



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO CONTENDO
EXTRATO METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul.) L.P. Queiroz PARA O
TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS DIABÉTICAS**

JONATAS DE SOUZA QUEIROZ

Manaus-AM

Julho de 2025

JONATAS DE SOUZA QUEIROZ

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO CONTENDO
EXTRATO METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz PARA O
TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Linha de Pesquisa: Ação imune de fármacos e biomoléculas oriundos da biodiversidade Amazônica.

Orientador: Dr. José Fernando Marques Barcellos

Coorientador: Dr. Bruno Bezerra Jensen

Manaus-AM

Julho de 2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- Q3d Queiroz, Jonatas de Souza
Desenvolvimento e caracterização de microemulsão contendo extrato metanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul.) L.P. Queiroz para o tratamento de feridas crônicas diabéticas / Jonatas de Souza Queiroz. - 2025.
60 f. : il., color. : 31 cm.
- Orientador(a): José Fernando Marques Barcellos.
Coorientador(a): Bruno Bezerra Jensen.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2025.
1. Microemulsão. 2. *Libidibia ferrea*. 3. Compostos fenólicos. 4. Cicatrização de feridas. 5. Diabetes. I. Barcellos, José Fernando Marques. II. Jensen, Bruno Bezerra. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. IV. Título
-

Agradecimentos

Ao encerrar este ciclo tão importante, meu coração se enche de gratidão. Primeiramente, agradeço a Deus, que em sua infinita bondade me capacitou, fortaleceu e guiou cada um dos meus passos até a conclusão deste mestrado. Sua presença foi o alicerce que me sustentou nos momentos de desafio e a luz que clareou meu caminho.

À minha amada esposa, Victoria, dedico um agradecimento que palavras mal podem expressar. Você foi a força motriz por trás de todo este sonho. Sem o seu apoio incondicional, seu incentivo constante e sua paciência infinita, eu sequer teria iniciado esta jornada. Você é minha maior inspiração e a motivação diária para buscar sempre o meu melhor. Obrigado por caminhar ao meu lado.

À minha querida família, meu muito obrigado. Aos meus pais, Ozeth e Neila, que com amor, dedicação e suporte inabalável me educaram e me deram a base para que eu pudesse sonhar e realizar. O incentivo e a confiança que sempre depositaram em mim foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Expresso minha profunda gratidão aos meus orientadores. Ao Prof. Dr. Fernando, por ter me acolhido desde o início, orientando-me não apenas com seu vasto conhecimento, mas também com um respeito, carinho e cuidado que fizeram toda a diferença na minha trajetória acadêmica. Sua mentoria foi um verdadeiro presente. Ao Prof. Dr. Bruno, agradeço imensamente por seu olhar atento, por suas contribuições tão precisas e por sua disponibilidade em ajudar a aprimorar este trabalho. Suas orientações foram cruciais para a qualidade final desta dissertação.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta conquista, meu eterno obrigado.

Agradecemos o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), por meio do Projeto POSGRAD 2023/2024 - UFAM - RESOLUÇÃO N. 002/2023 – POSGRAD UFAM – Edição 2023/2024 pela concessão da Bolsa de Estudo, por financiarem direta e/ou indiretamente esta pesquisa.

RESUMO

As lesões cutâneas crônicas, como as úlceras diabéticas, representam um desafio clínico significativo, caracterizado por um estado de inflamação persistente e uma resposta imune desregulada que impede o reparo tecidual. A *Libidibia ferrea* (Jucá), uma planta da biodiversidade amazônica, possui compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, com reconhecido potencial anti-inflamatório e imunomodulador, capazes de atuar sobre as vias que perpetuam a cronicidade dessas feridas. No entanto, a eficácia tópica desses ativos depende de um sistema de veiculação que supere a barreira da pele e garanta sua estabilidade. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização físico-química de microemulsões do tipo água em óleo (A/O) para a veiculação do extrato metanólico de *L. ferrea*. O extrato foi caracterizado fitoquimicamente por LC-MS, confirmando a presença de compostos bioativos. Foram desenvolvidas formulações placebo (MEPLA) e com 10% (ME 10%) e 20% (ME 20%) de extrato. A caracterização incluiu análises de pH, condutividade, viscosidade, tamanho de partícula (DLS) e potencial zeta. Os resultados demonstraram a formação de sistemas A/O com gotículas de tamanho nanométrico (~255 nm para ME 10%) e potencial zeta altamente negativo (~ -70 mV), indicativo de alta estabilidade eletrostática. A formulação ME 10% mostrou-se a mais promissora, enquanto a ME 20% apresentou instabilidade física. Um desafio identificado foi o pH final ácido das formulações ativas (4,11 para ME 10%), indicando a necessidade de otimização para garantir a compatibilidade cutânea. Conclui-se que a microemulsão ME 10% é um veículo promissor para a entrega dos compostos imunomoduladores da *L. ferrea*, e este estudo estabelece as bases farmacotécnicas essenciais para sua futura otimização e avaliação biológica como uma nova alternativa terapêutica.

Palavras-chave: Microemulsão; *Libidibia ferrea*; Compostos fenólicos; Cicatrização de feridas; Diabetes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Critérios de diagnóstico para a diabetes.....	16
Figura 2 - Camadas epiderme, derme e hipoderme e estruturas da pele	19
Figura 3 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo	21
Figura 4 - <i>L. ferrea</i> (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz	24
Figura 5 - Gotículas de microemulsão e nanoemulsão.....	26
Figura 6 - Grupos carboxílicos e hidroxílicos	37
Figura 7 - Íons mais intensos observado no experimento de LC-MS	38
Figura 8 - Cromatograma de íons totais (TIC) por espectrometria de massas da fração bruta do extrato	38
Figura 9 - Teste de diluição	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias encontradas no extrato bruto de <i>L. ferrea</i>	36
Tabela 2 - Características Organolépticas e Tipo de Microemulsão das Formulações.	39
Tabela 3 - Caracterização das microemulsões (MEPLA. ME 10% & ME 20%)	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- A/O** - Água em Óleo.
- A1c** - Hemoglobina Glicada.
- AGE** - Ácidos Graxos Essenciais.
- AGEs** - Produtos Finais de Glicação Avançada.
- AINE** - Anti-inflamatório não esteroide.
- AM** - Amazonas.
- APCI** - Ionização Química à Pressão Atmosférica.
- CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais.
- CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
- cP** - CentiPoise (unidade de viscosidade).
- DAD** - Detector de Arranjo de Diodos (*Diode-Array Detector*).
- DAP** - Doença Arterial Periférica.
- DF** - Distrito Federal.
- DLS** - Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering*).
- DM** - Diabetes Mellitus.
- DM1** - Diabetes Mellitus Tipo 1.
- DM2** - Diabetes Mellitus Tipo 2.
- DMG** - Diabetes Gestacional.
- DP** - Desvio Padrão.
- FAPEAM** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas.
- g/mL** - Gramas por mililitro.
- H₀** - Hipótese Nula.
- H₁** - Hipótese Alternativa.
- HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*).
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- ICB** - Instituto de Ciências Biológicas.
- IDF** - Federação Internacional de Diabetes.
- IFG** - Glicose de Jejum Prejudicada (*Impaired Fasting Glucose*).
- IGT** - Tolerância à Glicose Prejudicada (*Impaired Glucose Tolerance*).
- IL-1 β** - Interleucina-1 beta.
- IL-6** - Interleucina-6.
- IL-10** - Interleucina-10.
- IL-17** - Interleucina-17.
- INPA** - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- iNOS+** - Sintase de Óxido Nítrico Induzível (*Inducible Nitric Oxide Synthase*).
- L. ferrea*** - *Libidibia ferrea* (nome científico da planta Jucá/Pau-ferro).
- LC-MS** - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*).
- M1** - Fenótipo de macrófago M1 (pró-inflamatório).

M2 - Fenótipo de macrófago M2 (pró-reparador/anti-inflamatório).
ME - Microemulsão.
MEC - Matriz Extracelular.
ME 10% - Microemulsão com 10% de extrato.
ME 20% - Microemulsão com 20% de extrato.
MEPLA - Microemulsão Placebo.
mg/dL - Miligramas por decilitro.
MMPs - Metaloproteases de Matriz.
mmol/L - Milimol por litro.
MS - Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*).
MS/MS - Espectrometria de Massas em Tandem (*Tandem Mass Spectrometry*).
mV - Milivolts.
m/z - Relação massa/carga.
NF-κB - Fator Nuclear kappa B.
nm - Nanômetros.
NPD - Neuropatia Periférica Diabética.
O/A - Óleo em Água.
OMS - Organização Mundial da Saúde.
OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde.
p/p - Peso por peso.
PDI - Índice de Polidispersão.
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*).
pH - Potencial Hidrogeniônico.
PHMB - Poli-hexametileno biguanida.
POSGRAD - Pós-Graduação.
ppm - Partes por milhão.
psi - Libras por polegada quadrada (*Pounds per Square Inch*).
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*).
RPM - Rotações por Minuto.
SES-AM - Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas.
SP - São Paulo.
SUS - Sistema Único de Saúde.
TGF-β - Fator de Crescimento Transformador beta (*Transforming Growth Factor beta*).
Th1 - Linfócito T helper 1.
Th17 - Linfócito T helper 17.
TIC - Cromatograma de Íons Totais (*Total Ion Chromatogram*).
TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alfa.
TOTG - Teste Oral de Tolerância à Glicose.
UDP - Úlceras do Pé Diabético.
UFAM - Universidade Federal do Amazonas.
μA - Microampere.
μS/cm - Microsiemens por centímetro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 DIABETES MELLITUS	15
2.1.1 Conceito, Diagnóstico, Classificação e Fisiopatologia	15
2.1.2 Prevalência do DM no Mundo, no Brasil e no Amazonas.....	17
2.2 A PELE E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	18
2.3 DIABETES MELLITUS E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	21
2.4 TRATAMENTOS PARA LESÕES CUTÂNEAS	22
2.5 TERAPIAS CANDIDATAS AO TRATAMENTO PARA LESÕES CUTÂNEAS.....	23
2.5.1 Produtos naturais: <i>L. ferrea</i>	23
2.5.2 Nanomedicina: Sistema microemulsionado	25
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GERAL:	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 TIPOS DE ESTUDOS	31
5.2 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>L. FERREA</i>	31
5.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>L. FERREA</i>	31
5.3 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE MICROEMULSÃO	32
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES	32
5.4.1 Análises Organolépticas e Determinação do Tipo de Emulsão	32
5.4.2 Determinação de pH, Condutividade Elétrica, Densidade, Índice de Refração, Transmitância e Viscosidade	33
5.4.3 Determinação do Tamanho Médio de Gotícula, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta	33
5.5 HIPÓTESES	34
5.5.1 Hipótese Nula (H_0)	34
5.5.2 Hipótese Alternativa (H_1)	34
6. RESULTADOS	36
6.1 PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DA <i>L. FERREA</i> POR LC-MS.....	36
6.2 ANÁLISE POR HPLC-DAD-MS/MS DO EXTRATO DA <i>L. FERREA</i>	37
6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROEMULSÕES	38
6.3.1 Propriedades Físico-Químicas das Microemulsões.....	39

7. DISCUSSÃO	41
7.1 PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO DE <i>L. FERREA</i> E SEU POTENCIAL IMUNOLÓGICO.....	41
7.2 DESAFIOS NO DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROEMULSÕES A/O COM <i>L. FERREA</i>	43
7.3 <i>Análise das Propriedades Físico-Químicas das Formulações Mais Promissoras (MEPLA e ME 10%)</i>	43
7.4 <i>Implicações para a Veiculação Tópica e Modulação Imunológica Cutânea: Potencial e Otimizações Necessárias.</i>	44
8. CONCLUSÃO	47
9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS	49
10.CRONOGRAMA.....	50
11. EQUIPE DO PROJETO	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 425 milhões de adultos em todo o mundo vivem com diabetes, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o que corresponde a 8,5% da população mundial. O Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de casos dessa doença, totalizando mais de 14,3 milhões de pessoas, com uma prevalência estimada de 9,4% da população brasileira (de Negreiros *et al.*, 2021). Na capital do Amazonas, Manaus, a prevalência de Diabetes Mellitus (DM) em 2021 foi de 6,67% entre homens e mulheres adultos (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021).

Entre as complicações locais mais frequentes do DM, destacam-se as lesões na pele, que por sua vez, por ser um órgão exposto, está mais susceptível a traumas, especialmente nas extremidades dos membros inferiores, conhecidas como pés diabéticos. Estima-se que 25% das pessoas com diabetes desenvolverão, ao longo da vida, pelo menos uma lesão no pé, sendo que os custos com saúde são, em média, cinco vezes maiores quando comparados aos casos sem lesões (SBCBM, 2019). Soma-se a isso a preocupação com a presença de bactérias resistentes a antibióticos, o que dificultam o tratamento das lesões diabéticas e aumentam o risco de amputações (Blanck, 2014).

O processo de cicatrização de feridas envolve uma cadeia de eventos complexa, altamente organizada, que depende de uma cascata coordenada de mecanismos celulares e bioquímicos. Esse processo é dividido em três fases principais: inflamatória, proliferativa e de maturação, que, de forma essencial, promove o reparo tecidual (Childs; Murthy, 2017). No entanto, quando associado a fatores extrínsecos, como o DM, esse processo torna-se deficiente, levando à instalação de um quadro de inflamação patológica (Leal; Carvalho, 2014), o que compromete a transição adequada entre as fases da cicatrização, resultando no atraso ou na falha do reparo tecidual.

Diante desse cenário, um dos maiores desafios para tratamento de lesões crônicas é o controle dos fatores que interferem no processo de cicatrização, especialmente a escolha do tratamento tópico mais adequado para cada fase da lesão (Silva *et al.*, 2023). Atualmente, há diversos tratamentos padronizados amplamente utilizados, cujo objetivo é promover a restauração tecidual, tais como ácidos graxos essenciais (AGE), hidrogel, gazes umidificadas, filmes, hidrocoloide, espumas, collagenase, papaína, sulfadiazina de prata (Azevedo *et al.*, 2015), entre outros, geralmente indicados para as fases iniciais das feridas. Contudo, a maioria dos curativos modernos disponíveis são importados e de alto custo, o que reforça a necessidade

de desenvolver alternativas terapêuticas utilizando matérias-primas locais, viáveis economicamente, e produzidas com tecnologias simples e de baixo custo (Lima *et al.*, 2012).

Além disso, algumas lesões crônicas apresentam difícil cicatrização e não respondem de forma satisfatória aos tratamentos convencionais. Nesse contexto, o uso de produtos de origem vegetal para auxiliar na cicatrização de feridas tem sido amplamente investigado (Kobayashi *et al.*, 2015). Na Amazônia, a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, popularmente conhecida como pau-ferro, jucá, pau-ferro-verdadeiro, jucaína e pau de jucá, é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento tópico de feridas e contusões (Carvalho, F. G. *et al.*, 2016). No Baixo Amazonas, as vagens inteiras do Jucá são frequentemente maceradas em álcool para uso no tratamento de diferentes tipos de lesões cutâneas (Américo *et al.*, 2020; Batista *et al.*, 2017; Kobayashi *et al.*, 2015). Além de sua aplicação tópica, a *L. ferrea* também é utilizada na forma de chás e infusões para o tratamento de doenças broncopulmonares, diabetes, reumatismo, câncer, distúrbios gastrointestinais e diarreia (Américo *et al.*, 2020; Batista *et al.*, 2017; Carvalho, F. G. *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm destacado as propriedades biológicas do Jucá, incluindo atividades anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena, antioxidante e antimicrobiana (Dias *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Essas atividades são atribuídas, principalmente, à presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos em sua composição (Américo *et al.*, 2020; Batista *et al.*, 2017; Carvalho, F. G. *et al.*, 2016; Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017). Ressalta-se que, para que essas substâncias possam ser aplicadas clinicamente, é necessário que estejam incorporadas em formulações farmacotécnicas adequadas, que garantam estabilidade, eficácia e segurança.

Nesse sentido, a nanotecnologia tem se destacado como uma ferramenta promissora no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, capazes de otimizar a penetração dos princípios ativos e potencializar seus efeitos terapêuticos. O uso de tecnologias em escala nanométrica tem sido cada vez mais adotado nas últimas décadas, especialmente em sistemas de liberação controlada de fármacos (Ragelle *et al.*, 2017). Dentre essas tecnologias, destaca-se a microemulsão (ME), um sistema nanoestruturado que tem se mostrado uma alternativa viável para diferentes classes terapêuticas, incluindo anestésicos, antimicrobianos, antivirais e até bioativos obtidos em plantas medicinais (Figueiredo *et al.*, 2013; Lawrence; Rees, 2012; Sahu *et al.*, 2015; Tirnaksiz *et al.*, 2012).

Considerando o potencial de cicatrização, anti-inflamatório e antimicrobiano do Jucá, aliado às vantagens tecnológicas dos sistemas microemulsionados, este estudo pretende apresentar um produto mais barato e eficaz contra as feridas crônicas das complicações da

Diabetes Mellitus, descrevendo as observações macroscópicas e microscópicas provocadas pelo extrato de *L. ferrea*, associado a microemulsão.

Portanto, o objetivo deste trabalho é investigar a utilização do extrato da *L. ferrea* incorporado em sistema de microemulsão com potencial clínico na cicatrização de feridas. A proposta contempla tanto os compostos bioativos presentes no extrato, quanto as propriedades vantajosas do sistema de microemulsão como veículo de liberação. Espera-se que essa abordagem contribua significativamente para a saúde pública, oferecendo uma alternativa acessível e eficiente para o tratamento de feridas crônicas, especialmente as associadas ao diabetes, com impactos positivos na redução do tempo de internação, na prevenção de complicações, na aceleração do processo cicatricial e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Conceito, Diagnóstico, Classificação e Fisiopatologia

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico de etiologia complexa e multifatorial, cuja principal característica é a hiperglicemia crônica (International Diabetes Federation., 2021). Essa elevação dos níveis de glicose no sangue ocorre devido a defeitos na secreção ou na ação da insulina, um hormônio anabólico produzido pelas células β do pâncreas (Zajec *et al.*, 2022).

A insulina é fundamental para o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, facilitando a captação de glicose pelas células do corpo para ser convertida em energia. Quando a produção de insulina é insuficiente ou as células se tornam resistentes à sua ação, a glicose permanece na corrente sanguínea, desencadeando as manifestações e complicações da doença (International Diabetes Federation., 2021).

O diagnóstico do DM é estabelecido por meio da identificação laboratorial de hiperglicemia. Para isso, são utilizados testes padronizados, incluindo a dosagem da glicemia plasmática de jejum, o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que avalia a resposta do corpo a uma sobrecarga de glicose, e a medição da hemoglobina glicada (A1c), que reflete os níveis médios de glicose nos últimos três meses (Cobas *et al.*, 2023).

A **Figura 1** resume os critérios e os valores de corte estabelecidos pela Federação Internacional de Diabetes e outras organizações de saúde para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes.

Teste	Diabetes Deve ser diagnosticado se UM OU MAIS dos seguintes critérios forem atendidos	Tolerância à glicose prejudicada (IGT) Deve ser diagnosticado se AMBOS os critérios a seguir forem atendidos	Glicose de jejum prejudicada (IFG) Deve ser diagnosticado se O PRIMEIRO OU AMBOS os itens a seguir forem atendidos
 Glicose plasmática em jejum	≥7.0 mmol/L (126 mg/dL)	<7.0 mmol/L (126 mg/dL)	6.1 – 6.9 mmol/L (110 – 125 mg/dL)
 Glicose plasmática de duas horas > 75g de carga oral de glicose (teste oral de tolerância à glicose (OGTT))	≥11.1 mmol/L (200 mg/dL)	≥7.8 and <11.1 mmol/L (140–200 mg/dL)	<7.8 mmol/L (140 mg/dL)
 HbA1c	≥48 mmol/L (equivalent to 6.5%)		
 Glicose plasmática aleatória na presença de sintomas de hiperglicemia	≥11.1 mmol/L (200 mg/dL)		

O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica por pelo menos oito horas.

O teste de HbA1c deve ser realizado em um laboratório que use um método certificado pelo NGSP e padronizado para o ensaio do Diabetes Control and Complications Trial.

O teste de glicose plasmática pós-prandial de duas horas deve ser realizado com uma carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água.

Na ausência de sintomas de hiperglicemia, são necessários dois exames anormais para o diagnóstico de diabetes mellitus.

A Associação Americana de Diabetes (ADA)2 recomenda o diagnóstico de "pré-diabetes" com valores de HbA1c entre 39 e 47 mmol/mol (5,7-6,4%) e glicemia de jejum alterada quando a glicose plasmática de jejum estiver entre 5,6 e 6,9 mmol/L (100-125 mg/dL).

Figura 1 - Critérios de diagnóstico para a diabetes

Fonte: Adaptado do Atlas de Diabetes da Federação Internacional de Diabetes, 10ª ed., (2021).

A classificação do DM é baseada em sua causa subjacente (etiopatogenia). O Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune na qual o sistema imunológico do próprio indivíduo ataca e destrói as células β pancreáticas, resultando em uma deficiência absoluta na produção de insulina (Leslie *et al.*, 2021).

Por outro lado, o Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é a forma mais prevalente, correspondendo a cerca de 90% de todos os casos, e é caracterizado por um quadro duplo de resistência periférica à ação da insulina e uma disfunção progressiva das células β , que não conseguem mais compensar essa resistência, levando a uma deficiência relativa de insulina (Rodacki *et al.*, 2023).

Outras categorias importantes incluem o Diabetes Gestacional (DMG), que ocorre durante a gravidez, e tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como doenças

genéticas ou induzidas por medicamentos (American Diabetes Association, 2013; Bertoluci, 2023).

Independentemente do tipo, a fisiopatologia do DM converge para a hiperglicemia crônica, que é o principal fator para o desenvolvimento das complicações de longo prazo da doença. A exposição prolongada das células e tecidos a altos níveis de glicose desencadeia vias metabólicas danosas, como a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), o aumento do estresse oxidativo e a ativação de vias inflamatórias (Huijberts; Schaper; Schalkwijk, 2008).

Essas alterações resultam em danos estruturais e funcionais em diversos tecidos, notadamente nos vasos sanguíneos (levando à micro e macroangiopatia) e nos nervos periféricos (neuropatia), comprometendo a integridade da pele e sua capacidade de regeneração, um ponto crucial para a motivação deste estudo (Khamaisi; Balanson, 2017; Menezes; Fonseca; Matos, 2022; Minelli *et al.*, 2003).

2.1.2 Prevalência do DM no Mundo, no Brasil e no Amazonas

Mundialmente, o Diabetes se tornou um sério problema de saúde pública, cujas previsões vêm sendo superadas a cada nova triagem. Por exemplo, nos anos 2000, a estimativa global de adultos vivendo com diabetes era de 151 milhões, no entanto, segundo dados da OMS, o número de portadores da doença em todo o mundo era de 177 milhões em 2000. Em 2009, havia crescido 88%, ou seja, 285 milhões de portadores da doença. Em 2020, 9,3% dos adultos, entre 20 e 79 anos (assombrosos 463 milhões de pessoas) viviam com diabetes (Diabetes Millitus, 2006).

Dados divulgados na décima edição do Atlas do Diabetes, da Federação Internacional de Diabetes, mostram que 537 milhões de pessoas têm diabetes no mundo. Entre 2019 e 2021, houve um aumento de 74 milhões de casos. O documento destaca ainda que mais de 80% dos adultos com a doença vivem em países em desenvolvimento (International Diabetes Federation., 2021).

O IBGE divulgou os resultados do Censo 2022, indicando que a população do Brasil é formada por 203.080.756 pessoas. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2022) Isso indica também que a estimativa sobre o número de pessoas com diabetes no Brasil passaria a ser de aproximadamente 20 milhões, já que o último Vigitel, levantamento em amostra representativa da população brasileira feito pelo Ministério da Saúde, apontou que, no conjunto de 27 capitais pesquisadas, a frequência do diagnóstico autorreferido de diabetes foi de 10,2% (Ministério da Saúde, 2023).

A pesquisa Vigitel Brasil aponta também que o Diabetes atinge com mais frequência as mulheres, afetando 11,1% delas, contra 9,1% dos homens, e cerca de 90% dos diabéticos brasileiros apresentam o DM2. O resultado representa um aumento em relação a 2021, quando 9,1% dos brasileiros sofriam com a doença. Entre as capitais brasileiras, Brasília (DF) e São Paulo (SP) apresentam o maior percentual de prevalência de Diabetes no Brasil em 2023, com 12,1% (Ministério da Saúde, 2023).

De acordo com os dados levantados pela IDF, entidade que reúne mais de 240 associações de diabetes em mais de 161 países e territórios, também estima que a prevalência do diabetes no Brasil é de 10,5%, corroborando com os dados apresentados pela Vigitel. Ainda segundo a IDF, o Brasil ocupa o 6º lugar no mundo entre os países com mais pessoas com diabetes no geral e o 3º lugar quando se fala em diabetes Tipo 1. (Ogle *et al.*, 2022)

Dados da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SES-AM) mostram que, no Amazonas, existem mais de 185 mil pessoas vivendo com diabetes. Deste total, a maioria (61,72%) está na capital, Manaus, onde o número de diabéticos ultrapassa 114 mil (Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas - SES-AM, 2023).

A crescente prevalência de diabetes em todo o mundo é impulsionada por uma complexa interação de fatores socioeconômicos, demográficos, ambientais e genéticos. O aumento contínuo se deve, em grande parte, ao aumento do diabetes tipo 2 e dos fatores de risco relacionados, que incluem níveis crescentes de obesidade, dietas não saudáveis e falta de atividade física. No entanto, os níveis de Diabetes tipo 1, com início na infância, também estão aumentando (Rodacki *et al.*, 2023).

Ainda, a crescente urbanização e a mudança de hábitos de vida (por exemplo, maior ingestão de calorias, aumento do consumo de alimentos processados, estilos de vida sedentários) são fatores que contribuem para o aumento da prevalência de Diabetes tipo 2 em nível social. Enquanto a prevalência global de Diabetes nas áreas urbanas é de 10,8%, nas áreas rurais é menor, de 7,2%. No entanto, essa lacuna está diminuindo, com a prevalência rural aumentando (International Diabetes Federation., 2021).

2.2 A Pele e o Processo de Cicatrização Cutânea

A pele, o maior órgão do corpo humano, é uma barreira complexa e dinâmica, composta por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme, camada mais externa, é um epitélio estratificado constituído majoritariamente por queratinócitos. Entre eles, encontram-se células com funções especializadas, como os melanócitos, as células de Merkel e, de grande importância imunológica, as células de Langerhans, que atuam como células

apresentadoras de antígenos, sendo a primeira linha de vigilância do sistema imune na pele. Logo abaixo, a derme, um tecido conjuntivo denso, abriga vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, glândulas e uma rica rede de nervos, além de células como os fibroblastos, essenciais para a produção da matriz extracelular. A **Figura 2** ilustra as camadas da pele.

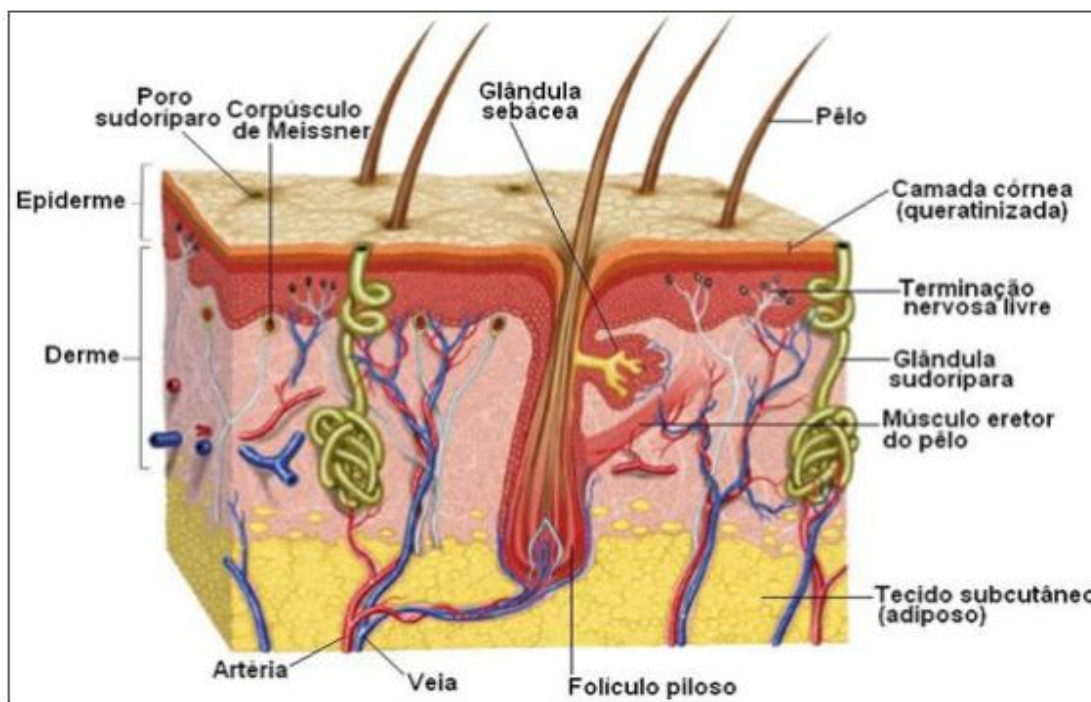


Figura 2 - Camadas epiderme, derme e hipoderme e estruturas da pele

Fonte: Internet, 2024 (www.ebah.com.br/content/ABAAeomcAJ/apresentacao-cicatrizacao-final)

Uma lesão cutânea é definida como a ruptura da integridade da pele, podendo variar em profundidade e causa. As feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. As feridas agudas progridem de forma ordenada e previsível através das fases da cicatrização, culminando na restauração da barreira cutânea em até três semanas (Ferreira, 2015).

Em contrapartida, as feridas crônicas são aquelas cuja cicatrização estagna, geralmente em uma fase inflamatória patológica, não progredindo para a resolução completa. Essa cronicidade está frequentemente associada a condições sistêmicas subjacentes, como o Diabetes Mellitus, e a fatores locais como infecção e hipóxia tecidual (Oliveira *et al.*, 2019)..

Após uma lesão, o organismo desencadeia uma cascata de eventos celulares e bioquímicos altamente orquestrados, conhecida como processo de cicatrização, que pode ser dividida em três fases sobrepostas: inflamatória, proliferativa e de maturação (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007).

A **fase inflamatória** inicia-se imediatamente com a hemostasia, onde plaquetas formam um coágulo primário e liberam fatores de crescimento, como o PDGF e o TGF- β . Esses

mediadores atraem células do sistema imune para o local. Os neutrófilos são os primeiros a chegar, realizando a fagocitose de detritos e microrganismos. Em seguida, os macrófagos assumem o papel central: além de continuarem a limpeza do leito da ferida, eles são os principais reguladores do processo, secretando um arsenal de citocinas e fatores de crescimento que encerram a fase inflamatória e dão início à fase seguinte. A função adequada dos macrófagos é, portanto, um ponto de controle imunológico crítico para a cicatrização bem-sucedida (Broughton; Janis; Attinger, 2006a; Campos; Borges-Branco; Groth, 2007).

A **fase proliferativa**, que se inicia por volta do quarto dia, é caracterizada pela formação de novo tecido. Nela ocorrem a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), a proliferação de fibroblastos, a deposição de uma nova matriz extracelular (rica em colágeno tipo III e fibronectina) e a epitelização, onde os queratinócitos migram das bordas da ferida para restaurar a cobertura epitelial (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007; Lawrence; Diegelmann, 1994).

Por fim, a **fase de maturação ou remodelagem**, que pode durar meses ou anos, consiste na reorganização da matriz extracelular. O colágeno tipo III, mais frágil, é gradualmente substituído pelo colágeno tipo I, mais resistente, que se alinha segundo as linhas de tensão da pele, resultando em um aumento da força tênsil da cicatriz. Mesmo após a conclusão do processo, a pele cicatrizada raramente atinge 100% da resistência da pele original (Broughton; Janis; Attinger, 2006b; Campos; Borges-Branco; Groth, 2007).

A **Figura 3** ilustra a sobreposição dessas fases e a dinâmica da deposição dos componentes da matriz ao longo do tempo.

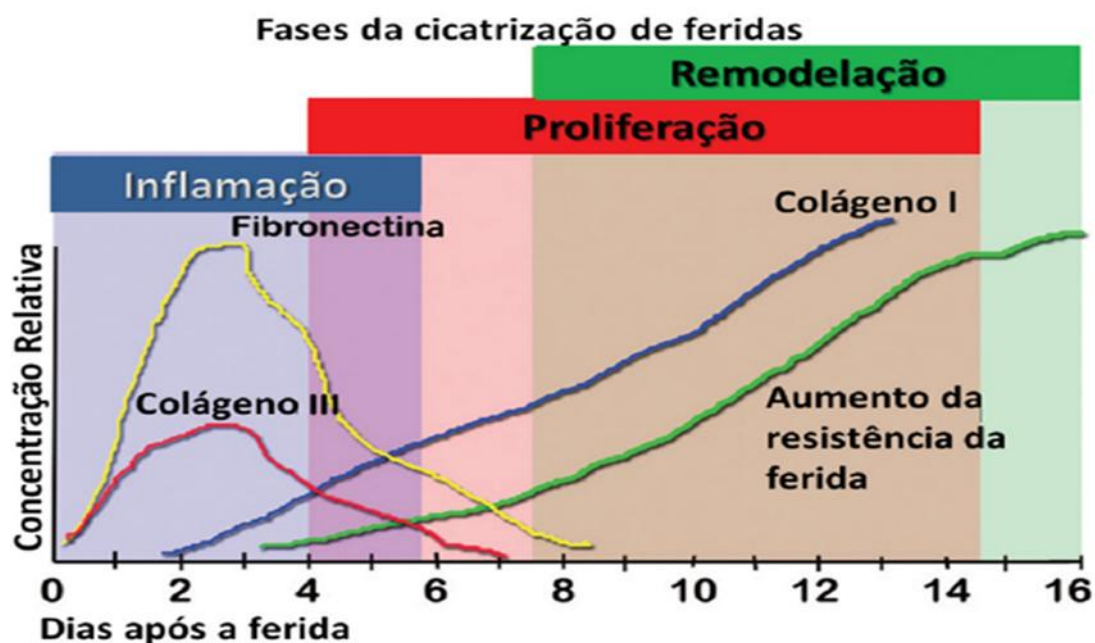


Figura 3 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo

Fonte: Adaptado de Broughton et al. (2006).

A falha em umas destas fases no processo de cicatrização da ferida pode prolongar o tempo de reparo e conduzir complicações, cerca de 60 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de feridas crônicas e seus custos de tratamento representam 4% do total de despesas de saúde e 68% do tempo de enfermagem (Yao; Fu; Cheng, 2020).

2.3 Diabetes Mellitus e o processo de cicatrização cutânea

O Diabetes Mellitus é um dos principais fatores sistêmicos que prejudicam o reparo tecidual, tornando seus portadores altamente suscetíveis ao desenvolvimento de feridas crônicas, como as úlceras do pé diabético (UDP) (Ferreira, 2020). A cicatrização em um ambiente diabético não progride de forma ordenada através das fases fisiológicas e frequentemente estagna em um estado de inflamação patológica e crônica, o que impede a resolução do processo. Essa falha no reparo é multifatorial, resultante de uma complexa interação entre desordens metabólicas, vasculares, neurológicas e imunológicas (Leal; Carvalho, 2014).

A hiperglicemia crônica cria um microambiente hostil à cicatrização. Ela induz um aumento do estresse oxidativo pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e promove a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Essas moléculas causam dano celular direto e disfunção em células cruciais para o reparo (Huijberts; Schaper; Schalkwijk, 2008).

As células imunes, como neutrófilos e macrófagos, apresentam uma redução em suas funções quimiotáticas e fagocíticas, comprometendo a limpeza da ferida e a eliminação de patógenos, o que aumenta o risco de infecções. Além disso, a capacidade dos macrófagos de transitar de um fenótipo pró-inflamatório (M1) para um pró-reparador (M2) é prejudicada, o que perpetua a fase inflamatória. Fibroblastos e queratinócitos também exibem menor capacidade proliferativa e migratória, resultando em uma deposição deficiente de matriz extracelular (MEC) e falha na reepitelização (Gary Sibbald; Woo, 2008).

A nível sistêmico, duas complicações do DM são particularmente devastadoras para a cicatrização: a Doença Arterial Periférica (DAP) e a Neuropatia Periférica Diabética (NPD) (Ferreira, 2020). A DAP, resultante da aterosclerose acelerada, reduz o fluxo sanguíneo para as extremidades, causando isquemia e hipóxia tecidual. A falta de oxigênio e nutrientes essenciais

limita a atividade celular e a síntese de colágeno, tornando a cicatrização energeticamente inviável (Woo; Ayello; Sibbald, 2007).

A NPD, por sua vez, causa a perda da sensação protetora, o que torna os pés vulneráveis a traumas repetidos e não percebidos. Adicionalmente, a neuropatia compromete a resposta neurogênica inflamatória, que é importante para a vasodilatação inicial e o recrutamento de células imunes para o local da lesão (Shepherd; Downing; Miyan, 2005).

Em síntese, o processo de cicatrização no indivíduo com diabetes é prejudicado por uma combinação de disfunção imune e celular, estresse oxidativo, angiogênese reduzida, degradação excessiva da MEC por metaloproteases (MMPs) e pelas condições macroscópicas de isquemia e neuropatia (Huijberts; Schaper; Schalkwijk, 2008; Leal; Carvalho, 2014). Esse cenário complexo justifica a busca por terapias inovadoras que possam atuar em múltiplos alvos para reverter o estado crônico e promover o reparo tecidual.

2.4 Tratamentos para lesões cutâneas

Dentre as principais terapêuticas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, estão: Polihexametilenobiguanida (PHMB) solução ou em rolo; Papaína em gel ou creme (8, 10 e 12%); Hidrocoloide; Ácidos graxos essenciais (AGE); Óxido de zinco; Carvão ativado associado com alginato de prata; Hidrofibra com prata e espuma de poliuretano; Alginato de cálcio; Hidrofibra sem prata; Bandagem de algodão puro ou misto impregnada com óxido de zinco, glicerina, óleo de castor ou mineral; Sulfadiazina de prata; Filmes semipermeáveis; Colágeno biológico; Fator de crescimento celular e Curativo de gaze não aderente (Tavares, 2018).

São inúmeras as terapêuticas existentes para tratamento de feridas, com destaque para o debridante enzimático que será utilizado no estudo, a collagenase composta por clostridiopeptidase A e enzima proteolítica, apresenta ação seletiva de degradar o colágeno nativo da ferida. Este produto pode ser usado onde há tecido desvitalizado, em feridas limpas ou infectadas, com exceção de feridas com cicatrização por primeira intenção e sensíveis à enzima (Mandelbaum; Di Santis; Mandelbaum, 2003). É uma das coberturas desbridantes mais disponível e de acesso facilitado nas Unidades de Saúde vinculadas ao SUS, no Estado do Amazonas.

Outros tratamentos de feridas, que envolvem altas tecnologias vem ganhando espaço no mercado, como as terapias de Oxigenoterapia Hiperbárica; Plasma autólogo rico em plaquetas (Cabral *et al.*, 2022); Ultrassom de baixa frequência (Ponte *et al.*, 2019); Terapia fotodinâmica (Domingues; Urizzi; Souza, 2022); Biocelulose (Netto; Jacon, 2022); Laserterapia (Lucio;

Paula, 2020); Terapia por pressão negativa (Dumville *et al.*, 2013) e Terapia de fechamento assistida por vácuo (Daskalaki *et al.*, 2016).

2.5 Terapias candidatas ao tratamento para lesões cutâneas

2.5.1 Produtos naturais: *L. ferrea*

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos é tão antigo quanto a existência da espécie humana, e até nos dias atuais é um recurso alternativo para muitas comunidades e grupos étnicos (Hardy *et al.*, 2012). Nas regiões mais pobres do país e até em grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em mercados e cultivadas em quintais residenciais para consumo (Maciel *et al.*, 2002).

Muitas sociedades tradicionais apresentam uma diversificada “Farmacopeia” natural, vivenciadas pelas mesmas e constituída por informações empíricas diversificadas. Esses ambientes estão sendo alvo de estudos por pesquisadores, que possuem a finalidade de registro de novas espécies e comprovações de suas atividades medicinais (Amorozo, 2002). Uma vez isolados os metabólitos secundários que apresentam atividade farmacológica, pode-se progredir para um medicamento, pois estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, a maioria destas de plantas (Calixto *et al.*, 2001; WHO, 2011).

A família Fabaceae compreende uma diversidade de substâncias ativas, não só da classe dos flavonoides, como também de alcaloides, terpenoides e esteroides, que são exemplos de outras classes fitoquímicas na qual estão presentes em muitos exemplares dessa família (Rocha e Silva *et al.*, 2007). Desse modo, é conhecida como uma das famílias vegetais de interesse na área de produtos naturais, por disponibilizar diferentes princípios ativos para aplicação na medicina.

A *L. ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz var. férrea, basônimo de (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex. Tul.), é conhecida popularmente como jucá, pau ferro (Carvalho, F. G. *et al.*, 2016; Souza, 2007)

Essa espécie vegetal pertence à família botânica Fabaceae, de grande importância pelo seu número de espécies, cerca de 19.325 espécies em mais de 720 gêneros (Souza; Bastos; Rocha, 2009; Souza; Lorenzi, 2012). Sendo a única família vegetal com os gêneros classificados tradicionalmente em três subfamílias: *Caesalpinioideae*, *Faboideae* e *Mimosoideae* (Ignoato, 2012). Somente no Brasil, existe o registro de pelo menos 200 gêneros

e 2700 espécies, correspondendo à maior família em número de espécies no país (Souza; Lorenzi, 2012).

A *L. ferrea* é uma espécie nativa do Brasil, largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste. Quanto à sua estrutura botânica, possui flores amarelas, pequenas, em cachos, folhas compostas, folioladas e frutos indeiscentes de cor marrom escuro, tipo legume, com sementes escuras **Figura 4**. Possui classificação arbórea, com altura de 10 a 15 metros, e tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro (Souza; Lorenzi, 2012). As folhas da árvore podem medir de 7 a 20 cm, cobertas com pelos amarelados e curtos. Quanto aos frutos possuem dimensões em torno de 8,3 x 1,8 x 0,8 cm, de coloração esverdeada, quando imaturos, e as sementes possuem o tamanho médio de 0,9 x 0,5 x 0,5 cm, com coloração variando de verde claro a amarelo (Ferreira; Soares, 2015).

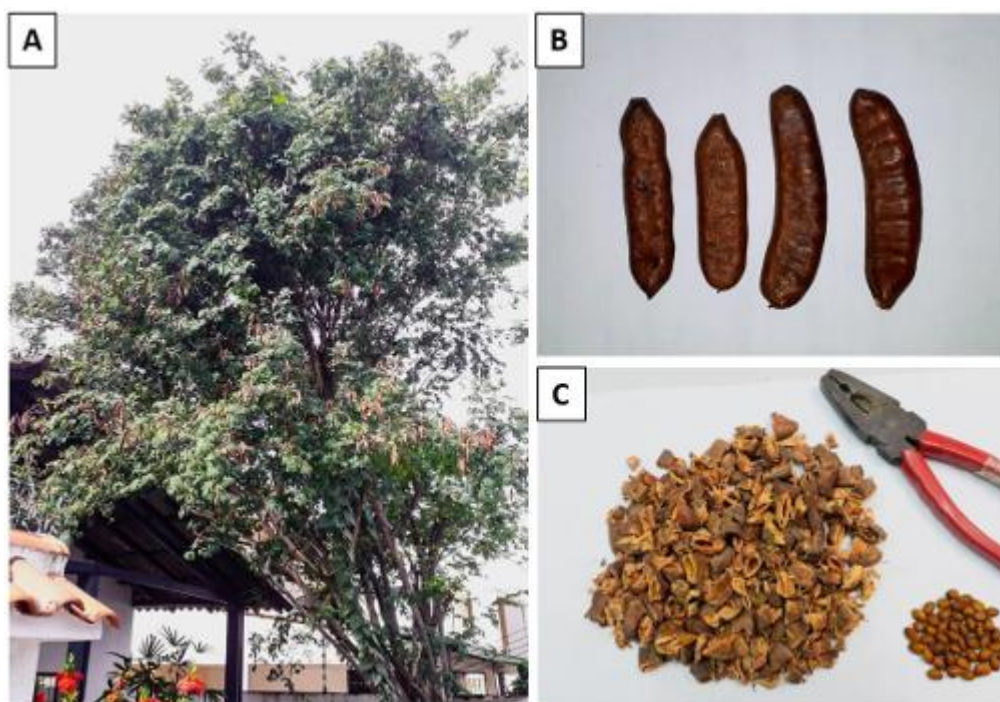


Figura 4 - *L. ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz
(A) Frutificação da Espécie vegetal; (B) Fruto maduro; (C) Fruto triturado e sementes removidas.

Fonte: Jensen, 2020.

O extrato aquoso das sementes apresentou atividades celulásica, anticoagulante e larvicida contra *Aedes aegypti* (Cavalheiro *et al.*, 2009). Outro trabalho corroborou com esse resultado, mostrando também atividade repelente, porém, em moscas da família Calliphoridae ao utilizar extrato alcoólico do fruto dessa planta (Fernandes *et al.*, 2016). Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico da casca e das folhas demonstraram a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos (Gonzalez; Barros; Bacchi, 2004).

Os frutos são antidiarreicos, anticatarrais, cicatrizantes e têm sido usados para o tratamento de diabetes e prevenção do câncer (Carvalho, F. G. *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2012). O extrato metanólico (80%) dos frutos obtido através da maceração durante 72 h foi testado frente às cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralise*, *Lactobacillus casei*, apresentando uma concentração inibitória mínima que variou de 25 a 100 µg/mL (Sampaio *et al.*, 2009).

A partir dos estudos que avaliaram as atividades medicinais, pode-se afirmar que a *L. ferrea* é uma planta rica em metabólitos secundários, majoritariamente os compostos fenólicos (Cunha *et al.*, 2017). Logo, diante do levantamento, mostra-se que várias substâncias são responsáveis por essas atividades biológicas ao utilizar diferentes partes dessa espécie vegetal, como, a casca, o epicarpo (fruto), folhas, galhos e sementes, tornando-se assim, uma linha de pesquisa atrativa para bioprospecção de substâncias químicas, isolando-as e avaliando sua atividade farmacológica para contribuir para o desenvolvimento de futuros fitoterápicos de aplicação em diferentes doenças.

Outra vantagem dessa planta é a ausência de efeitos tóxicos observados no estudo toxicológico, por meio da administração aguda e subaguda do extrato aquoso do fruto e da casca do jucá, em ratos e suínos, onde seus exames laboratoriais não mostraram indícios de efeitos tóxicos (Queiroz Neto *et al.*, 1991). Dessa forma, este fator é bastante promissor quanto ao aspecto terapêutico, porque durante o estudo das substâncias candidatas aos protótipos de novos fármacos, é de suma importância que além da comprovação de sua eficácia, se comprove a segurança ao administrá-las em pacientes (Borges, 2013).

2.5.2 Nanomedicina: Sistema microemulsionado

A Nanomedicina é uma ciência interdisciplinar com a finalidade de aplicar a nanotecnologia na medicina, utilizando compostos nanoestruturados de 1 a 1.000 nanômetros (nm), voltados para o diagnóstico e o tratamento de doenças (Gu *et al.*, 2013; Hafner *et al.*, 2014). O estudo desses sistemas tem sido realizado principalmente para direcionar e controlar a liberação de fármacos (Sakata *et al.*, 2007). Dentre os nanossistemas com essa finalidade, destaca-se os lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões e microemulsões (Silva, 2004).

O marco inicial da produção de uma microemulsão descrito na literatura foi na década de 40, ao descreverem a produção de uma solução translúcida a partir da titulação de uma emulsão com hexanol (Hoar; Schulman, 1943). No entanto, somente no fim da década de 50, foi estabelecido o termo microemulsão, que ao longo dos anos, tem recebido redefinições proporcionais aos avanços tecnológicos (Schulman; Stoeckenius; Prince, 1959).

Atualmente as microemulsões são definidas como um sistema nanoestruturado termodinamicamente estável, isotrópicas e transparentes ou translúcidas, nas quais a fase oleosa está dispersa num meio aquoso ou fase aquosa no meio oleoso, composta por um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando uma interface óleo/água e apresentando gotículas com tamanho menor que 100 nm. Comparada com a nanoemulsão, a microemulsão possui uma escala de gotícula bem menor **Figura 5**, e as substâncias ativas podem ser veiculadas quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (Carvalho, A. L. M. *et al.*, 2016; Lawrence, 1994).

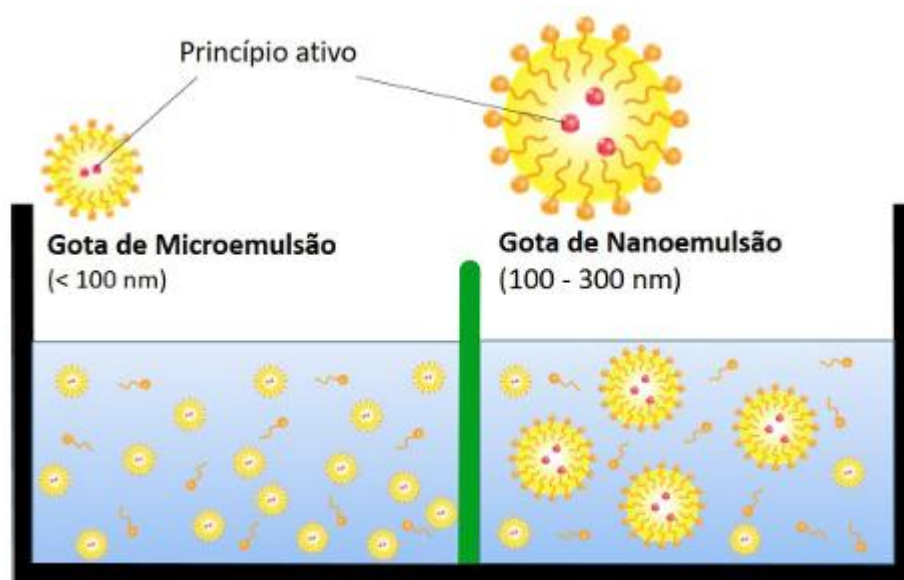


Figura 5 - Gotículas de microemulsão e nanoemulsão.

Fonte: Jensen, 2020.

Os tensoativos permitem um aumento na permeabilidade de membrana celular, o que colabora para a absorção do fármaco e a biodisponibilidade (Formariz *et al.*, 2007; Sintov; Shapiro, 2004). Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e o co-tensoativo (Lawrence, 1994).

As microemulsões são nanoestruturas que podem apresentar aspectos visualmente diferentes dos outros sistemas emulsionados, uma vez que as emulsões clássicas são brancas, de aspecto leitoso e opaco, representadas por sistemas de elevada viscosidade, cujos processos de instabilidade tendem a levar à separação de fases. O sistema microemulsionado é um líquido com boa fluidez, baixa viscosidade, e é opticamente transparente ou translúcido em virtude do reduzido diâmetro das gotículas (Formariz *et al.*, 2007). Estudos com esses nanoestruturados têm sido relevantes na área das ciências farmacêuticas, possibilitando alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com redução de reações adversas (Oliveira *et al.*, 2004).

Os sistemas microemulsionados vêm sendo objeto de várias patentes em todo o mundo, sendo que a China e os Estados Unidos da América são os maiores detentores de patentes envolvendo microemulsões para uso transdérmico, com finalidade de incorporação de diferentes classes terapêuticas de fármacos, como, anti-inflamatório não estereoidal (AINE), anestésicos, imunossupressor, antiparkinsoniano, anti-hormonal, antimicrobiano e até mesmo derivados de plantas (Figueiredo *et al.*, 2013).

O melhoramento da solubilidade de fármacos também pode ser atribuído ao sistema microemulsionado, ao avaliar um gel à base de microemulsão com etoricoxibe, um anti-inflamatório não estereoidal, sendo possível o seu emprego para melhorar a solubilidade e a permeabilidade da pele (Fonseca; Bhide; Joshi, 2019). Outro estudo que corrobora com esses dados, testa um hidrogel microemulsionado no carreamento de 3,5,4' trimetoxi-trans-estilbeno pela via tópica em coelhos, modelo para a osteoartrite. Após o tratamento, houve redução significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e melhor regeneração macroscópica de cartilagem (Hu *et al.*, 2019).

A atividade antifúngica também já foi relatada, ao utilizar uma microemulsão contendo clotrimazol e itraconazol para liberação transdérmica no tratamento da esporotricose, mostrando atividades inibitórias potentes e melhora da permeação, sugerindo então, a sua aplicação como veículo promissor para o tratamento transdérmico da esporotricose (Ferreira *et al.*, 2020).

O recurso das microemulsões também pode ser adotado para melhorar a estabilidade de formulações contendo extrato vegetais, como o trabalho de (Parveen *et al.*, 2019), que desenvolveram uma microemulsão contendo extrato de *Lycopersicon esculentum*, resultando em um sistema estável diante de várias condições simuladas em laboratório. O trabalho de (Ghorbanzadeh *et al.*, 2019), também mostrou melhor estabilidade do hidrogel à base de microemulsão com óleo de gergelim, indicada para prevenção dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta na pele ao testarem em porquinhos da Índia.

3. JUSTIFICATIVA

O tratamento de lesões cutâneas crônicas, como as úlceras do pé diabético, representa um desafio significativo para a saúde pública, especialmente na região amazônica. Em Manaus, a prevalência de Diabetes Mellitus é expressiva, e as complicações decorrentes, como as feridas de difícil cicatrização, resultam em altas taxas de morbidade, prolongados períodos de

internação e desfechos adversos, incluindo amputações (Blanck, 2014; Cunha, 2023; Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas - SES-AM, 2023).

As terapias convencionais, frequentemente baseadas em produtos de alto custo, nem sempre apresentam eficácia satisfatória, o que evidencia a necessidade urgente de desenvolver alternativas terapêuticas mais acessíveis, eficazes e adaptadas à realidade socioeconômica da região (Lima *et al.*, 2012).

A biodiversidade amazônica constitui uma fonte rica e promissora de compostos bioativos com potencial terapêutico (Maciel *et al.*, 2002). Entre as espécies de relevância, destaca-se a *Libidibia ferrea* (popularmente conhecida como Jucá), amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de feridas, contusões e processos inflamatórios (Amorozo, 2002; Carvalho, F. G. *et al.*, 2016). Esse conhecimento tradicional tem sido corroborado por estudos científicos que demonstram as propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante da espécie (Batista *et al.*, 2017; Crisci, 2013; Dias *et al.*, 2013).

A atividade terapêutica da *L. ferrea* está associada ao seu rico perfil fitoquímico, especialmente à presença de taninos, flavonoides e outros compostos fenólicos, que apresentam efeito imunomodulador, favorecendo o controle da resposta inflamatória – aspecto central nas dermatoses crônicas quanto no processo de cicatrização (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2013).

De forma mais específica, estudos aprofundados com frações ricas em taninos da *L. ferrea* demonstraram uma notável capacidade de modular a resposta imune celular. Em modelos experimentais de doenças autoimunes, estes compostos foram capazes de suprimir a produção de citocinas-chave de perfis patogênicos, como o IFN- γ (da resposta Th1) e a IL-17 (da resposta Th17) (Almeida, 2022). A supressão dessas vias inflamatórias, juntamente com a capacidade de reduzir o edema *in vivo* com eficácia comparável a fármacos padrão, confirma o potente efeito anti-inflamatório do extrato (Dias *et al.*, 2013).

Crucialmente, o mesmo estudo demonstrou que, ao mesmo tempo em que suprime as vias inflamatórias, o extrato de *L. ferrea* promove um aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Almeida, 2022). A IL-10 é fundamental para a resolução da inflamação e para a polarização de macrófagos para um fenótipo M2, que é pró-reparador. A capacidade de modular o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias e de influenciar diretamente a biologia de linfócitos T e macrófagos é exatamente o tipo de intervenção necessária para

"desbloquear" o processo de cicatrização estagnado em feridas diabéticas (Leal; Carvalho, 2014).

Contudo, para que o potencial terapêutico dos extratos vegetais se torne clinicamente viável, não é suficiente apenas a comprovação da presença de compostos bioativos. É fundamental o desenvolvimento de sistemas de liberação farmacêutica capazes de superar barreiras específicas da administração tópica, como a limitada permeabilidade do estrato córneo, além de desafios relacionados à baixa solubilidade e à instabilidade dos fitoquímicos (Calixto *et al.*, 2001). Na ausência de uma formulação adequada, a biodisponibilidade dos ativos na pele pode ser insuficiente para alcançar o efeito terapêutico desejado.

Neste contexto, a nanotecnologia farmacêutica, particularmente através do desenvolvimento de sistemas de microemulsão, surge como uma estratégia inovadora e promissora (Figueiredo *et al.*, 2013; Sahu *et al.*, 2015). As microemulsões são sistemas coloidais com gotículas de tamanho nanométrico, que apresentam vantagens significativas, como: (i) formação espontânea e estabilidade termodinâmica; (ii) aumento da área de superfície para contato com a pele; (iii) melhoria da solubilização e da estabilidade dos compostos ativos; e (iv) maior capacidade de permeação cutânea, permitindo que os ativos atinjam camadas mais profundas da epiderme e derme, onde estão localizadas células essenciais para a modulação da resposta inflamatória e do processo cicatricial (Lawrence; Rees, 2012).

Apesar do reconhecido potencial terapêutico da *L. ferrea*, sua associação a sistemas nanoestruturados, como as microemulsões, ainda é pouco explorada na literatura. Portanto, este estudo se justifica pela necessidade de preencher essa lacuna científica, por meio do desenvolvimento e da caracterização físico-química de um sistema de microemulsão do tipo água em óleo (A/O) contendo extrato de *L. ferrea*. Essa etapa é fundamental, pois garante a qualidade, a segurança, a estabilidade e reprodutibilidade da formulação, além de ser pré-requisito para futuras avaliações biológicas e clínicas.

Dessa forma, este trabalho busca propõe-se a ser um avanço na translação do conhecimento tradicional e científico sobre a *L. ferrea* para a obtenção de um produto farmacêutico inovador, com base tecnológica robusta. Espera-se, assim, estabelecer as bases para futuras investigações que avaliem a eficácia e a segurança desta microemulsão como uma alternativa terapêutica para o tratamento de lesões cutâneas de difícil cicatrização, com forte componente inflamatório e imunológico, especialmente no contexto das complicações associadas ao Diabetes Mellitus.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente sistemas microemulsionados contendo extrato metanólico do epicarpo de *L. ferrea*, visando otimizar a veiculação tópica de seus constituintes bioativos e discutir seu potencial para modular respostas imunológicas cutâneas.

4.2 Objetivos Específicos:

1. Realizar a caracterização fitoquímica do extrato metanólico do epicarpo de *L. ferrea* por meio de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS).
2. Revisar, sistematizar e discutir, com base na literatura científica, as propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e cicatrizante dos principais constituintes identificados no extrato de *L. ferrea*.
3. Desenvolver formulações de microemulsões do tipo água em óleo (A/O) contendo o extrato vegetal.
4. Caracterizar físico-quimicamente as microemulsões obtidas, avaliando parâmetros como tamanho de partículas, índice de polidispersidade, potencial zeta, pH, viscosidade, condutividade, estabilidade e morfologia.
5. Avaliar criticamente o potencial das microemulsões desenvolvidas como sistemas de liberação tópica voltados para a modulação de respostas imunológicas e inflamatórias na pele.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipos de Estudos

Trata-se de um estudo experimental voltado ao desenvolvimento farmacotécnico e à caracterização físico-química de sistemas microemulsionados contendo extrato metanólico do epicarpo dos frutos de *Libidibia ferrea*. O estudo visou à obtenção de formulações estáveis, com características físico-químicas adequadas com potencial de aplicação tópica, considerando a veiculação de compostos bioativos com relevância para processos imunológicos e inflamatórios cutâneos.

Nesse contexto, foi possível determinar um objeto de estudo, variáveis capazes de influenciá-lo, diferentes intervenções alocadas de forma controlada e aleatória, além dos critérios para monitoramento e avaliação dos efeitos gerados (OPAS; OMS; BIREME, 2018).

5.2 Material Vegetal e Obtenção do Extrato Metanólico de *L. ferrea*

O extrato metanólico do epicarpo dos frutos de *L. ferrea* foi obtido em parceria com o laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), seguindo protocolo previamente estabelecido por Jensen (2020). O extrato bruto obtido foi armazenado em frascos âmbar, sob condições controladas de temperatura e proteção contra a luz, até sua utilização nas análises fitoquímicas e no desenvolvimento das formulações microemulsionadas.

5.3 Caracterização Fitoquímica do Extrato Metanólico de *L. ferrea*

A caracterização fitoquímica do extrato metanólico foi realizada por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS), com o objetivo de identificar os principais constituintes químicos, especialmente aqueles associados às atividades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e cicatrizantes, conforme descrito na literatura.

Para a análise, o extrato bruto da *L. ferrea* foi solubilizado em metanol grau HPLC, obtendo-se soluções estoque de 1000 ppm. Aliquotas de 10 µL foram diluídas em 1 mL de Metanol. Posteriormente, 5 µL dessas soluções foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas do tipo ion trap, modelo LCQ Fleet, equipado com fonte APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica), operando nos modos positivo e negativo. Os parâmetros analíticos utilizados foram: corrente de descarga (*discharge current*): 5 µA; temperatura do vaporizador (vaporizer temperature): 320 °C; temperatura do capilar (capillary temperature): 220 °C; gás de nebulização (sheath gas): 30 psi; gás auxiliar (aux gas): 10 arb; faixa de massas (mass range): m/z 100-1000. Os espectros de MS/MS foram adquiridos utilizando hélio como gás de colisão

e energia variando entre 20-30%. A identificação presuntiva dos compostos foi realizada por comparação dos espectros obtidos com dados disponíveis na literatura científica especializada.

5.3 Desenvolvimento das Formulações de Microemulsão

Foram desenvolvidas três formulações base: uma microemulsão placebo (MEPLA), sem a adição de extrato vegetal, e duas microemulsões contendo o extrato metanólico do epicarpo de *L. ferrea*, nas concentrações de 10% e 20% (p/p).

As microemulsões foram preparadas utilizando propilenoglicol como tensoativo primário, Tween[®] 80 como cotensoativo (ou tensoativo secundário), água destilada como fase hidrofílica (externa, para sistemas do tipo água em óleo (A/O) e ácido oleico como fase lipofílica (interna). Os componentes foram previamente pesados e, em seguida, misturados sob agitação magnética constante, por aproximadamente 2 minutos, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), até a obtenção de sistemas monofásico, homogêneo, translúcidos ou transparentes, característicos das microemulsões.

5.4 Caracterização Físico-Química das Microemulsões

As formulações de microemulsão (MEPLA, ME 10% e ME 20%) foram submetidas às seguintes análises físico-químicas:

5.4.1 Análises Organolépticas e Determinação do Tipo de Emulsão

As formulações foram inspecionadas visualmente quanto ao aspecto (homogeneidade, separação de fases), cor e odor. O tipo de microemulsão (Óleo/Água - O/A ou Água/Óleo - A/O) foi determinado pelo teste de diluição em água e óleo e pelo teste do corante.

Para o teste de diluição, uma pequena alíquota de cada microemulsão foi adicionada a volumes separados de água destilada e de óleo (ácido oleico). A facilidade de dispersão da microemulsão em água (indicativo de sistema O/A) ou em óleo (indicativo de sistema A/O) foi observada para classificar o tipo de emulsão formada.

O teste do corante foi realizado utilizando um corante hidrossolúvel (solução aquosa de azul de metileno a 1%) e um corante lipossolúvel (solução metanólica de Sudan Black B a 1%). A miscibilidade ou não do corante com a fase externa da microemulsão indica seu tipo.

5.4.2 Determinação de pH, Condutividade Elétrica, Densidade, Índice de Refração, Transmitância e Viscosidade

- **pH:** Medido diretamente nas amostras utilizando um pHmetro (DEL LAB – Modelo DL-pH) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, à temperatura de 25 °C.
- **Condutividade Elétrica:** Medida por imersão direta do eletrodo de um condutivímetro (Quimis – Modelo Q795PN) nas amostras, previamente calibrado com solução padrão de condutância 1408 $\mu\text{S}/\text{cm}$, à temperatura de 25 °C. Valores elevados de condutividade são esperados para sistemas O/A.
- **Densidade:** Determinada utilizando picnômetro de vidro de 25 mL. O picnômetro foi pesado vazio (m_i), preenchido com a amostra e pesado novamente (m_f). A densidade (d) foi calculada pela equação $d = (m_f - m_i)/V$, onde V é o volume do picnômetro, à temperatura de 25 °C.
- **Índice de Refração:** Medido em refratômetro Abbe de bancada (Quimis - Modelo Q767B), utilizando água destilada para calibração, à temperatura de 25 °C.
- **Transmitância:** Na determinação da transmitância, será medida em espectrofotômetro de UV (UV Even – Modelo IL-592), no comprimento de onda de 650 nm, utilizando água para ajuste do zero
- **Viscosidade:** A viscosidade aparente das microemulsões foi determinada utilizando um viscosímetro analógico de Brookfield (BrasEq – Modelo LTV). As medições foram realizadas à temperatura de 25 °C, utilizando o spindle 63 e velocidade de rotação 3, 6 e 12.

5.4.3 Determinação do Tamanho Médio de Gotícula, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta

O tamanho médio das gotículas da fase interna, bem como o índice de polidispersão (PDI) das microemulsões, foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Horiba®, modelo SZ-100.

As amostras foram previamente diluídas em água ultrapura em proporção adequada, visando minimizar os efeitos de espalhamento múltiplo de luz, que podem interferir na acurácia dos resultados. O potencial zeta, parâmetro relacionado à estabilidade eletrostática do sistema coloidal, foi determinado no mesmo equipamento, operando no modo de mobilidade

eletroforética, ou em aparelho equivalente. Este parâmetro reflete a magnitude da repulsão eletrostática entre as partículas e, portanto, fornece uma estimativa da tendência à agregação ou à estabilidade das gotículas na suspensão. Todas as análises foram realizadas em triplicata, à temperatura controlada de 25 °C (± 1 °C).

5.5 Hipóteses

Pergunta do estudo: A incorporação do extrato metanólico de *Libidibia ferrea*, nas concentrações de 10% e 20%, em um sistema de microemulsão do tipo água em óleo (A/O) afeta significativamente as propriedades físico-químicas – como pH, viscosidade, tamanho de partícula e potencial zeta –, bem como a sua estabilidade física, em comparação com uma formulação placebo?

5.5.1 Hipótese Nula (H_0)

A incorporação do extrato metanólico de *L. ferrea*, nas concentrações de 10% e 20% não promovem alterações estatisticamente significativa nas propriedades físico-químicas (pH, viscosidade, tamanho de partícula, potencial zeta) nem a estabilidade física das microemulsões, quando comparadas à formulação placebo (MEPLA).

- **$H_0(a)$:** Não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, tamanho de partícula, potencial zeta) das formulações MEPLA, ME 10% e ME 20%.
- **$H_0(b)$:** A estabilidade física das formulações ME 10% e ME 20% é equivalente à da formulação placebo (MEPLA) sob as condições experimentais avaliadas.

5.5.2 Hipótese Alternativa (H_1)

A incorporação do extrato metanólico de *L. ferrea* promove alterações estatisticamente significativa nas propriedades físico-químicas (pH, viscosidade, tamanho de partícula, potencial zeta) e/ou a estabilidade física das microemulsões, quando comparadas à formulação placebo (MEPLA).

- **$H_1(a)$:** Existe diferença estatisticamente significativa em pelo menos um dos parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, tamanho de partícula, potencial zeta) entre as formulações MEPLA, ME 10% e ME 20%.

- **H₁(b):** A incorporação do extrato de *L. ferrea*, especialmente na concentração de 20%, compromete, parcial ou totalmente, a estabilidade física da formulação, em comparação às formulações MEPLA e a ME 10%.

6. RESULTADOS

6.1 Perfil dos compostos fenólicos do extrato da *L. ferrea* por LC-MS

O espectro de massas obtido em modo negativo por LC-MS para o extrato bruto da *L. ferrea* exibiu íons de moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$) nos valores de m/z 291, 301, 343, 359, 367, 469, 633, os quais são indicativos da presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos. Os espectros de MS^2 dos íons em m/z 301, 359 e 367 apresentaram perdas de massa características, frequentemente associadas à fragmentação de compostos polifenólicos complexos e compostos fenólicos contendo grupos metoxila e/ou éter. Os dados detalhados de identificação presuntiva dos compostos estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Substâncias encontradas no extrato bruto de *L. ferrea*

Substâncias	m/z	Fragmentações	Literatura
Ácido brevifolincarboxílico	291	246	Santos <i>et al</i> , 2013
Ácido elágico	301	257, 229, 185	Mullen <i>et al</i> , 2003
Ácido 5-galoilquínico	343	191	Wyrepkowski <i>et al</i> , 2014
Éter O-glicosídeo de ácido siríngico	359	197, 153	Ismail <i>et al</i> , 2019
Ácido feruloilquínico	367	191, 179	Nesrine <i>et al</i> , 2019
Dilactona do ácido valoneico	468	425	Wyrepkowski <i>et al</i> , 2014
Corilagina	633	463	Ferreira <i>et al</i> , 2019

Fonte: Autores, 2024.

Os espectros de MS^2 das moléculas protonadas em m/z 291, 343, 469, 633 apresentaram vias consistentes com derivados de ácido elágico com grupos metoxila, e com presença ou ausência de grupos metilas ou etilas. De forma consistente, suas perdas foram atribuídas a grupos carboxílicos e hidroxílicos (m/z 291 $\rightarrow$ 246), (m/z 301 $\rightarrow$ 257 $\rightarrow$ 229 $\rightarrow$ 185), (m/z 468 $\rightarrow$ 425) respectivamente (**Figura 6**). Assim, o perfil inicial pelo LS-MS negativo permitiu a identificação de 4 composto fenólicos derivados de do ácido elágico, entretanto deve-se notar que o reconhecimento de compostos fenólicos a partir da análise direta de MS pode ter sido comprometido pelo efeito da matriz sendo necessária a análise HPLC-DAD-MS para uma investigação mais abrangente.

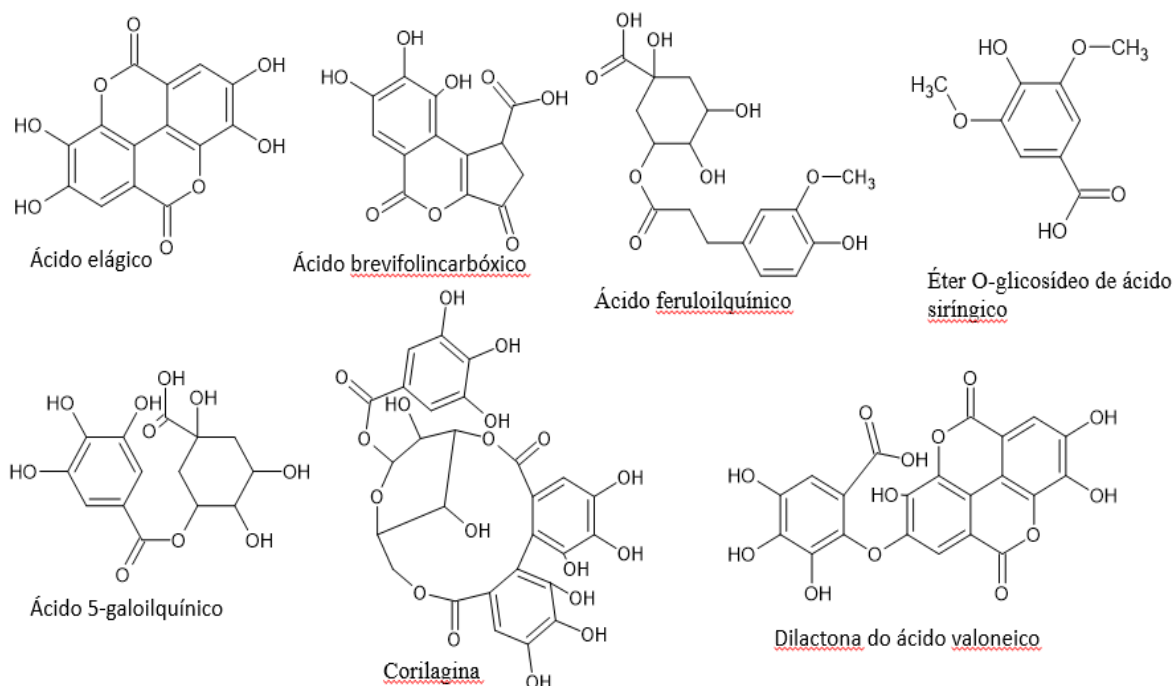


Figura 6 - Grupos carboxílicos e hidroxílicos
 Fonte: Autores, 2024.

6.2 Análise por HPLC-DAD-MS/MS do extrato da *L. ferrea*

O cromatograma de íons totais (TIC) obtido por espectrometria de massas da fração bruta do extrato (**Figuras 7 e 8**) corroborou com os dados obtidos na análise de LC-MS. Os íons de maior intensidade observados foram atribuídos ao ácido elágico, com sinais característicos em m/z 257 e 229, que representam os picos mais proeminentes na análise (**Figura 7**). Além disso, a análise revelou a presença de compostos fenólicos de menor abundância, cujos sinais foram registrados em m/z 343 e 367, também compatíveis com os dados de LC-MS. Os espectros de fragmentação (MS^2) dos íons em 343 e 367 apresentaram fragmentos comuns em m/z 191 (pico base), sugerindo que se trata de derivados de ácido elágico.

O padrão de fragmentação observado, particularmente relacionado aos íons correspondentes ao ácido 5-galoilquínico e ao ácido feruloilquínico, é consistente com a presença de compostos fenólicos, como o ácido gálico, ácido ferúlico e ácido químico, que são frequentemente relatados na composição fitoquímica de *L. ferrea*. A proposta de identificação desses compostos foi confirmada por meio da comparação dos espectros MS^2 obtidos com dados previamente descritos na literatura científica especializada.

LB MeOH_APCI_NEG #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 2,39E3
T: ITMS - c APCI corona Full ms [150,00-800,00]

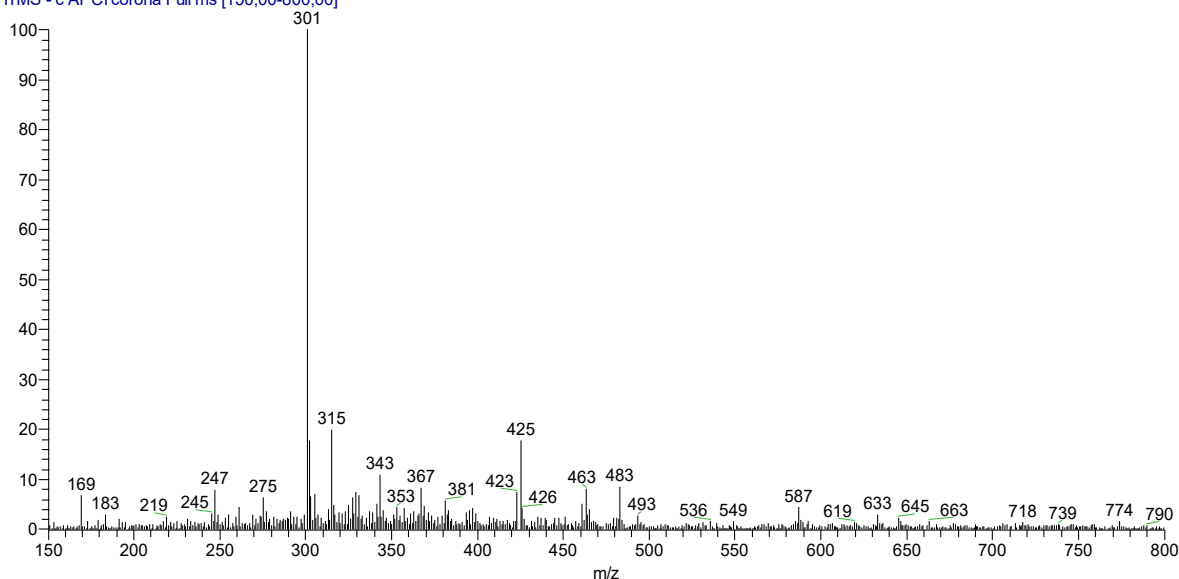


Figura 7 - Íons mais intensos observado no experimento de LC-MS
Fonte: Autores, 2024.

LB MeOH APCI POS #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 2,00E4
T: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-800,00]

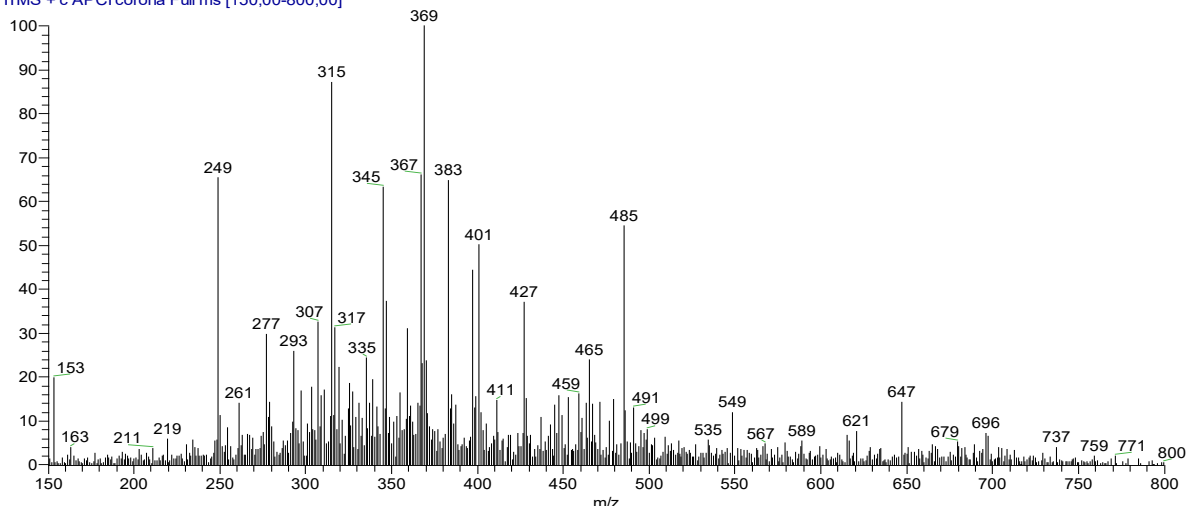


Figura 8 - Cromatograma de íons totais (TIC) por espectrometria de massas da fração bruta do extrato
Fonte: Autores, 2024.

6.3 Caracterização das microemulsões

Todas as formulações apresentaram-se como líquidos homogêneos, sendo a microemulsão placebo (MEPLA) transparente, enquanto as microemulsões contendo extrato (ME 10% e ME 20%) mostraram-se translúcidas, com coloração marrom, cuja intensidade aumentou proporcionalmente à concentração do extrato.

As formulações contendo o extrato apresentaram odor característico do material vegetal. O teste de diluição em ácido oleico (fase externa) e a ausência de miscibilidade em água (fase

interna) confirmaram que todas as formulações desenvolvidas eram do tipo água em óleo (A/O), conforme apresentado na **Tabela 2 e Figura 9**.

Tabela 2 - Características Organolépticas e Tipo de Microemulsão das Formulações.

Parâmetro	MEPLA	ME 10%	ME 20%
Aspecto Visual	Líquido transparente e homogêneo	Líquido translúcido e homogêneo	Líquido translúcido e homogêneo
Cor	Amarelo claro	Marrom escuro	Marrom escuro intenso
Odor	Característico dos componentes	Característico do extrato	Característico do extrato
Tipo de Emulsão (Teste de Diluição)	A/O (dispersou em óleo)	A/O (dispersou em óleo)	A/O (dispersou em óleo)

Fonte: Autores, 2025.



Figura 9 - Teste de diluição
Fonte: Autores, 2025.

6.3.1 Propriedades Físico-Químicas das Microemulsões

O valor de pH encontrado na microemulsão de MPLA foi igual a $5,91 \pm 0,03$, enquanto nas formulações ME 10% e ME 20% observou-se que, à medida que a concentração do extrato aumentou, a formulação tornou-se mais ácida. Os valores de densidade das microemulsões MPLA, ME 10% e ME 20% foram, respectivamente, $1,042 \pm 0,001$; $1,090 \pm 0,002$ e $1,130 \pm 0,0$, conforme apresentado na **Tabela 3**.

No teste de viscosidade, foi possível verificar que o aumento da concentração do extrato da *L. ferrea* resultou em formulações mais viscosas. De maneira semelhante, os valores de índice de refração também aumentaram proporcionalmente à concentração do extrato, indicando maior densidade óptica nas formulações com maiores teores ativos.

Tabela 3 - Caracterização das microemulsões (MEPLA, ME 10% & ME 20%)

Parâmetro	MEPLA [Valor $\pm$ DP]	ME 10% [Valor $\pm$ DP]	ME 20% [Valor $\pm$ DP]
pH	$5,91 \pm 0,08$	$4,11 \pm 0,11$	$3,65 \pm 0,07$

Condutividade Elétrica (μS/cm)	0,009 ± 0,0	0,034 ± 0,0	0,034 ± 0,0
Densidade (g/mL)	1,040 ± 0,0	1,090 ± 0,0	1,130 ± 0,0
Índice de Refração	1,434 ± 0,001	1,450 ± 0,001	1,465 ± 0,001
Viscosidade (cP) (Spindle 63 / 12 RPM)	220 ± 26,5	533,3 ± 28,9	1650 ± 173,2
Tamanho Médio de Partícula (nm)	253,53 ± 15,94	255 ± 6,1	344,9 ± 11,56
Índice de Polidispersão (PDI)	0,4 ± 0,049	0,3 ± 0,058	0,228 ± 0,071
Potencial Zeta (mV)	-69,2 ± 3,4	-70,4 ± 1,7	-48,9 ± 5,9

Fonte: Autores, 2024.

7. DISCUSSÃO

Este estudo focou no desenvolvimento e na caracterização físico-química de microemulsões do tipo água em óleo (A/O) contendo extrato metanólico do epicarpo de *Libidibia ferrea*. Esta planta amazônica é tradicionalmente utilizada para diversas afecções cutâneas, e a formulação em um sistema microemulsionado visa otimizar a entrega tópica de seus fitoquímicos, particularmente aqueles com potencial para modular respostas imunológicas e inflamatórias.

7.1 Perfil Fitoquímico do Extrato de *L. ferrea* e seu Potencial Imunológico

A caracterização fitoquímica do extrato metanólico do epicarpo de *L. ferrea* revelou um perfil rico em compostos fenólicos, notadamente derivados de ácido gálico e elágico, como o ácido 5-galoilquínico e a corilagina. Esses achados corroboram a literatura, que descreve taninos e flavonoides como constituintes majoritários da planta (Carvalho, F. G. *et al.*, 2016). O potencial terapêutico deste extrato, especialmente no contexto complexo das feridas diabéticas, pode ser compreendido ao analisar como esses compostos podem antagonizar os desarranjos imunológicos específicos que perpetuam o estado crônico dessas lesões.

O ambiente de uma ferida diabética é caracterizado por uma fase inflamatória prolongada e desregulada. Há uma infiltração persistente de neutrófilos e macrófagos com um fenótipo predominantemente pró-inflamatório (M1), que liberam altos níveis de citocinas como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) (Leal; Carvalho, 2014). Neste cenário, os compostos identificados no extrato de *L. ferrea* apresentam um potencial terapêutico direto. Estudos demonstram que o ácido gálico e o ácido elágico são capazes de suprimir a produção dessas mesmas citocinas pró-inflamatórias, frequentemente através da inibição de vias de sinalização intracelular, como a do fator de transcrição NF- κ B, que é um mestre regulador da resposta inflamatória (Dias *et al.*, 2013). A atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *L. ferrea* foi confirmada *in vivo* em um modelo de edema de pata induzido por carragenina, onde demonstrou eficácia comparável à indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal padrão. Isso sugere que o extrato, como um todo, possui uma potente capacidade de conter a hiperinflamação, um dos pilares da patologia da ferida diabética (Dias *et al.*, 2013).

Um ponto de controle crucial na transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização é a plasticidade funcional dos macrófagos. Em uma cicatrização normal, os macrófagos transitam do fenótipo M1 (inflamatório e microbicida) para o M2 (anti-inflamatório

e pró-reparador), que secreta fatores de crescimento e citocinas que promovem a angiogênese e a deposição de matriz. Nas feridas diabéticas, essa transição M1-M2 é severamente prejudicada, aprisionando a ferida na fase inflamatória (Leal; Carvalho, 2014). Embora estudos diretos sobre a polarização de macrófagos pelo extrato de *L. ferrea* sejam necessários, a eficácia demonstrada contra *Leishmania sp.* oferece uma pista importante (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017). O controle da *Leishmania*, um parasita intracelular de macrófagos, depende criticamente da ativação adequada dessas células (uma resposta Th1 clássica). A capacidade do extrato de atuar nesse modelo sugere uma interação direta com a biologia dos macrófagos. Portanto, é plausível hipotetizar que os compostos do extrato possam modular a atividade dos macrófagos na ferida diabética, ajudando a resolver a inflamação e a promover a transição para um fenótipo pró-reparo.

Além da desregulação de citocinas e macrófagos, o microambiente da ferida diabética é hostil devido ao intenso estresse oxidativo e à alta carga microbiana. Os altos níveis de glicose levam à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam dano celular e perpetuam a inflamação. Os compostos fenólicos e taninos da *L. ferrea* são potentes antioxidantes, capazes de neutralizar esses radicais livres e proteger as estruturas celulares do dano oxidativo. Adicionalmente, os taninos, abundantes na planta, possuem atividade antimicrobiana e a capacidade de formar uma camada protetora adstringente sobre o tecido lesado. Essa "crosta biológica" não só protege a ferida de contaminações externas, mas também modula o microambiente local, reduzindo a exsudação e o estímulo inflamatório constante causado pela presença de patógenos (Batista *et al.*, 2017). Ao controlar tanto o estresse oxidativo quanto a carga microbiana, o extrato de *L. ferrea* atua em duas frentes adicionais que contribuem para a quebra do ciclo vicioso da inflamação crônica.

Em suma, o perfil fitoquímico do extrato de *L. ferrea* o posiciona como um candidato terapêutico multifuncional para o tratamento de feridas diabéticas. Sua combinação de atividades anti-inflamatória (supressão de citocinas), potencial de modulação de macrófagos, ação antioxidante e proteção antimicrobiana/adstringente permite que ele atue simultaneamente em diversos dos principais pontos de falha imunológica que caracterizam a não cicatrização nessas lesões. A veiculação desses compostos através de uma microemulsão, como a desenvolvida neste trabalho, torna-se então uma estratégia crucial para garantir que esses agentes bioativos atinjam seu local de ação na pele de forma eficaz.

7.2 Desafios no Desenvolvimento e Caracterização das Microemulsões A/O com *L. ferrea*

As formulações foram inicialmente caracterizadas como microemulsões A/O (**Tabela 1**), com a fase oleosa (ácido oleico) como contínua, o que é evidenciado pelos baixos valores de condutividade elétrica (**Tabela 2**). O desenvolvimento das formulações, no entanto, revelou dois desafios principais. O primeiro foi a estabilidade física da formulação ME 20%, que se mostrou instável nos testes preliminares.

A alta concentração de extrato (20%) provavelmente excedeu a capacidade do sistema tensoativo em manter a integridade da microemulsão. Este resultado indica que, para a atual composição, existe um limite de incorporação do extrato para garantir a estabilidade do sistema.

Outro ponto crítico é o pH das formulações contendo extrato. A ME 10% apresentou pH de $4,11 \pm 0,11$ e a ME 20% um pH ainda mais ácido de $3,65 \pm 0,07$ (**Tabela 2**). Embora o pH fisiológico da superfície da pele seja ácido (em torno de 4,5-5,5), valores de pH abaixo de 4,0 podem ser potencialmente irritantes para a pele humana, especialmente com o uso contínuo ou em peles sensíveis ou comprometidas. A acidez é provavelmente derivada dos próprios constituintes do extrato, como os ácidos fenólicos. Portanto, este resultado aponta para a necessidade de adotar estratégias de correção de pH para um nível de maior compatibilidade com a pele (idealmente entre 4,5 e 5,5), de forma que não altere as propriedades físico-químicas, a estabilidade da formulação ou a integridade dos ativos do extrato.

7.3 Análise das Propriedades Físico-Químicas das Formulações Mais Promissoras (MEPLA e ME 10%)

A análise comparativa das formulações indicou que, embora a incorporação do extrato de *L. ferrea* tenha sido bem-sucedida em duas concentrações, a instabilidade física da ME 20% direciona o foco para a ME 10% como a formulação mais promissora e robusta deste estudo. A discussão a seguir aprofunda a análise das características físico-químicas da ME 10% em comparação com o veículo placebo (MEPLA), ressaltando a importância desses parâmetros para um potencial aplicação tópica.

A viscosidade é um parâmetro reológico crucial que dita o comportamento da formulação durante o armazenamento e a aplicação na pele. A ME 10% apresentou uma viscosidade significativamente maior ($533,3 \pm 28,9$ cP) em comparação com a MEPLA ($220 \pm 26,5$ cP) (**Tabela 2**). Esse aumento é esperado e pode ser atribuído a um aumento no volume da fase interna dispersa (água + extrato) e às interações intermoleculares entre os componentes do extrato e a estrutura da microemulsão. Uma viscosidade mais elevada é vantajosa para a

aplicação tópica, pois confere à formulação uma consistência que aumenta o seu tempo de residência no local de aplicação, evitando o escorrimento e garantindo um contato mais prolongado entre os compostos ativos e a pele (Tirnaksiz *et al.*, 2012). Essa propriedade é essencial para otimizar a liberação e a permeação dos ativos, sendo uma característica desejável em veículos dermatológicos (Fonseca; Bhide; Joshi, 2019).

As características coloidais, como o tamanho de partícula e o índice de polidispersão (PDI), são determinantes para o desempenho de sistemas microemulsionados. A ME 10% apresentou um tamanho médio de gotícula de $255,00 \pm 6,10$ nm. Estes sistemas com gotículas na faixa nanométrica são altamente vantajosos em comparação com emulsões convencionais, pois o tamanho reduzido aumenta drasticamente a área de superfície total do sistema (Oliveira *et al.*, 2004). Uma maior área de superfície pode facilitar a partição e a difusão dos compostos ativos do veículo para a pele, potencializando sua eficácia. O PDI da ME 10% ($0,300 \pm 0,058$) indica uma distribuição de tamanho de gotícula razoavelmente homogênea, o que é fundamental para a uniformidade do produto e para a previsibilidade de sua estabilidade e desempenho (Parveen *et al.*, 2019).

O potencial zeta é um indicador chave da estabilidade de dispersões coloidais. A formulação ME 10% apresentou um valor de potencial zeta de $-70,40 \pm 1,70$ mV, um valor altamente negativo que sugere uma excelente estabilidade física a longo prazo. Geralmente, valores de potencial zeta com magnitude superior a $|30|$ mV indicam que a repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas é forte o suficiente para superar as forças de *van der Waals*, prevenindo a agregação e a coalescência (Formariz *et al.*, 2007). Embora em sistemas A/O a estabilização estérica pelos tensoativos seja frequentemente o mecanismo dominante, a presença de uma contribuição eletrostática tão significativa é um achado notável e muito positivo. A forte carga negativa pode ser atribuída à ionização de grupos carboxílicos do ácido oleico (fase externa) e/ou à adsorção de componentes aniônicos do extrato de *L. ferrea* na interface água/óleo, contribuindo para a robustez da formulação (Tirnaksiz *et al.*, 2012).

7.4 Implicações para a Veiculação Tópica e Modulação Imunológica Cutânea: Potencial e Otimizações Necessárias

A formulação do extrato de *L. ferrea* em um sistema de microemulsão do tipo água em óleo (A/O) representa uma estratégia farmacotécnica deliberada para superar as limitações da administração tópica e potencializar a ação de seus compostos bioativos. As vantagens teóricas de um veículo A/O, como o da formulação ME 10%, são particularmente relevantes para o tratamento de peles comprometidas, como as que apresentam feridas diabéticas (Crisci, 2013).

Sistemas A/O são conhecidos por formarem um filme lipídico sobre a pele, que exerce um efeito oclusivo. Essa oclusão reduz a perda de água transepidérmica, promovendo a hidratação do estrato córneo. Um estrato córneo mais hidratado torna-se mais permeável a muitos compostos ativos, facilitando sua penetração para as camadas mais profundas (Lawrence; Rees, 2012). Adicionalmente, a fase oleosa externa contínua, composta por ácido oleico, possui alta afinidade com os lipídios intercelulares da pele, o que pode facilitar a adesão e a fusão da formulação com a barreira cutânea.

O grande desafio de um sistema A/O é a entrega de compostos hidrofílicos, como são muitos dos polifenóis bioativos da *L. ferrea* (ácido gálico, elágico, etc.). Neste sistema, esses compostos estão encapsulados nas nanogotículas aquosas internas (**Tabela 2**). Este encapsulamento oferece uma vantagem crucial: a proteção dos ativos contra a degradação no ambiente externo antes de atingirem a pele. A liberação desses compostos para a pele depende de sua partição da fase aquosa interna, através da interface estabilizada pelos tensoativos, para a fase oleosa externa e, finalmente, para a pele (Lawrence; Rees, 2012).

O tamanho nanométrico das gotículas dispersas cria uma área interfacial imensa, o que favorece cineticamente este processo de transferência de massa. Além disso, os próprios tensoativos utilizados na formulação (propilenoglicol, Tween® 80) podem atuar como promotores de permeação, interagindo com os lipídios do estrato córneo e desorganizando-os temporariamente, criando "caminhos" para a entrada dos ativos (Sahu *et al.*, 2015).

A entrega eficiente desses compostos às camadas viáveis da epiderme e derme é a chave para a modulação imunológica. A pele é um órgão imunologicamente complexo, populado por diversas células de defesa. Na epiderme, as células de Langerhans e os próprios queratinócitos atuam como sentinelas, capazes de iniciar e propagar respostas inflamatórias através da liberação de citocinas como TNF- α e IL-1 β . Na derme, residem macrófagos, mastócitos e linfócitos. Ao facilitar a penetração dos compostos da *L. ferrea*, a microemulsão A/O pode permitir que estes ajam diretamente sobre essas células. Poderíamos hipotetizar que o ácido gálico e elágico, ao alcançarem os queratinócitos de uma ferida diabética, poderiam reduzir a produção de citocinas inflamatórias. Da mesma forma, ao penetrarem na derme, poderiam modular a atividade dos macrófagos, auxiliando na crucial transição do fenótipo M1 (pró-inflamatório) para M2 (pró-reparo), um processo que, como discutido, é deficiente nessas lesões (Leal; Carvalho, 2014).

Entretanto, a concretização desse potencial terapêutico depende diretamente da superação dos desafios de formulação identificados. A principal barreira para a aplicação da

ME 10%, que se mostrou a mais estável, não é sua estrutura coloidal, que com o seu tamanho nanométrico e alto potencial zeta (-70,4 mV) é bastante promissora, mas sim o seu pH final de $4,11 \pm 0,11$. Para uma formulação destinada a peles comprometidas, como as diabéticas, a compatibilidade fisiológica é imperativa. Portanto, a viabilidade da formulação para uso em pele humana está condicionada à sua otimização. É fundamental desenvolver e testar estratégias para o ajuste do pH para uma faixa mais próxima do fisiológico (entre 4,5 e 5,5), garantindo que tal modificação não comprometa a estabilidade físico-química da microemulsão nem a integridade dos seus compostos ativos. Somente após essa otimização será possível explorar de forma segura e eficaz o potencial imunomodulador da formulação .

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou com sucesso o desenvolvimento e a caracterização físico-química de uma microemulsão do tipo água em óleo (A/O) capaz de incorporar de forma estável 10% do extrato metanólico de *Libidibia ferrea* (formulação ME 10%). A formulação promissora apresentou características de um sistema coloidal de alta qualidade, incluindo tamanho de partícula na faixa nanométrica ($255,00 \pm 6,10$ nm), boa homogeneidade (PDI de $0,300 \pm 0,058$) e um potencial zeta altamente negativo ($-70,40 \pm 1,70$ mV), indicativo de excelente estabilidade eletrostática. Os desafios encontrados, como a instabilidade física da formulação com 20% de extrato e o pH ácido das formulações ativas, não são apenas limitações, mas achados científicos valiosos que estabelecem os parâmetros críticos para futuras otimizações. Assim, este trabalho não só alcançou seu objetivo principal, mas também mapeou o caminho para a transformação de um extrato natural em um produto farmacêutico viável.

A relevância terapêutica desta formulação reside na sua capacidade de veicular um complexo de fitoquímicos com notável potencial para o tratamento de feridas com componente inflamatório e imunológico, como as úlceras diabéticas. Dentre os compostos identificados no extrato de *L. ferrea*, o ácido elágico e a corilagina (um elagitânico) emergem como substâncias de particular interesse. O ácido elágico é um potente antioxidante e anti-inflamatório, capaz de neutralizar o estresse oxidativo e suprimir citocinas que perpetuam a inflamação crônica na ferida diabética. A corilagina, por sua vez, possui atividade imunomoduladora, com potencial para influenciar o comportamento de macrófagos, células-chave cujo desequilíbrio funcional impede a progressão da cicatrização. A microemulsão A/O desenvolvida serve como um veículo ideal para entregar essa combinação sinérgica de ativos, protegendo-os e potencializando sua chegada ao microambiente cutâneo.

Com base nos resultados positivos da formulação ME 10%, a perspectiva de avanço para estudos biológicos é clara e promissora. O próximo passo mandatório é a otimização da formulação, com foco no ajuste do pH para uma faixa fisiologicamente compatível (4,5-5,5), garantindo a segurança e a tolerabilidade cutânea. Uma vez obtida essa formulação otimizada e segura, projeta-se um futuro estudo *in vivo* para avaliar sua eficácia cicatricial, utilizando um modelo de ferida excisional em ratos com diabetes induzido.

A comprovação de que a formulação otimizada acelera a cicatrização e promove a transição de um perfil inflamatório para um perfil pró-reparador forneceria a evidência pré-clínica necessária para consolidar o extrato de *L. ferrea*, veiculado nesta microemulsão, como uma nova e valiosa terapia derivada da biodiversidade amazônica.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS

As principais limitações deste trabalho são a instabilidade da formulação com 20% de extrato e o pH ácido das formulações com 10% e 20%. As perspectivas futuras devem, portanto, centrar-se na resolução desses problemas:

Otimização da Formulação: Explorar diferentes sistemas tensoativos ou proporções para melhorar a estabilidade em maiores concentrações de extrato.

Estratégias de Ajuste de pH: Implementar e avaliar métodos para a correção do pH das formulações para uma faixa fisiologicamente aceitável. Isso pode envolver o uso de agentes alcalinizantes ou sistemas tampão na fase aquosa antes da emulsificação, com uma reavaliação completa da estabilidade, tamanho de partícula, PDI e potencial zeta pós-ajuste.

Avaliação da Segurança Cutânea: Após a otimização do pH, realizar testes de irritabilidade cutânea *in vitro* para validar a segurança da formulação final.

Estudos de Liberação e Permeação: Investigar a liberação e a permeação dos ativos a partir da formulação otimizada.

Investigação da Atividade Imunomoduladora *in vivo*: Com uma formulação otimizada, estável e segura, proceder com os ensaios em modelos celulares para avaliar seu impacto em mediadores inflamatórios e células do sistema imune, além de avaliar o perfil imunomodulatório estimado pela dosagem de citocinas. Tal estudo poderia incluir: (i) a análise macroscópica da taxa de contração da ferida ao longo de 14 a 21 dias; (ii) a análise histológica patológica para avaliar a qualidade do novo tecido, quantificando a reepitelização, a deposição de colágeno (por coloração de Tricrômico de Masson) e a angiogênese; e (iii) crucialmente, a análise imuno-histoquímica para investigar os mecanismos imunomoduladores, através da marcação de macrófagos de fenótipo M1 (ex: iNOS⁺) e M2 (ex: Arginase-1⁺ ou CD206⁺) no tecido cicatricial

10. CRONOGRAMA

ATIVIDADES	PERÍODO																							
	2023												2024										2025	
	1º Semestre						2º Semestre						1º Semestre					2º Semestre					1º Semestre	
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Disciplinas Obrigatórias/Optativas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
Artigo de revisão de Literatura							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Elaboração do projeto para submissão ao CEUA	X	X	X	X	X	X	X																	
Submissão ao CEUA								X	X	X	X													
Curso de capacitação e certificação do Biotério Central do INPA																	X	X						
Qualificação																	X							
Coleta de dados															X	X	X				X	X	X	
Análise de dados																					X	X	X	
Elaboração artigo																	X	X	X	X	X	X	X	
Submissão do artigo																								X
Escrita dissertação																				X	X	X	X	
Defesa																								X

11. EQUIPE DO PROJETO

Nome completo	Jonatas de Souza Queiroz
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Mestrando PPGIBA
Telefone	(92) 99308-4093
E-mail	jonatas.queiroz@ufam.edu.br
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/6671287839360046
Função no projeto	Pesquisador

Nome completo	José Fernando Marques Barcellos
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Doutor
Telefone	(92) 98122-6666
E-mail	fmarques@ufam.edu.br
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/9296854102700928
Função no projeto	Orientador

Nome completo	Bruno Bezerra Jensen
Instituição	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Nível acadêmico	Doutor
Telefone	(92) 98404-3590
E-mail	brunobjensenfarma@gmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/9739896616838681
Função no projeto	Coorientador

Nome completo	Priscila Gonçalves Jacinto Figueredo
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Mestre
Telefone	(63)984002593
E-mail	pris.fly2@gmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/1066810752883157
Função no projeto	Colaboradora geral para desenvolvimento das Etapas 1 e 2 do estudo.

Nome completo	Géssica Liana Dos Santos Lima
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Acadêmico de Medicina
Telefone	(92) 98198-3457
E-mail	gessica.slima@outlook.com
Link do Currículo Lattes	https://lattes.cnpq.br/4523549661923364
Função no projeto	Aluna de Iniciação Científica

Nome completo	Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Doutora
Telefone	(92) 99393-3324
E-mail	katiasantos@ufam.edu.br
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/9335611922167342
Função no projeto	Pesquisadora colaboradora especialista na produção das microemulsões

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. C. O. da S. Evidências da ação anti-inflamatória de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz em modelos experimentais in vivo e in vitro: Uma revisão sistemática. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/8699>. Acesso em: 19 out. 2022.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 37, n. Supplement_1, p. S81–S90, 2013.

AMÉRICO, Á. V. L. dos S. *et al.* Efficacy of Phytopharmaceuticals From the Amazonian Plant *Libidibia ferrea* for Wound Healing in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 7, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00244>. Acesso em: 19 out. 2022.

AMOROZO, M. C. de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 16, p. 189–203, 2002.

AZEVEDO, W. T. de A. *et al.* Record of the First Cases of Human Myiasis by *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1368–1373, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv130>. Acesso em: 22 fev. 2024.

BATISTA, E. K. F. *et al.* AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE PREPARADOS À BASE DE JUCÁ (*Caesalpinia ferrea* Mart.). **Arch Vet Sci**, [s. l.], v. 22, n. 3, 2017. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/50360>. Acesso em: 3 jan. 2023.

BERTOLUCI, M. C. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2023. ed. São Paulo, SP: L3 Soluções em tecnologia ltda, 2023.

BLANCK, M. **Úlceras e Feridas. As Feridas Tem Alma**. [S. l.]: Di Livros, 2014.

BORGES, M. Ensaio Clínicos em Medicamentos. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, [s. l.], n. 24, p. 57–63, 2013.

BROUGHTON, G. I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 117, n. 7S, p. 12S, 2006a.

BROUGHTON, G. I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound Healing: An Overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 117, n. 7S, p. 1e, 2006b.

CABRAL, A. D. *et al.* TERAPIAS INOVADORAS PARA REPARO TECIDUAL EM PESSOAS COM PÉ DIABÉTICO. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, [s. l.], v. 96, n. 39, 2022. Disponível em:

<http://www.revistaenfermagematual.com.br/index.php/revista/article/view/1365>. Acesso em: 2 jun. 2024.

CALIXTO, J. B. *et al.* Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 261–279, 2001.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [s. l.], v. 20, p. 51–58, 2007.

CARVALHO, F. G. *et al.* Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 137–143, 2016.

CARVALHO, A. L. M. *et al.* Evaluation of Microemulsion and Lamellar Liquid Crystalline Systems for Transdermal Zidovudine Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 7, p. 2188–2193, 2016.

CAVALHEIRO, M. G. *et al.* Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, p. 586–591, 2009.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, [s. l.], v. 97, n. 1, Emergency Pediatric Surgery, p. 189–207, 2017.

COBAS, R. *et al.* Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. In: BERTOLUCI, M. C. *et al.* **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2023. ed. [S. l.]: Conectando Pessoas, 2023. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/diagnostico-e-rastreamento-do-diabetes-tipo-2/>. Acesso em: 27 maio 2024.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. *et al.* Atividade anti-leishmania de extratos de *Libidibia ferrea*: desenvolvimento de testes *in vitro* e *in vivo*. **Acta Amazonica**, [s. l.], v. 47, p. 331–340, 2017.

CRISCI, A. R. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea* ex. TUL. var *ferrea* e da *Aloe vera* (L.) Burm. f. em lesões cutâneas totais em ratos. **Biológicas & Saúde**, [s. l.], v. 3, n. 11, 2013. Disponível em: https://ojs3.perspectivasonline.com.br/biologicas_e_saude/article/view/13. Acesso em: 3 jan. 2023.

CUNHA, A. P. *et al.* Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 65, p. 68–76, 2017.

CUNHA, A. M. **Programa “Pé Diabético” atende mais de 170 mil pacientes no AM.** [S. l.], 2023. Disponível em: <https://agenciacenarium.com.br/programa-pe-diabetico-atende-mais-de-170-mil-pacientes-no-am/>. Acesso em: 19 jul. 2024.

DASKALAKI, A. *et al.* Well-promising outcomes with vacuum-assisted closure in an infected wound following laparotomy: A case report. **Annals of Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 10, p. 73, 2016.

DE NEGREIROS, R. *et al.* Internação por diabetes mellitus no Brasil entre 2016 e 2020 / Hospitalization for diabetes mellitus in Brazil between 2016 and 2020. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, p. 77218–77232, 2021.

DIABETES MILLITUS. [S. l.]: Ms, 2006. (Série a. Normas E Manuais Tecnicos; Cadernos De Atenção Básica Nº 15).

DIAS, A. M. A. *et al.* Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 74, p. 34–45, 2013.

DOMINGUES, E. A. R.; URIZZI, F.; SOUZA, F. R. de. EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM FERIDAS AGUDAS E CRÔNICAS: REVISÃO DE ESCOPO. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, [s. l.], v. 96, n. 38, p. e-021243, 2022.

DUMVILLE, J. C. *et al.* Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], n. 1, 2013. Disponível em: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD010318/full>. Acesso em: 2 jun. 2024.

FERNANDES, C. P. M. *et al.* Repellent Action of *Carapa guianensis* and *Caesalpinia ferrea* for flies species of *Calliphoridae* family. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 46, p. 867–870, 2016.

FERREIRA, P. G. *et al.* Investigation of a Microemulsion Containing Clotrimazole and Itraconazole for Transdermal Delivery for the Treatment of Sporotrichosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 1026–1034, 2020.

FERREIRA, R. C. Pé diabético. Parte 1: Úlceras e Infecções*. **Revista Brasileira de Ortopedia**, [s. l.], v. 55, p. 389–396, 2020.

FERREIRA, P. D. A. M. Topical therapy of wounds: availability and use in primary health care centers. **Journal of Nursing Ufpe Online**, [s. l.], 2015. Disponível em: https://www.academia.edu/100380874/Topical_therapy_of_wounds_availability_and_use_in_primary_health_care_centers. Acesso em: 2 jun. 2024.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 140–150, 2015.

FIGUEIREDO, K. A. *et al.* MICROEMULSIONS FOR TRANSDERMAL DRUGS DELIVERY SYSTEMS: AN EXPLORATION TECHNOLOGY. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 036–046, 2013.

FONSECA, V. R.; BHIDE, P. J.; JOSHI, M. P. Formulation, Development and Evaluation of Etoricoxib Nanosize Microemulsion Based Gel for Topical Drug Delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, [s. l.], v. 53, n. 4s, p. s571–s579, 2019.

FORMARIZ, T. P. *et al.* Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 28–35, 2007.

FREITAS, A. C. C. *et al.* Biological Activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2012, n. 1, p. 514134, 2012.

GARY SIBBALD, R.; WOO, K. Y. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, [s. l.], v. 24, n. S1, p. S25–S30, 2008.

GHORBANZADEH, M. *et al.* Formulation, clinical and histopathological assessment of microemulsion based hydrogel for UV protection of skin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 179, p. 393–404, 2019.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. de M.; BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* mart. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 40, p. 78 res. FM25, 2004.

GU, W. *et al.* Nanotechnology in the targeted drug delivery for bone diseases and bone regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 2305–2317, 2013.

HAFNER, A. *et al.* Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1005–1023, 2014.

HARDY, K. *et al.* Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. **Naturwissenschaften**, [s. l.], v. 99, n. 8, p. 617–626, 2012.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. **Nature**, [s. l.], v. 152, n. 3847, p. 102–103, 1943.

HU, X.-B. *et al.* Topical delivery of 3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene-loaded microemulsion-based hydrogel for the treatment of osteoarthritis in a rabbit model. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 357–365, 2019.

HUIJBERTS, M. S. P.; SCHAPER, N. C.; SCHALKWIJK, C. G. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, [s. l.], v. 24, n. S1, p. S19–S24, 2008.

IGNOATO, M. C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de Aeschynomene fluminensis e de Machaerium hirtum (Fabaceae) de Porto Rico – Paraná**. 2012. Tese - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/1119>. Acesso em: 19 jul. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Prévia da população calculada com base nos resultados do Censo Demográfico 2022 até 25 de dezembro de 2022**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. Disponível em: https://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Demografico_2022/Previa_da_Populacao/POP2022_Brasil_e_UFs.pdf. .

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 10th edn**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation: [s. n.], 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

KHAMAIISI, M.; BALANSON, S. Dysregulation of wound healing mechanisms in diabetes and the importance of negative pressure wound therapy (NPWT). **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. e2929, 2017.

KOBAYASHI, Y. T. da S. *et al.* Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 34–40, 2015.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: Microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 257–269, 1994.

LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 157–169, 1994.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, MOST CITED PAPERS IN THE

HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL, p. 175–193, 2012.

LEAL, E. C.; CARVALHO, E. Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 133–143, 2014.

LESLIE, R. D. *et al.* Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 2449–2456, 2021.

LIMA, C. R. de O. *et al.* CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO. REVISÃO DE LITERATURA. **Revista CFMV. Ano. XVIII.**, [s. l.], v. 2, n. 56, p. 53–59, 2012.

LUCIO, F. D.; PAULA, C. F. B. Fotobiomodulação no processo cicatricial de lesões - estudo de caso. **CuidArte, Enferm**, [s. l.], p. 111–114, 2020.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, p. 429–438, 2002.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 78, p. 525–542, 2003.

MENEZES, S. M. de; FONSECA, A. K. B.; MATOS, N. M. de. Perfil de pacientes com lesões cutâneas hospitalizados em uma unidade de internação de clínica médica. **Health Residencies Journal - HRJ**, [s. l.], v. 3, n. 15, p. 95–108, 2022.

MINELLI, L. *et al.* Diabetes mellitus e afecções cutâneas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 78, p. 735–747, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2023: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2023**. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2023.pdf.

NETTO, L. E.; JACON, J. C. Efetividade da biocelulose na cicatrização de úlceras venosas. **CuidArte, Enferm**, [s. l.], p. 51–58, 2022.

OGLE, G. D. *et al.* Type 1 diabetes estimates in children and adults. **IDF Atlas Reports; International Diabetes Federation (IDF): Brussels, Belgium**, [s. l.], 2022.

OLIVEIRA, I. V. P. de M. *et al.* AVALIAÇÃO CICATRICIAL MACROSCÓPICA DA VAGEM E DA CASCA DO JUCÁ (CAESALPINIA FERREA MART. EX TUL. VAR.

FERREA) EM LESÕES CUTÂNEAS EM ASININOS (EQUUS ASINUS). **Acta Veterinaria Brasilica**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 129–135, 2014.

OLIVEIRA, M. F. de *et al.* Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevida. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, [s. l.], v. 40, p. e20180016, 2019.

OLIVEIRA, A. G. de *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, p. 131–138, 2004.

PARVEEN, R. *et al.* Preparation of microemulsion containing Lycopersicon esculentum extract: In vitro characterization and stability studies. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 32, p. 1821–1827, 2019.

PONTE, V. A. *et al.* Assessment of the Effects of Low-Frequency Ultrasound Irradiation Applied to Venous Ulcer Treatment / Avaliação dos Efeitos da Irradiação Ultrassônica de Baixa Frequência no Tratamento de Úlcera Venosa. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1219–1225, 2019.

QUEIROZ NETO, A. *et al.* Avaliação toxicológica da administração oral aguda e sub-aguda do Extrato aquoso de casca e vagem de jucá (Caesalpinia ferrea) em ratos e suínos. **In: Reunião Annual da FESBE VI**, [s. l.], p. 273–273, 1991.

RAGELLE, H. *et al.* Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 851–864, 2017.

ROCHA E SILVA, H. *et al.* Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, p. 1877–1881, 2007.

RODACKI, M. *et al.* Classificação do diabetes. *In: BERTOLUCI, M. C. et al. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes*. 2023. ed. [S. l.]: Conectando Pessoas, 2023. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/classificacao-do-diabetes/>. Acesso em: 27 maio 2024.

SAHU, G. K. *et al.* Advancements in Microemulsion Based Drug Delivery Systems for Better Therapeutic Effects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Developmental Research**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 008–015, 2015.

SAKATA, S. *et al.* Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 733–737, 2007.

SAMPAIO, F. C. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 289–294, 2009.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 10, p. 1677–1680, 1959.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO AMAZONAS - SES-AM. Dia do Diabetes: SES-AM alerta sobre os mais de 100 mil casos no Amazonas. *In*: 2023. Disponível em: <https://www.saude.am.gov.br/dia-do-diabetes-ses-am-alerta-sobre-os-mais-de-100-mil-casos-no-amazonas/>. Acesso em: 28 maio 2024.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigitel Brasil 2021. surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of frequency and sociodemographic distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states and the Federal District in 2021.** [S. l.]: Ministério da Saúde, 2021.

SHEPHERD, A. J.; DOWNING, J. E. G.; MIYAN, J. A. Without nerves, immunology remains incomplete –in vivo veritas. **Immunology**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 145–163, 2005.

SILVA, G. A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 216–220, 2004.

SILVA, M. T. da *et al.* OS DESAFIOS NA CONDUTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES ACOMETIDOS COM FERIDAS CRÔNICAS. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 1242–1268, 2023.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 173–183, 2004.

SOUSA, J. dos S. de; BASTOS, M. de N. do C.; ROCHA, A. E. S. Mimosoideae (Leguminosae) do litoral paraense. **Acta Amazonica**, [s. l.], v. 39, p. 799–811, 2009.

SOUZA, L. A. G. **Leguminosas da Amazônia. Jucá - *Caesalpinia ferrea* C. Mart.** Editora INPAed. Manaus: [s. n.], 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.** 2012. Monografia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Nova Odessa, 2012. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002668199>. Acesso em: 19 jul. 2024.

TAVARES, E. de A. **Efeito da membrana quitosana com complexo de Zinco-vanilina no tratamento de lesões cutâneas em ratos diabéticos**. 2018. masterThesis - Brasil, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/26701>. Acesso em: 2 jun. 2024.

TIRNAKSIZ, F. *et al.* Preparation and evaluation of topical microemulsion system containing metronidazole for remission in rosacea. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 583–592, 2012.

WHO. **World Health Organization. The world medicines situation 2011**. Geneva: [s. n.], 2011.

WOO, K.; AYELLO, E. A.; SIBBALD, R. G. The Edge Effect: Current Therapeutic Options to Advance the Wound Edge. **Advances in Skin & Wound Care**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 99–117, 2007.

YAO, Z. X.; FU, X. B.; CHENG, B. [New concept of chronic wound healing: advances in the research of wound management in palliative care]. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi = Zhonghua Shaoshang Zazhi = Chinese Journal of Burns**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 754–757, 2020.

ZAJEC, A. *et al.* Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. **Genes**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 706, 2022.