standard curve would be one in which the peptide was diluted in the empty chitosan supernatant (obtained after nanoparticles centrifugation) or in the filtrate of the empty chitosan supernatant. Our results indicated the safest methodology tested for peptide quantification in the supernatant chitosan nanoparticles was filtering the solution before subjecting the sample to the Bradford assay.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Today, nanotechnology is found in a wide range of applications [1–4] and allows the manipulation of material creating structures in a small dimension. Nanoparticles around 300 nm are suitable to incorporate drugs or bioactive molecules improving drug delivery formulation, which allows a diverse range of applications in the pharmaceutical field [5]. Polymeric nanoparticles are promising to achieve this goal due to its capacity to promote drug sustained release and the possibility to direct the drug to reach specific sites in the body [6,7]. Chitosan is a good example of a natural polymer used to prepare these nanoparticles since it presents characteristics such as hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability and low toxicity [8].

Chitosan is formed by monosaccharide chains linked by glycosidic bonds with polymer amino groups, enabling the formation of chemical complexes with both drugs and biological tissues [9]. The chemical properties of chitosan [ $\alpha$  (1 → 4) 2-amino 2-deoxy  $\beta$ -D glucan] are determined by the molecular weight, degree of deacetylation and viscosity [10]. The molecular weight of this polymer can be low (70 kDa), medium (190–310 kDa) or high (500 kDa) [11].

This cationic polymer is soluble in weak acids which presents protonated amino groups in its polymeric chain [12]. In pharmaceutical applications, chitosan nanoparticles play an important role by carrying negatively charged molecules, such as peptides and proteins, and providing a significant protection against their biodegradation by enzymes in physiological fluids [13].

The ionotropic gelation method, containing sodium tripolyphosphate (TPP) as a cross-linker agent, is commonly used to prepare chitosan nanoparticles [14,15]. Usually, during the cross-linking process, the TPP solution, including the negatively charged biomolecule, is slowly added to a chitosan solution resulting in the spontaneous formation of nanoparticles. This simple and mild method of preparation and the advantages of chitosan become these nanoparticles carriers of interest to peptides and other molecules like antibiotics. In this way, chitosan nanoparticles have become the target of studies in the treatment of important pathologies such as cancer and diabetes [16–19].

After the nanoparticle production, it is important to determine the amount of the molecule of interest (drug or a biomolecule) that is linked to or encapsulated in the nanoparticles. The mechanism by which the peptide and protein, like insulin, lipase and others, interacts with chitosan-TPP nanoparticles is, probably, through hydrophobic interactions and H-bonding [20,21].

The physical-chemical characteristics of the compound must be taken into consideration when choosing the quantification method.

\* Corresponding author at: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brazil.

E-mail address: [amaral.nanobiotech@gmail.com](mailto:amaral.nanobiotech@gmail.com) (A.C. Amaral).



## Wound healing treatment using insulin within polymeric nanoparticles in the diabetes animal model



Maycon Carvalho Ribeiro<sup>a</sup>, Viviane Lopes Rocha Correa<sup>a</sup>, Francenya Kelley Lopes da Silva<sup>a</sup>, Ariadine Amorim Casas<sup>a</sup>, Angelica de Lima das Chagas<sup>d</sup>, Leiny Paula de Oliveira<sup>d</sup>, Marina Pacheco Miguel<sup>b,d</sup>, Danielle Guimaraes Almeida Diniz<sup>c</sup>, Andre Correa Amaral<sup>a</sup>, Liliana Borges de Menezes<sup>b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Nano & Biotecnologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás 74605-050, Brazil

<sup>b</sup> Setor de Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, s/ n, Setor Universitário, Goiânia, Goiás 74605-050, Brazil

<sup>c</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-220, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiania, Goiás 74001-970, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Polymeric nanoparticles  
Chitosan  
Insulin  
Diabetes  
Wound healing

### ABSTRACT

The aim of this work was to prepare chitosan nanoparticles containing insulin and to evaluate its therapeutic activity during wound healing in diabetic rats. The hypothesis that guided this study was that the combination of insulin within chitosan nanoparticles could stimulate the signaling pathway for wound healing. The chitosan nanoparticles were prepared by the ionotropic gelation method presenting average size of  $183.3 \pm 8.32$  nm, polydispersity index (PDI)  $0.397 \pm 0.07$  and zeta potential of  $33.7 \pm 2.45$  mV for empty chitosan nanoparticles (EC) and  $245.9 \pm 25.46$  nm and PDI  $0.463 \pm 0.01$ , and zeta potential of  $39.3 \pm 4.88$  mV for chitosan nanoparticles containing insulin (IC). The insulin association efficiency was  $97.19\% \pm 2.18$ . These nanoparticles and free insulin (FI) were incorporated within a hydrogel (Sepigel®) for topical application in the wound of 72 diabetic rats distributed in four groups: Sepigel® (S, control), free insulin (FI), empty chitosan nanoparticles (EC), and chitosan nanoparticles containing insulin (IC). The animals in each group were reorganized into three subgroups ( $n = 6$ ) to assess their clinical signs after days 3, 7, and 14 from the beginning of treatments. Intense fibroplasias were observed in the free or insulin-chitosan nanoparticles groups. In the latter, a large number of blood vessels were observed at day 7th. Our data indicated that both empty and insulin-containing chitosan nanoparticles were able to stimulate inflammatory cell proliferation, and angiogenesis, followed by wound maturation.

What's new section: The alarming rise in diabetic person around the world associated with the problematic wound healing impairment brings serious health problems for the patients, such as the dramatic amputation of the infected limb. In this study a novel strategy to improve wound healing in diabetic rats was tested. The main goal used here was to combine the insulin's stimulatory effect on healing metabolic route and the chitosan healing effect in a formulation appropriate to be topically administrated in wound. The positive results obtained here could be used as proof of concept to develop a refined therapy to improve the healing process in diabetic patients.

### 1. Introduction

Impaired wound healing is a major health concerns in diabetes mellitus (DM) patients in which a several factors contribute to this disorder, including neuropathy and vascular injuries (Hossein et al., 2018; Liu et al., 2019). Also, a persistent hyperglycaemia state is observed because of the deficiency in insulin production or by its incapacity to interact with the cells (Skyler, 2004). The projections for diabetes prevalence in 18–99 years old population are estimated to rise from 8.4% in 2017 to 9.9% in 2045 (Cho et al., 2018).

\* Corresponding author at: Setor de Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, s/ n, Setor Universitário, Goiânia 74605-050, Goiás, Brazil.

E-mail address: [liliana@ufg.com](mailto:liliana@ufg.com) (L.B.d. Menezes).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105330>

Received 25 November 2019; Received in revised form 23 March 2020; Accepted 29 March 2020

Available online 05 April 2020

0928-0987/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

# CONCLUSÕES

## 4 CONCLUSÕES

No presente estudo, foram produzidas nanopartículas mistas de quitosana e lecitina, com e sem melatonina encapsulada. As nanopartículas contendo melatonina apresentaram tamanho médio de  $160 \pm 4,45$  nm, índice de polidispersão de 0,220 e potencial zeta de  $25,0 \pm 0,57$  mV. O percentual de encapsulação da melatonina nestas partículas foi de 27%. As nanopartículas vazias, sem melatonina, apresentaram tamanho médio de  $207,63 \pm 14,61$  nm, índice de polidispersão de 0,193 e potencial zeta de  $25,97 \pm 1,13$  mV.

Utilizando o modelo experimental *Galleria mellonella*, avaliou-se a toxicidade das nanopartículas produzidas e verificou-se que a sobrevivência larval foi 13,33% maior no grupo tratado com a melatonina encapsulada nas nanopartículas, que naquele tratado com a molécula livre. Os resultados indicaram que a toxicidade da melatonina livre pode ser reduzida quando encapsulada nas nanopartículas produzidas neste estudo.

Por fim, avaliou-se o efeito das formulações contendo as nanopartículas mistas de quitosana e lecitina, com e sem melatonina encapsulada, na cicatrização de feridas em modelo animal para diabetes. Verificou-se que ambas formulações favoreceram a cicatrização. No entanto, a formulação contendo as nanopartículas com melatonina mostrou maior eficácia por estimular eventos importantes como a deposição de colágeno e a proliferação de vasos sanguíneos.

Desta forma, consideramos as nanopartículas de quitosana e lecitina contendo melatonina um sistema promissor para ser utilizado no tratamento de feridas em indivíduos portadores da DM. No entanto, mais testes são necessários a fim de obter um produto final com os melhores parâmetros possíveis.

# REFERÊNCIAS

## 5 REFERÊNCIAS

- ABU-ELALA, N. M.; ATTIA, M. M.; ABD-ELSALAM, R. M. Chitosan-silver nanocomposites in goldfish aquaria: A new perspective in *Lernaea cyprinacea* control. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.
- ACHARJEE, S. et al. Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 269–276, 2013.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, 2016.
- AIJAZ, A. et al. Hydrogel Microencapsulated Insulin-Secreting Cells Increase Keratinocyte Migration, Epidermal Thickness, Collagen Fiber Density, and Wound Closure in a Diabetic Mouse Model of Wound Healing. **Tissue Eng Part A**, v. 21, p. 2723–2732, 2015.
- ALAVI, A. et al. **Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention** **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2014.
- ALLEGRA, M. et al. **The chemistry of melatonin's interaction with reactive species** **Journal of Pineal Research**, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standard medical care in diabetes 2018. **The journal of clinical and applied research and education**, 2018.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. v. 42(Suppl., n. 2, 2019).
- AZEVEDO, F. et al. Effect of Topical Insulin on Second-Degree Burns in Diabetic Rats. **Biological Research for Nursing**, v. 18, n. 2, p. 181–192, 2016.
- BALTZIS, D.; ELEFTHERIADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. **Advances in Therapy**, v. 31, n. 8, p. 817–836, 2014.
- BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.
- BARBIERI, S. et al. Lecithin/chitosan controlled release nanopreparations of tamoxifen citrate: Loading, enzyme-trigger release and cell uptake. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 3, p. 276–283, 2013.
- BEANES, S. R. et al. **Skin repair and scar formation: The central role of TGF- $\beta$**  **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 2003.
- BEIDLER, S. K. et al. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency

- ulcer tissue before and after compression therapy. **Journal of Vascular Surgery**, 2009.
- BEŞKONAKH, E. et al. The effect of pinealectomy on immune parameters in different age groups in rats: Results of the weekly alteration of the zinc level and the effect of melatonin administration on wound healing. **Journal of Clinical Neuroscience**, 2000.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 2 SUPPL. 1, p. 3–8, 2000.
- BLAKYTNY, R.; JUDE, E. **The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes** **Diabetic Medicine**, 2006.
- BLAŽEVIĆ, F. et al. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 445–454, 2016.
- BONORA, E.; TUOMILEHTO, J. **The pros and cons of diagnosing diabetes with A1C** **Diabetes Care**, 2011.
- BOULTON, A. J. M. The pathway to foot ulceration in diabetes. **Medical Clinics of North America**, v. 97, n. 5, p. 775–790, 2013.
- BRUHN-OLSZEWSKA, B. et al. **Molecular factors involved in the development of diabetic foot syndrome** **Acta Biochimica Polonica**, 2012.
- BRZEZINSKI, A. **Melatonin in humans** **New England Journal of Medicine**, 1997.
- BUBENIK, G. A. **Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance** **Digestive Diseases and Sciences**, 2002.
- BURCHAKOV, D. I.; USPENSKAYA, Y. B. The Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Sedative Effects of Melatonin: Results of Clinical Trials. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 49, n. 1, p. 54–59, 2019.
- BUTLER, A. E. et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. **Diabetologia**, 2010.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17–MR71, 2007.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239–2251, 2017.
- CHELLAPPAN, D. K. et al. Nanotechnology and Diabetic Wound Healing: A Review. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 17, n. 2, 2017.
- CHEN, C. S. et al. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: Pain relief**

or excessive scar formation? **Mediators of Inflammation**, 2010.

CHUNG, S. S. M. et al. **Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress**. *Journal of the American Society of Nephrology*. **Anais...**2003

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. **Chitosan-based biomaterials for tissue engineering** *European Polymer Journal*, 2013.

CROOKE, A. et al. Effect of Melatonin and Analogues on Corneal Wound Healing: Involvement of Mt<sub>2</sub> Melatonin Receptor. **Current Eye Research**, v. 40, n. 1, p. 56–65, 2015.

CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. **Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury** *European Journal of Pharmacology*, 2001.

DABELEA, D. et al. Trends in the prevalence of ketoacidosis at diabetes diagnosis: The search for diabetes in youth study. **Pediatrics**, 2014.

DAI, T. et al. **Chitosan preparations for wound-healing effects**. [s.l.: s.n.]. v. 9

DALL, T. M. et al. The economic burden of elevated blood glucose levels in 2012: Diagnosed and undiagnosed diabetes, gestational diabetes mellitus, and prediabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 12, p. 3172–3179, 2014.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.

DELAMAIRE, M. et al. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, 1997.

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2449–2462, 2018.

DINH, T.; ELDER, S.; VEVES, A. Delayed wound healing in diabetes: considering future treatments. **Diabetes Management**, v. 1, n. 5, p. 509–519, 2011.

DINH, T. L.; VEVES, A. A review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 4, n. 3, p. 154–159, 2005.

DOSHI, H. K.; MOISSINAC, K.; HARWANT, S. Are diabetic foot lesions precipitated by accidental trauma? **The Medical journal of Malaysia**, 2001.

DROBNIK, J. Wound healing and the effect of pineal gland and melatonin. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

DROBNIK, J.; DABROWSKI, R. The opposite effect of morning or afternoon application of melatonin on collagen accumulation in the sponge-induced granuloma.

**Neuroendocrinology Letters**, 2000.

EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1181–1189, 2018.

EMING, S. A. et al. Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. **Journal of Proteome Research**, 2010.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. **Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms** **Journal of Investigative Dermatology**, 2007.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6-265sr6, 2014.

FALANGA, V. **Wound healing and its impairment in the diabetic foot** **Lancet**, 2005.

FAN, Z. et al. Synthesis, characterization, and antifungal evaluation of diethoxyphosphoryl polyaminoethyl chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, 2018.

FELIPE, L. DE O. et al. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*—natural products that show promise in candidiasis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 212–219, 2018.

FERREIRA, E. et al. **Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura**. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, 2003.

GALE, E. A. M. **Type 1 diabetes in the young: The harvest of sorrow goes on** **Diabetologia**, 2005.

GALKOWSKA, H.; WOJEWODZKA, U.; OLSZEWSKI, W. L. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, 2006.

GANAN, M.; CARRASCOSA, A. V.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J. Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter* spp. and other microorganisms and its mechanism of action. **Journal of Food Protection**, 2009.

GE, J. et al. Melatonin Protects Intervertebral Disc from Degeneration by Improving Cell Survival and Function via Activation of the ERK1/2 Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

GERELLI, Y. et al. Structure of self-organized multilayer nanoparticles for drug

delivery. **Langmuir**, v. 24, n. 20, p. 11378–11384, 2008.

GHASSEMI-BARGHI, M. S. N. Melatonin Loading Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles : Application in Attenuating Etoposide-Induced Genotoxicity in HepG2 Cells. p. 74–80, 2018.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. **Oxidative stress and diabetic complications****Circulation Research**, 2010.

GO, A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update. **Circulation**, 2014.

GOLDACRE, M. J. Cause-specific mortality: Understanding uncertain tips of the disease iceberg. **Journal of Epidemiology and Community Health**, 1993.

GRARUP, N. et al. **Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: From genome-wide association studies to rare variants and beyond****Diabetologia**, 2014.

GREENHALGH, D. G. Wound healing and diabetes mellitus. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 30, n. 1, p. 37–45, 2003.

GREGG, E. W.; SATTAR, N.; ALI, M. K. **The changing face of diabetes complications****The Lancet Diabetes and Endocrinology**, 2016.

GU, B. K. et al. Gelatin blending and sonication of chitosan nanofiber mats produce synergistic effects on hemostatic functions. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

HAAS, S. E. et al. Development of innovative oil-core self-organized nanovesicles prepared with chitosan and lecithin using a 23 full-factorial design. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 7, p. 769–778, 2014.

HAFNER, A. et al. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 2, p. 205–213, 2009.

HALICI, M. et al. Melatonin promotes fracture healing in the rat model. **Eklemler hastalıkları ve cerrahisi = Joint diseases & related surgery**, v. 21, n. 3, p. 172–7, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, 1994.

HARJUTSALO, V.; SJÖBERG, L.; TUOMILEHTO, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. **The Lancet**, 2008.

HARPSØE, N. G. et al. Clinical pharmacokinetics of melatonin: A systematic review.

- European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 901–909, 2015.
- HOLMAN, R. R. et al. 10-Year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, 2008.
- HOSSEINZADEH, H. et al. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: Preparation and in vitro study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1851–1863, 2012.
- IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. August, p. 656–662, 2018.
- INTERNATION DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas Ninth**. [s.l.: s.n.].
- IZYKOWSKA, I. et al. Effect of melatonin on human keratinocytes and fibroblasts subjected to UVA and UVB radiation in vitro. **In Vivo**, 2009.
- JEFFCOATE, W. J.; PRICE, P.; HARDING, K. G. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcer. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 20, n. SUPPL. 1, p. 78–89, 2004.
- JENNINGS, J. A. et al. Chitosan coatings to control release and target tissues for therapeutic delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 7, p. 855–871, 2015.
- JUPITER, D. C. et al. The impact of foot ulceration and amputation on mortality in diabetic patients. I: From ulceration to death, a systematic review. **International Wound Journal**, v. 13, n. 5, p. 892–903, 2015.
- KÄHÄRI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. **Matrix metalloproteinases in skin****Experimental Dermatology**, 1997.
- KARN, P. R. et al. Mucoadhesive liposomal delivery systems: The choice of coating material. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2011.
- KAYAPINAR, M. et al. Saving the zone of stasis in burns with melatonin: An experimental study in rats. **Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 21, n. 6, p. 419–424, 2015.
- KHAN, M. A.; MUJAHID, M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 138–147, 2019.
- KHAN, R. M. M. et al. From pre-diabetes to diabetes: Diagnosis, treatments and translational research. **Medicina (Lithuania)**, v. 55, n. 9, p. 1–30, 2019.
- KIM, D. L. et al. Is an oral glucose tolerance test still valid for diagnosing diabetes mellitus? **Diabetes and Metabolism Journal**, 2016.
- KOZEN, B. G. et al. An alternative hemostatic dressing: Comparison of CELOX,

- HemCon, and QuikClot. **Academic Emergency Medicine**, 2008.
- KUMAR JHA, P.; CHALLET, E.; KALSBECK, A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, n. February, p. 74–88, 2015a.
- KUMAR JHA, P.; CHALLET, E.; KALSBECK, A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 74–88, 2015b.
- KUMAR YADAV, S. et al. Nanomelatonin triggers superior anticancer functionality in a human malignant glioblastoma cell line. **Nanotechnology**, v. 28, n. 36, 2017.
- KUNKEMOELLER, B.; KYRIAKIDES, T. R. Redox Signaling in Diabetic Wound Healing Regulates Extracellular Matrix Deposition. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 27, n. 12, p. 823–838, 2017.
- LIMA, M. H. M. et al. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: A double-blind placebo-controlled clinical trial. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–13, 2012.
- LIN, A.; KARIN, M. NF-kappaB in cancer: a marked target. **Seminars in cancer biology**, 2003.
- LIU, L. et al. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation and functional evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 761–769, 2016.
- LOBMANN, R. et al. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, 2002.
- LOPEZ-MOYA, F.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Omics for investigating chitosan as an antifungal and gene modulator. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 1, 2016.
- LORENZINI, G. C. et al. Preparação e caracterização de filmes de quitosana contendo quitossomas revestidos por condroitina. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2009.
- LYNAM, A. L. et al. Logistic regression has similar performance to optimised machine learning algorithms in a clinical setting: application to the discrimination between type 1 and type 2 diabetes in young adults. **Diagnostic and Prognostic Research**, v. 4, n. 1, p. 0–9, 2020.
- MA, X. et al. METABOLISM OF MELATONIN BY HUMAN CYTOCHROMES P450  
METABOLISM OF MELATONIN BY HUMAN CYTOCHROMES P450. v. 33, n. 4, p. 489–494, 2005.

- MAGLIANO, D. J. et al. Trends in incidence of total or type 2 diabetes: Systematic review. **The BMJ**, v. 366, p. 1–12, 2019.
- MAKAROFF, L. E.; CAVAN, D. **Which biochemical assay is best for measuring diabetes prevalence?***The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2015.
- MAO, S.; SUN, W.; KISSEL, T. **Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA***Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010.
- MARIA, S. et al. Biological effects of melatonin on osteoblast/osteoclast cocultures, bone, and quality of life: Implications of a role for MT2 melatonin receptors, MEK1/2, and MEK5 in melatonin-mediated osteoblastogenesis. **Journal of Pineal Research**, 2018.
- MCLAUGHLIN, K. A. et al. Identification of tetraspanin-7 as a target of autoantibodies in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 6, p. 1690–1698, 2016.
- MELMER, A.; LAIMER, M. Treatment goals in diabetes. **Endocrine Development**, v. 31, p. 1–27, 2016.
- MILLNER, R. W. J. et al. A New Hemostatic Agent: Initial Life-Saving Experience With Celox (Chitosan) in Cardiothoracic Surgery. **Annals of Thoracic Surgery**, 2009.
- NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.
- NAIR, H. K. R. Nano-colloidal silver and chitosan bioactive wound dressings in managing diabetic foot ulcers: Case series. **Journal of Wound Care**, v. 27, p. S32–S36, 2018.
- NAVEED, M. et al. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 827–843, 2019.
- NIETHAMMER, P. et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, 2009.
- NIU, B. et al. Melatonin promotes goat spermatogonia stem cells (SSCs) proliferation by stimulating glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production in Sertoli cells. **Oncotarget**, 2016.
- OCHOA, O.; TORRES, F. M.; SHIREMAN, P. K. **Chemokines and diabetic wound healing***Vascular*, 2007.
- ONG, T. H. et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p.

367–368, 2017.

ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. **Biomaterials**, 1999.

OZLER, M. et al. Comparison of the effect of topical and systemic melatonin administration on delayed wound healing in rats that underwent pinealectomy. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 70, n. 6, p. 447–452, 2010.

PAN, R. et al. Size-dependent endocytosis and a dynamic-release model of nanoparticles. **Nanoscale**, v. 10, n. 17, p. 8269–8274, 2018.

PANDEY, A.; CHAWLA, S.; GUCHHAIT, P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. **IUBMB Life**, v. 67, n. 7, p. 506–513, 2015.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2004.

PARK, J. et al. Novel Biomaterials for Regenerative Medicine. v. 1077, 2018.

PARK, K. H. et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 187–194, 2011.

PATEL, S. et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, n. January, p. 108615, 2019.

PEVET, P.; CHALLET, E. **Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network** **Journal of Physiology Paris**, 2011.

PICINATO, M. C. et al. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Pineal Research**, 2008.

POEGGELER, B. et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. **Journal of Pineal Research**, 1993.

POSTNOVA, I. et al. Chitosan hydrogels and bionanocomposites formed through the mineralization and regulated charging. **Chemical Record**, v. 18, n. 7–8, p. 1247–1260, 2018.

POURHANIFEH, M. H. et al. Potential use of melatonin in skin cancer treatment: A review of current biological evidence. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 8, p. 12142–12148, 2019.

- PRABAHARAN, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1313–1322, 2015.
- PRADHAN, L. et al. **Inflammation and neuropeptides: The connection in diabetic wound healing** **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 2009.
- PROFYRIS, C.; TZIOTZIOS, C.; DO VALE, I. **Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. the molecular basis of scar formation** **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2012.
- PUGAZHENTHI, K. et al. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 4, p. 387–396, 2008.
- RAAFAT, D. et al. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008.
- RAHIER, J. et al. **Pancreatic  $\beta$ -cell mass in European subjects with type 2 diabetes**. Diabetes, Obesity and Metabolism. **Anais...**2008
- RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, M. P. et al. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: A radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 1, p. 147–158, 2013.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.
- REITER, R. J. et al. **Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review** **Journal of Biomedical Science**, 2000.
- REITER, R. J. et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: A review of the evidence. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 2001.
- REITER, R. J. et al. Melatonin and Its Relation to the Immune System and Inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2006.
- REITER, R. J. et al. Melatonin and Reproduction Revisited. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445–456, 2009.
- REPORT, A.; CONSULTATION, W. H. O. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. 3, p. 299–309, 2011.
- REPPERT, S. M. et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proceedings of**

**the National Academy of Sciences**, 1995.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses.

**Neuron**, 1994.

RHOADES, J.; RASTALL, B. Chitosan as an antimicrobial agent. n. January, p. 32–33, 2015.

RIAZ RAJOKA, M. S. et al. Chitosan and its derivatives: synthesis, biotechnological applications, and future challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 4, p. 1557–1571, 2019.

RIBEIRO, M. C. et al. Wound healing treatment using insulin within polymeric nanoparticles in the diabetes animal model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, n. March, p. 105330, 2020.

RIBEIRO, M. P. et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. **Wound Repair and Regeneration**, 2009.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 64–70, 2018.

RODRIGUEZ, C. et al. **Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin** **Journal of Pineal Research**, 2004.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. **Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress** **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2006.

ROMIĆ, M. D. et al. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: An innovative antimicrobial wound dressing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 67–79, 2016.

RUDENSKI, A. S. et al. Natural History of Pancreatic Islet B-Cell Function in Type 2 Diabetes Mellitus Studied over Six Years by Homeostasis Model Assessment. **Diabetic Medicine**, 1988.

SAHANA, T. G.; REKHA, P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. **Molecular Biology Reports**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.

SBD, D. Classificação etiológica do diabetes mellitus. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014-2015)**, n. Dm, p. 5–8, 2015.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. **Oxidative stress in normal and impaired wound repair** **Pharmacological Research**, 2008.

SEN, C. K.; ROY, S. **Redox signals in wound healing** **Biochimica et Biophysica**

**Acta - General Subjects**, 2008.

SHARMA, S. et al. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications.

**Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 391–399, 2015.

SHIELDS, B. M. et al. Can clinical features be used to differentiate type 1 from type 2 diabetes? A systematic review of the literature. **BMJ Open**, v. 5, n. 11, 2015.

SIMONNEAUX, V. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. **Pharmacological Reviews**, 2003.

SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: Functions and ligands. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1410–1418, 2014.

SMITH, J. K. et al. Antibiotic-loaded chitosan film for infection prevention: A preliminary in vitro characterization. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, 2010.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. **Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing** **Pharmacological Reports**, 2005.

SONG, R. et al. Melatonin promotes diabetic wound healing in vitro by regulating keratinocyte activity. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 11, p. 4682–4693, 2016.

SONVICO, F. et al. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 67–73, 2006.

SORG, H.; KRUEGER, C.; VOLLMAR, B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. **Journal of Anatomy**, 2007.

STEFULJ, J. et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, 2001.

TAMURA, H. et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v. 5, n. 1, p. 5, 2012.

TAN, D. et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 2002.

TAN, D. X. et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1999.

TAN, D. X. et al. Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and

an antioxidant vitamin. **Journal of Pineal Research**, 2003.

TAROCCO, A. et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 4, 2019.

TAYLOR, R. **Pathogenesis of type 2 diabetes: Tracing the reverse route from cure to cause** *Diabetologia*, 2008.

TAYLOR, R.; AL-MRABEH, A.; SATTAR, N. Understanding the mechanisms of reversal of type 2 diabetes. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 726–736, 2019.

TETSUO, M.; MARKEY, S. P.; KOPIN, I. J. Measurement of 6-hydroxymelatonin in human urine and its diurnal variations. **Life Sciences**, 1980.

THOMAS, N. J. et al. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, 2018.

TORDJMAN, S. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v. 15, p. 434–443, 2017.

TSOURDI E, BARTHEL A, RIETZSCH H, REICHEL A, B. S. Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus. v. 2013, 2013.

TUOMI, T. et al. **The many faces of diabetes: A disease with increasing heterogeneity** *The Lancet*, 2014.

TURSILLI, R. et al. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2006.

TZIOTZIOS, C.; PROFYRIS, C.; STERLING, J. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2012.

VAALAMO, M.; LEIVO, T.; SAARIALHO-KERE, U. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. **Human Pathology**, 1999.

VAN NETTEN, J. J.; BABA, M.; LAZZARINI, P. A. Epidemiology of diabetic foot disease and diabetes-related lower-extremity amputation in Australia: A systematic review protocol. **Systematic Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2017.

VIGGIANO, C. E. Uma Revisão Sobre Diabetes Melito a Review on Diabetes Mellitus. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, n. 11, p. 52–62, 2007.

- VIJAN, S. Type 2 diabetes. **Annals of Internal Medicine**, v. 163, n. 4, p. 322, 2015.
- VIJAYAKUMAR, V. et al. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 137–148, 2019.
- VIRDI, A. S. et al. Modulation of bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene expression in osteoblastic cell lines. **Cellular and molecular biology**, v. 44, n. 8, p. 1237–1246, 1998.
- VON GALL, C.; STEHLE, J. H.; WEAVER, D. R. **Mammalian melatonin receptors: Molecular biology and signal transduction** *Cell and Tissue Research*, 2002.
- WANG, F. et al. Effects of CD100 promote wound healing in diabetic mice. **Journal of Molecular Histology**, v. 49, n. 3, p. 277–287, 2018.
- WHO/IDF. **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF consultation** *World Health Organization*. [s.l: s.n.].
- WYSOCKI, J. et al. The influence of thymus extracts on the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils (PMN) from patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDD). **Thymus**, 1992.
- XU, K. et al. Melatonin Promotes the Proliferation of Chicken Sertoli Cells by Activating the ERK/Inhibin Alpha Subunit Signaling Pathway. **Molecules**, v. 25, p. 1230, 2020.
- YANG, L. et al. miR-155 promotes cutaneous wound healing through enhanced keratinocytes migration by MMP-2. **Journal of Molecular Histology**, 2017.
- YILDIRIMTURK, S. et al. The effects of supplemental melatonin administration on the healing of bone defects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 3, p. 239–249, 2016.
- ZAGAJEWSKI, J. et al. Conversion L-tryptophan to melatonin in the gastrointestinal tract: The new high performance liquid chromatography method enabling simultaneous determination of six metabolites of L-tryptophan by native fluorescence and UV-VIS detection. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2012.
- ZHANG, Z. et al. **Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases** *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2013.
- ZHAO, R. et al. Effects of phosphorylatable short peptide-conjugated chitosan-mediated IL-1RA and IGF-1 gene transfer on articular cartilage defects in rabbits.

**PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014.

ZIMMET, P. et al. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: Facts and fallacies. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 10, p. 616–622, 2016.