

INSTITUTO DE ENGENHARIA NUCLEAR

VANESSA GONZALEZ FERREIRA CAMINHA MARTINS

**USO DE PONTOS QUÂNTICOS DE GRAFENO COMO INSUMO
FARMACEUTICO ATIVO NO DESENVOLVIMENTO DE PÓ SECANTE
CICATRICIAL**

Rio de Janeiro
2023

VANESSA GONZALEZ FERREIRA CAMINHA MARTINS

.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Nucleares do Instituto de Engenharia Nuclear, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia Nucleares

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira
Orientador: Dr^a. Aline Oliveira da Silva de Barros

Rio de Janeiro
2023

MART Martins, Vanessa Gonzalez Ferreira Caminha

USO DE PONTOS QUÂNTICOS DE GRAFENO COMO
INSUMO FARMACEUTICO ATIVO NO
DESENVOLVIMENTO DE PÓ SECANTE CICATRICIAL. /
Vanessa Gonzalez Ferreira Caminha Martins. – Rio de Janeiro:
IEN/CNEN, 2023.

x, 66f. : il. ; 31 cm

Orientador: Prof. Dr.Ralph Santos-Oliveira

Orientador: Aline Oliveira da Silva de Barros

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Engenharia Nuclear,
PPGIEN, 2023

1.Grafeno – 2. Cicatrização de feridas. – 3. Feridas crônicas

**USO DE PONTOS QUÂNTICOS DE GRAFENO COMO INSUMO FARMACEUTICO
ATIVO NO DESENVOLVIMENTO DE PÓ SECANTE CICATRICIAL**

VANESSA GONZALEZ FERREIRA CAMINHA MARTINS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEARES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEARES

Aprovada por:

BANCA EXAMINADORA



Prof. Ralph Santos-Oliveira, D.Sc.



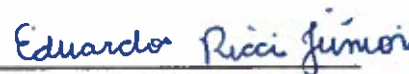
Documento assinado digitalmente

LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR

Data: 28/03/2023 12:21:09-0300

Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof^a. Luciana Magalhães rebelo Alencar, D.Sc.



Prof. Eduardo Ricci Junior, D.Sc.



Prof^a. Aline Oliveira da Silva de Barros, D.Sc.

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Começo não agradecendo mas sim dizendo que sou uma mistura do atual, divino e demoníaco...Escolhi correr sobre a linha que divide a estrada na qual percorre uma cadeia de montanhas, cercada de abismos por todos os lados onde todos os dias tenho medo e tomo cuidado para não pisar nem no lado esquerdo nem no lado direito da estrada, pois o abismo é um defeito de nascença e por isso minhas escolhas são feitas de modo independente, de um jeito racional e inteligente na maioria do tempo, pois como já disse Friedrich Nietzsche, quase tudo na vida é uma questão de vontade, vontade de poder...qualidades, não tenho nenhuma, pelo menos nenhuma humana, defeitos?...também, pelo menos nenhum desumano, mas vontades....essas sim...várias...e eu escolhi uma delas, eu escolhi viver...viver o caminho mais difícil ao invés de seguir uma pista plana e reta, sem obstáculos....resolvi criar histórias ao longo da vida a partir das experiências e o fatos desde o início do trajeto até o pico da montanha mais alta na qual não sei se irei alcançar, sejam boas ou ruins, de alegrias ou tristezas eu resolvi viver tudo que a vida tem de bom e ruim a me oferecer, resolvi criar o meu limite para não me machucar tanto, eu resolvi respirar sem me arrepender ...decidi assumir cada consequência das minhas escolhas, resolvi dar valor a cada momento que respiro...resolvi que o dia que eu morrer ao menos poderão dizer o quanto eu vivi, resolvi seguir o caminho mais difícil e não me arrependo disso...

Agradeço ao meu marido *Tiago* e a família que criamos e nossas filhas *Aimeè e Lavinia* por confiarem em mim e aceitarem percorrer esse caminho perigoso que é a vida me concedendo amor, carinho e respeito mesmo diante de vários obstáculos no qual vocês nunca desistiram de mim e sempre me apoiaram de forma incondicional e acreditando quando eu mesmo não acreditava. É por vocês que eu assumo todas as consequências, vivo cada momento e tento ser melhor a cada dia. Vocês são as minhas melhores escolhas, me realizam como pessoa e permitem que me realize como profissional, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao meu orientador, *Ralph Santos Oliveira*, um exemplo de pessoa e profissional, por me tirar da minha zona de conforto e me fornecer possibilidades que eu jamais imaginava, mas principalmente por sua humanidade, empatia, profissionalismo, ensinamentos e paciência comigo (*rs*) Quando decidi pela graduação em farmácia, meu objetivo, mesmo sabendo de todas as dificuldades que enfrentaria, era seguir na pesquisa acadêmica de uma forma que eu pudesse de fato desenvolver algo com impacto positivo

na vida as pessoas e graças a você eu sigo em direção para concretização desse sonho que agora é uma realidade mesmo que ainda tenha muito a ser feito.

Aproveito para agradecer a coorientadora Aline pelos ensinamentos, suporte e disponibilidade em me atender e auxiliar, mas principalmente por me mostrar que sou capaz quando eu pensava em desistir. Agradeço também minha eterna professora da graduação Dra. Joseli Nogueira (Fiocruz) que sempre foi um exemplo pra mim como pesquisadora, profissional e comediante (rs) que sempre esteve disposta a me ouvir e me ajudar quando necessário e uma grande incentivadora e aos meus amigos, Dr. Luiz Rodrigues (Museu Nacional), Dr. Davyson Moreira (Jardim Botânico) e Msc. Paulo (Fiocruz) por estarem presentes em minha jornada acadêmica, com incentivos e conversas. Vocês também foram essenciais.

À CNEN pelo aporte financeiro para que eu desenvolvesse minhas atividades sem maiores preocupações e ao coordenador Daniel de Palma e a secretária Carla Leia por todo aporte quando eu precisei.

Muito obrigada!

RESUMO

Definidas como uma descontinuidade da pele que pode atingir músculo, órgãos e tecidos, as feridas são um problema de saúde mundial. Suas causas são diversas e entre suas características destacam-se: custo elevado de tratamento; mecanismo de cicatrização complexo e risco potencial para agravamentos a depender do agente etiológico, condições do paciente e se há presença de infecções

As feridas, principalmente as crônicas, geram um desgaste emocional, social e financeiro para os enfermos e seus familiares pois trata-se de lesões que envolvem afastamento do paciente de suas atividades cotidianas e laborais. Nesse caso, boa parte desses pacientes estão sob cuidados médicos 24h em ambiente hospitalar e a depender da gravidade da ferida que apresentem há possibilidade de evoluírem de forma negativa com a necessidade de procedimentos cirúrgicos, amputações e em casos extremamente graves evoluem a óbito.

Dentre as feridas crônicas, a úlcera diabética, uma complicação do diabetes melitus, é a lesão de maior incidência no mundo, trata-se de uma ferida difícil de tratar e com custos elevados. Atualmente estima-se que 537 milhões de adultos vivem com diabetes e que em 2045, 783 milhões de adultos terão a patologia o que torna possível imaginar um aumento do número de indivíduos com complicações desse tipo. Um dos principais motivos de preocupação e problemas relacionados as feridas é a pouca disponibilidade de produtos eficazes, alto custo de tratamentos e facilidade de complicações como infecções, o que torna necessário o desenvolvimento de um produto eficaz para cicatrização de ferida em curto período de tempo, com boa resposta antimicrobiana, simples produção e baixo custo. Diante do exposto, foi desenvolvido, caracterizado e testado *in vitro* e *in vivo* uma formulação de pó secante tendo como principal ativo o grafeno, substância descoberta em 2004, com alta biocompatibilidade, ação antimicrobiana e outras características de interesse biomédico, associado a um antibiótico e um antifúngico na fórmula. Os resultados demonstraram que o pó secante de grafeno apresentou eficácia no processo de cicatrização em um período de 5 dias nos testes *in vivo* e *in vitro* bem como nos testes antimicrobianos para *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, microrganismos presentes em feridas crônicas, corroborando deste modo com a utilização do pó secante de grafeno para tratamento de feridas e expansão de sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Grafeno; Cicatrização; Pele; Feridas

ABSTRACT

Defined as a discontinuity of the skin that can affect muscles, organs and tissues, wounds are a worldwide health problem. Its causes are diverse and among its characteristics the following stand out: high cost of treatment; complex healing mechanism and potential risk for aggravations depending on the etiological agent, patient conditions and whether infections are present.

Wounds, especially chronic ones, generate emotional, social and financial distress for patients and their families, as these are injuries that involve removal of patients from their daily activities and work. In this case, most of these patients are under 24-hour medical care in a hospital environment and, depending on the severity of the wound they present, there is the possibility of a negative evolution with the need for surgical procedures, amputations and, in extremely severe cases, they evolve to death.

Among the chronic wounds, the diabetic ulcer, a complication of diabetes mellitus, is the injury with the highest incidence in the world, it is a difficult wound to treat and with high costs. It is currently estimated that 537 million adults live with diabetes and that in 2045, 783 million adults will have the pathology, which makes it possible to imagine an increase in the number of individuals with complications of this type. One of the main reasons for concern and problems related to wounds is the limited availability of effective products, the high cost of treatments and the ease of complications such as infections, which makes it necessary to develop an effective product for wound healing in a short period of time, with good antimicrobial response, simple production and low cost. In view of the above, a drying powder formulation was developed, characterized and tested in vitro and in vivo, with graphene as its main active ingredient, a substance discovered in 2004, with high biocompatibility, antimicrobial action and other characteristics of biomedical interest, associated with an antibiotic and an antifungal in the formula. The results demonstrated that the graphene drying powder was effective in the healing process in a period of 5 days in the in vivo and in vitro tests as well as in the antimicrobial tests for *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *C. albicans* and *C. tropicalis*, microorganisms present in chronic wounds, thus corroborating the use of graphene drying powder for wound treatment and expansion of its application.

KEYWORDS: Graphene; healing; skin; Wounds

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA PELE.	3
FIGURA 2: MICROBIOTA DA PELE, SUAS FUNÇÕES E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO.	5
FIGURA 3: MICROBIOTA DA PELE E OS PATÓGENOS ASSOCIADOS A DISTÚRBIOS E DOENÇAS DA PELE.	6
FIGURA 4: IMAGEM ESQUEMÁTICA PARA CLASSIFICAÇÃO DE FERIDAS QUANTO A CAUSA SUBJACENTE, GRAU DE INFECÇÃO E BASE NA FISIOLOGIA DE CICATRIZAÇÃO. FONTE: VANESSA (2023).	9
FIGURA 5: ASPECTOS EXTERNOS E INTERNOS DE ÚLCERAS VENOSAS PRESENTES NA PELE SOBRE OS TORNOZELOS.	10
FIGURA 6: ESTÁGIOS DAS ÚLCERAS POR PRESSÃO.	11
FIGURA 7: FERIDA CIRÚRGICA POR INCISÃO.	12
FIGURA 8: DIFERENÇAS ENTRE A CICATRIZAÇÃO DE UMA FERIDA AGUDA E DE UMA FERIDA CRÔNICA: FORMAÇÃO DE BIOFILME NA FERIDA CRÔNICA.	15
FIGURA 9: AS FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E OS ELEMENTOS ENVOLVIDOS.	17
FIGURA 10: DESENHO ESQUEMÁTICO DE REDES MICROVASCULARES RECÉM-FORMADAS DE UMA FERIDA CUTÂNEA EM REGENERAÇÃO.	20
FIGURA 11: TERAPIA DE PRESSÃO NEGATIVA EM UMA FERIDA AGUDA.	21
FIGURA 12: OXIDO DE GRAFENO.	233

LISTA DE QUADROS

TABELA 1: RELAÇÃO DAS DOS DEZ PRINCIPAIS MICRORGANISMOS RESIDENTES DA PELE A CARACTERÍSTICA DA REGIÃO.	8
TABELA 2: RELAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS E FERIDAS.	13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

0D	Zero dimensional
AFM	Microscopia de Força Atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
CEUA	Comitê de Ética de Estudos em Animais
DLS	Dispersão dinâmica da luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração por raio X
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FC	Feridas cirúrgicas
FGI	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
GO	Oxido de Grafeno
GQDs	Grafeno Quantum Dots / Pontos quânticos de grafeno
HGF	Fator de crescimento de Hepatócitos
IDF	<i>International Federation diabetes</i>
IFN	Interferon
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Interleucina
IN	Instrução Normativa
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
PDI	Índice de Polidispersividade
PDGF	Fator de crescimento de plaquetas
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RGO	Óxido de Grafeno Reduzido
RNA	Ácido ribonucleico
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de crescimento tumoral

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UD	Úlcera diabética
UEZO	Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
UP	Úlcera de pressão
UV	Úlcera venosa
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1.1.1	PELE	3
1.1.2	ANATOMIA DA PELE	3
1.1.3	MICROFLORA DA PELE HUMANA SAUDÁVEL	4
1.2	FERIDAS.....	8
1.2.1	INFECÇÃO EM FERIDAS.....	12
1.2.2	INFECÇÃO POR BIOFILMES	14
1.2.3	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	16
1.2.3.1	Hemostasia.....	17
1.2.3.2	Inflamação	18
1.2.3.3	Proliferação.....	19
1.2.3.4	Remodelação.....	20
1.3	TRATAMENTO DE FERIDAS.....	21
1.4	GRAFENO	222
1.4.1	PONTOS QUANTICOS DE GRAFENO.....	233
1.5	ANFOTERICINA B	244
1.6	SULFATO DE NEOMICINA	244
1.7	ÓXIDO DE ZINCO	255
2	OJETIVOS	266
3	PROCEDIMETO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	277
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	566
5	BIBLIOGRAFIA.....	577

1. INTRODUÇÃO

As feridas podem ser definidas como qualquer lesão ao corpo, iniciadas por diversos fatores intrínsecos ou extrínsecos, onde há ruptura de estruturas anatômicas, normalmente, com danos à epiderme, órgãos e tecidos próximos. As causas envolvidas no desenvolvimento de feridas incluem: cirurgias, injúrias, lesões por pressão, queimaduras, cortes e condições patológicas prévias como diabetes e doenças vasculares (CLARK e colab., 2022; LAZARUS e colab., 1994; TOTTOLI e colab., 2020; YAZARLU e colab., 2021). Em termos práticos, ferida pode ser definida como a desintegração na função de defesa da pele com perda de coesão do epitélio, com ou sem perda de tecido conjuntivo elementar (REZVANI GHOMI e colab., 2019).

As feridas agudas caracterizam-se por uma cicatrização organizada em sua fase inflamatória, sem complicações e em tempo médio de 3 semanas, sem intercorrências resultando na restauração anatômico funcional do tecido lesionado. Já as feridas crônicas relacionam-se a um prolongamento da atividade inflamatória, com resposta ao tratamento diferente da prevista (CLARK e colab., 2022; MEHL e colab., 2020; REZVANI GHOMI e colab., 2019).

As feridas crônicas podem ser consideradas como epidêmicas em muitos países (GRAVES e colab., 2021). Estima-se que entre 1 e 2% da população em países desenvolvidos, apresentará durante sua vida, uma ferida crônica (JÄRBRINK e colab., 2016), ocasionando custos econômicos e importante fonte de morbidade e comorbidade gerando impacto aos pacientes e a sociedade (AZEVEDO e colab., 2020).

As feridas são responsáveis por gastos anuais aproximados de US\$ 32 bilhões de dólares, ocasionados pelo aumento no quantitativo de indivíduos com diabetes e obesidade e ao envelhecimento da população (GHOMI e colab., 2021; SHOHAM e colab., 2021). Estima-se que a demanda por produtos para tratamento de lesões aumentou para US\$ 9,3 trilhões em todo o mundo no setor de saúde, afetando o crescimento econômico em 2019 (KHANNA e colab., 2020), sendo os Estados Unidos e Europa os maiores mercados.

Recentemente, a nanotecnologia tem sido aplicada de formas diversas na engenharia de tecidos (SOLIMAN e colab., 2021). Entre os vários nanocompositos destacam-se o grafeno e seus derivados, que vêm sendo estudados como um material de suporte para regeneração de tecidos (HUSSEIN e colab., 2019).

Dentre os derivados do grafeno, os pontos quânticos de grafeno (GQDS) destacam-se devido as suas características: i) grande área de superfície; ii) alta

condutividade térmica; iii) alta eficiência de carregamento de drogas (ZHAO, Changhong e colab., 2020), iv) biocompatibilidade (IANNAZZO e colab., 2021; KORTELE e colab., 2020), e v) biodegradabilidade (CAMPBELL e colab., 2019).

Além disso os GQDS possuem alta resistência mecânica (CHUNG e colab., 2021a; SAMPLES, 2021; TRONCOSO e TORRES, 2020; ZHAO, Changhong e colab., 2020), atividade antimicrobiana (MOHAMMED e colab., 2020; PANDIT e colab., 2021) atividade regenerativa (BELLET e colab., 2021; KENRY e colab., 2018) e baixa toxicidade (FASBENDER e colab., 2019; MONDAL e colab., 2019; ZHAO, Changhong e colab., 2020).

Diante do exposto, a aplicação dos pontos quânticos de grafeno como ativo para tratamento de feridas se torna uma possibilidade, podendo contribuir de forma significativa para a implantação de um tratamento eficaz para cicatrização de feridas.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano (MSSILLOU e colab., 2022; WANG, Na e colab., 2020) e o mais complexo (MOHAMED e HARGEST, 2022); ela é o maior sistema orgânico dos vertebrados (QI e colab., 2022), é um órgão plano que cobre todo o corpo, um dos maiores em superfície (cerca de 2 m²) e corresponde a 15% do total do peso corporal adulto. Sua estrutura é altamente adaptada para proteger o corpo de muitas formas de agentes nocivos, assim como manter homeostase e fornecer sensibilidade (HAFTEK e colab., 2022; MESTRALLET e colab., 2021; MOHAMED e HARGEST, 2022; PISSARENKO e colab., 2020).

Com múltiplas funções essenciais, a pele é a principal barreira para proteger o corpo do meio ambiente. Ela compõe uma barreira de proteção contra microrganismos, limita a penetração de elementos inertes, evita a perda de água, limita danos ao DNA induzidos pela radiação ultravioleta e radiações solares. A pele possui ainda funções sensoriais; termorreguladoras além de realizar síntese de vitamina D (MOHAMED e HARGEST, 2022; PISSARENKO e colab., 2020).

1.1.2 ANATOMIA DA PELE

A anatomia da pele se constitui em três compartimentos distintos onde cada camada tem um papel funcional (MOHAMED e HARGEST, 2022; PISSARENKO e colab., 2020), embora alguns autores considerem apenas dois compartimentos (BONIFANT e HOLLOWAY, 2019; LOSQUADRO, 2017). As três camadas que compõem anatomicamente a pele são: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

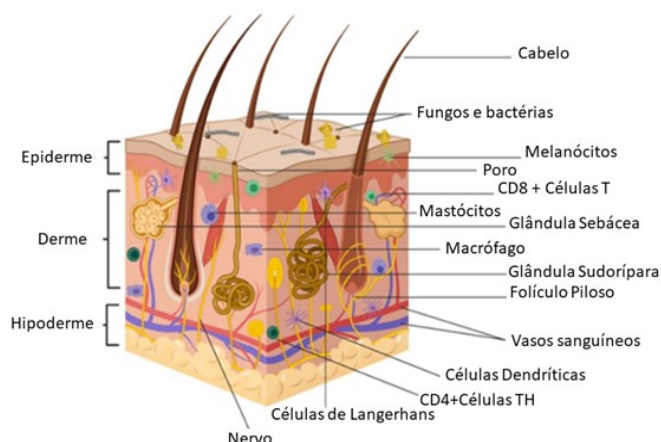


Figura 1: Representação Estrutural da pele.

Estrutura da pele com células imunológicas, microrganismos (bactérias e fungos) e apêndices correspondentes que habitam cada camada. Adaptado de “Anatomy of the Skin”, de BioRender.com (2022). Retirado e adaptado de [https:// app.biorender. com/ biorender-templates](https://app.biorender.com/biorender-templates)

1.1.2.1. Epiderme

A epiderme está em constante interação com o meio ambiente, ela é uma camada estratificada composta por células epiteliais que a torna uma barreira físico-biológica contra patógenos e efeitos nocivos provenientes do ambiente (DAI e colab., 2020; MOHAMED e HARGEST, 2022). Estruturalmente é composta de uma matriz extracelular (MEC) no qual inclui colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e de componentes celulares como queratinócitos (90%), melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel entre outras distribuídas em cinco camadas de acordo com o seu estágio de diferenciação (estrato basal, espinhal, granuloso, lúcido e córneo) (BONIFANT e HOLLOWAY, 2019; MOHAMED e HARGEST, 2022)

1.1.2.2. Derme

A derme é uma camada fibrosa que representa cerca de 80% da massa da pele (SOLIMAN e colab., 2021) é dividida em duas regiões estruturalmente diferentes: derme papilar e derme reticular (QI e colab., 2022; RIPPA e colab., 2019). Sua composição consiste em uma matriz extracelular composta de três tipos de fibras: colágeno, elastina, e fibras reticulares (MOHAMED e HARGEST, 2022). Contém também ácido hialurônico, proteoglicanos (QI e colab., 2022; SOLIMAN e colab., 2021), fibroblastos, células imunes, além de vasos sanguíneos, nervos, glândulas sudoríparas (LOSQUADRO, 2017), vasos linfáticos (EGERT e colab., 2017) e folículo piloso (BOLLAG e colab., 2020).

1.1.2.3. Hipoderme

Está localizada abaixo da derme e atua como principal suporte estrutural da pele, sendo formada por tecido conjuntivo relativamente frouxo e tecido adiposo. Atua como um reservatório de energia desenvolvendo funções de termorregulação e absorção de choque (MOHAMED e HARGEST, 2022; QI e colab., 2022).

1.1.3 MICROFLORA DA PELE HUMANA SAUDÁVEL

A pele abriga milhões de microrganismos como fungos, bactérias, vírus e ácaros (MIKOLAJCZYK e ROESNER, 2019), sendo o segundo maior reservatório desses micro-organismos residentes de forma permanente ou transitória (BONAR e colab., 2021; PRESCOTT e colab., 2017a; VERSEY e colab., 2021).

A microbiota da pele desempenha um papel essencial na educação do sistema imunológico, na degradação de produtos naturais (PRESCOTT e colab., 2017a), na maturação e regulação homeostática dos queratinócitos e das redes imunes (Figura 2) e na

proteção contra patógenos invasores (Figura 2), (ERIN CHEN e colab., 2018a; PRESCOTT e colab., 2017b; VERSEY e colab., 2021).

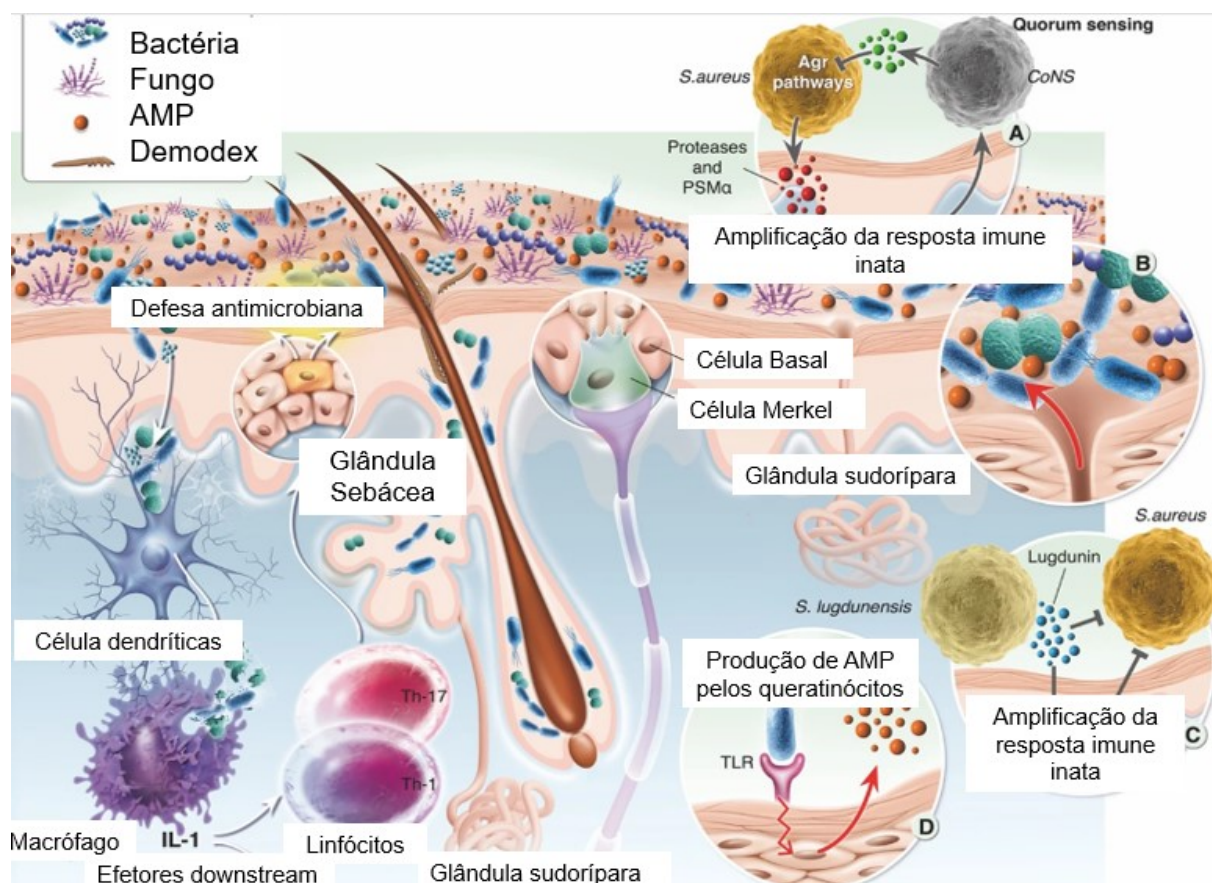


Figura 2: Microbiota da pele, suas funções e sua relação com o sistema imunológico.

A microbiota da pele é composta por bactérias, fungos, archaea, vírus e ácaros (Demodex) que se relacionam com o sistema imunológico por meio do diálogo com células dendríticas residentes resultantes da ativação do complemento. (a) O sistema imunológico é aprimorado pelo processo de detecção de quorum entre as populações bacterianas, que pode limitar o supercrescimento de patógenos potenciais, ou pela produção de certos antibióticos, como a lugdunina (c). A homeostase microbiótica é dependente da produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) tanto pelas próprias bactérias quanto pelas células hospedeiras, como queratinócitos e glândulas sebáceas (b e d). Adaptado de (BOXBERGER e colab., 2021).

Basicamente, as bactérias que residem na pele auxiliam na manutenção da homeostase tecidual através de interações comensais ou mutualísticas (Figura 3). Esses microorganismos se enquadram principalmente em quatro filos¹: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. (PRESCOTT e colab., 2017a) na proporção respectivamente de 24%, 7%, 17% e 52%. Os gêneros predominantes incluem

¹ Filos: *Firmicutes* é composto basicamente por bactérias gram positivas incluem várias espécies de *Lactobacillus*, e de *Clostridium*. *Bacteroidetes* consistem principalmente de bactérias gram negativas. Esse grupo de bactérias possui características fermentativas e com capacidade de modular o sistema imune de forma benéfica. No filo *Proteobacteria* todas as bactérias são gram-negativas e apresentam morfologia de cocos, bacilo, espirilo e bactérias apendiculadas. Por final, o filo *actinobactérias* é caracterizado por bactérias gram positivas semelhantes a fungos filamentosos.

Corynebacterium, *Propionibacterium* e *Staphylococcus* (MCLOUGHLIN e colab., 2022). Um dos patógenos mais importantes da pele é o *S. aureus* e, mais de 30% dos indivíduos saudáveis são colonizados assintomaticamente por ele (ERIN CHEN e colab., 2018b). Porém, é uma das espécies bacterianas mais prevalentes identificadas em feridas agudas e crônicas de etiologias diversas junto ao *Pseudomonas aeruginosa* (ERIN CHEN e colab., 2018b; TOMIC-CANIC e colab., 2020).

Microbiota da pele patógenos associados a distúrbios ou doenças.

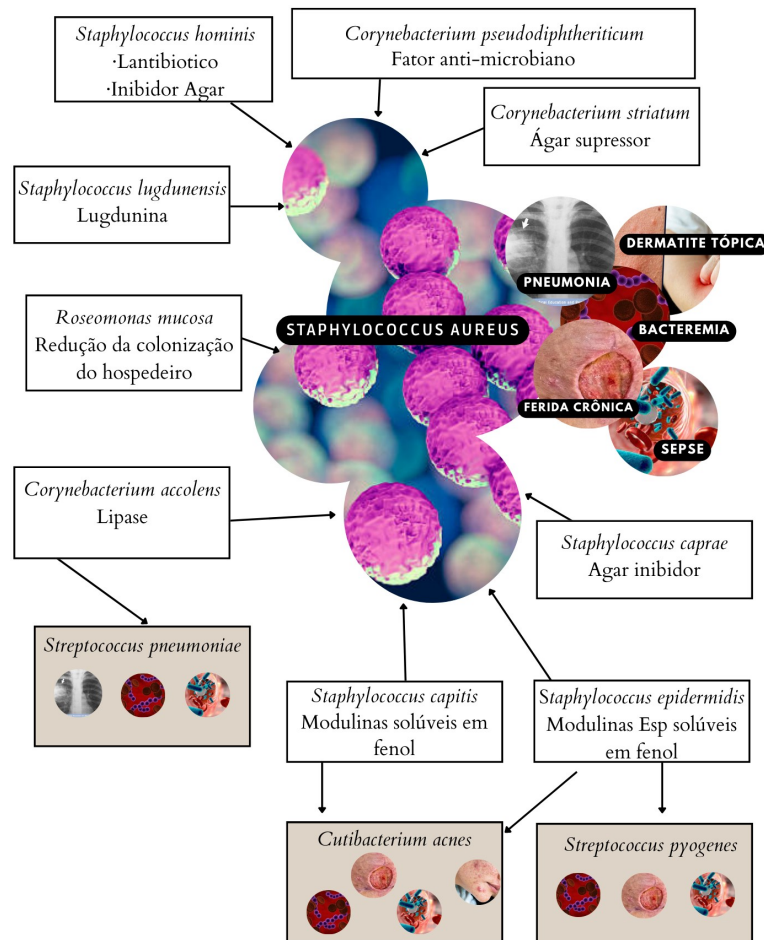


Figura 3: Microbiota da pele e os patógenos associados a distúrbios e doenças da pele.

As interações microbianas entre o microbioma da pele (retângulos brancos) e patógenos (retângulos coloridos) demonstram benefício que o microbioma da pele pode oferecer ao hospedeiro. As setas na figura apontam da origem para o alvo. CoNs, *Corynebacterium spp* e *Roseomonas mucosa* visam *Staphylococcus aureus*. Elas podem matar diretamente através da secreção de fatores antimicrobianos ou limitar a virulência do *Staphylococcus aureus* através da secreção de um inibidor ou supressor de um importante regulador de virulência do *S. aureus*. Outras espécies microbianas da pele podem atingir e limitar *Cutibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. Criado em: <https://app.biorender.com/illustrations/639d212c1c47e5bebff1c083> Adaptado de FLOWERS e GRICE, 2020.

Byrd et. al., 2018 elencam as dez principais espécies bacterianas, eucarióticas e virais abundantes na pele humana agrupadas de acordo com aspectos fisiológicos de locais (Tabela 1).

Áreas secas ¹	Áreas úmidas ²	Áreas sebáceas ³	Pés ⁴
Bactérias			
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Corynebacterium simulans</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Corynebacterium fastidiosum</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium afermentans</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	<i>Corynebacterium afermentans</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	<i>Corynebacterium simulans</i>
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Corynebacterium simulans</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Corynebacterium resistens</i>
Eucariontes			
<i>Malassezia restricta</i>	<i>Malassezia globosa</i>	<i>Malassezia restricta</i>	<i>Malassezia restricta</i>
<i>Malassezia globosa</i>	<i>Malassezia restricta</i>	<i>Malassezia globosa</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Tilletia walkeri</i>	<i>Malassezia sympodialis</i>	<i>Malassezia globosa</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Malassezia sympodialis</i>	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	<i>Pyramimonas parkeae</i>
<i>Zymoseptoria tritici</i>	<i>Pyramimonas parkeae</i>	<i>Tilletia walkeri</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Malassezia sympodialis</i>	<i>Parachlorella kessleri</i>	<i>Pycnococcus provasolii</i>	<i>Parachlorella kessleri</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>

Áreas secas ¹	Áreas úmidas ²	Áreas sebáceas ³	Pés ⁴
<i>Pyramimonas parkeae</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>	<i>Pyramimonas parkeae</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>
<i>Nannizzia nana</i>	<i>Nephroselmis olivacea</i>	<i>Parachlorella kessleri</i>	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>
<i>Parachlorella kessleri</i>	<i>Cyanophora paradoxa</i>	<i>Leucocytozoon majoris</i>	<i>Nephroselmis olivacea</i>
Vírus			
Molluscum contagiosum virus	Molluscum contagiosum virus	<i>Propionibacterium phage</i>	<i>Propionibacterium phage</i>
<i>Propionibacterium phage</i>	<i>Propionibacterium phage</i>	Molluscum contagiosum virus	Merkel cell polyomavirus
Merkel cell polyomavirus	Polyomavirus HPyV6	Merkel cell polyomavirus	Alphapapillomavirus
Polyomavirus HPyV7	Merkel cell polyomavirus	Polyomavirus HPyV6	Human papillomavirus (μ)
<i>Acheta domestica densovirus</i>	Polyomavirus HPyV7	Human papillomavirus (γ)	Human papillomavirus (β)
Human papillomavirus (β)	Human papillomavirus (β)	Human papillomavirus (β)	<i>Pseudomonas phage</i>
<i>Actinomyces phage</i>	<i>Acheta domestica densovirus</i>	<i>Acheta domestica densovirus</i>	<i>Staphylococcus phage</i>
Simian virus	Human papillomavirus (γ)	<i>Staphylococcus phage</i>	RD114 retrovírus
<i>Streptococcus phage</i>	<i>Staphylococcus phage</i>	Gammapapillomavirus HPV127	Molluscum contagiosum virus
<i>Stenotrophomonas phage</i>	<i>Actinomyces phage</i>	Enterobacteria phage	<i>Stenotrophomonas phage</i>

Tabela 1: Relação das dos dez principais microrganismos residentes da pele a característica da região.

Legenda: Dez microrganismos mais encontrados na pele humana. Descrição dos dez microrganismos (Bactérias, eucariontes e vírus) mais encontrados na pele humana e sua relação com a característica local do habitat. 1 – Palmas das mãos e antebraço. 2 – Fossa antecubital (dobra do braço), narina, prega inguinal, entre os dedos e face posterior dos joelhos. 3 – Asa nasal, bochechas, sobrancelhas, manúbrio (região no tórax), prega inguinal (atrás das orelhas), nuca e dorso. 4 – Entre os dedos, unha e sola dos pés. Fonte: (BYRD e colab., 2018).

1.2 FERIDAS

As feridas estão se tornando uma epidemia silenciosa, afetando até 2% da população em países de renda média e alta, com um custo estimado de 20 bilhões de dólares (DARVISHI e colab., 2022). As feridas podem ser definidas como qualquer lesão no corpo, normalmente com danos à epiderme da pele, que perturbe sua anatomia e funções normais.

A lesões podem ser classificadas de acordo com: causa subjacente da formação da ferida em feridas abertas ou fechadas; com base no grau de colonização ou infecção em:

limpas, limpas contaminadas, contaminadas e Infectadas (FLETCHER, 2008.; NIEDERSTÄTTER e colab., 2021) e com base na fisiologia da cicatrização de feridas em: agudas ou crônicas conforme pode ser observado na Figura x (MSSILLOU e colab., 2022; YAZARLU e colab., 2021).

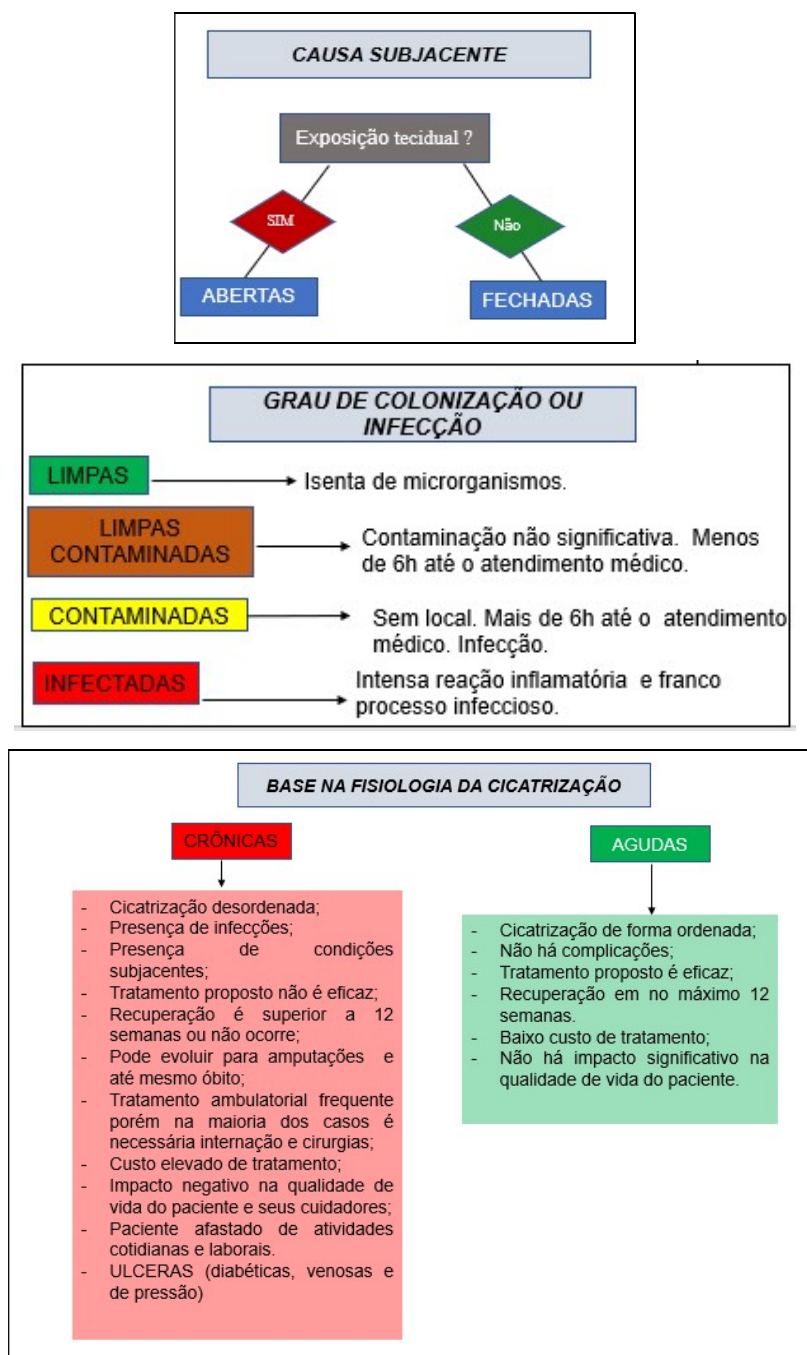


Figura 4: Imagem esquemática para classificação de feridas quanto a causa subjacente, grau de infecção e base na fisiologia de cicatrização.

Fonte: VANESSA (2023).

Sobre as feridas crônicas, vale ressaltar que como uma categorias de feridas, elas são divididas em 4 tipos principais sendo elas: (A) úlceras diabéticas (UD), (B) úlceras

venosas (UV), (C) úlceras de pressão (UP) e (D) feridas pós-cirúrgicas (ANISUZZAMAN e colab., 2022; REZAIE e colab., 2019).

A) Úlcera diabética – É uma ferida crônica que ocorre no dorso, dedos ou bordas do pé e podem ser neuropáticas, vasculares e mistas (CUBAS e colab., 2013; THANGAVEL e colab., 2018b). As principais complicações na ulcera diabética envolvem infecções, amputações e em alguns casos morte precoce (GAZZARUSO e colab., 2021). De acordo com o Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention – CDC), de 40 a 60 milhões de diabéticos no mundo sofrem de úlcera diabética. Nos países desenvolvidos em sua maioria, há uma incidência anual em torno de 2% de sua população com ulceração de pé em diabéticos diagnosticados (ASCHNER, 2017).

B) Úlcera venosa - As úlceras venosas afetam 1% da população adulta e estão associadas a uma redução acentuada na qualidade de vida (BERGANT SUHODOLČAN e colab., 2021). Este tipo de lesão está relacionado a hipertensão venosa dos membros inferiores (Figura 5) (XIE e colab., 2018.; DE OLIVEIRA, Beatriz G.R.B. e colab., 2019) associada a trombose venosa profunda levando à incompetência venosa, lipodermatoesclerose, tamponamento leucocitário dos capilares, hipóxia tecidual e disfunção microvascular (XIE e colab., 2018). Localizam-se na maioria dos casos (70%–90%) nos membros inferiores (CARBINATTO e colab., 2018).

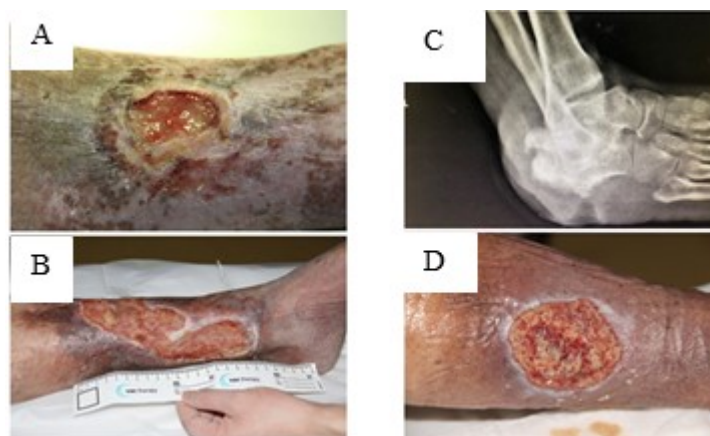


Figura 5: Aspectos externos e internos de úlceras venosas presentes na pele sobre os tornozelos.

A - Aspecto típico de paciente com lipodermatoesclerose. A pele é escamosa e há uma descoloração acastanhada. A pele pode ter uma sensação de cera. B - Uma úlcera venosa na face medial da perna. C- Filme de raio-X simples de paciente com úlcera venosa na perna de longa data. Na imagem é possível observar uma grande perda óssea devido à infecções (osteomielite). D- Uma UV de longa data próxima a região inferior da panturrilha. Fonte: XIE, Ting e colab.; 2018.

C) Úlceras por pressão - As úlceras por pressão são definidas como um dano localizado na pele e/ou tecido subjacente como tecidos moles da pele, incluindo tecidos epiteliais, dérmicos e subcutâneos, como gordura ou músculo. Essas úlceras resultam de pressão ou pressão em combinação com cisalhamento causados por deformação mecânica prolongada de tecidos moles entre estruturas anatômicas rígidas internas (ossos, cartilagens, tendões) e superfícies de suporte rígidas externas (KOTTNER e colab., 2020). Entre os fatores de risco para úlceras de pressão encontram-se imobilidade, umidade, percepção sensorial diminuída, diabetes, e má nutrição, (HEADLAM e ILLSLEY, 2020; JAUL e colab., 2018). Em resumo, as úlceras por pressão se desenvolvem como pode ser observado na figura 6. a partir isquemia localizada, lesão de reperfusão, drenagem linfática prejudicada e deformação celular sustentada comumente acompanhadas de complicações graves, incluindo dor, depressão e infecções (JAUL e colab., 2018).

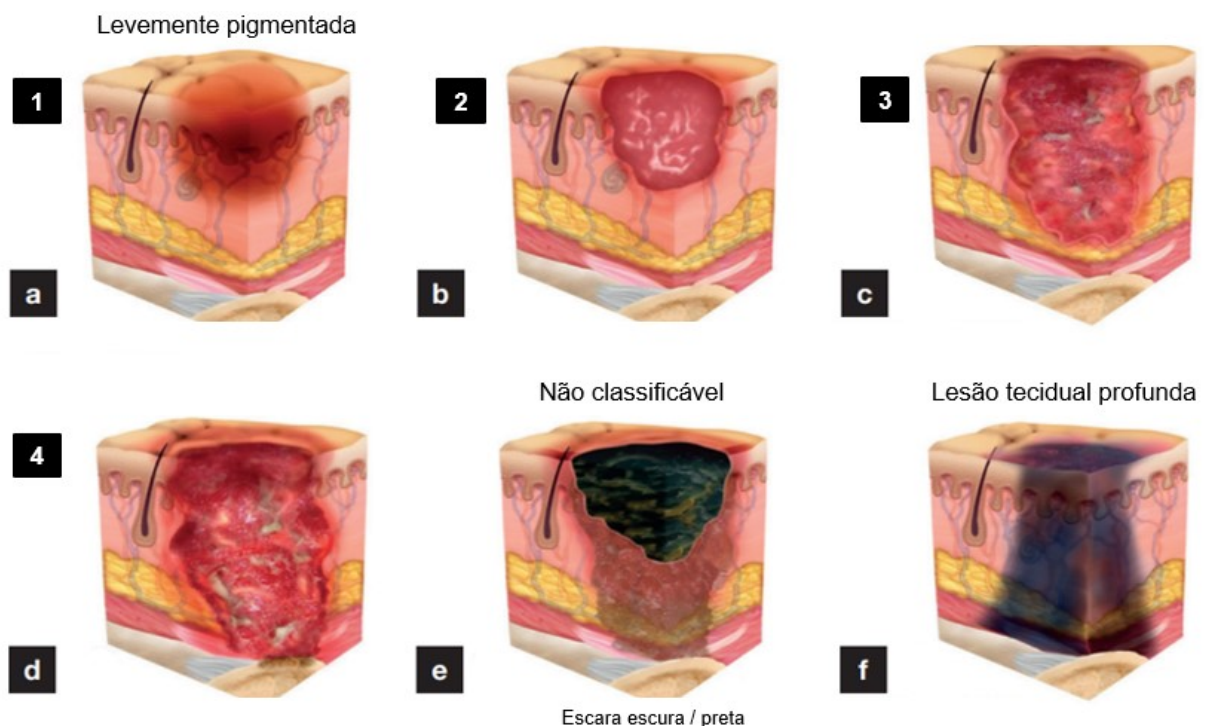


Figura 6: Estágios das úlceras por pressão.

Classificação de úlceras por pressão usando o sistema de classificação de úlceras por pressão do International National Pressure Ulcer Advisory Panel/European Pressure Ulcer Advisory Panel (<https://npiap.com/page/PressureInjuryStages>). a. 1 Pele intacta com vermelhidão que não embranquece localizada em uma área geralmente sobre proeminência óssea. A área pode estar dolorida, firme, mole, mais quente ou mais fria que o tecido adjacente. b. 2 Perda parcial da espessura da derme apresentando-se como uma úlcera rasa com leito róseo. c. 3 Perda total da espessura da pele. Úlcera na qual a gordura subcutânea pode ser visível com ou sem esfacelo. No entanto, osso, tendão ou músculo não são visíveis. d. 4 Perda total da espessura do tecido. Úlcera na qual o músculo, tendão ou osso é exposto. A profundidade da úlcera varia dependendo da localização anatômica. A úlcera muitas vezes inclui enfraquecimento ou formação de túneis, portanto, corre o risco de causar osteomielite. e. Impossível de escalar (profundidade desconhecida). Úlcera em que a base é coberta por esfacelo ou tecido necrótico, portanto, a verdadeira profundidade não pode ser determinada e,

portanto, classificada. f. A lesão tecidual profunda apresenta-se com uma área localizada roxa ou marrom de pele descolorida ou bolha de sangue como resultado de dano do tecido mole subjacente. Em tipos de pele mais escuros, pode ser difícil detectar se há eritema cutâneo não esbranquiçado, como em úlceras de estágio 1 ou uma lesão tecidual profunda, portanto, é necessária uma alta suspeita de risco. Adaptado de (HEADLAM e ILLSLEY, 2020).

D) Feridas Cirúrgicas - As feridas cirúrgicas (FC) são aquelas, planejadas e realizadas com justaposição de bordas, cicatrizam por primeira intenção e, possuem tendência à regressão espontânea e completa em um prazo esperado; são caracterizadas por ruptura da integridade epitelial da pele e estruturas subjacentes ocasionada de forma intencional como pode ser observada na figura 7 (APARECIDA e colab., 2016.; FLETCHER, 2008).



Surgical incision

Figura 7: Ferida cirúrgica por incisão.

Ferida cirúrgica sendo corrigida com aproximação das bordas por sutura. Fonte: (FLETCHER, 2008).

1.2.1 INFECCÃO EM FERIDAS

A pele saudável é ricamente povoada por bactérias que desempenham um papel importante no ecossistema cutâneo. Essas bactérias podem se originar do ambiente externo, como *Staphylococcus aureus*, ou de bactérias que residem em órgãos e migram através da via sanguínea. No caso da interrupção da continuidade da pele, as bactérias migram da superfície da pele para regiões em que normalmente não estão hospedadas, que pode resultar em um desequilíbrio e levar à infecção na ferida (TOTTOLI e colab., 2020). Na tabela 2 é possível observar os principais microrganismos envolvidos na infecção de feridas crônicas como úlcera de pressão, venosa, abscessos e feridas cirúrgicas (VERSEY e colab., 2021).

Úlcera Venosa			
Gram-positivos Aeróbias	Gram-negativos Aeróbios	Gram-positivos Anaeróbias	Gram-negativos Anaeróbias
<i>Actinotignum schaalii</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Brevibacterium casei</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>C. feikeium</i> <i>C. simulans</i> <i>C. striatum</i> <i>C. tuberculostearicum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. pettenkoferi</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Citrobacter</i> spp. <i>Delftia acidovorans</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>E. hormaechei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa fluorescens</i> <i>Serratia nematodiphila</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Anaerococcus vaginalis</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Peptoniphilus harei</i> <i>Peptostreptococcus assacharolyticus</i> <i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Bacteroides tectus</i> <i>Flavobacterium succinicans</i> <i>Fusobacterium gonidiaformans</i>
Úlceras de Pressão			
Gram-positivos Aeróbias	Gram-negativos Aeróbios	Gram-positivos Anaeróbias	Gram-negativos Anaeróbias
<i>C. jeikeium</i> <i>C. striatum</i> <i>C. tuberculostearicum</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i>	<i>A. baumannii</i> <i>D. acidovorans</i> <i>E. hormaechei</i> <i>Escherichia</i> spp. <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Serratia</i> spp. <i>S. maltophilia</i> <i>unclassified Enterobacteriaceae</i> spp.	<i>Allobaculum</i> spp. <i>A. vaginas</i> <i>Eubacterium dolichum</i> <i>F. magna</i> <i>Peptococcus</i> spp. <i>Peptoniphilus rorii</i>	<i>B. fragilis</i> <i>Dialister</i> spp. <i>F. nucleatum</i> <i>Prevotella bAfra</i>
Feridas Cirúrgicas Infectadas			
Gram-positivos Aeróbias	Gram-negativos Aeróbios	Gram-positivos Anaeróbias	Gram-negativos Anaeróbias
<i>Bacillus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>Coagulase-negative staphylococci (CONS)</i> <i>C. striatum</i> <i>C. tuberculostearicum</i> <i>Granulicatella elegans</i> <i>methicillin-resistant S. aureus (MASA)</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. mitis</i> <i>S. salivarius</i>	<i>A. baumannii</i> <i>A. lwoi</i> <i>D. acidovorans</i> <i>Diaphorobacter</i> spp. <i>K. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> spp. <i>E. coli</i> <i>K. oxytoca</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Moraxella</i> spp. <i>Morganella morganii</i> <i>Neorhizobium</i> spp. <i>Novosphingobium</i> spp. <i>Paracoccus</i> spp. <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Ralstonia pickettii</i> <i>S. nematodiphila</i> <i>Sphingomonas</i> spp. <i>S. maltophilia</i>	<i>A. vaginalis</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>F. magna</i> <i>C. acnes</i>	<i>Cloacibacterium</i> spp. <i>F. nucleatum</i> <i>Methylobacterium</i> spp.
Outro			
<i>Candida albicans</i>			
Abscesso			
Gram-positivos Aeróbias	Gram-negativos Aeróbios	Gram-positivos Anaeróbias	Gram-negativos Anaeróbias
<i>CONS</i> <i>C. accolens/gurimucosum</i> <i>C. afermentans</i> <i>C. mucifaciens</i> <i>C. tuberculostearicum</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Micrococcus luteus</i> <i>MRSA</i> <i>Methicillin sensitive S. aureus (MSSA)</i> <i>S. aureus</i> <i>S. caprae/capitis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. petrasii</i> <i>S. agalactiae</i>	<i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Haemobacter massiliensis</i> <i>P. aminovorans</i> <i>P. versutus</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Rhodanobacter</i> spp. <i>Sphingomonas</i> spp.	<i>F. magna</i> <i>C. acnes</i>	<i>Flavobacterium</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.

Tabela 2: Relação entre microrganismos e feridas.

Legenda: Principais envolvidos na infecção De feridas crônicas Adaptado de (VERSEY e colab., 2021).

As bactérias estão presentes em todas as feridas abertas porém a interação entre as bactérias e o hospedeiro varia desde a contaminação até a colonização, tal transição é

determinada pela quantidade, virulência e patogenicidade das bactérias, bem como pela capacidade do hospedeiro de montar uma defesa imunológica eficaz (LANDÉN e colab., 2016). Em resumo, todas as feridas são contaminadas, porém a colonização das mesmas depende de o microrganismo encontrar condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Vale lembrar que no estágio inicial do processo de cicatrização de feridas ocorre uma resposta imunológica como forma de limpar a ferida para que a cicatrização ocorra de forma adequada, o que contribuiu para evitar infecções e agravamento da lesão (VERSEY e colab., 2021).

Estudos demonstram que tanto microrganismos oportunistas como residentes naturais atuam nas feridas (PASTAR e colab., 2013). De acordo Mihai et al. 2018 espécies como: *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *freundii*, *Serratia marcescens* e *Providencia* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *Corynebacterium* spp. ou *Acinetobacter baumannii*, podem ser encontradas lesões assim como *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Fingoldia*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter* também são encontrados em feridas crônicas (DE OLIVEIRA, Beatriz G.R.B. e colab., 2019; PHALAK e HENSON, 2019; THOMAS e THOMAS, 2021).

Infecções fúngicas também podem acometer feridas, com destaque para a presença de *Candida* spp., colonizadores frequentes da pele humana, são a causa predominante de infecções fúngicas em queimadura. Curiosamente, a implicação da *Candida* em processos humanos complexos, como a cicatrização de feridas, recentemente começou a entrar em destaque e sugere-se que esses patógenos contribuam para feridas crônicas ou que não cicatrizam (MAHADIK e colab., 2018; PHALAK e HENSON, 2019; VON MÜLLER e colab., 2020).

1.2.2 INFECÇÃO POR BIOFILMES

Os biofilmes são sistemas biológicos dinâmicos e estruturalmente complexos definidos como um consórcio microbiano, formado por uma matriz tridimensional (3D) exopolissacarídica (EPS) ou glicocálix composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA) onde os microrganismos estão intimamente ligados a uma superfície ou uns aos outros fornecendo proteção e coesão (DARVISHI e colab., 2022; MIHAI e colab., 2018a; OMAR e colab., 2017).

Os biofilmes podem ser divididos em duas categorias principais: comensais e patogênicos. Os patogênicos diferem dos comensais de várias maneiras, incluindo a presença de genes mais regulados. Isso promove níveis excessivos de enzimas de degradação (metaloproteinases de matriz (MMPs)), o crescimento de EPS e aumento da proliferação e disseminação microbiana (que caracterizam feridas crônicas). O estabelecimento de biofilmes patogênicos leva a uma regulação positiva das respostas imunes, levando a inflamação crônica. A Figura 1 fornece uma comparação entre uma ferida aguda em cicatrização e uma ferida crônica que não cicatriza (DARVISHI e colab., 2022).

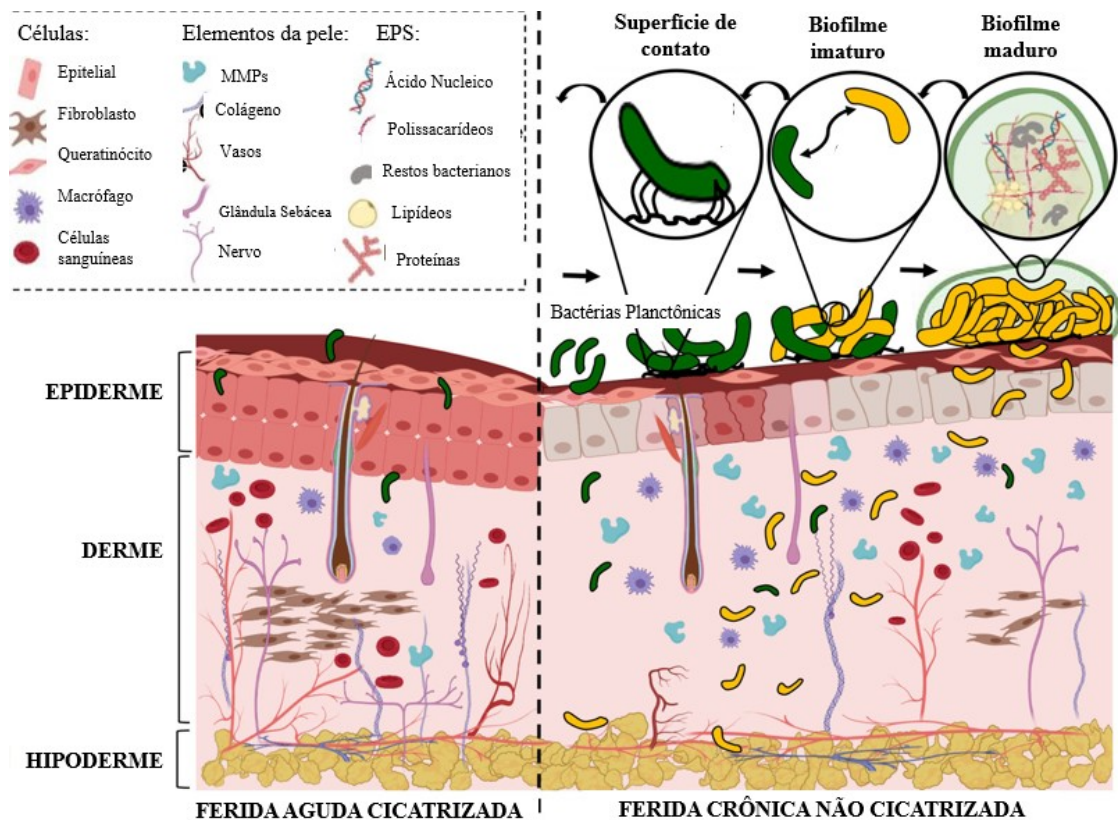


Figura 8: Diferenças entre a cicatrização de uma ferida aguda e de uma ferida crônica: formação de biofilme na ferida crônica.

Diferenças entre a cicatrização de uma ferida aguda e de uma ferida crônica: Um biofilme é formado na ferida crônica. Os estágios de formação do biofilme são representados: Proteínas de ancoragem específicas permitem que as bactérias planctônicas se prendam às superfícies da ferida. Um sistema de detecção de quorum e sistemas baseados em RNA transformam bactérias planctônicas em bactérias de biofilmes após a fixação bem-sucedida. As microcolônias se transformam gradualmente em biofilmes maduros. Fonte: DARVISHI e colab., 2022.

Biofilmes também podem ser entendidos como colônias microbianas embebidas em uma matriz polimérica extracelular secretada por elas mesmas. Seu padrão de crescimento correspondente às células planctônicas formadas na superfície de materiais inertes ou ativos, e se adaptam ao ambiente vivo durante o crescimento da bactéria. Sua

estrutura pode ser diferente a depender do microrganismo envolvido (MIHAI e colab., 2018a; SEN e colab., 2021; WEI e colab., 2019).

De acordo com Wei et al 2019, as bactérias podem formar biofilmes em um intervalo de 24 h. Uma das características mais importantes dos biofilmes é sua tolerância a terapias convencionais, como antibioticoterapia (MIHAI e colab., 2018b; RAZIYEVA e colab., 2021). Os biofilmes possuem uma forte capacidade de aderência para garantir uma interação complexa entre as comunidades microbianas e protegê-las contra a ação de compostos antimicrobianos (CARRADORI e colab., 2020).

Bactérias em biofilmes podem desenvolver resistência de 100 a 1000 vezes maior contra múltiplos agentes antimicrobianos em comparação com microrganismos isolados (DARVISHI e colab., 2022; THOMAS e THOMAS, 2021). Basicamente, o biofilme se forma em quatro etapas sendo elas: adesão, reprodução, maturação e dispersão no qual no primeiro evento se tem uma colonização temporária e no ultimo há um biofilme maduro com capacidade de criar resistência a antibióticos (EVELHOCH, 2020; MIHAI e colab., 2018a; WEI e colab., 2019). Tal habilidade está relacionada à alterações fenotípicas sejam eles biofilmes mono ou poli microbianos que ocorrem através das interações sinérgicas entre bactérias que expressam diferentes fenótipos de virulência assim como pela transferência de genes de resistência entre bactérias, taxas de crescimento bacterianas lentas dentro de biofilmes, células persistentes, que são particularmente resistentes à destruição, e atividade quorum sensing entre bactérias (MIHAI e colab., 2018a; THOMAS e THOMAS, 2021).

1.2.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Ao passo que lesão ocorre o corpo humano responderá imediatamente e iniciará o processo de cicatrização (QI e colab., 2022). A cicatrização de feridas é um processo biológico e molecular complexo de recuperação da estrutura e funções normais dos tecidos lesados (MSSILLOU e colab., 2022). Também se trata de um processo fisiológico dinâmico a partir do qual a ativação de vários tipos celulares e de vias de sinalização ocorrem de forma ordenada (Figura 11) (OLIVEIRA, André e colab., 2022). A cicatrização típica de feridas é tradicionalmente dividida em quatro estágios sobrepostos: (1.2.3.1) hemostasia, (1.2.3.2) inflamação, (1.2.3.3) proliferação e (1.2.3.4) remodelação (RAJENDRAN e colab., 2018; RAZIYEVA e colab., 2021; THANGAVEL e colab., 2018a; WANG, Na e colab., 2020).

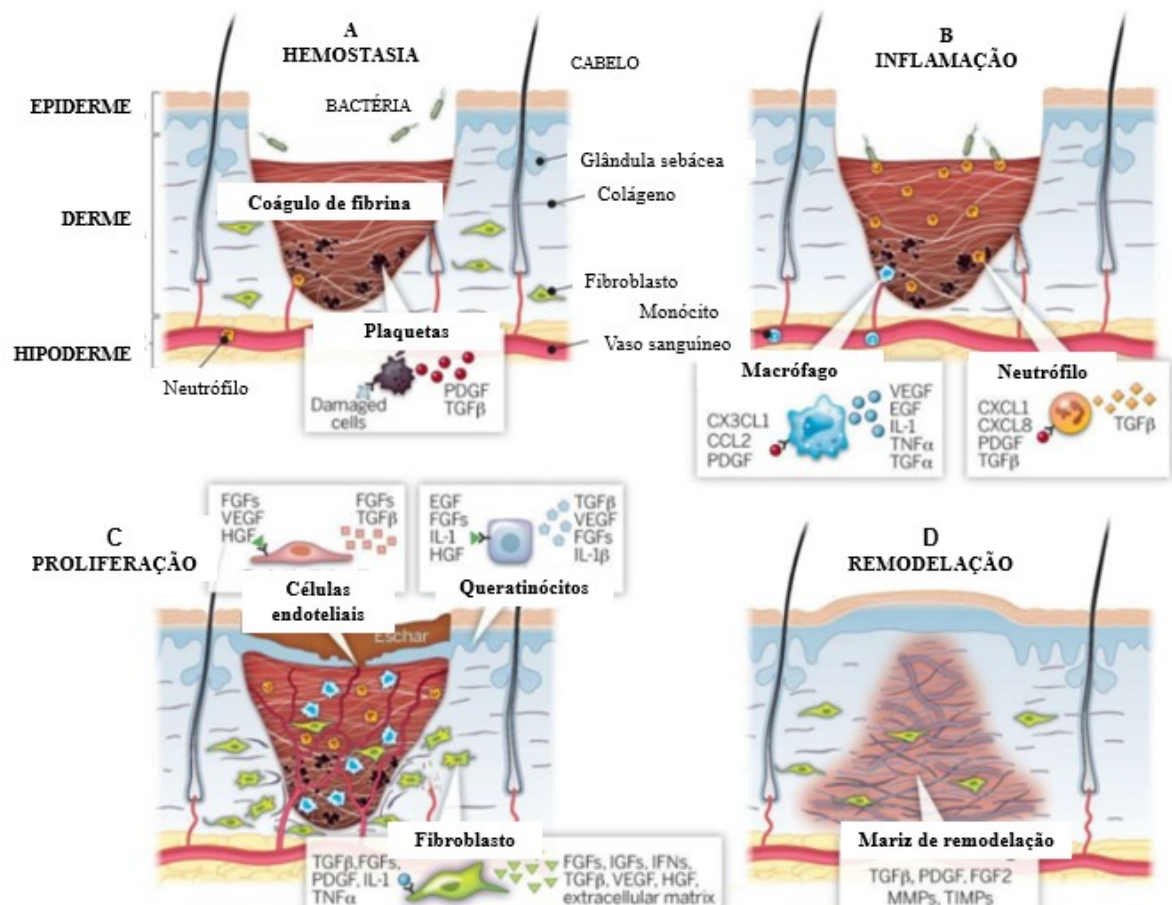


Figura 9: As fases da cicatrização de feridas e os elementos envolvidos.

(A) Hemostasia, (B) Inflamação, (C) Proliferação e (D) Remodelação. PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF: fator de necrose tumoral, TGF: fator transformador de crescimento, KGF: fator de crescimento de queratinócitos, FGFs: fatores de crescimento de fibroblastos, IGF: fator de crescimento semelhante à insulina, IL-1: interleucina-1, IFN: interferon, TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase, VEGF: fator de crescimento endotelial vascular, MMP: metaloproteinase de matriz, HGF: fator de crescimento de hepatócitos. Adaptado de (ABAZARI e colab., 2021).

1.2.3.1 Hemostasia

A hemostasia é o primeiro estágio do processo de cicatrização de feridas e tem como objetivo interromper a hemorragia no local da lesão a partir de produção de um coágulo insolúvel. Imediatamente após a injúria a hemostasia se inicia através do processo de vasoconstrição pela contração reflexa do sistema microvascular próximo ao local do dano. No caso, a contratura reflexiva do músculo liso vascular é mediada por vasoconstritores, como a endotelina, liberada do endotélio e regulada por catecolaminas circulantes, epinefrina, norepinefrina e prostaglandinas liberadas de células lesadas além de tromboxano A₂. Nesse instante as plaquetas produzem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que ativa preferencialmente as células mesenquimais, especialmente os músculos lisos nas paredes dos vasos, causando contração. Esse evento reduz o fluxo sanguíneo no local da lesão para que então o processo de coagulação possa ocorrer resultando em tampão plaquetário para continuidade do processo de cicatrização

(BRUMBERG e colab., 2021; MSSILLOU e colab., 2022; RODRIGUES e colab., 2019; YAZARLU e colab., 2021).

O coágulo formado além de cumprir a função de barreira contra a perda sanguínea também confere proteção contra a invasão bacteriana, fornecendo um suporte para as células imunes que chegam. Ainda, o coágulo serve como fonte de citocinas e fatores de crescimento que são liberados das plaquetas ativadas como: fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), além de prostaglandinas e tromboxanos. Estes fatores de crescimento e mediadores inflamatórios são necessários para o recrutamento de células imunes e para orientar o comportamento das células da ferida no reparo precoce (RODRIGUES e colab., 2019; WILKINSON e HARDMAN, 2020).

1.2.3.2 Inflamação

A inflamação é o mecanismo de defesa natural e essencial do organismo responsável por combater os antígenos e pela reparação do dano tecidual. A resposta inflamatória consiste em uma variedade de eventos desencadeados por células imunes, que envolve o influxo de leucócitos para a área lesada e a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios (SILVA e colab., 2018). Ela pode ser definida como uma resposta imunológica inata essencial, inespecífica, que envolve a invasão de tecido e limpeza de detritos celulares, extracelulares e patógenos no qual se resolve em um período de duas semanas quando os leucócitos infiltrados retornam aos seus números (ZHAO, Ruilong e colab., 2016).

No período compreendido entre 24-48h após a lesão há uma predominância de granulócitos (especificamente, neutrófilos de núcleos fragmentados) e de monócitos no intervalo entre 48 -72h pós injúria (BRUMBERG e colab., 2021).

A etapa inflamatória é caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular pela liberação de histamina e outros fatores de crescimento ativados que através de quimiotaxia torna possível a migração de neutrófilos para a ferida recrutados por fatores de crescimento e citocinas. Uma vez fora do vaso sanguíneo, os neutrófilos são expostos a um gradiente de quimiocinas dentro da pele e migram para a concentração mais alta, o local onde essas quimiocinas são liberadas, ou seja, na ferida onde realizam fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO), peptídeos

antimicrobianos e enzimas proteolíticas para remover patógenos e restos celulares. (LANDÉN e colab., 2016).

Além dos neutrófilos, monócitos são recrutados ao local da ferida, e logo se diferenciam, em macrófagos (WILKINSON e HARDMAN, 2020) que também fagocitam detritos e bactérias, entretanto, produzem e liberam citocinas inflamatórias (incluindo fatores de crescimento) como $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1, bFGF, entre outras. Estas citocinas ativam queratinócitos e fibroblastos, estimulam a proliferação de células inflamatórias e promove a angiogênese através do recrutamento de células endoteliais (MUTSCHLER, 2012; QING, 2017a).

Ao final do processo inflamatório, os fatores de crescimento e angiogênicos derivados de macrófagos alcançam níveis ideais e, conseqüentemente, influenciam para que ocorra um influxo de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos na ferida para estimular a proliferação do tecido conjuntivo, endotelial e epitelial direta e indiretamente, alterando a composição da MEC tanto durante a angiogênese quanto na fase de remodelação pela liberação de enzimas proteolíticas e pela síntese de moléculas de MEC (ELLIS e colab., 2018; QING, 2017b).

1.2.3.3 Proliferação

A fase proliferativa envolve a formação de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e tecidos de granulação no local da lesão para substituir as células mortas (reepitelização, angiogênese e fibroplasia). É caracterizada pela migração de fibroblastos que proliferam profusamente e começam a sintetizar novos componentes da MEC como fibrina, colágeno I, III, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e as proteínas matricelulares. A matriz extracelular (MEC) forma um tecido de granulação para substituir a formação original do coágulo. Muitos tipos de citocinas e fatores de crescimento participam dessa fase, como o fator de crescimento transformador da família β ($\text{TGF-}\beta$, incluindo $\text{TGF-}\beta 1$, $\text{TGF-}\beta 2$ e $\text{TGF-}\beta 3$), família da interleucina (IL) e fatores de angiogênese (como o fator de crescimento epidérmico vascular- VEGF) (ALVEN e ADERIBIGBE, 2020; MONIKA e colab., 2021; MSSILLOU e colab., 2022; WANG, Peng Hui e colab., 2018).

A reepitelização consiste na migração de queratinócitos existentes na borda da ferida ativados por mudanças na tensão mecânica, gradientes elétricos, exposição ao peróxido de hidrogênio, patógenos, fatores de crescimento e citocinas. Seu objetivo é cobrir a lesão como forma de restabelecer a barreira protetora. Os queratinócitos sofrem alterações fenotípicas após a lesão e o contato entre a epiderme e a membrana basal é

perdido o que, juntamente com a secreção de várias proteases, permite o movimento lateral das células epidérmicas para dentro da ferida. O processo é encerrado quando os queratinócitos de uma borda encontram os queratinócitos da outra borda (LANDÉN e colab., 2016; MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2017; WILKINSON e HARDMAN, 2020).

1.2.3.4 Remodelação

A etapa de remodelação é a etapa de restauração da integridade do tecido. Nessa fase o tecido de granulação passa por um processo de diminuição gradual, ocorre a formação de um tecido funcional pela remodelação da vasculatura dérmica da derme (Figura 10), nervos e miofibras do músculo esquelético. O diâmetro das fibras de colágeno aumenta e ocorre uma diminuição no conteúdo de ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos em relação ao colágeno. As metaloproteinases de matriz (MMPs) liberadas por fibroblastos e macrófagos degradam o colágeno tipo III do tecido de granulação e então este é substituído pelo colágeno tipo I, que é posteriormente reorganizado em fibrilas paralelas formando assim a cicatriz (BRUMBERG e colab., 2021; DORANTES e AYALA, 2019).

É importante lembrar que as fases da cicatrização de feridas determinam o tipo de curativo e terapia a ser usada para o manejo adequado da ferida (ALVEN e ADERIBIGBE, 2020).

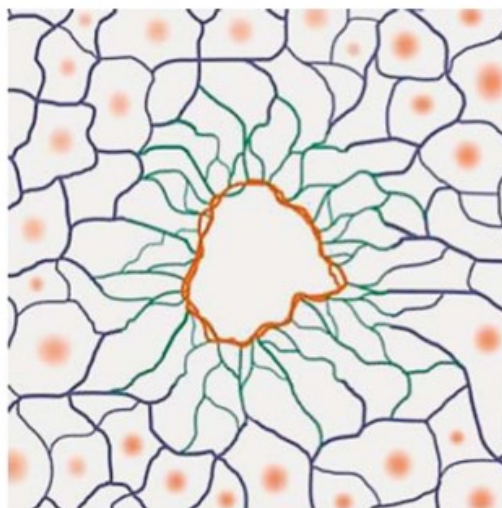


Figura 10: Desenho esquemático de redes microvasculares recém-formadas de uma ferida cutânea em regeneração.

Arranjo típico da neovascularização como dado por vasos circulares (laranja) ao redor das margens da ferida, redes vasculares radiais (verde) construindo a ponte entre a rede vascular fisiológica e a microvasculatura recém-formada, e a microcirculação fisiológica correndo como uma rede ao redor dos folículos pilosos (azul). Fonte: (SORG e colab., 2017).

1.3 TRATAMENTO DE FERIDAS

O tratamento de feridas sejam elas crônicas ou não, incluiu uma diversidade de opções. No caso das feridas crônicas o manejo das lesões é um desafio. Para a escolha da estratégia adequada alguns critérios devem ser observados: tipo de ferida, tamanho da lesão, quantidade de exsudato, risco de infecção e outros fatores (MOFAZZAL JAHROMI e colab., 2018; RAJENDRAN e colab., 2018; YE e colab., 2020).

O tratamento de feridas engloba terapias e produtos inovadores além da utilização de produtos e substâncias clássicas. As técnicas e produtos para tratamento das feridas envolvem utilização de curativos como: gazes, filmes, hidrocoloides, hidrogel, espuma, alginatos; engenharia de tecidos; utilização de fatores de crescimento; terapia hiperbárica; terapia de pressão negativa (Figura 11) (POWERS e colab., 2016.; HAN E CEILLEY, 2017); hidroterapia, (BROUGHTON e colab., 2006). Atualmente, há mais de 3000 tipos de curativos disponíveis no mercado (OLIVEIRA, André e colab., 2022).



Figura 11: Terapia de pressão negativa em uma ferida aguda.

Fonte: (POWERS e colab., 2016)

Alguns aspectos devem ser levados em consideração ao se planejar um tratamento adequado e deve incluir principalmente a preparação da base da ferida e o reparo da ferida. A preparação da base da ferida inclui a remoção de tecido inativado, redução da contaminação microbiana, redução da exsudação da ferida, manutenção da ferida úmida e promoção do tecido de granulação fresco conforme indicado no princípio TIME (CHHABRA e colab., 2017; SHETE e colab., 2022; YE e colab., 2020).

O método TIME, tempo em português, consiste em avaliar a lesão sob a ótica dos principais fatores que interferem negativamente no processo de cicatrização o (T) tecido - Procedimento de Desbridamento; (I) Infecção - Estratégias de Prevenção; (M) -

Equilíbrio de Umidade e Gerenciamento de Exsudato; e (E) borda Epitelial - Avanço da Borda Epitelial (ALAM e colab., 2021; BOWERS e FRANCO, 2020; POWERS e colab., 2016; TOTTOLI e colab., 2020).

1.4 GRAFENO

O grafeno é formado por uma densa camada de átomos de carbono ligados por hibridização do tipo sp^2 dispostos em uma matriz hexagonal em forma de favo de mel. Possui ainda propriedades promissoras como excelente condutividade térmica e elétrica, baixa densidade, inércia química, transmitância óptica e hidrofobicidade muito alta, grande área de superfície, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, alta resistência mecânica (DOS REIS e colab., 2020; GOENKA e colab., 2014; KENRY e colab., 2018; MILOSAVLJEVIC e colab., 2022) e atividade antimicrobiana (MOHAMMED e colab., 2020; PANDIT e colab., 2021) especialmente contra infecções por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (MAGNE e colab., 2021).

A atividade antimicrobiana do grafeno e seus derivados é mediada por ações físicas e químicas que ocorrem através de ruptura física e através de estresse oxidativo. A ruptura física ocorre quando o GO penetra na bactéria, comprometendo a membrana bacteriana, enquanto o estresse oxidativo ocorre quando o GO induz a bactéria a gerar ERO (PULINGAM e colab., 2020). Sua atividade antimicrobiana é dependente de do tempo e da concentração assim como seu tamanho lateral, número de camadas, cargas de superfície, grupos funcionais de superfície e teores de oxigênio, podem ter um impacto significativo em suas propriedades antibacterianas (TU e colab., 2013; KUMAR e colab., 2019; JI; SUN; QU, 2016).

A família do grafeno é composta por óxido de grafeno (GO) (Figura 12), óxido de grafeno reduzido e *graphene quantum dots* (GQDs), entre outros. Os seus grupos funcionais são ácidos carboxílicos, éster de álcool terciário, cetona e hidroxila que maximiza a capacidade de funcionamento e sua aplicação como carreadores de drogas (MAGNE e colab., 2021).

Dentre os vários produtos à base de carbono, os pontos quânticos de grafeno são os que mais impressionam (DE MENEZES e colab., 2020).

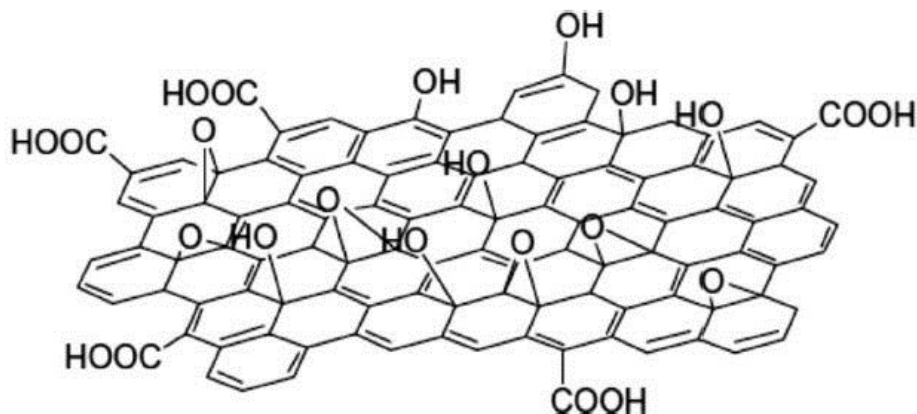


Figura 12: Óxido de grafeno.

Fonte: Díez-Pascual, A. M. 2021.

1.4.1 PONTOS QUÂNTICOS DE GRAFENO

Os pontos quânticos de grafeno são uma espécie de nanomaterial da família do carbono e, diferente do grafeno, ele é zero dimensional (0D) constituído em uma ou poucas camadas de folhas de grafeno (CHUNG e colab., 2021b; TADE e colab., 2020; YOUNIS e colab., 2020). São cristais de grafeno hexagonalmente simétricos com um plano grafitico atômicamente fino (CHUNG e colab., 2021a). (CHUNG e colab., 2021b; TADE e colab., 2020; YOUNIS e colab., 2020).

Além de possuir as mesmas propriedades que o grafeno, os pontos quânticos de grafeno ainda possuem como características fotoestabilidade, excelente biocompatibilidade, propriedade de fluorescência estável, boa solubilidade, transparência, hidrofobicidade maior que a do grafeno, são biodegradáveis, possuem capacidade de entrar no citoplasma de células humanas primárias (CHUNG e colab., 2021a; FASBENDER e colab., 2019) e de interagir com uma grande variedade de moléculas, drogas, DNA e materiais radioativos (FELIX e colab., 2021). Em geral, os pontos quânticos de grafeno, são compostos por poucas camadas de fragmentos de grafeno, com absorção na região do ultravioleta entre 230 e 300nm, que pode variar de acordo com o tamanho, uma vez que o efeito de confinamento quântico e densidade dos sítios sp² são dependentes do tamanho (FELIX e colab., 2021).

Embora a maioria da literatura diga que o confinamento quântico de nanopartículas esteja inserido na escala entre 10 a 20nm, trabalhos já demonstraram que o confinamento quântico permanece em escalas superiores próximas a 142nm (SANTANA e colab., 2023).

A aplicação dos GQDS é vasta, envolve diversas áreas. Na área biomédica muitas são as aplicações do GQDS: obtenção de imagens, entrega de drogas, teranóstico de câncer (YOUNIS e colab., 2020), curativos, agente terapêutico em diversas patologias como leucemia (FELIX e colab., 2021; KORTELE e colab., 2020; ZHAO, Changhong e colab., 2020). Também possuem propriedades anti-inflamatórias (LEE e colab., 2020a; MOUSAVI e colab., 2022). São aplicados em biossensores; na engenharia de tecidos (CHUNG e colab., 2021a), em vacinas, imunoterapia; como imunossupressores (LEE e colab., 2020b) e detecção de processos inflamatórios (MOUSAVI e colab., 2022).

1.5 ANFOTERICINA B

A anfotericina B é um antibiótico indicado para o tratamento de doenças fúngicas graves e, potencialmente, fatais. Seu mecanismo de ação ocorre pela interrupção da síntese da parede celular fúngica devido à sua capacidade de se ligar a esteróis, principalmente ergosterol, o que leva a alteração da permeabilidade da membrana celular, com consequente formação de poros que permitem o vazamento de componentes celulares (RICHTER e colab., 2020; SAGHAZADEH e colab., 2018).

1.6 SULFATO DE NEOMICINA

O sulfato de neomicina é um antibiótico pertencente à família dos aminoglicosídeos, que são eficazes contra bactérias gram-negativos e alguns gram-positivos, como por exemplo, os estafilococos. (LAM e colab., 2017 (SINGH e JONNALAGADDA, 2021)).

Os aminoglicosídeos ligam-se predominantemente ao ribossomo no centro de decodificação da subunidade 30S dos ribossomos e reduzem a fidelidade da decodificação. Essa ligação faz com que nucleotídeos críticos de rRNA sejam alterados e assumam posições que não permitam a decodificação resultando na produção aberrante de proteínas ou não há produção (DUNKLE e colab., 2014; PUNJATAEWAKUPT e colab., 2019; WANG, Xiaochun e colab., 2021). Primeiramente ligam-se à superfície da célula bacteriana e posteriormente é transportado através da parede por um processo dependente de energia oxidativa (VEIRUP e KYRIAKOPOULOS, 2022). Muitas vezes, é encontrado associado com a bacitracina zíncica que também impede a multiplicação desses microrganismos, potencializando o efeito (SINGH e JONNALAGADDA, 2021).

1.7 ÓXIDO DE ZINCO

O óxido de zinco é um fármaco adstringente e antisséptico que possui ação suavizante, cicatrizante e protetora nas afecções da pele. É indicado na dermatite das fraldas, queimaduras do primeiro grau e cicatrização de feridas superficiais. Sua utilização aumenta a cicatrização de feridas, amplia a reepitelização, diminuiu as taxas de infecção e as taxas de deterioração das úlceras. Ele possui uma função significativa junto às células durante todo o processo de cicatrização de feridas (LIN e colab., 2018). Também possui atividade antimicrobiana através da produção de ROS e pela interação com ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA) e enzimas (inibitórias), que juntos provocam morte bacteriana (BLANCO-FERNANDEZ e colab., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e avaliar eficácia de pó secante de GQDS e associações como tratamento farmacológico tópico na cicatrização de feridas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Desenvolver formulação de pó secante para aplicação em feridas contendo pontos quânticos de grafeno; anfotericina B 5,0mg, neomicina 50,0mg e óxido de zinco de formar a se obter uma formulação com rendimento superior a 90% e eficaz para o tratamento de feridas.

2.2.2. Avaliação in vitro de processo de cicatrização através de ensaio de ranhura in vitro para verificação de fechamento de ferida na monocamada celular mediante tratamento direto com a formulação desenvolvida.

2.2.3. Realizar o desenvolvimento de feridas in vivo, em camundongos machos balb/c através da aplicação de Punch dermatológico.

2.2.4. Tratar as feridas com formulação desenvolvida a partir de aplicação tópica diária durante um período de 5 dias.

2.2.5. Análise histológica da cicatrização de feridas após finalização do período de tratamento e eutanásia dos animais, de forma comparativa entre grupo de feridas tratadas e controle.

2.2.6. Avaliação de efeito antimicrobiano do produto desenvolvida a partir de análise de sensibilidade microbiana para microrganismos característicos envolvidos em infecções de feridas, principalmente por *Candida spp.*

3 PROCEDIMETO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

O artigo intitulado *Graphene Quantum Dots as Dry Powder for Wound Dressing: A proof of concept.* de minha autoria foi aceito para publicação em 24/01/2023 para publicação na revista *Journal of Pharmaceutical Investigation*. DOI : 10.1007/s40005-023-00612-3.

Wound dressing using graphene quantum dots: a proof of concept.

Vanessa Gonzalez Ferreira Caminha Martins¹, Luciana Magalhaes Rebelo Alencar²,
 Pedro Filho Noronha Souza³, Carolinne Margot Albanez Lorentino⁴, Heloisa Freire
 Frota^{4,5}, Andre Luis Souza dos Santos^{4,5}, Sara Gemini-Piperni⁶, Veronica Morandi⁷,
 Vinicius Gonçalves Rodrigues⁸, Jonathas Xavier Pereira⁸, Eduardo Ricci-Junior⁹, Aline
 Oliveira da Silva de Barros¹, Ralph Santos-Oliveira^{1,10}

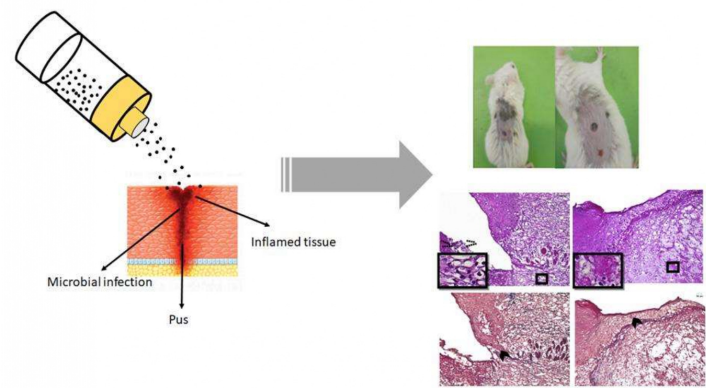
- 1- Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, 21941906, Brazil
- 2- Department of Physics, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Federal University of Maranhão, Maranhão 65080-805, Brazil
- 3- Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Ceará, CE, Brazil, Laboratory of Plant Defense Proteins, Ceará 60451, Brazil.
- 4- Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941902, Brazil.
- 5- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941902, Brazil
- 6- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
- 7- Department of Cell Biology, University of the State of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro 20550-900, Brazil
- 8- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiás, Goiânia, Brasil
- 9- Laboratory of Nanomedicine, College of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941902, Brazil
- 10- Zona Oeste State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro 2320000, Brazil.

All correspondence to:

Dr. Ralph Santos-Oliveira
 Brazilian Nuclear Energy Commission
 Nuclear Engineering Institute
 Rio de Janeiro/RJ, Brazil
 Rua Helio de Almeida, 75, Ilha do Fundão-Rio de Janeiro-Brazil
 E-mail: roliveira@ien.gov.br

39

Graphical Abstract



40

41 **Abstract**

42 The costs and complexity related for wound healing effective treatment is
43 immense. The number of cases as the multifactorial aspect related to the
44 treatment of wounds (inflammation, infection and many others) implies in a multi-
45 therapeutic and complex approach, which involves several proceedings,
46 including medications and surgery. In terms of medication there just few options
47 and with a very restrict effect, especially in chronic wounds. Recently, graphene
48 quantum dots have been used as potent antimicrobial compound. Also, graphene
49 quantum dots have demonstrated significant tissue remodeling property. In this
50 study we have developed a formulation based on graphene quantum dots to be
51 used a dry powder for wound healing process. The graphene quantum dots have
52 been produced and fully characterized by: Raman spectroscopy, atomic force
53 microscopy and RX diffractometry. The formulation has been produced under
54 aseptically conditions and evaluated *in vitro* and *in vivo*. The results showed that
55 the graphene quantum dots formulation were able to improve the healing process
56 in vitro and in vivo. The antimicrobial effect demonstrated to be effective against
57 to *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* and *C. albicans* e *C. tropicalis*. The results
58 corroborated the use of the dry powder formulation based on graphene quantum
59 dots and expand its use in the biomedical field.

60

61 **Key-word:** inflammation; healing; skin; diabetes; dry powder; pharmaceuticals

62

63

64

65 **Introduction**

66 Wounds may have a variety of causes: i) surgery; ii) injuries; iii) burns and cuts;
67 or v) pathologic conditions such as diabetes or vascular diseases. In addition,
68 depending on the type of wound, it can be selected as non-chronic or chronic
69 wound. The non-chronic wounds (or acute wounds) represent the easiest form,
70 achieving full restoration and tissue functionality by organized and appropriate
71 repair process. On the other hand, chronic wounds result in partial tissue
72 restoration, with loss in functionality and high probability of infection and formation
73 of new wound [1–3]. The cutaneous wound healing is a complex process
74 dependent of molecular and cellular events to restore the lesioned area [4–6].
75 The healing of wounds is a complex process separated into several phases,
76 which include hemostasis, acute inflammation, proliferation and maturation [7].
77 After all these processes, it is expected the complete healing of the tissue,
78 nevertheless, in some cases the complete restoration is not achieved, resulting
79 in a persistent (chronic) wound [8,9]. The cost relate to wound treatment is high
80 and may represent an important healthy issue. For instance, the treatment of
81 chronic diabetic ulcer may cost nearly US\$ 50,000 and the total cost of wound
82 treatment is over US\$25 billion per year [10,11]. There are several factors that may
83 influence wound healing process, especially: oxygenation, inflammation, infection
84 and previous diseases (diabetes) [12].

85 The treatment of wounds is complex and encompass a systemic strategy that
86 should comply to fight and avoid the several processes involved in the wound
87 progress. In this direction, the use of oxygen, for instance, have demonstrated
88 good results in both, chronic and non-chronic wounds [13]. Also, the use of
89 extracorporeal shock wave therapy (ESWT) has shown good results [14]. In

90 terms of medication, several drugs have been evaluated for wound healing, in
91 both systemic and topic application. For instance, Yang et al [15] have used
92 umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined with
93 pluronic F127 hydrogel for wound treatment with great results. On the other hand,
94 Rehman et al [16] have used gelatin-methacryloyl (GelMA) based hydrogels
95 loaded with rGO (reduced Graphene Oxide) has been used for wound therapy
96 with goo results.

97 Graphene (G) and its derivatives, including graphene quantum dots (GQDs), are
98 carbon-based nanomaterial with high mechanical resistance and stability [17–20]
99 as antimicrobial [21,22] and regenerative activity [23,24]. In terms of biomedical
100 application, GQDs shows high biocompatibility [25,26] and low toxicity
101 [17,27,28].

102 In this study, we have used graphene quantum dots as the main component
103 (matrix) of a dry powder for the treatment of wound.

104 **Methodology**

105 **Reagents and Solvents**

106 All reagents and solvents used in all experiments were purchased from Sigma-
107 Aldrich (St. Lois, MO, USA) with exception of the GQDs, which have been
108 previously produced by our laboratory.

109 **Development and Characterization of Graphene**

110 The synthesis and characterization of GQDs were comprehensively described by
111 Menezes and co-workers [29] Briefly, the electrochemical green route was used
112 to produce it. Initially, graphite rod and platinum, respectively anode and cathode,

were used in the buffer solution of citric acid/sodium citrate (Sigma-Aldrich, USA). The decomposition by electrolysis was performed using a constant current of 190 mA for 24 hours (ICEL PS-1500; Manaus, Brazil). The dispersion was filtered and dried (60 °C). Next, 50 mL of absolute ethanol was added; the upper phase (purified graphene) harvested and dried again (60 °C). These characterization methods included UV-Visible (Cary 60 UV-Vis, Agilent; Santa Clara, California, USA) (emission at 395 nm), atomic force microscopy (AFM) (Bruker, Santa Barbara, California, USA) (scan resolution of 256 x 256 lines and frequency of 0.5 Hz), fluorescence spectrophotometer (Ocean Optics HR2000, Dunedin, Florida, USA), powder X-ray diffraction (PXRD) (Bruker AXS D8, Karlsruhe, Germany) using CuK α radiation source and Raman analysis performed by a spectrometer (Horiba-Jobin-Yvon triple model T64000, Palaiseau, Ile de France, France)

Pharmaceutical Production of Graphene Quantum Dot Powder

The formulation adopted for this study was described in Table 1. The actives were weighed using an analytical balance (Shimadzu, model ATX224) and further manually homogenized using grate and pistil. Finally, the samples were packed in a polyurethane flask with a screw cap.

Table 1: Graphene Quantum Dot Dry Powder formulation.

Active Ingredients	Concentration mg
Amphotericin B	50.0
Neomycin sulfate	5,.0 mg
Zinc oxide	400.0 mg
Graphene quantum dot	5.0 mg
Excipients	1.0 g

132 **Wound-Healing Assay**

133 Cells (2×10^5 cells) were seeded in 24-well plates and allowed to attach for 24 h.
 134 Wounds were created in confluent cells using a pipette tip. Cells were then rinsed
 135 with medium to remove floating cells and debris. Then, cells were treated in the
 136 absence or presence of graphene powder (25 ug/mL, 50 ug/mL and 100 μ g/mL)
 137 for another 24 h. The culture plates were incubated at 37 °C. Wounds were
 138 measured at 0 and 24 h. The percentage of wound-healing was calculated using
 139 the equation: (percentage wound-healing) = average of ([gap length: 0 h]-[gap
 140 length: 24 h])/[gap length: 0 h].

141 ***In vivo* wound healing analysis**

142 **Ethics Approval and Consent to Participate**

143 All procedures were approved by Zona Oeste State University Animal Care and
 144 Use Committee (Rio de Janeiro, RJ, Brazil; protocol number CEUA
 145 8059100220/2021), which is consistent with United States National Institute of
 146 Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research
 147 Council, 1996).

148 **Animals**

149 Male Balb/c mice (20–30g) (n=10 animals, 5 animals per group) were maintained
 150 on a 12h-light/dark cycle with controlled temperature with food and water *ad*
 151 *libitum*.

152 **Animal Preparation**

153 Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection (ketamine 100 mg.kg-
 154 1 and xylazine 20 mg.kg-1), followed by shaving the dorsal hair with a commercial
 155 hair-removing. All animals were cleaned up with alcohol 70%.

156

157 **Wound preparation**

158 In each mouse were made four wounds with the sterile punch biopsy needle (2-
159 mm diameter). After the wound protocol, the mice were maintained with food,
160 water, and dipyrone (200mg/Kg) for pain control.

161 **Wound Healing Assay**

162 The animals were divided into two groups (figure 1) (n=5 per group): **group 1:**
163 treated animals. In this group the animals were treated daily with a regular dose
164 (200mg) of graphene dry powder formulation. The powder was applied topically
165 once a day for five consecutive days. The **group 2:** control group. In this group
166 animals received no treatment just normal physiological saline was used for
167 prevention of dryness.

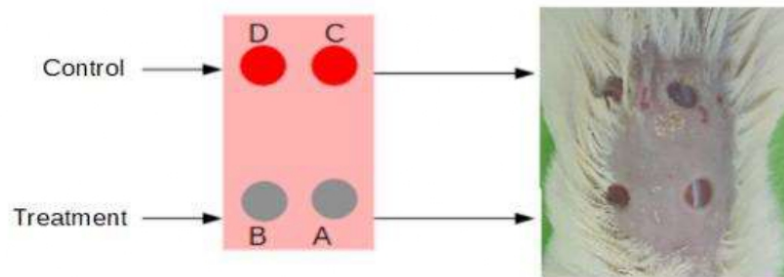


Figure 1: Wound with the muscle fascia exposure and identification of control group and the treatment group.

170 **Histological analysis of skin wound**

171 On day 7 after punch (DAP), lesions of both mice groups were collected and
172 immediately fixated in 4% buffered paraformaldehyde pH 7.4 for 24 h at 4 °C.
173 Samples were dehydrated in growing concentrations of ethanol (70–100%) for 30
174 min and washed 3 times in xylene for 30 min. Then, were individually embedded
175 in paraffin and tissues sectioned into 4 µm thick slices, stained with hematoxylin

176 and eosin (H&E). Masson's Trichromic (MT) stain was utilized to identify
 177 extracellular matrix deposit. Bright-field pictures were acquired using the LAS X
 178 Core Leica Microsystems Software, Germany.

179 **Microbiological Assay**

180 **Microorganisms and Culture Conditions**

181 Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and gram-positive
 182 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC
 183 12228) bacteria were grown in Mueller-Hinton agar (Difco, USA) for 24 h at 35 ±
 184 2°C. The yeasts *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750,
 185 *Candida krusei* MG26, *Candida glabrata* M, *Candida parapsilosis* LIP45, *Candida*
 186 *haemulonii* LIPCh2 and *Candida auris* 885 were cultured in Sabouraud dextrose
 187 agar (Difco) for 24 h at 35 ± 2°C.

188 **Antimicrobial tests**

189 The *in vitro* antimicrobial susceptibility tests similar to those reported by Pan et al
 190 [31] was carried out with few modifications. Furthermore, standardized protocols
 191 recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) using the
 192 broth microdilution technique described in the documents M07-A9 (for bacterial
 193 assays) (CLSI, 2012) and M27-A3 (for fungal assays) was also employed (CLSI,
 194 2008). The test compound was solubilized in DMSO at 5 mg/mL and used in a
 195 range from 500 to 0.48 µg/mL. Standard antimicrobials used by CLSI are as
 196 follows: ceftazidime (32 – 0.062 µg/mL), ciprofloxacin (4 – 0.007 µg/mL),
 197 fluconazole (64 – 0.062 µg/mL) and amphotericin B (16 – 0.015 µg/mL). The
 198 lowest concentration of each compound that inhibited the microbial growth, as
 199 ascertained by the absence of visible turbidity in each well, was considered the

200 minimum inhibitory concentration (MIC). The minimum bactericidal concentration
201 (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were also evaluated. After
202 determination of MIC, each well was homogenized and 10 μ L were transferred
203 onto drug-free solid medium. The plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. The
204 MBC/MFC was determined as the lowest concentration without visual growth of
205 microbial colonies.

206 **Statistical analysis**

207 All statistical analysis was performed using the Graph-Pad Prism 5.0 software
208 (GraphPad Software, San Diego, USA). Assuming normal distribution and
209 homoscedasticity of the data, differences between means from groups were
210 compared by one-way ANOVA test and confirmed by Bonferroni post-test. Values
211 of $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.005$ were considered statistically significant.

212 **Results**

213 **Wound Healing *in vitro***

214 The wound healing assay is a standard *in vitro* technique to study cell migration
215 [30]. In order to assess the potential of graphene powder to enhance fibroblast
216 (FGH) migration, a time-dependent experiment (0-24 hours) was performed, as
217 shown in figure 2. We observed a significant increase in fibroblast migration, ($* =$
218 $P < 0.05$) with the 25 $\mu\text{g/mL}$ treatment. Fibroblasts treated with 25 $\mu\text{g/mL}$
219 graphene migrated significantly ($* = P < 0.05$) compared to control (untreated)
220 cells. However, there was no significant difference between the concentrations of
221 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$. This result showed that graphene powder can increase
222 the migration of fibroblasts which indicates its wound healing property.

223

224

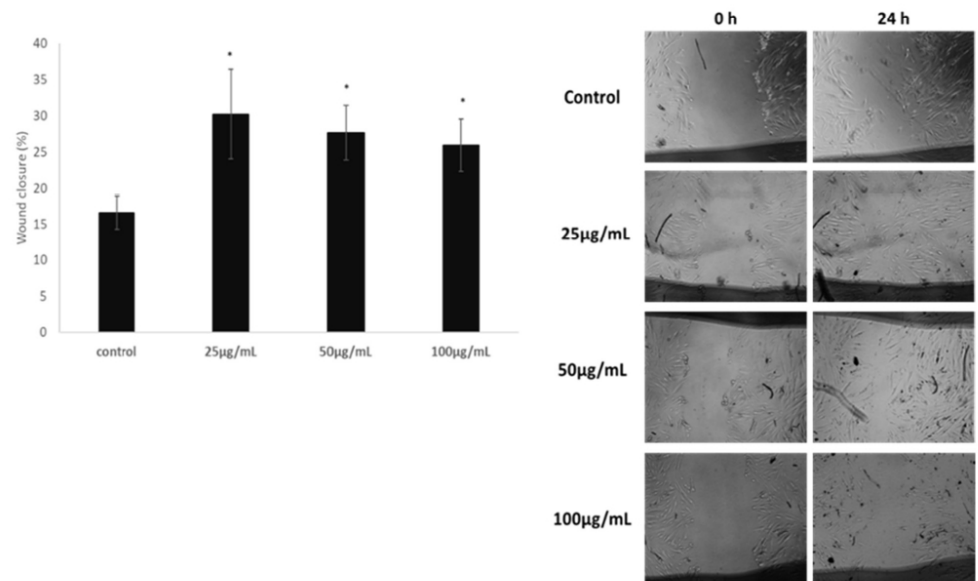


Figure 2: Effects of graphene powder FGH cells migration. FGH cells were cultured for 24 h in the absence (ctrl) or in the presence of 25 ug/mL, 50 ug/mL and 100 ug/mL of graphene powder. (* $p < 0.05$).

Wound Healing *in vivo*

The wound healing progress began with the clinical observation since day 1, with development of granulation in the tissue and dried wound in group that received treatment. In the controls wounds was possible to see inflammatory tissue and erythema (Figure 3). In the subsequent days it was observed an advanced re-epithelialization process and mature scar tissue in the wound's treatment with GQDs powder. In contrast, the control showed erythema, dermal persistent inflammation and slow development of granulation process with no re-epithelialization in five days. No infection was observed during the process. GQDs powder recovered the wound totally in 5 days with mature scar tissue confirmed in the histological analysis of skin wound.

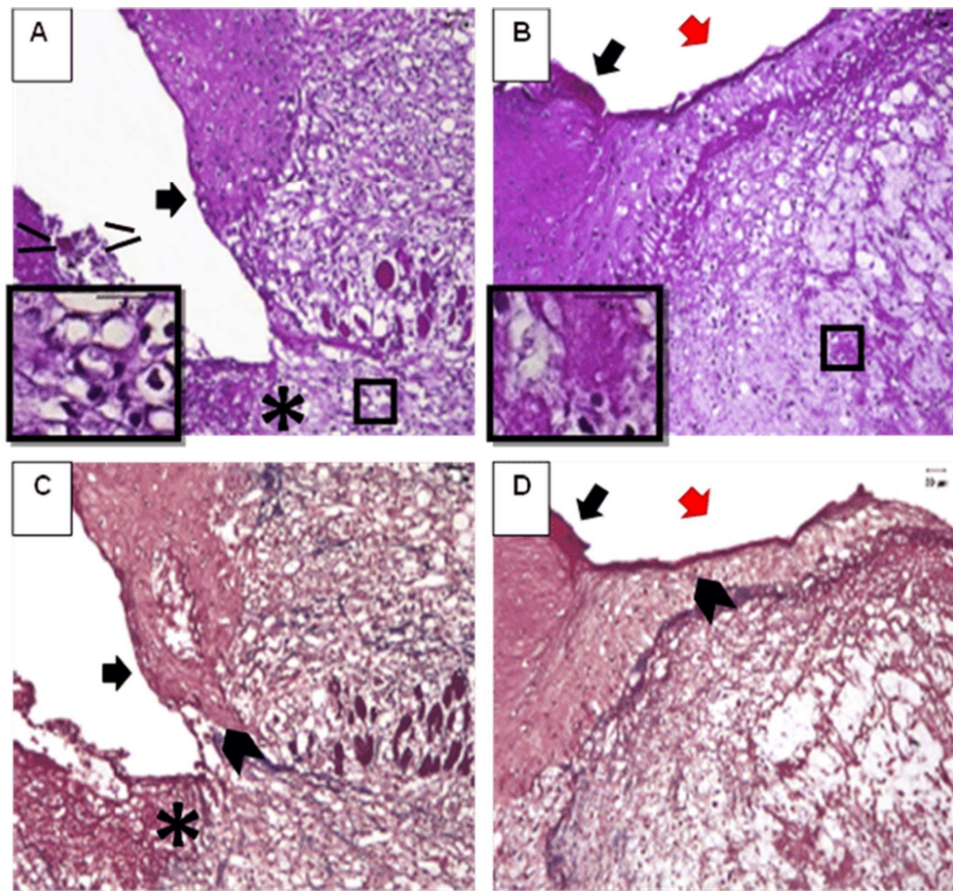


Figure 3: Evaluate healing process. D-1, excision and first day of treatment. In D-2 and D-3 (days 2 and 3 of treatment) is possible to observe granulation treatment group and erythema and inflammatory process in the group that received no treatment. Day 3 and 4 (D-3 and D-4), the re-epithelialization was evident whit with mature scar present in wound treatment and on control, persistent in inflammatory process and discrete granulation process. In day 5 (D-5) is possible to observe the complete cicatrization on the treated wound, while the untreated wound remained the same. The arrow red indicates the control and the blue arrow indicates the treatment.

238 **Histological analysis of skin wound**

239 Histopathological analyzes show that mice treated with the GQDs drying powder
240 had greater re-epithelializing capacity 7 DAP, when compared to the control
241 group. The histological structures highlighted by H&E staining demonstrate the
242 edges of untreated wounds are well defined, surrounding ulcerated areas with
243 the presence of crust/necrosis (Figure 4A). In contrast, the edges of wounds
244 treated with drying powder showed epithelial prolongations above the tissue
245 granulation, indicating re-epithelialization, and approaching the edges of the
246 lesions (Figure 4B). In both groups, a loose granulation tissue was identified, with
247 a slight deposit of extracellular matrix in a region close to the basal lamina (Figure
248 4C and D). The inflammatory infiltrate in both groups showed diffuse distribution
249 and moderate intensity.

250



251

252 **Figure 4:** Photomicrographs of wounds after 7 days. Representative images of skin tissue
 253 obtained from control (A and C) and from treatment with Graphene Quantum Dots (B and D). **A**
 254 **and B** show the histological structure of the lesion using hematoxylin and eosin stain. **C and D**
 255 show extracellular matrix (ECM) deposition evidenced by Masson's Trichromic stain. Inserts in A
 256 and B show the granulation tissue. Black arrows indicate the wound's edge. Red arrows indicate
 257 the re-epithelialization area. Black arrowhead indicates ECM deposit. Ulcerated area (*). Data
 258 are representative of four independent experiments. Magnification: A-D (100x), Inserts in A and
 259 B (X400)

260

261 **Microbial Sensibility**

262 The ability of Formulation to inhibit the growth of different classes of microorganisms
263 with both medical relevance and global perspective is summarized in Table 3. In a
264 general way, the Formulation was able to robustly inhibit the fungal growth (showing
265 MIC values ranging from 0.48 to 3.90 $\mu\text{g/mL}$), while marginally block the bacterial
266 proliferation (MICs ranging between 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$) (Table 3). The following
267 experimental approach was to check if the antimicrobial action of the Formulation was
268 related to a static or cidal effect. The Formulation showed potent fungicidal action
269 against all tested species belonging to the *Candida* genus, displaying MFC values
270 ranging from 0.97 to 3.90 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3). As expected, bactericidal effect was only
271 achieved in high Formulation concentrations (Table 3) [31–33] .

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286 **Table 3:** Antimicrobial activity of the test compounds. MIC, minimum inhibitory concentration (MIC); minimum bactericidal concentration (MBC); minimum fungicidal
 287 concentration (MFC)–, non-tested compounds
 288

Microorganisms	Test Compounds (µg/mL)									
	Formulation		Ceftazidime		Ciprofloxacin		Fluconazole		Amphotericin B	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Candida albicans</i>	0.97	1.95	–	–	–	–	64	64	0.25	0.25
<i>Candida auris</i>	3.90	3.90	–	–	–	–	32	64	2	2
<i>Candida glabrata</i>	1.95	1.95	–	–	–	–	64	64	1	4
<i>Candida haemulonii</i>	0.97	0.97	–	–	–	–	64	>64	2	2
<i>Candida krusei</i>	0.48	1.95	–	–	–	–	64	>64	0.25	0.25
<i>Candida parapsilosis</i>	1.95	1.95	–	–	–	–	4	4	1	1
<i>Candida tropicalis</i>	3.90	3.90	–	–	–	–	64	64	2	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125	500	8	32	–	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	500	–	–	0.031	0.031	–	–	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	125	125	–	–	0.062	0.062	–	–	–	–

290 Discussion

291 Wound healing is one of the most complex biological processes that occur in life.
292 Tissue repair after injury involves dynamic interactions between various cell
293 types, growth factors, inflammatory mediators and extracellular matrix (ECM)
294 components [12]. These cellular and biochemical events in wound repair can be
295 divided into: inflammatory reaction, cell proliferation and synthesis of elements of
296 the extracellular matrix and remodeling [6,34].

297 Fibroblasts are present in wound healing, from the late inflammatory phase to
298 complete epithelialization. These cells proliferate and migrate to the wound area
299 through chemo attractants produced by platelets and macrophages as part of the
300 inflammatory response [35]. Also, they are essential cells in supporting normal
301 wound healing, participating in important processes such as fibrin clot
302 breakdown, creating new extracellular matrix (ECM) and collagen structures to
303 support other associated cells in healing as well as wound contraction [36–38].

304 Here, through the wound healing assay, fibroblast migration was evaluated in the
305 presence and absence of graphene powder (Figure 1B). After 24 hours of
306 treatment, we clearly observed an increase in fibroblast migration in the presence
307 of graphene powder. This observation corroborates data in the literature. For
308 example, Thangavel et al. that observed that nanocomposite of graphene
309 accelerated wound healing in normal and diabetic rats [39]. Safina I. et al
310 demonstrated that Graphene-based 2D constructs for enhanced fibroblast
311 support [40].

312 The skin loss of integrity may lead to major disability or even death [41]. The
313 wound healing process encompass four highly integrated and overlapping
314 phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and tissue [12]. The use of

graphene, especially graphene quantum dots (GQDs) as anti-inflammatory platform has been demonstrated previously. According to Lee et al [42] GQDs, can decrease the reactive oxygen species (ROS) by delocalizing electron density in the conjugated ring structure; reducing consequently the oxidative stress. Thus, GQDs regulate ROS in proinflammatory M1 macrophages, resulting in M2 polarization of macrophages (anti-inflammatory) [43]. According to Mohammed et al [22] carbon-based nanomaterials, including GQDs have been shown to have potent antibacterial activities. Although the antimicrobial activity exist the mechanism involved in this process is intricate and complex. One of the parameters that influence the antimicrobial activity of GQDs is the number of layers that form the GQDs, higher number of layers, increase the thickness, leading a weakened "nano knife" effect, decreased dispersibility, and increased aggregation tendency, resulting in reduced contact between GQDs and microorganisms with a reduced antimicrobial effect [44]. The numbers of layers in the GQDs used was of 3nm (approximately five layers) which permits a higher interaction with microorganism resulting in a better antimicrobial effect. Finally, GQDs have demonstrated ability to be used in tissue regeneration. The GQDs have great, conformational, structural, mechanical and electronic properties [69] which stimulates cell adhesion, promotes better nutrient transport to cell, increase oxygenation and molecular transport [45]. The amphotericin B has been used for over 50 years as antimicrobial drugs against fungal disease and leishmania [46]. It is a polyene highly hydrophobic. This high hydrophobicity is the leading cause of low cutaneous penetration [47]. For that reason, the use of amphotericin B associated with a nanoparticle (nanosystem) may increase the absorption by skin and acting synergistic with GQDs avoiding microbial infection

340 [48]. For instance, Matos et al [49] have developed a topical nanoemulsion of
341 amphotericin B for local treatment of leishmania with good results. Balabathula
342 et al [50] have developed iron oxide nanoparticles encapsulated in amphotericin
343 B as a nanosystem/ drug delivery system for fungal infection with important
344 results.

345 The neomycin sulphate is an antibiotic, which belongs to the aminoglycoside
346 group [51], with a broad spectrum and high efficacy for the main bacterial
347 pathogens found in wounds [52]. It is widely used in pharmaceutical formulations,
348 mainly in creams, eye drops and ointments [53]. The main mechanism of
349 neomycin sulphate is through protein inhibition by binding irreversibly to the
350 pathogen's ribosomes in the 30S subunit. The addition of sulphate neomycin in
351 the drying power will increase the antimicrobial activity of the formulation.

352 Finally, the use of zinc oxide (ZnO) has been described to treat injuries with
353 effective healing and antimicrobial effect. In terms of nanosystems, zinc oxide
354 was used in several nanosystems to increase the antimicrobial effect. Li et al [54]
355 for instance, reported that ZnO nanoparticles increased the antibiotics effect, as
356 the permeability and the synergism with other antimicrobials.

357 **Conclusion**

358 The study demonstrated that graphene quantum dots could be used with
359 dermatopharmacy (dermatopharmacology) purposes. The results support the
360 application of graphene quantum dots in the formulation of skin wound-healing
361 products, since the presence of graphene quantum dots increased the
362 antimicrobial as the wound healing process.

363 Finally, and although preliminary, these results open new opportunities for the
364 use of graphene quantum dots as their derivatives, in biomedical field.

365 **Novelty Statement**

366 This is the first study using GQDs as drug in a cutaneous formulation.

367 **ETHICAL STATEMENT**

368 **Ethics approval and consent to participate**

369 All procedures were approved by Zona Oeste State University Animal Care and
370 Use Committee (Rio de Janeiro, RJ, Brazil; protocol number CEUA
371 8059100220/2021), which is consistent with United States National Institute of
372 Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research
373 Council, 1996).

374 **Consent for publication**

375 All authors are in accordance with the publication of this material

376 **Availability of data and materials**

377 All data will be available under request.

378 **Competing interests**

379 All authors declare no conflict of interest

380 **Funding**

381 This study was funded by Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support
382 of Rio de Janeiro State (FAPERJ) (Cientista do Nosso Estado: E-
383 26/200.815/2021; Rede NanoSaude: E-26/010.000981/2019, Pesquisa na
384 UEZO: E-26/010.002362/2019; Temáticos: E-26/211.269/2021, Infraestrutura e
385 Pesquisa na UEZO e UERJ: E-26//211.207/2021, Bolsa de Pós Doutorado

386 Senior (PDS): E-26/202.320/2021) CNPq (Bolsa de Produtividade 1B:
387 301069/2018-2) to Ralph Santos-Oliveira.

388 **Authors' contributions**

389 **Vanessa Gonzalez Ferreira Caminha Martins:** Conceptualization, Methodology,
390 Formal analysis, Investigation, Data Curation. **Luciana Magalhaes Rebelo Alencar:**
391 Formal analysis, Software, Validation. **Pedro Filho Noronha Souza:** Formal analysis,
392 Investigation, Resources, Data Curation. **Carolinne Margot Albanez Lorentino:**
393 Methodology, Software, Validation, Formal analysis. **Heloisa Freire Frota:**
394 Methodology, Software, Validation, Formal analysis. **Andre Luis Souza dos Santos:**
395 Conceptualization, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Writing - Original
396 Draft. **Sara Gemini-Piperni:** Methodology, Software, Validation, Formal
397 analysis. **Veronica Morandi:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Funding
398 acquisition, Writing - Original Draft. **Vinicius Gonçalves Rodrigues:** Methodology,
399 Software, Validation, Formal analysis. **Jonathas Xavier Pereira:** Methodology,
400 Software, Validation, Formal analysis. **Eduardo Ricci-Junior:** Conceptualization,
401 Methodology, Investigation, Funding acquisition, Writing - Original Draft. **Aline Oliveira**
402 **da Silva de Barros:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation,
403 Resources, Data Curation, Visualization, Supervision, **Ralph Santos-Oliveira:**
404 Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation,
405 Resources, Data Curation, Visualization, Supervision, Funding acquisition, Writing -
406 Original Draft

407 **Acknowledgements**

408 This study was funded by Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support
409 of Rio de Janeiro State (FAPERJ) (Cientista do Nosso Estado: E-
410 26/200.815/2021; Rede NanoSaude: E-26/010.000981/2019, Pesquisa na
411 UEZO: E-26/010.002362/2019; Temáticos: E-26/211.269/2021, Infraestrutura e
412 Pesquisa na UEZO e UERJ: E-26//211.207/2021, Bolsa de Pós Doutorado
413 Senior (PDS): E-26/202.320/2021) CNPq (Bolsa de Produtividade 1B:
414 301069/2018-2) to Ralph Santos-Oliveira.

417 **References**

- 418 1. Tottoli EM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. Skin wound
419 healing process and new emerging technologies for skin wound care and
420 regeneration. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):1–30.
- 421 2. Karimi K, Odhav A, Kollipara R, Fike J, Stanford C, Hall JC. Acute

- 422 cutaneous necrosis: A guide to early diagnosis and treatment. *J Cutan*
 423 *Med Surg.* 2017;21(5):425–37.
- 424 3. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE,
 425 Rodeheaver G, et al. Definitions and Guidelines for Assessment of
 426 Wounds and Evaluation of Healing. *Arch Dermatol.* 1994;130(4):489–93.
- 427 4. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in
 428 wound healing: A review of the literature. *Dermatologic Surg.*
 429 2008;34(9):1159–69.
- 430 5. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound
 431 healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):614–20.
- 432 6. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: An overview of
 433 the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528–
 434 42.
- 435 7. Nalinda B. Wasala¹, Shi-jie Chen^{2,3} DD. 乳鼠心肌提取 HHS Public
 436 Access. *Physiol Behav.* 2016;176(1):100–106.
- 437 8. Brocke T, Barr J. The History of Wound Healing. *Surg Clin North Am.*
 438 2020 Aug 1;100(4):787–806.
- 439 9. Abbasi S, Sinha S, Labit E, Rosin NL, Yoon G, Rahmani W, et al. Distinct
 440 Regulatory Programs Control the Latent Regenerative Potential of Dermal
 441 Fibroblasts during Wound Healing. *Cell Stem Cell* [Internet].
 442 2020;27(3):396–412.e6. Available from:
 443 <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.07.008>
- 444 10. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current

- 445 Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599–610.
- 446 11. Murphy PS, Evans GRD. Advances in Wound Healing: A Review of
447 Current Wound Healing Products. *Plast Surg Int.* 2012;2012:1–8.
- 448 12. Guo S, DiPietro LA. Critical review in oral biology & medicine: Factors
449 affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219–29.
- 450 13. Kimmel HM, Grant A, Ditata J. The presence of oxygen in wound healing.
451 *Wounds.* 2016;28(8):264–70.
- 452 14. Omar MTA, Gwada RFM, Shaheen AAM, Saggini R. Extracorporeal
453 shockwave therapy for the treatment of chronic wound of lower extremity:
454 current perspective and systematic review. *Int Wound J.* 2017;14(6):898–
455 908.
- 456 15. Yang J, Chen Z, Pan D, Li H, Shen J. Umbilical cord-derived
457 mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127
458 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin
459 regeneration. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:5911–26.
- 460 16. Ur Rehman SR, Augustine R, Zahid AA, Ahmed R, Tariq M, Hasan A.
461 Reduced graphene oxide incorporated gelma hydrogel promotes
462 angiogenesis for wound healing applications. *Int J Nanomedicine.*
463 2019;14:9603–17.
- 464 17. Zhao C, Song X, Liu Y, Fu Y, Ye L, Wang N, et al. Synthesis of graphene
465 quantum dots and their applications in drug delivery. Vol. 18, *Journal of*
466 *Nanobiotechnology.* 2020. 1–32 p.
- 467 18. Troncoso OP, Torres FG. Bacterial cellulose—graphene based

- 468 nanocomposites. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):1–17.
- 469 19. Chung S, Revia RA, Zhang M. Graphene Quantum Dots and Their
470 Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy. *Adv Mater.*
471 2021;33(22):1–26.
- 472 20. Samples N. applied sciences Mechanical Properties of Green
473 Synthesized Graphene. 2021;
- 474 21. Pandit S, Gaska K, Kádár R, Mijakovic I. Graphene-Based Antimicrobial
475 Biomedical Surfaces. *ChemPhysChem.* 2021;22(3):250–63.
- 476 22. Mohammed H, Kumar A, Bekyarova E, Al-Hadeethi Y, Zhang X, Chen M,
477 et al. Antimicrobial Mechanisms and Effectiveness of Graphene and
478 Graphene-Functionalized Biomaterials. A Scope Review. *Front Bioeng*
479 *Biotechnol.* 2020;8(May).
- 480 23. Bellet P, Gasparotto M, Pressi S, Fortunato A, Scapin G, Mba M, et al.
481 Graphene-based scaffolds for regenerative medicine. *Nanomaterials.*
482 2021;11(2):1–41.
- 483 24. Kenry, Lee WC, Loh KP, Lim CT. When stem cells meet graphene:
484 Opportunities and challenges in regenerative medicine. *Biomaterials.*
485 2018;155:236–50.
- 486 25. Iannazzo D, Celesti C, Espro C. Recent Advances on Graphene Quantum
487 Dots as Multifunctional Nanoplatfoms for Cancer Treatment. *Biotechnol*
488 *J.* 2021;16(2):1–41.
- 489 26. Kortel M, Mansuriya BD, Santana NV, Altintas Z. Graphene quantum dots
490 as flourishing nanomaterials for bio-imaging, therapy development, and

- 491 micro-supercapacitors. *Micromachines*. 2020;11(9).
- 492 27. Mondal MK, Mukherjee S, Joardar N, Roy D, Chowdhury P, Sinha Babu
493 SP. Synthesis of smart graphene quantum dots: A benign biomaterial for
494 prominent intracellular imaging and improvement of drug efficacy. *Appl*
495 *Surf Sci* [Internet]. 2019;495(July):143562. Available from:
496 <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.143562>
- 497 28. Fasbender S, Zimmermann L, Cadeddu RP, Luysberg M, Moll B, Janiak
498 C, et al. The Low Toxicity of Graphene Quantum Dots is Reflected by
499 Marginal Gene Expression Changes of Primary Human Hematopoietic
500 Stem Cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
- 501 29. de Menezes FD, dos Reis SRR, Pinto SR, Portilho FL, do Vale Chaves e
502 Mello F, Helal-Neto E, et al. Graphene quantum dots unraveling: Green
503 synthesis, characterization, radiolabeling with ^{99m}Tc, in vivo behavior
504 and mutagenicity. *Mater Sci Eng C*. 2019 Sep 1;102:405–14.
- 505 30. Ilina O, Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J*
506 *Cell Sci*. 2009;122(18):3203–8.
- 507 31. Pan X, Zheng Y, Chen R, Qiu S, Chen Z, Rao W, et al. Cocrystal of
508 Sulfamethazine and p-Aminobenzoic Acid: Structural Establishment and
509 Enhanced Antibacterial Properties. *Cryst Growth Des*. 2019;19(4):2455–
510 60.
- 511 32. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That
512 Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32. 2012.
- 513 33. Clinical ALSI. Document M27-A4. Ref Method Broth Dilution Antifung

- 514 Suscetibility Test Yeasts. 2012;
- 515 34. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and
516 regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314–21.
- 517 35. Desjardins-Park HE, Foster DS, Longaker MT. Fibroblasts and wound
518 healing: An update. *Regen Med*. 2018;13(5):491–5.
- 519 36. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound
520 healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998–1008.
- 521 37. Forrest L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *Br J*
522 *Surg*. 1983;70(3):133–40.
- 523 38. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic
524 reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen*.
525 2011;19(2):134–48.
- 526 39. Thangavel P, Kannan R, Ramachandran B, Moorthy G, Suguna L,
527 Muthuvijayan V. Development of reduced graphene oxide (rGO)-isabgol
528 nanocomposite dressings for enhanced vascularization and accelerated
529 wound healing in normal and diabetic rats [Internet]. Vol. 517, *Journal of*
530 *Colloid and Interface Science*. Elsevier Inc.; 2018. 251–264 p. Available
531 from: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.01.110>
- 532 40. Safina I, Bourdo SE, Algazali KM, Kannarpady G, Watanabe F, Vang KB,
533 et al. Graphene-based 2D constructs for enhanced fibroblast support.
534 *PLoS One* [Internet]. 2020;15(5):1–16. Available from:
535 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0232670>
- 536 41. Singer AJ, Clark RAF. Epstein1999_Woundhealing. *N Engl J Med*. 1999;

- 537 42. Lee BC, Lee JY, Kim J, Yoo JM, Kang I, Kim JJ, et al. Graphene quantum
538 dots as anti-inflammatory therapy for colitis. *Sci Adv.* 2020;6(18):1–14.
- 539 43. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization:
540 Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs.
541 Alternatively activated macrophages. *Front Immunol.* 2019;10(MAY):1–
542 14.
- 543 44. Zou X, Zhang L, Wang Z, Luo Y. Mechanisms of the Antimicrobial
544 Activities of Graphene Materials. *J Am Chem Soc.* 2016;138(7):2064–77.
- 545 45. Shin SR, Li YC, Jang HL, Khoshakhlagh P, Akbari M, Nasajpour A, et al.
546 Graphene-based materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*
547 [Internet]. 2016;105:255–74. Available from:
548 <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.007>
- 549 46. Richter AR, Carneiro MJ, de Sousa NA, Pinto VPT, Freire RS, de Sousa
550 JS, et al. Self-assembling cashew gum-graft-poly lactide copolymer
551 nanoparticles as a potential amphotericin B delivery matrix. *Int J Biol*
552 *Macromol* [Internet]. 2020;152:492–502. Available from:
553 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.166>
- 554 47. Jackson J, Pandey R, Schmitt V. Part 1. Evaluation of Epigallocatechin
555 Gallate or Tannic Acid Formulations of Hydrophobic Drugs for Enhanced
556 Dermal and Bladder Uptake or for Local Anesthesia Effects. *J Pharm Sci*
557 [Internet]. 2021;110(2):796–806. Available from:
558 <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.10.001>
- 559 48. Janout V, Bienvenu C, Schell W, Perfect JR, Regen SL. Molecular
560 Umbrella – Amphotericin B Conjugates. 2015;(C).

- 561 49. dos Santos Matos AP, Lopes DCDXP, Peixoto MLH, da Silva Cardoso V,
562 Vermelho AB, Santos-Oliveira R, et al. Development, characterization,
563 and anti-leishmanial activity of topical amphotericin B nanoemulsions.
564 Drug Deliv Transl Res. 2020;10(6):1552–70.
- 565 50. Balabathula P, Whaley SG, Janagam DR, Mittal NK, Mandal B, Thoma
566 LA, et al. Lyophilized iron oxide nanoparticles encapsulated in
567 amphotericin B: A novel targeted nano drug delivery system for the
568 treatment of systemic fungal infections. Pharmaceutics. 2020;12(3).
- 569 51. Citation NLM, Database L, Library N, Url B. Drug Levels And Effects
570 Effects In Breastfed Infants Effects On Lactation And Breastmilk
571 Substance Identification Substance Name. 2018;(Md):1–3.
- 572 52. Heal CF, van Driel ML, Lepper PD, Banks JL. Topical antibiotics for
573 preventing surgical site infection in wounds healing by primary intention.
574 Cochrane Database Syst Rev. 2014;2014(12).
- 575 53. Singh M, Jonnalagadda S. Design and characterization of 3D printed,
576 neomycin-eluting poly-L-lactide mats for wound-healing applications. J
577 Mater Sci Mater Med [Internet]. 2021;32(4):1–13. Available from:
578 <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-021-06509-7>
- 579 54. Balduit A, Mangogna A, Agostinis C, Zito G, Romano F, Ricci G, et al.
580 Zinc oxide exerts anti-inflammatory properties on human placental cells.
581 Nutrients. 2020;12(6):1–11.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nessa dissertação, os resultados apresentados demonstram que a formulação de pó secante composta em sua parte com GQDS, anfotericina B, sulfato de neomicina e óxido de zinco se mostrou eficiente no tratamento de feridas.

5 BIBLIOGRAFIA

- ABAZARI, Mohammad Foad e colab. **Recent advances in cellulose-based structures as the wound-healing biomaterials: A clinically oriented review.** Applied Sciences (Switzerland), v. 11, n. 17, 2021.
- AGYARE, Christian e colab. **Review: African medicinal plants with wound healing properties.** Journal of Ethnopharmacology, v. 177, p. 85–100, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.008>>.
- ALAM, Wahila e HASSON, Jonathan e REED, May. **Clinical approach to chronic wound management in older adults.** Journal of the American Geriatrics Society, v. 69, n. 8, p. 2327–2334, 2021.
- ALVEN, Sibusiso e ADERIBIGBE, Blessing Atim. **Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management.** International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 24, p. 1–30, 2020.
- ANISUZZAMAN, D. M. e colab. **Wound Severity Classification using Deep Neural Network.** 2022. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/2204.07942>>.
- APARECIDA, Patrícia e SILVA, Barbosa e SOARES, Sônia Maria. **Fatores associados à cicatrização de feridas cirúrgicas complexa mamária e abdominal : estudo de coorte retrospectivo Introdução Método da morbidade , mortalidade e custos para os sistemas.** 2016.
- ASCHNER, Pablo. **New IDF clinical practice recommendations for managing type 2 diabetes in primary care.** [S.l: s.n.], 2017. v. 132.
- AZEVEDO, Maria Manuel e colab. **Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: An intricate interrelationship.** British Journal of Nursing, v. 29, n. 5, p. S6–S13, 2020.
- BELLET, Pietro e colab. **Graphene-based scaffolds for regenerative medicine.** Nanomaterials, v. 11, n. 2, p. 1–41, 2021.
- BERGANT SUHODOLČAN, Aleksandra e LUZAR, Boštjan e KECELJ LESKOVEC, Nada. **Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2, but not COX-2 serve as additional predictors for chronic venous ulcer healing.** Wound Repair and Regeneration, v. 29, n. 5, p. 725–731, 2021.
- BLANCO-FERNANDEZ, Barbara e colab. **Nanotechnology Approaches in Chronic Wound Healing.** Advances in Wound Care, v. 10, n. 5, p. 234–256, 2021.
- BOLLAG, Wendy B e colab. **Aquaporin-3 in the epidermis: more than skin deep.** Am J Physiol Cell Physiol, v. 318, p. 1144–1153, 2020. Disponível em: <www.ajpcell.org>.
- BONAR, Emilia e colab. **Human skin microbiota-friendly lysostaphin.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 183, p. 852–860, 2021.
- BONIFANT, Hilary e HOLLOWAY, Samantha. **A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing.** British Journal of Community Nursing, v. 24, n. March, p. S28–S33, 2019.
- BOWERS, Steven e FRANCO, Eginia. **Chronic wounds: Evaluation and management.** American Family Physician, v. 101, n. 3, p. 159–166, 2020.
- BOXBERGER, Manon e colab. **Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome.** Microbiome, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2021.
- BROUGHTON, George e JANIS, Jeffrey E. e ATTINGER, Christopher E. **Wound healing: An overview.** Plastic and Reconstructive Surgery, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 1–32, 2006.
- BRUMBERG, Valentin e colab. **Modern wound dressings: Hydrogel dressings.** Biomedicines, v. 9, n. 9, 2021.
- BYRD, Allyson L. e BELKAID, Yasmine e SEGRE, Julia A. **The human skin microbiome.** Nature Reviews Microbiology, v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>>.

- CAMPBELL, E. e colab. Doped Graphene Quantum Dots for Intracellular Multicolor Imaging and Cancer Detection. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, [s.l.], v. 5, no 9, p. 4671–4682, 2019. ISSN: 23739878, DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b00603.
- CARBINATTO, Fernanda Mansano e colab. **Photonic technology for the treatments of venous and arterial ulcers: Case report**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 22, n. August 2017, p. 39–41, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.02.011>>.
- CARRADORI, Simone e colab. **Biofilm and Quorum Sensing inhibitors: the road so far**. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 30, n. 12, p. 917–930, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1830059>>.
- CHHABRA, Shruti e colab. **Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS**. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, v. 16, n. 4, p. 403–423, 2017.
- CHUNG, Seokhwan e REVIA, Richard A. e ZHANG, Miqin. **Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy**. *Advanced Materials*, v. 33, n. 22, 2021a.
- CHUNG, Seokhwan e REVIA, Richard A. e ZHANG, Miqin. **Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy**. *Advanced Materials*, v. 33, n. 22, p. 1–26, 2021b.
- CLARK, Rya K. e colab. **Evaluating the impact of using a wound-specific oral nutritional supplement to support wound healing in a rehabilitation setting**. *International Wound Journal*, n. March, p. 1–10, 2022.
- CUBAS, Marcia Regina e colab. **Pé diabético: orientações e conhecimento sobre cuidados preventivos**. *Fisioterapia em Movimento*, v. 26, n. 3, p. 647–655, 2013.
- DAI, Christina e SHIH, Shawn e KHACHEMOUNE, Amor. **Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review**. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 31, n. 6, p. 639–648, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>>.
- DARVISHI, Sorour e colab. **Advances in the Sensing and Treatment of Wound Biofilms**. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 61, n. 13, 2022.
- DE MENEZES, Frederico Duarte e colab. **Using graphene quantum dots for treating radioactive liquid waste**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 3, p. 3508–3512, 2020.
- DE OLIVEIRA, Beatriz G.R.B. e colab. **Epidermal growth factor vs platelet-rich plasma: Activity against chronic wound microbiota**. *International Wound Journal*, v. 16, n. 6, p. 1408–1415, 2019.
- DÍEZ-PASCUAL, A.M. **Development of Graphene-Based Polymeric Nanocomposites: A Brief Overview**. *Polymers* 2021, 13, 2978. <https://doi.org/10.3390/polym13172978>
- DORANTES, Luis e AYALA, Mara. **Skin acute wound healing: A comprehensive review**. *International Journal of Inflammation*, v. 2019, n. 1, p. 1–15, 2019.
- DOS REIS, Sara Rhaissa Rezende e colab. **Senescence and the Impact on Biodistribution of Different Nanosystems: the Discrepancy on Tissue Deposition of Graphene Quantum Dots, Polycaprolactone Nanoparticle and Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles in Young and Elder Animals**. *Pharmaceutical Research*, v. 37, n. 3, 2020.
- DUNKLE, Jack A. e colab. **Molecular recognition and modification of the 30S ribosome by the aminoglycoside-resistance methyltransferase NpmA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 17, p. 6275–6280, 2014.
- EGERT, M. e SIMMERING, R. e RIEDEL, C. U. **The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease**. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 102, n. 1, p. 62–69, 2017.
- ELLIS, Samantha e LIN, Elaine J. e TARTAR, Danielle. **Immunology of Wound Healing**. *Current Dermatology Reports*, v. 7, n. 4, p. 350–358, 2018.

- ERIN CHEN, Y. e FISCHBACH, Michael A. e BELKAID, Yasmine. **Skin microbiota-host interactions**. *Nature*, v. 553, n. 7689, p. 427–436, 2018a.
- ERIN CHEN, Y. e FISCHBACH, Michael A. e BELKAID, Yasmine. **Skin microbiota-host interactions**. *Nature*, v. 553, n. 7689, p. 427–436, 2018b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature25177>>.
- EVELHOCH, Steven R. **Biofilm and Chronic Nonhealing Wound Infections**. *Surgical Clinics of North America*, v. 100, n. 4, p. 727–732, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.05.004>>.
- FASBENDER, Stefan e colab. **The Low Toxicity of Graphene Quantum Dots is Reflected by Marginal Gene Expression Changes of Primary Human Hematopoietic Stem Cells**. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- FELIX, Daniele Mendes e colab. **Graphene quantum dots decorated with imatinib for leukemia treatment**. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 61, n. May, p. 1–7, 2021.
- FLETCHER, Jacqui. **Surgical Wounds**. *Lower Extremity Wounds: A Problem-Based Learning Approach*, p. 139–160, 2008.
- FLOWERS, Laurice e GRICE, Elizabeth A. **The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward**. *Cell Host and Microbe*, v. 28, n. 2, p. 190–200, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017>>.
- GAZZARUSO, Carmine e colab. **Predictors of healing, ulcer recurrence and persistence, amputation and mortality in type 2 diabetic patients with diabetic foot: a 10-year retrospective cohort study**. *Endocrine*, v. 71, n. 1, p. 59–68, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12020-020-02431-0>>.
- GHOMI, Erfan Rezvani e colab. **Innovations in Drug Delivery for Chronic Wound Healing**. *Current Pharmaceutical Design*, v. 28, n. 5, p. 340–351, 2021.
- GOENKA, Sumit e SANT, Vinayak e SANT, Shilpa. **Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering**. *Journal of Controlled Release*, v. 173, n. 1, p. 75–88, 2014.
- GRAVES, N. e PHILLIPS, C. J. e HARDING, K. **A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds**. *British Journal of Dermatology*, p. 141–148, 2021.
- HAFTEK, Marek e ABDAYEM, Rawad e GUYONNET-DEBERSAC, Pascale. **Skin Minerals: Key Roles of Inorganic Elements in Skin Physiological Functions**. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI. , 1 Jun 2022
- HAN, George e CEILLEY, Roger. **Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments**. *Advances in Therapy*, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.
- HEADLAM, John e ILLSLEY, Amy. **Pressure ulcers: An overview**. *British Journal of Hospital Medicine*, v. 81, n. 12, p. 1–9, 2020.
- HUSSEIN, Kamal Hany e colab. **Ultrasonicated graphene oxide enhances bone and skin wound regeneration**. *Materials Science and Engineering C*, v. 94, n. July 2018, p. 484–492, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.051>>.
- IANNAZZO, Daniela e CELESTI, Consuelo e ESPRO, Claudia. **Recent Advances on Graphene Quantum Dots as Multifunctional Nanoplatfoms for Cancer Treatment**. *Biotechnology Journal*, v. 16, n. 2, p. 1–41, 2021.
- JÄRBRINK, Krister e colab. **Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: A protocol for a systematic review**. *Systematic Reviews*, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13643-016-0329-y>>.
- JAUL, Efraim e colab. **An overview of co-morbidities and the development of pressure ulcers among older adults**. *BMC Geriatrics*, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.
- Ji H, Sun H, Qu X. **Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent achievements and challenges**. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Oct 1;105(Pt B):176-189. doi:

- 10.1016/j.addr.2016.04.009. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27129441.
- KENRY e colab. **When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine.** *Biomaterials*, v. 155, p. 236–250, 2018.
- KHANNA, Kushagra e colab. **A Comparative Study of Chitosan Gel and Soframycin in the Management of Wounds.** *International Journal of Lower Extremity Wounds*, v. 19, n. 2, p. 148–157, 2020.
- KORTEI, Merve e colab. **Graphene quantum dots as flourishing nanomaterials for bio-imaging, therapy development, and micro-supercapacitors.** *Micromachines*, v. 11, n. 9, 2020.
- KOTTNER, Jan e colab. **Pressure ulcer/injury classification today: An international perspective.** *Journal of Tissue Viability*, v. 29, n. 3, p. 197–203, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtv.2020.04.003>>.
- Kumar P, Huo P, Zhang R, Liu B. **Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials.** *Nanomaterials (Basel)*. 2019 May 13;9(5):737. doi: 10.3390/nano9050737. PMID: 31086043; PMCID: PMC6567318.
- LANDÉN, Ning Xu e LI, Dongqing e STÅHLE, Mona. **Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 2016.
- LAZARUS, Gerald S. e colab. **Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing.** *Archives of Dermatology*, v. 130, n. 4, p. 489–493, 1994.
- LEE, Byung Chul e colab. **Graphene quantum dots as anti-inflammatory therapy for colitis.** *Science Advances*, v. 6, n. 18, 2020a.
- LEE, Byung Chul e colab. **Graphene quantum dots as anti-inflammatory therapy for colitis.** *Science Advances*, v. 6, n. 18, p. 1–14, 2020b.
- LOSQUADRO, William D. **Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer.** *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.
- MAGNE, Tais Monteiro e colab. **Graphene and its derivatives: understanding the main chemical and medicinal chemistry roles for biomedical applications.** [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40097-021-00444-3>>.
- MAHADIK, Kasturi e colab. **Deregulated AUF1 Assists BMP-EZH2-Mediated Delayed Wound Healing during Candida albicans Infection.** *The Journal of Immunology*, v. 201, n. 12, p. 3617–3629, 2018.
- MCLOUGHLIN, Isabella J. e colab. **Skin Microbiome—The Next Frontier for Probiotic Intervention.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 14, n. 4, p. 630–647, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09824-1>>.
- MEDEIROS, Aldo Cunha e DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. **Cicatrização das feridas cirúrgicas.** *Journal of Surgical and Clinical Research*, v. 7, n. 2, p. 87, 2017.
- MEHL, Adriano Antonio e colab. **Measurement of wound area for early analysis of the scar predictive factor.** *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 28, p. 1–9, 2020.
- MESTRALLET, Guillaume e colab. **Skin Immunity and Tolerance: Focus on Epidermal Keratinocytes Expressing HLA-G.** *Frontiers in Immunology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A., 6 Dez 2021
- MIHAI, Mara Mădălina e colab. **Nanocoatings for chronic wound repair—modulation of microbial colonization and biofilm formation.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, 2018a.
- MIHAI, Mara Mădălina e colab. **Nanocoatings for Chronic Wound Repair—Modulation of Microbial Colonization and Biofilm Formation.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 1179, 12 Abr 2018b. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1179>>. Acesso em: 17 maio 2022.
- MIKOLAJCZYK, R. e ROESNER, L. M. **General aspects regarding the skin microbiome.**

- Hautarzt, v. 70, n. 6, p. 400–406, 2019.
- MILOSAVLJEVIC, Vedran e MITREVSKA, Katerina e ADAM, Vojtech. **Benefits of oxidation and size reduction of graphene/graphene oxide nanoparticles in biosensing application: Classification of graphene/graphene oxide nanoparticles.** Sensors and Actuators B: Chemical, v. 353, n. August 2021, p. 131122, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131122>>.
- MOFAZZAL JAHROMI, Mirza Ali e colab. **Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 123, p. 33–64, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.001>>.
- MOHAMED, Sarah A. e HARGEST, Rachel. **Surgical anatomy of the skin.** Surgery (United Kingdom), v. 40, n. 1, p. 1–7, 2022.
- MOHAMMAD REZA, Shakibaie. **Bacterial Biofilm and its Clinical Implications.** Annals of Microbiology and Research, v. 2, n. 1, p. 45–50, 2018.
- MOHAMMED, Hiba e colab. **Antimicrobial Mechanisms and Effectiveness of Graphene and Graphene-Functionalized Biomaterials. A Scope Review.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 8, n. May, 2020.
- MONDAL, Maloy Kr e colab. **Synthesis of smart graphene quantum dots: A benign biomaterial for prominent intracellular imaging and improvement of drug efficacy.** Applied Surface Science, v. 495, n. July, p. 143562, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.143562>>.
- MONIKA, Prakash e colab. **Myofibroblast progeny in wound biology and wound healing studies.** [S.l.: s.n.], 2021. v. 29.
- MOUSAVI, Seyyed Mojtaba e colab. **Recent Advances in Inflammatory Diagnosis with Graphene Quantum Dots Enhanced SERS Detection.** Biosensors, v. 12, n. 7, 2022.
- MSSILLOU, Ibrahim e colab. **Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds : A review.** Journal of Ethnopharmacology, v. 298, n. May, p. 115663, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115663>>.
- MUTSCHLER, W. **Physiologie und pathophysiologie der heilung von defektwunden.** Unfallchirurg, v. 115, n. 9, p. 767–773, 2012.
- NIEDERSTÄTTER, Ines Maria e SCHIEFER, Jennifer Lynn e FUCHS, Paul Christian. **Surgical Strategies to Promote Cutaneous Healing.** Medical Sciences, v. 9, n. 2, p. 45, 2021.
- OLIVEIRA, André e colab. **Therapeutic advances in wound healing.** Journal of Dermatological Treatment, v. 33, n. 1, p. 2–22, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09546634.2020.1730296>>.
- OMAR, Amin e colab. **Microbial biofilms and chronic wounds.** Microorganisms, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2017.
- PANDIT, Santosh e colab. **Graphene-Based Antimicrobial Biomedical Surfaces.** ChemPhysChem, v. 22, n. 3, p. 250–263, 2021.
- PASTAR, Irena e colab. **Interactions of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in Polymicrobial Wound Infection.** PLoS ONE, v. 8, n. 2, p. 1–11, 2013.
- PHALAK, P. e HENSON, M. A. **Metabolic modelling of chronic wound microbiota predicts mutualistic interactions that drive community composition.** Journal of Applied Microbiology, v. 127, n. 5, p. 1576–1593, 2019.
- PISSARENKO, Andrei e RUESTES, Carlos J. e MEYERS, Marc A. **Constitutive description of skin dermis: Through analytical continuum and coarse-grained approaches for multi-scale understanding.** Acta Biomaterialia, v. 106, p. 208–224, 2020.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.026>>.

POWERS, Jennifer G. e colab. **Wound healing and treating wounds Chronic wound care and management.** Journal of the American Academy of Dermatology, v. 74, n. 4, p. 607–625, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.070>>.

PRESCOTT, Susan L. e colab. **The skin microbiome: Impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming.** World Allergy Organization Journal, v. 10, n. 1, p. 29, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40413-017-0160-5>>.

PRESCOTT, Susan L. e colab. **The skin microbiome: Impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming.** World Allergy Organization Journal, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2017b.

PULINGAM, T. e colab. **Synergistic antibacterial actions of graphene oxide and antibiotics towards bacteria and the toxicological effects of graphene oxide on human epidermal keratinocytes.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, [s.l.], v. 142, 2020. ISSN: 18790720, DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105087.

PUNJATAEWAKUPT, Apirujee e NAPAICHAYANUN, Supamas e ARAMWIT, Pornanong. **The downside of antimicrobial agents for wound healing.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 38, n. 1, p. 39–54, 2019.

QI, Liangfa e colab. **Progress in Hydrogels for Skin Wound Repair.** Macromolecular Bioscience, v. 2100475, p. 1–20, 2022.

QING, Chun. **The molecular biology in wound healing & non-healing wound.** Chinese Journal of Traumatology - English Edition, v. 20, n. 4, p. 189–193, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjtee.2017.06.001>>.

QING, Chun. **The molecular biology in wound healing & non-healing wound.** Chinese Journal of Traumatology - English Edition, v. 20, n. 4, p. 189–193, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjtee.2017.06.001>>.

RAJENDRAN, Naresh Kumar e colab. **A review on nanoparticle based treatment for wound healing.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 44, p. 421–430, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.009>>.

RAZIYEVA, Kamila e colab. **Immunology of acute and chronic wound healing.** Biomolecules, v. 11, n. 5, p. 1–25, 2021.

REZAIE, Fahimeh e MOMENI-MOGHADDAM, Madjid e NADERI-MESHKIN, Hojjat. **Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment.** International Journal of Lower Extremity Wounds, v. 18, n. 3, p. 247–261, 2019.

REZVANI GHOMI, Erfan e colab. **Wound dressings: Current advances and future directions.** Journal of Applied Polymer Science, v. 136, n. 27, p. 1–12, 2019.

RICHTER, Ana Rosa e colab. **Self-assembling cashew gum-graft-poly(lactide) copolymer nanoparticles as a potential amphotericin B delivery matrix.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 152, p. 492–502, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.166>>.

RIPPA, Alexandra L. e KALABUSHEVA, Ekaterina P. e VOROTELYAK, Ekaterina A. **Regeneration of dermis: Scarring and cells involved.** Cells, v. 8, n. 6, 2019.

RODRIGUES, Melanie e colab. **Wound healing: A cellular perspective.** Physiological Reviews, v. 99, n. 1, p. 665–706, 2019.

SAGHAZADEH, Saghi e colab. **Drug delivery systems and materials for wound healing applications.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 127, p. 138–166, 2018.

SAMPLES, Nano-composite. **applied sciences Mechanical Properties of Green Synthesized Graphene.** 2021.

SANTANA, Natália. e colab. **Nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis: review.** Journal of Nanoparticle Research. v.25. 2023.

- SEN, Chandan K. e colab. **Biofilm Management in Wound Care**. Plastic and Reconstructive Surgery, v. 148, n. 2, p. 275E-288E, 2021.
- SHETE, Bharat e GULHANE, Rucha e HANTODKAR, Rahul. **A Comprehensive Review on Wound Dressings and Their Comparative Effectiveness on Healing of Contaminated Wounds and Ulcers**. Archives of Anesthesia and Critical Care, v. 8, n. Spring, p. 151–158, 2022.
- SHOHAM, Yaron e colab. **Bromelain-based enzymatic debridement of chronic wounds: Results of a multicentre randomized controlled trial**. Wound Repair and Regeneration, v. 29, n. 6, p. 899–907, 2021.
- SILVA, Jéssica R. e colab. **Wound healing and omega-6 fatty acids: From inflammation to repair**. Mediators of Inflammation, v. 2018, 2018.
- SINGH, Mahima e JONNALAGADDA, Sriramakamal. **Design and characterization of 3D printed, neomycin-eluting poly-L-lactide mats for wound-healing applications**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 32, n. 4, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-021-06509-7>>.
- SOLIMAN, Mahmoud e colab. **Graphene oxide-cellulose nanocomposite accelerates skin wound healing**. Research in Veterinary Science, v. 137, n. February, p. 262–273, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.05.013>>.
- SORG, Heiko e colab. **Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts**. European Surgical Research, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.
- TADE, Rahul S. e colab. **Recent Advancement in Bio-precursor derived graphene quantum dots: Synthesis, Characterization and Toxicological Perspective**. Nanotechnology, v. 31, n. 29, 2020.
- THANGAVEL, Ponrasu e colab. **Development of reduced graphene oxide (rGO)-isabgol nanocomposite dressings for enhanced vascularization and accelerated wound healing in normal and diabetic rats**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 517, p. 251–264, 1 Maio 2018a.
- THANGAVEL, Ponrasu e colab. **Development of reduced graphene oxide (rGO)-isabgol nanocomposite dressings for enhanced vascularization and accelerated wound healing in normal and diabetic rats**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018b. v. 517. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.01.110>>.
- THOMAS, Roger E. e THOMAS, Bennett Charles. **Reducing biofilm infections in burn patients' wounds and biofilms on surfaces in hospitals, medical facilities and medical equipment to improve burn care: A systematic review**. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 18, n. 24, 2021.
- TOMIC-CANIC, Marjana e colab. **Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing**. American Journal of Clinical Dermatology, v. 21, n. s1, p. 36–43, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40257-020-00536-w>>.
- TOTTOLI, Erika Maria e colab. **Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration**. Pharmaceutics, v. 12, n. 8, p. 1–30, 2020.
- TRONCOSO, Omar P. e TORRES, Fernando G. **Bacterial cellulose—graphene based nanocomposites**. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 18, p. 1–17, 2020.
- TU, Y. e colab. **Destructive extraction of phospholipids from Escherichia coli membranes by graphene nanosheets**. Nature Nanotechnology, [s.l.], v. 8, no 8, p. 594–601, 2013. ISSN: 17483395, DOI: 10.1038/nnano.2013.125.
- VEIRUP, Niel e KYRIAKOPOULOS, Chris. **Neomicina**. p. 9–14, 2022.
- VERSEY, Zoya e colab. **Biofilm-Innate Immune Interface: Contribution to Chronic Wound Formation**. Frontiers in Immunology, v. 12, n. April, p. 1–25, 2021.
- VON MÜLLER, Christin e colab. **Active neutrophil responses counteract**

Candida albicans burn wound infection of ex vivo human skin explants. Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78387-y>>.

WANG, Na e colab. **Wound therapy via a photo-responsively antibacterial nano-graphene quantum dots conjugate.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 210, n. February, p. 111978, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111978>>.

WANG, Peng Hui e colab. **Wound healing.** Journal of the Chinese Medical Association, v. 81, n. 2, p. 94–101, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>>.

WANG, Xiaochun e colab. **Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections.** Acta Pharmaceutica Sinica B, v. 11, n. 8, p. 2585–2604, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.04.010>>.

WEI, Di e colab. **Chronic wound biofilms: Diagnosis and therapeutic strategies.** Chinese Medical Journal, v. 132, n. 22, p. 2737–2744, 2019.

WILKINSON, Holly N. e HARDMAN, Matthew J. **Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair.** Open Biology, v. 10, n. 9, 2020.

XIE, Ting e colab. **The venous ulcer continues to be a clinical challenge: an update.** Burns & Trauma, v. 6, p. 1–7, 2018.

YAZARLU, Omid e colab. **Perspective on the application of medicinal plants and natural products in wound healing: A mechanistic review.** Pharmacological Research, v. 174, p. 105841, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105841>>.

YE, Chunjiang e colab. **A Wound Treatment Strategy for “Super Long-Term Difficult-to-Heal Wounds”: A Single-Center Retrospective Study.** International Journal of Lower Extremity Wounds, n. 62, 2020.

YOUNIS, Muhammad Rizwan e colab. **Recent Advances on Graphene Quantum Dots for Bioimaging Applications.** Frontiers in Chemistry, v. 8, n. June, p. 1–25, 2020.

ZHAO, Changhong e colab. **Synthesis of graphene quantum dots and their applications in drug delivery.** [S.l: s.n.], 2020. v. 18.

ZHAO, Ruilong e colab. **Inflammation in chronic wounds.** International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 12, p. 1–14, 2016.