PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

TAINAH DORADO CEREJA DE SOUZA

ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL INCORPORADA COM ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS

(Analysis of vegetable cellulose membrane dressing incorporated with sodium alginate in the healing of cutaneous lesions)

CURITIBA
2019

TAINAH DORADO CEREJA DE SOUZA

ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL INCORPORADA COM ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS

(Analysis of vegetable cellulose membrane dressing incorporated with sodium alginate in the healing of cutaneous lesions)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior.

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

PUCPR
GRUPO MARISTA

ATA Nº 0138 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA TAINAH DORADO CEREJA DE SOUZA

Aos vinte e quatro dias do mês de maio do ano de dois mil e dezenove, às 14h30, realizou-se na sala 23, 2º andar, Bloco Verde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa de dissertação da mestranda Tainah Dorado Cereja de Souza, intitulada: **"ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL INCORPORADA COM ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS"**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. José Ademar Villanova Junior (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Lucas Alécio Gomes (UEL) e Thais Andrade Costa Casagrande (UP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua argüição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada APROVADA.

Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior (Presidente)
Assinatura

Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes (UEL)
Assinatura

Profa. Dra. Thais Andrade Costa Casagrande (UP)
Assinatura

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 24 de maio de 2019.

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Renata Ernlund Freitas de Macedo
Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho - CEP 80215-901 Curitiba Paraná Brasil
Tel.: (41) 3271 2615 ppgca@pucpr.br Site: www.pucpr.br/ppgca

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....VI

LISTA DE QUADROS E TABELAS.....VII

LISTA DE ABREVIAÇÕES.....VIII

DEDICATÓRIA.....IX

AGRADECIMENTOS.....X

RESUMO GERAL.....XII

ABSTRACT.....XIII

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....14

1.1 LESÕES CUTÂNEAS.....16

1.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....17

1.3 CURATIVOS: BREVE HISTÓRICO E SUAS CARACTERÍSTICAS.....18

1.4 MEMBRANAS DE CELULOSE.....22

1.5 ALGINATO DE SÓDIO.....24

2. OBJETIVOS.....29

2.1 OBJETIVO GERAL.....29

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....29

3. HIPÓTESES.....29

3.1 HIPÓTESE POSITIVA.....29

3.2 HIPÓTESE NEGATIVA.....29

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL INCORPORADA COM ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS.....30

2.1 INTRODUÇÃO.....30

2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....32

2.2.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA CIENTÍFICA.....32

2.2.2 PREPARO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE VEGETAL.....32

2.2.3 INCORPORAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO À MEMBRANA.....34

2.2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....34

2.2.5 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....35
2.2.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E RETRAÇÃO CICATRICIAL.....38
2.2.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....39
2.2.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO IMPLANTE SUBCUTÂNEO.....41
2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MODELAGEM MATEMÁTICA.....41
2.3 RESULTADOS.....42
2.3.1 TESTES FÍSICOS COM A MEMBRANA BASE.....42
2.3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DA RETRAÇÃO CICATRICIAL.....42
2.3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA.....45
2.3.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....46
2.3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO IMPLANTE SUBCUTÂNEO 49
2.4 DISCUSSÃO.....50
2.5 CONCLUSÃO.....54

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....56
REFERÊNCIAS.....57
ANEXO 1.....66
ANEXO 2.....68

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPITULO 1
Figura 1.1 Fórmula molecular estrutural do alginato.....25

CAPITULO 2
Figura 2.1 Imagem fotográfica do moinho Masscoloider Masuko Sangyo (A), em funcionamento para o preparo do gel de celulose nanofibrilada (B) 33
Figura 2.2 Identificação e distribuição em grupos dos animais utilizados no estudo.....35
Figura 2.3 Imagem fotográfica do molde circular de 3 cm de diâmetro utilizado para padronizar a ferida cirúrgica em todos os grupos do experimento.....36
Figura 2.4 Imagens de rato Wistar com lesão cutânea de 3 cm de diâmetro, induzida experimentalmente.....37
Figura 2.5 Imagem de rato Wistar submetido à incisão cutânea, para implantação de membrana de 6 mm de celulose vegetal e alginato no tecido celular subcutâneo.....38
Figura 2.6 Planimetria para mensuração de área de ferida em programa de imagem IMAGE J 1.51K.....39
Figura 2.7 Microscopia eletrônica do filme de nanocelulose de Pinus (membrana base).....42
Figura 2.8 Imagens fotográficas das lesões cutâneas induzidas experimentalmente, em ratos Wistar pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 em diferentes tempos de observação (dias 4, 7, 11 e 14).....43
Figura 2.9 Imagens fotográficas das lesões cutâneas nos dias 7 e 11 em animal do grupo G3.....44
Figura 2.10 Porcentagem da retração cicatricial em função dos tempos avaliados (4, 7, 11 e 14) dos grupos G1 (controle negativo), G2 (controle positivo) e G3 (tratamento - alginato).....45
Figura 2.11 Curvas ajustadas para retração da lesão x tempo (linhas) próximas às porcentagens de tração observadas nos dias 4, 7, 11 e 14 (pontos) nos grupos G1 (controle negativo), G2 (controle positivo) e G3 (tratamento), obtidas pelo método de modelagem matemática, mostrando G3 atingindo 50% de retração cicatricial em 6.7 dias.....46
Figura 2.12 Secções histológicas (hematoxilina e eosina). A. Grau 1 de inflamação (4 dias). B. Grau 2 da inflamação (7 dias). C. Grau 3 da inflamação (14 dias).....47
Figura 2.13 Secções histológicas (tricrômio de Mallory). A. Produção e organização de colágeno grau 1 (7 dias). B. Produção e organização de colágeno grau 2 (14 dias).....48
Figura 2.14 Secção histológica (hematoxilina e eosina). Grau 0 de reepitelização (14 dias).....49
Figura 2.15 Secções histológicas (hematoxilina e eosina) de implante subcutâneo. A. Granuloma em tecido subcutâneo (5x). B. Aproximação de A (40X).....50

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Página

CAPITULO 1

Quadro 1.1 Requerimentos para um curativo ideal.....19
Quadro 1.2 Classificação de curativos cutâneos segundo Blanes et al. (2004) e Boateng et al. (2008).....20
Quadro 1.3 Curativos de alginato disponíveis comercialmente.....27

CAPITULO 2

Tabela 2.1 Testes físicos da membrana- base de celulose vegetal……..……42
Tabela 2.2 Médias das porcentagens de retração das lesões de G1 (controle negativo), G2 (controle positivo) e G3 (tratamento) nos dias 4, 7, 11 e 14. Os dados foram expressados em médias e desvios padrão utilizando um grau de significância de $p < 0,05$.....44

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ALT – Alanina amonotransferase

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FA – Fosfatase Alcalina

G1 – Grupo controle

G2 – Grupo membrana de celulose bacteriana

G3 – Grupo membrana de celulose vegetal com alginato de sódio

G4 – Grupo de implante subcutâneo

GCN - Gel de celulose nanofibrilada

HE – Hematoxicilina e eosina

N2 - Nitrogênio

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

R^2aj – Coeficiente de determinação ajustado

Syx% – Erro padrão da estimativa

TM – Tricrômio de Mallory

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UP – Universidade Positivo

UV – Ultravioleta

Essa dissertação é dedicada a todos os animais utilizados em estudos científicos, pois sem eles novas descobertas não seriam possíveis.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste projeto foram necessários esforços mútuos oriundos de diferentes estabelecimentos de ensino, como da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, da Universidade Positivo – UP e da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Desta forma agradeço primeiramente a união entre essas Universidades e aos seus colaboradores, pois sem eles o desenvolvimento deste estudo não seria possível. Em especial à Luana da Silva Mazepa bioterista da UFPR pelo fornecimento dos animais, Douglas Oliveira dos Santos e Misael Gomes Barbosa funcionários da PUCPR pelo transporte dos animais e auxílio durante o estudo, Paulo Henrique Utumi pelo auxílio ao procedimento de esterilização das membranas, Feliphe Boaventura, Daiane Alves Bertagi, Vinícius Augusto Guilhen e professoras Thais Andrade Costa Casagrande, Taíse Fuchs e Rebeca Bacchi Villanova da Universidade Positivo por toda paciência e apoio durante os meses de execução do projeto no biotério da Universidade.

À equipe executora deste estudo, primeiramente aos pesquisadores da EMBRAPA Florestas Prof. Washington Luiz Esteves Magalhães e Msc. Francine Ceccon Claro pelo desenvolvimento da membrana base para início desta pesquisa, aos amigos Msc. Luciano José Eigio Isaka e Msc. Bruno Massa por toda a parceria desde o início do projeto até o seu término, pela disposição a tantas conversas e dúvidas relacionadas a linha de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. José Ademar Villanova Jr, por toda a paciência envolvida em guiar e orientar um estudo com tantas dificuldades em sua execução, sempre otimista e extremamente gentil. Meu sentimento é de gratidão e admiração.

Ao Prof. Gervásio H. Bechara pela coorientação e oportunidade de ingressar no programa de Pós-graduação da PUCPR, todo o meu agradecimento.

Aos profissionais envolvidos no processamento de dados, à patologista M.v. Msc. Iara Brandão pela avaliação histológica das amostras, à equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, Ana Martins e Seigo Nagashima pela feitura de lâminas e digitalização de imagens, ao Prof. Saulo Henrique Webber pela execução da análise estatística e modelagem matemática de dados.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Maria Ruth, por sempre incentivar o estudo e acreditar em mim, às vezes até mais do que eu mesma, à

minha irmã por todo o otimismo, minhas sobrinhas pelo bom humor e a minha avó por todo o carinho.

Agradeço ao meu marido Marcel Castella por todas as palavras de incentivo durante esses dois anos, por me mostrar que tudo é possível se a alma não é pequena e por todas as vezes que me fez sorrir e me sentir mais leve, eu te amo justamente por isso, agradeço imensamente à sua família que também é minha, por todo o carinho e apoio durante os caminhos que escolhemos para nossas vidas.

Agradeço também aos meus amigos pelos momentos de conforto e apoio constante durante esses dois anos e principalmente nos últimos meses.

RESUMO GERAL

O tratamento de feridas corresponde a um grande desafio para os profissionais da área de saúde, em especial, feridas cutâneas extensas ou crônicas que causam limitações físicas, sofrimento emocional e altos custos de tratamento. Diversos curativos estão sendo desenvolvidos com finalidade de tratar essas feridas de forma eficiente e a um custo acessível, dentre eles os curativos com base em biomateriais como a celulose vegetal. O presente estudo objetivou avaliar a segurança e eficácia de membranas de celulose vegetal com alginato de sódio em feridas cutâneas. Para tal, feridas cutâneas foram induzidas em 117 ratos Wistar machos divididos aleatoriamente em três grupos de 36 animais: G1 (grupo controle negativo), G2 (grupo controle positivo - membrana de celulose bacteriana) e G3 (grupo tratamento - membrana de celulose vegetal). Todos os animais foram avaliados nos dias 4, 7, 11 e 14 em relação à retração cicatricial, inflamação, neovascularização e reepitelização. A biossegurança foi avaliada por meio de implante subcutâneo de discos de membrana de celulose vegetal com alginato de sódio em nove animais (Grupo G4), acompanhados durante 14 dias.Para a comparação das porcentagens de retração da ferida foi utilizado o teste ANOVA, e o teste de Mann-Whitney para comparação entre variáveis não paramétricas com grau de significância de $p<0,05$. O método de modelagem matemática foi empregado para determinar a retração cicatricial. Houve diferença significativa na retração cicatricial de G3 em todos os dias, atingindo 50% de retração em média aos 6.7 dias. Indícios de absorção da membrana ocorreu em até 11 dias, e não houve alterações macroscópicas ou sistêmicas associadas ao implante subcutâneo. A membrana de celulose vegetal e alginato aplicada topicamente demonstrou ser segura, sustentável, de baixo custo e promoveu retração cicatricial contínua sem necessidade de troca de curativo.

Palavras-chave: Cicatrização, Biocurativos, Alginato, Celulose.

ABSTRACT

Wound treatment is a major challenge for healthcare professionals, especially long or chronic skin wounds that cause physical limitations, emotional distress, and high treatment costs. Several dressings are being developed with the purpose of treating these wounds efficiently and at an affordable cost, among them dressings based on biomaterials such as vegetable cellulose. The present study aimed to evaluate the safety and efficacy of vegetable cellulose membranes with sodium alginate in skin wounds. For this, cutaneous wounds were induced in 117 male Wistar rats randomly divided into three groups of 36 animals: G1 (negative control group), G2 (positive control group - bacterial cellulose membrane) and G3 (treatment group – vegetable cellulose membrane). All animals were evaluated on days 4, 7, 11 and 14 in relation to cicatricial retraction, inflammation, neovascularization and reepithelialization. Biosafety was evaluated by subcutaneous implantation of plant cellulose membrane discs with sodium alginate in nine animals (Group G4), followed for 14 days. For the comparison of percentages of wound retraction, the ANOVA test was used, and the Mann-Whitney test was used to compare non-parametric variables with a significance level of $p < 0.05$. The mathematical modeling method was used to determine cicatricial retraction. There was a significant difference in the cicatricial retraction of G3 in all days, reaching 50% of retraction at 6.7 days. Signs of membrane absorption occurred within 11 days, and there were no macroscopic or systemic changes associated with the subcutaneous implant. The topically applied vegetable cellulose and alginate membrane proved to be safe, effective and inexpensive and promoting continuous healing retraction without the need for dressing change.

Key words: Cicatrization, Biological Dressing, Biocuratives, Alginate, Cellulose

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

A pele corresponde ao maior órgão do corpo e muitas são as funções conferidas a ela, dentre outras podemos listar a regulação da temperatura corporal, detecção de estímulos, barreira de proteção contra agentes químicos, biológicos e efeitos dos raios solares, além de evitar a perda excessiva de líquidos. Dessa forma, é preciso estar atento ao fato de que qualquer alteração na pele pode resultar em consequências significativas para a saúde do indivíduo (BUENO, 2015). Especialistas alertam que são muitas as possibilidades de lesões ou afecções cutâneas, sendo elas primárias ou secundárias, e que é necessária dedicação especial à busca de métodos para a obtenção de adequada cicatrização cutânea, pois muitas são as dificuldades no processo de reparação tecidual (MORAES, 2012). Dentre outras, as lesões causadas por feridas crônicas e queimaduras correspondem aos maiores desafios para os profissionais da saúde e especialistas da área (RIBEIRO et al., 2012; CAMPOS et al., 2016).

De maneira geral, as feridas crônicas resultam de quadros mais graves de doenças que induzem a perda tecidual gradativa, como diabetes, pressão local contínua, tromboses e edemas (PAUL; SHARMA, 2004; OLIVEIRA et al., 2019). Com o fenômeno mundial de envelhecimento da população, o número de indivíduos que apresentam quadros de feridas crônicas tem aumentado de maneira expressiva (STEPHEN-HAYNES et al., 2014). As queimaduras também correspondem a um tipo grave de lesão que acomete grande parcela da população mundial, uma vez que os acidentes envolvendo queimaduras estão entre as principais ocorrências dos serviços de emergências hospitalares. No Brasil, as queimaduras consistem no terceiro tipo de acidente com maior número de ocorrência (BUENO, 2015).

A Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ) estima que no Brasil ocorram cerca de 1 milhão de acidentes com queimaduras por ano e que, desse total, 300 mil sejam crianças. A SBQ afirma que lesões causadas por queimaduras, consistem na quarta principal causa de morte infantil em todo o mundo (DIAS, 2015).

Tendo em vista os impactos causados por essas lesões, é preciso que sejam estudados curativos biológicos de baixo custo que apresentem resultados bastante promissores. Contudo, embora se tenha grande variedade de curativos sendo comercializados, nenhum desses produtos contempla todas as exigências que os faria se enquadrar em uma categoria de curativo ideal (MOURA et al., 2013). Segundo Muzzarelle et al. (2007) pode-se caracterizar como tratamento ideal aquele que, além de proporcionar uma rápida cicatrização, seja capaz de evitar infecções e que mantenha a área lesionada em condições de umidade suficientes para possibilitar a formação de tecido de granulação; ainda é preciso que o dispositivo drene a secreção produzida pela ferida e previna a formação de cicatrizes. Diante dessas exigências, os curativos usados atualmente, como a gaze, apresentam inúmeras desvantagens. Dentre elas podemos destacar a forte aderência à superfície lesionada, o que resulta em oclusão e acúmulo de fluido sob o curativo, favorecendo, portanto, a proliferação de patógenos (MOURA et al., 2013). Como tentativa de reduzir os danos ocasionados por esses curativos, são associadas às gases, géis que diminuem o ressecamento da pele e dor em função da troca de curativos (YUDANOVA; RESHETOV, 2006; CIRILLO et al., 2016).

Dessa forma, é necessário que muitos materiais sejam utilizados a fim de agilizar a cicatrização e reduzir os riscos para o paciente em tratamento. No entanto, essa estratégia torna os procedimentos mais caros e pouco acessíveis (WIEGAND; HIPLER, 2010). Para tanto, é preciso que pesquisadores se dediquem a investigar alternativas que possam aprimorar os métodos vigentes, bem como desenvolver novos protocolos e tecnologias que proporcionem tratamentos mais acessíveis (MANDELBAUM et al., 2003; SOARES et al., 2012).

Estudos recentes têm investido em curativos elaborados com materiais com atividade biológica, capaz de contribuir na cicatrização e melhorar tanto a aparência quanto a funcionalidade do tecido reconstituído (MUZZARELLI, 2007). Nesse contexto, os biopolímeros do grupo dos polissacarídeos e proteínas têm sido muito utilizados na composição desses tipos de curativo – quanto aos polissacarídeos destacamos a quitosana e alginato, pois correspondem a recursos bastante consagrados na composição desses dispositos e têm sido alvo de pesquisas recentes (YAN et al., 2001; WANG et al., 2002; OLIVEIRA, 2012; SILVA; CROSSETTI, 2012). Dentre as vantagens desses recursos podemos listar a alta capacidade de atividade fisiológica, diminuição dos riscos de rejeição do material

por apresentarem alta biocompatibilidade e fácil biodegradação (YUDANOVA; RESHETOV, 2006). Além disso, os curativos a base de biopolímeros podem se associar ao tecido lesionado e possibilitar melhor cicatrização, ainda podem ser associados a agentes antimicrobianos combatendo infecções, e desta forma auxiliar no tratamento de feridas crônicas (WIEGAND; HIPLER, 2010).

1.1. LESÕES CUTÂNEAS

A estrutura da pele é constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A camada mais externa – epiderme – é composta basicamente por células mortas e queratina, são essas estruturas que conferem o caráter de impermeabilização da pele. Por sua a vez a derme, localizada imediatamente abaixo da epiderme, é composta por células conjuntivas. Por fim, a hipoderme, que corresponde à camada mais profunda da pele, é responsável por absorver impactos e servir de suporte às demais camadas (SILVA, 2017). Associados a esse órgão são encontrados pelos e glândulas dos tipos sudorípara e sebácea (PAUL; SHARMA, 2004).

Qualquer defeito ou rompimento na estrutura da pele configura uma lesão de pele ou lesão cutânea que pode atingir diferentes graus de gravidade de acordo com os níveis e camadas que foram atingidas. Existem três tipos de lesões na pele, são elas: (i) lesões superficiais: aquelas que envolvem somente a derme; (ii) lesões profundas parciais: aquelas que alcançam o tecido subcutâneo – hipoderme; e (iii) lesões profundas totais: correspondem aquelas que são capazes de atingir o músculo e áreas adjacentes (BORGES et al., 2007; MORAES et al., 2013).

Quando levado em consideração o processo de cicatrização, a lesão pode ser classificada segundo dois tipos: aguda e crônica. As lesões do tipo aguda são, geralmente, dos tipos profundas parciais ou profundas totais que levam em média de oito a 12 semanas para reparação tecidual, apresentando formação de cicatrizes. Essas lesões têm como causas fatores externos como cortes, perfurações, incisões cirúrgicas, abrasões, queimaduras, choques e contatos com substâncias corrosivas, ou ainda, radioatividade (BOATENG et al., 2008). Dentre esses tipos de feridas, as queimaduras exigem atenção especial, uma vez que apresentam maior dificuldade no tratamento, podendo resultar em danos irreversíveis que vão desde a perda de fluidos até comprometimento funcional da área afetada. Dessa forma, o atendimento às vítimas de queimaduras exige uma

série de cuidados que incluem treinamento especializado das equipes de saúde e acesso a equipamentos especializados para apropriados cuidados com esses pacientes (IURK et al., 2010; SANTOS et al., 2017; CUNHA; FERREIRA; SILVA, 2017).

Já as feridas do tipo crônica apresentam cicatrização bastante lenta, uma vez que os tecidos de pacientes que apresentam esses tipos de lesões estão expostos à constantes danos, à tratamentos muitas vezes ineficazes, ou ainda, as condições fisiológicas desfavoráveis, como em casos de pacientes diabéticos, com infecções persistentes, ocorrência de tromboses, edemas ou pressão local prolongada (BUENO, 2015). É possível, também, que nesse tipo de lesão sejam encontrados elevados níveis de substâncias que contribuem para a perpetuação da fase inflamatória, podendo provocar retardo no processo de regeneração que leva de meses a anos para cicatrizar, estão no grupo das feridas crônicas as úlceras de pressão e as úlceras em membros (BOATENG et al., 2008; PAUL; SHARMA, 2004; WIEGAND; HIPLER,2010).

Há trabalhos que citam lesões crônicas, em especial úlceras crônicas dos pés e pernas, como causa importante de afastamento do trabalho no Brasil (BUENO, 2015), demonstrando que, apesar de diversas opções para o tratamento de feridas, ainda há muito para se pesquisar, incluindo a racionalização dos recursos já existentes e a sua acessibilidade ao maior número de pessoas. Um dos principais desafios ao pesquisador é o desenvolvimento de tecnologias simples e baratas, porém igualmente eficientes, pois há um elevado custo nos materiais disponíveis no mercado, sendo a maioria importada e com tecnologia patenteada por empresas multinacionais (ERENO D., 2003; MORAES P., 2013).

1.2. PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Lesões cutâneas são muito frequentes tanto em humanos quanto em animais, sendo algumas destas lesões profundas e extensas. O processo cicatricial destas lesões consiste em uma sequência coordenada de eventos celulares e moleculares que resultam em restauração tissular. São utilizadas diferentes classificações didáticas para o processo cicatricial. Para Moraes (2012) existem três estágios: estágio inflamatório, seguido por um estágio de proliferação e em seguinda a restauração tissular por meio do estágio de remodelação. Já Bueno (2015) explica o processo de cicatrização mediante quatro estapas: homeostase –

em que ocorre a coagulação; inflamação; granulação – fase em que há proliferação das células e formação de tecido; e por fim, a reepitelização – período no qual o tecido é remodelado. É importante lembrar que o mecanismo cicatricial envolve muito tipos de células e é influenciado por fatores de caráter bioquímico, molecular e extracelular.

Após a danificação do tecido, o processo de coagulação auxilia na redução de perda de fluido do organismo, além disso, age como uma barreira que protege a área lesionada contra a ação de patógenos e ainda serve de suporte para o desenvolvimento celular. A medida que ocorre a coagulação, as plaquetas iniciam uma cascata de cicatrização por meio da liberação de componentes que induzem a reprodução celular. Concomitante a esse processo, células de defesa como os granulócitos e macrófagos penetram na ferida protegendo-a de organismos estranhos. Ainda, os macrófagos liberam citocinas pro-inflamatórias como interleucinas e fator de necrose tumoral (FNT) que induzem a migração das células, proliferação de fibroflastos e queratinócitos e a síntese de componentes da matriz extracelular. Já na fase de granulação o tecido se reconstitui e posteriormente a epiderme é restruturada (WIEGAND e HIPLER, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

1.3. CURATIVOS: BREVE HISTÓRICO E SUAS CARACTERÍSTICAS

Os produtos para tratamento de feridas podem ser separados em dois grandes grupos: agentes tópicos e curativos. Os agentes tópicos são aqueles destinados à limpeza ou à proteção da área, são aplicados diretamente sobre a ferida. Já os curativos são os recursos que cobrem uma ferida com o objetivo de favorecer o processo cicatricial, protegendo-a contra as agressões externas, mantendo sua umidade e preservando a integridade de sua região periférica (OLIVEIRA et al., 2011).

Inicialmente, era mais comum que os curativos fossem feitos com bandagens à base de algodão ou lã. Esse formato de curativos tem como princípio manter a ferida livre de umidade, dessa forma permite a evaporação do exsudato e evita que bactérias contaminem a região. Posteriormente, foi descoberto que a manutenção da umidade e alta temperatura da região lesionada, corresponde a uma excelente estratégia para o processo de cicatrização, uma vez que otimiza as condições fisiológicas da matriz extracelular, possibilita troca de gases e impede

que os microrganismos se desenvolvam (SILVA, 2017). A partir de então os curativos modernos passam a ser elaborados com vistas à criação deste tipo de ambiente.

Após levantamentos das orientações para a elaboração de curativos consagradas na literatura, Bueno (2015) compilou uma série características que devem ser consideradas a fim de promover as condições ideais na cobertura de feridas (Quadro 1.1).

Quadro 1.1 – Requerimentos para um curativo cutâneo ideal.

Requisitos Primários	Requisitos Secundários
1-Oferecer proteção mecânica	1-Acelerar o processo de reparo tecidual
2-Ser livre de substâncias tóxicas e irritantes	2-Possuir atividade antimicrobiana
3-Proteger contra a entrada de microrganismos	3-Ser transparente para possibilitar o monitoramento da cicatrização
4-Criar um ambiente úmido para a cicatrização	4-Possuir atividade hemostática
5-Proteger a pele do exsudato e excesso de umidade	5-Exibir atividade de debridamento (remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos)
6-Permitir trocas gasosas com o ambiente	6-Ser capaz de combater o mau odor
7-Não aderir ao leito da ferida	7-Possuir capacidade de remover ou inativar enzimas proteolíticas em feridas crônicas
8-Não incomodar o paciente	
9-Não provocar dor quando aplicado ou removido	
10-Moldar-se à região ferida	
11-Ser resistente à água e facilmente removível	
12-Ser de baixo custo	
13-Não liberar partículas ou fibras não biodegradáveis na ferida	
14-Não necessitar de trocas frequentes	
15-Funcionar efetivamente sob compressão	
16-Manter na ferida a temperatura e pH ótimos	

BUENO (2015, p. 9).

Embora muitas sejam as orientações, é preciso estar atento ao fato de que o tratamento de uma ferida precisa considerar inúmeros fatores: a origem do ferimento, o estágio de cicatrização, condições de saúde do indivíduo e, ainda, as situações sócio-econômico-sociais do paciente (BOATENG et al., 2008). Para tanto, cada tipo de curativo deve ser adequado para cada situação. Os curativos

podem, ainda, ser classificados em diferentes tipos segundo alguns critérios de classificação (Quadro 1.2).

Quadro 1.2 – Classificação de curativos cutâneos segundo Blanes et al. (2004) e Boateng et al. (2008).

Critério de Classificação	Tipos
Contato com a superfíficie lesionada	• Primários - quando estão em contato direto com a pele lesionada
	• Secundários - não estão em contato direto com a ferida, geralmente, ficam acima dos curativos primários, dentre eles podemos citar as gazes
	• Ilha - que corresponde a cobrir a região central com material absorvente e cobrir a porção adjacente com material adesivo
Atividade que desempenham	• Inativos – são estruturas absorventes que servem de barreira de proteção contra partículas
	• Interativos – são capazes de atuar na regulação das condições do ambiente (hidrocoloides, hidrogéis)
	• Ativos – auxiliam no crescimento de células e inibem a ação da protease
Estrutura física	• Pomada
	• Gel
	• Filme
	• Espuma
Natureza do curativo	• Hidrocoloides – são derivados de materiais coloidais associados a elastômeros e estruturas adesivas
	• Curativos de alginato – são compostos por sais de cálcio e de sódio oriundos do ácido algínico
	• Hidrogeis – correspondem as redes de polímeros que apresentam grande potencial para absorção e retenção de água sem que haja degradação do curativo
	• Filmes adesivos semipermeáveis – são constituídos de derivados de náilon associados a um adesivo composto por polietileno dando-lhes maior capacidade de oclusão
	• Espumas – se caracterizam por serem compostas, geralmente de poliuretano
	• Matrizes celulares ou acelulares – consistem em sofisticado dispositivo constituído por uma combinação entre colágeno e componentes da matriz extracelular
	• Curativos biológicos – compostos por biopolímeros

Essa classificação dos curativos segundo a sua natureza é aplicada apenas aos curativos modernos. Muitas são as vantagens e especificidades desses tipos de curativos, uma vez que é possível associar suas funções às necessidades de cada paciente (BOATENG et al., 2008). Dentre eles, os curativos mais utilizados atualmente são os hidrocoloides, pois sua composição o torna adequado para o

tratamento de feridas com pouca ou moderada liberação de exsudato (BUENO, 2015). Já os curativos de alginato podem ser encontrados em forma de espumas liofilizadas ou fibras flexíveis. Ao entrar em contato com o exsudato liberado pelas feridas, esses curativos adquirem consistência gelatinosa capaz de absorver a secreção produzida na área lesionada e evitar a contaminação por ação de bactérias (BOATENG et al., 2008).

Semelhante à capacidade de absorção dos curativos de alginato, os hidrogeis também apresentam alta capacidade de retenção de água, que se dá em função dos grupos funcionais hidrofílicos do polímero, além disso, esses curativos apresentam grande resistência à solubilização, pois as cadeias poliméricas apresentam fortes pontes de reticulação entre si (AHMED, 2015). Ao contrário desses curativos, os filmes adesivos semipermeáveis não absorvem exsudato de maneira satisfatória, o que induz a lesões cutâneas e alta proliferação de bactérias (BOATENG et al., 2008).

Das vantagens apresentadas por curativos do tipo espuma podem ser listados: a prevenção contra perda de fluidos, proteção contra contaminação bacteriana, além de possibilitar manter o ambiente em condições fisiológicas que favorecem à cicatrização, promovendo assim, isolamento térmico da área tratada (SILVA, 2017). Por sua vez, as matrizes celulares e acelulares podem substituir temporariamente a pele, uma vez que parte da composição desses curativos pode ser obtida de pele natural, em que se mantém a estrutura da derme e elimina os componentes celulares. Além disso, é preciso que esses curativos tenham estrutura tridimensional, abranjam área de superfície, tenham adesão eficiente e, por fim, permitam boa migração e crescimento celular (BOATENG et al., 2008).

Esses dispositivos também devem ter características que permitam sua degradação sem a liberação de substância tóxicas que poderíam ser eliminadas ou absorvidas pelo organismo, para tanto, é preciso que a degradação seja programada para o período de regeneração do tecido (RIBEIRO et al., 2012).

Por fim, os curativos biológicos são constituídos de polímeros de origem natural, o que concede a esses dispositivos grandes benefícios: produção a partir de recursos de fontes renováveis, biodegradação e biocompatibilidade (NETO et al., 2015). Para elaboração de alguns curativos, os biopolímeros podem ser associados a componentes ativos, a exemplo das substâncias antimicrobianas e princípios ativos capazes de induzir o processo de cicatrização (CAMPOS, 2017).

Embora, atualmente, muitas sejam as variedades de curativos, ainda é difícil para o profissional da área de saúde determinar qual o curativo eleger para o tratamento levando em consideração o tipo de ferida e características do paciente. Com vistas a esse problema, foram criados curativos mais complexos com a presença de bioativos que interferem de forma ativa nos estágios do processo cicatricial das feridas. No entanto, a maioria dos pacientes não têm acesso a esses curativos devido ao seu alto custo (MANDELBAUM et al., 2003; YAGUISHITA, 2007).

1.4. MEMBRANAS DE CELULOSE

Desde 1945 curativos de filme transparente e permeável vêm sendo usados em pacientes com queimadura. No entanto, apenas em 1962 houve interesse pelo desenvolvimento de pesquisas, produção e comercialização desse novo conceito de curativo. Em 1970 nos Estados Unidos e na Europa, teve inicio a produção desses recursos, entretanto, no início da utilização ocorreu grande insegurança entre os profissionais sobre as indicações e utilização, pois não existiam dados científicos sobre os reais benefícios de cada um e nem estudos sobre a relação custo-benefício. A partir desse fato, houve a preocupação em coordenar estudos e avaliar cada tipo de membrana existente (FIELD et al., 1994; MANDELBAUM et al., 2003; ERENO, 2003). Em especial, no final da década de 1980 muitos pesquisadores se dedicaram a estudar as membranas biológicas como alternativas ao tratamento de feridas (CABRAL et al., 1987; PITANGY; SALGADO; MARACAJÁ, 1988; VELASQUEZ, 1988).

As membranas de celulose obtidas por meio de síntese bacteriana, são indicadas para os tratamentos de lesões de pele com perda do epitélio, especialmente as com grande potencial de infecção. A partir do surgimento dessas membranas, muitos foram os benefícios relatados dessas estruturas no tratamento de feridas (MARQUES; MORAES; TEXEIRA-NETO, 1996). Por meio destes estudos, a membrana de celulose bacteriana não porosa passa a ser utilizada em diversas situações, tais como: queimaduras superficiais e profundas, dermoabrasões mecânicas ou a laser, áreas doadoras de enxertos, escaras de decúbito, úlceras de estase venosa e arteriais. Sendo que suas principais vantagens estão atreladas à redução da dor e inflamação, manutenção de umidade da ferida e dos fatores de crescimento e defesa, bem como favorecimento da

granulação e crescimento dérmico, manutenção do potencial elétrico da pele das bordas dos ferimentos, menor taxa de contaminação externa, visualização direta do aspecto e quantidade de secreção da ferida e diminuição ou ausência de trocas de curativos, diminuindo assim as lesões epidérmicas com comodidade e segurança ao paciente (OLYVEIRA, 2016).

Porém, foram observadas algumas inconveniências referentes à sua utilização, tais como, a necessidade de remoção de bolhas de ar sob a membrana, remoção de exsudato, dificuldade de adesão à área receptora, enrugamento e desprendimento da membrana sobre a lesão e elasticidade além da desejada para tratamento de lesões em áreas articulares (MORESCHI *et al*., 1993; VIEIRA *et a*l., 2007, MORAES, 2013; NASCIMENTO; MORAES, 2017).

Tendo em vista a necessidade do aperfeiçoamento do material e aproveitando as características vantajosas já existentes, foram desenvolvidas as membranas celulósicas de porosidade variável para se adaptar às diversas necessidades do tratamento das lesões de pele. A membrana porosa possui textura fina e uniforme, com alta maleabilidade e resistência mecânica na presença de umidade, nela foram criados artificialmente poros que permitem a remoção espontânea ou estimulada do exsudato das lesões. O aperfeiçoamento da membrana porosa permitiu vantagens sobre os tratamentos convencionais, como facilidade de aplicação, excelente adesão aos tecidos, diminuição da dor, visualização adequada do leito da lesão, drenagem espontânea, diminuição ou ausência de trocas de curativos e aumento do intervalo do acompanhamento médico (MORESCHI et al., 1993; VIEIRA et al., 2007; CAMARGO et al., 2011; BRITO JUNIOR; FERREIRA, 2015).

A ampla utilização da membrana de celulose bacteriana estimulou o desenvolvimento de diversas pesquisas com finalidade de ampliar as opções terapêuticas para o tratamento de pacientes com lesões de pele extensas. Diante disso, a nanotecnologia se apresenta como uma tecnologia recente e importante pois permite o desenvolvimento de novos materiais funcionais a partir da reutilização de subprodutos da agroindústria, como a celulose vegetal. O processamento de alguns produtos vegetais, como o Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) gera uma grande quantidade de resíduos, apresentando assim uma problemática quanto à questão sustentável. Aliando a nanotecnologia com a existência desses resíduos é possível realizar o aproveitamento desses subprodutos industriais para

desenvolvimento de produtos médicos e farmacêuticos, tal como a membrana de celulose vegetal (MANDELBAUM et al., 2003; YAGUISHITA, 2007; DUARTE et al., 2018).

De maneira geral, nanotecnologia é um termo genérico utilizado para referir um compilado de técnicas, tecnologias e processos que se dedicam a manipulação de partículas para construção de novos materiais com novas propriedades em escalas de nanômetro (CAMPOS et al., 2009). Na medicina, esses nanomateriais têm contemplado grande escala de diferentes necessidades, desde a liberação controlada de substâncias até a regeneração tissular, pois são capazes de guiar a regeneração tecidual de maneira mais rápida e eficiente (MAZZEO; SANTOS, 2018).

1.5. ALGINATO DE SÓDIO

Nas últimas décadas houve aumento no interesse por medicamentos fitoterápicos, grande parte proveniente de extratos naturais, incentivando a busca pela validação do uso desses medicamentos perante os resultados favoráveis em estudos in vitro e in vivo. Nesse contexto, os curativos do tipo alginato emergem como excelente estratégia a fim de se consagrar como alternativa para o tratamento de diferentes tipos de feridas. Na engenharia de tecidos e liberação de bioativos, o alginato tem sido alvo de muitos estudos (RINAUDO, 2008; WIEGAND; HIPLER, 2010; TANAKA; MONTEIRO; MENEGON, 2016; DUARTE et al., 2018). Na maioria dos casos, o alginato é extraído de algas marinhas, pois estes organismos apresentam essa substância na estrutura de sua parede celular associada a dois outros polissacarídeos – ágar e carragena, o que confere flexibilidade no ambiente marinho (RINAUDO, 2008).

A forma comercial do alginato é extraída, em sua maioria, das algas marrons. No entanto, além das algas, o alginato também pode ser obtido por meio de bactérias da espécie *Azobacter vinelandii* e outras do gênero Pseudomas (MAURSTAD et al., 2008).

Nas algas, o alginato é encontrado numa mistura de sais insolúveis, a exemplo do cálico e do magnésio (PINHEIRO; BORGES; DONOSO, 2013). O processo de extração do alginato das algas marinhas envolve a conversão de sais insolúveis em água, para uma versão solúvel – alginato de sódio. Após esse processo, o alginato é diluído em água e os resíduos excedentes da estrutura das

algas é filtrado. Em seguida, a fim a de recuperar o biopolímero é feita a adição de sal de cálcio para a obtenção de uma versão insolúvel do alginato – alginato de cálcio. Em seguida é produzida uma solução entre o alginato de cálcio associado a um ácido que resulta na formação do ácido algínico, que pode ser facilmente isolado. A substância, então, é submetida a um novo processo de filtração, a fim de eliminar o líquido presente. Por fim, adiciona-se carbonato de sódio até que a solução se converta em alginato de sódio (RINAUDO, 2008).

O produto derivado desse processo pode ser apresentado na forma de grãos que são moídos. Estimava-se que a indústria de todo o mundo produzia cerca de 30 mil toneladas de alginato de sódio anualmente (MÜLLER; SANTOS, BRIGIDO, 2011). Dados mais atuais mostram que em 2015 o Brasil importou aproximadamente 900 toneladas de ácido algínico (NOGUEIRA, 2017).

De maneira geral o alginato é descrito em sua fórmula estrural como um copolímero linear de ânios (1,4): β-D-manuronato (M) e α-Lguluronato (G). Essa molécula é composta por regiões homopoliméricas – blocos G e blocos M, que ficam intercaladas com regiões em que se encontram grupos dos dois blocos (G-M), conforme apresentado na Figura 1 (RODRIGUES, 2008). É importante ressaltar que tanto a composição química, quanto a formatação de distribuição das sequências dos blocos são determinadas pela origem do alginato e as condições a que foi submetido (WIEGAND; HIPLER, 2010).

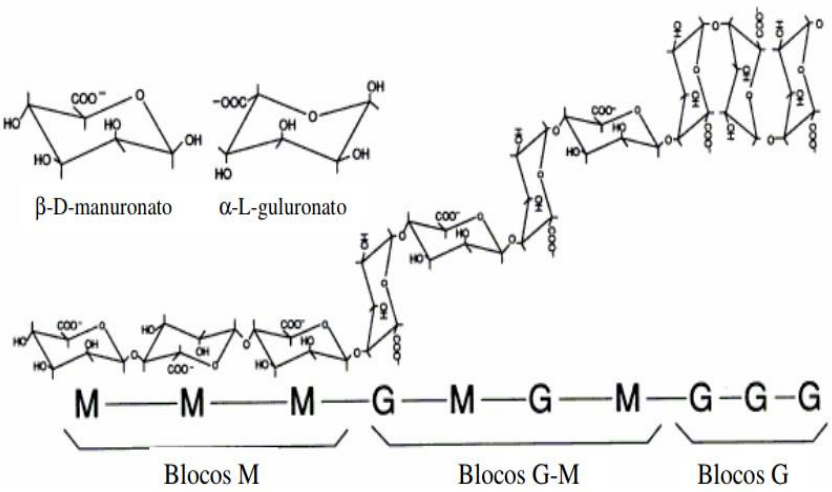

Figura 1.1 – Fórmula molecular estrutural do alginato. Em que o bloco G corresponde aos copolímeros lineares de α-L-guluronato, e M aos copolímeros de α-D-manuronato. Fonte: Rodrigues (2008, p. 13).

Dentre as principais características do grupo dos alginatos, vale rassaltar a capacidade de absorção e retenção de água, bem como os potenciais gelitificantes e estabilizantes (RODRIGUES, 2008). A estrutura linear e alta massa molar dos alginatos, permite que esses grupamentos constituam filmes e fibras no estado sólido (RINAUDO, 2008).

Muitas são as aplicações do alginato. Quanto ao seu uso na indústria, estima-se que aproximadamente 30% de todo alginato produzido no mundo seja destinado ao setor alimentício (RINAUDO, 2008; NOGUEIRA, 2017) Ele assume papel de espassante na indústria têxtil e de alimentos, sendo usado na produção de molhos, xaropes, iorgurtes, maioneses e coberturas. Além disso, também se comporta como estabilizante de sorvetes, atuando na redução da formação de cristais e prevenindo o derretimento. Já no setor farmacêutico, o alginato emerge como controlador de medicamentos e demais produtos químicos, pois possui grande sensibilidade à variação de pH (RODRIGUES, 2008). O alginato também apresenta capacidade de auxiliar no processo de remoção de íons metálicos de soluções aquosas (MCHUGH, 2003).

Ainda no setor farmacêutico, o alginato é largamente utilizado na produção de curativos utilizados, em especial, em feridas exsudativas, uma vez que este apresenta alto potencial de absorção do exsudato. Sua utilização é justificada devido à capacidade de alterar sua estrutura à medida que reage com o exsudato da ferida, passando de fibrosa para gel transparente hidrofílico e não aderente. Essa nova estrutura possui a capacidade de absorver o exsudato inflamatório e proporciona ao leito da ferida um meio úmido propício para a cicatrização e manutenção da integridade da pele perilesional. A manutenção do meio úmido tem como objetivo estimular o processo de cicatrização, e a presença do alginato favorece a hemostasia primária ao formar uma película em gel sobre a ferida, mantendo a temperatura e umidade adequadas ao processo de recuperação do tecido lesionado (FRANCO; GONÇALVES, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

Outra propriedade do gel é a capacidade de reduzir dores tanto as derivadas das feridas, quanto as provenientes da troca dos curativos (LALAU et el., 2002). Os curativos alginatos também possuem propriedades bioadesivas, antimicrobianas e hemostáticas. Sendo a capacidade antimicrobiana dada em função da imobilização dos microrganismos na matriz fibrosa do polímero (RINAUDO, 2008).

A associação do alginato com outros polímeros resulta tanto na variação da porosidade do curativo, quanto na formatação da rede polimérica, o que induz a melhora no material que constitui o curativo. Dessa forma, os alginatos podem ser associados a pectina, quitosana e etilcelulose, que correspondem a polímeros largamente utilizados na produção de microcápsulas de liberação controlada de substância (RODRIGUES, 2008).

Estudos recentes relatam a utilização de curativos com alginato de sódio em tratamentos de úlceras venosas, apresentando como resultados melhora do processo de cicatrização da úlcera, aumento de tecido de granulação e epitelização, sendo também relatadas diminuição de exsudato, edema e dor. De acordo com os resultados destes estudos, a periodicidade da troca do curativo com alginato depende do estado de contaminação da ferida, sendo recomendada a troca de curativo a cada sete dias para feridas limpas e em até três dias para feridas contaminadas (OLIVEIRA et al, 2011).

Bueno (2015) listou alguns dos curativos de alginato disponíveis comercialmente (Quadro 1.3).

Quadro 1.3 – Curativos de alginato disponíveis comercialmente.

Nome e fabricante do curativo	Descrição
Algiderm® - Bard	Tecido de fibras de alginato de cálcio
Sorbsan® - UDL	Material não-tecido de fibras de alginato de cálcio
Nu-Derm® - Johnson & Johnson	Material não-tecido de fibras de alginato em forma de faixas
Algosteril® - Systagenix	Material não-tecido de fibras de alginato de cálcio
Kaltostat® - ConvaTec	Material não-tecido de fibras de alginato de cálcio e sódio
Kalginate® - DeRoyal Industries	Material não-tecido de fibras espessas de alginato de cálcio
Restore® - Hollister	Material não-tecido de fibras de alginato de cálcio e sódio
SeaSorb® - Coloplast Sween	Material não-tecido de fibras de alginato de cálcio e carboximetilcelulose
Maxorb® Extra - Medline Industries	Material não-tecido composto por fibras de alginato e carboximetilcelulose
AlgiSite® - Smith & Nephew	Material tecido e não-tecido de fibras de alginato de cálcio com elevado conteúdo de ácido manurônico
Tegagen HG® - 3M Health Care	Fibras de alginato de cálcio em formato de faixas
PhytaCare® - Curafarm	Hidrogel de alginato

Silverlon® - Cura Surgical	Curativo em duas camadas sendo uma composta por material não-tecido de fibras de alginato de cálcio de alto conteúdo de ácido manurônico e outra composta por náilon impregnado com prata
Hyperion Advanced Film Dressing ® - Hyperion Medical	Filme transparente de alginato
PolyMem® - Ferris Mfg	Membrana de alginato contendo glicerina e agente surfactante

Fonte: BUENO (2015, p. 21).

Ferida contaminada é a principal causa de retardo no processo cicatricial, a presença de exsudato inflamatório infeccioso, associado a agentes bacterianos como *Enterococcus faecallis, Pseudomonas aeruginiae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae e Escherichia coli* promovem aumento da fase inflamatória do processo cicatricial, interferindo assim, na epitelização, contração e deposição de colágeno. Devido a complexidade do fenômeno é fundamental a utilização de modelos in vivo e análise da resposta orgânica do animal perante o uso do curativo, apresentando assim condições semelhantes a um contexto de uso clínico em humanos (NITZ et al., 2006; BRITO JUNIOR; FERREIRA, 2015).

Lesões cutâneas sejam elas limpas ou contaminadas, são relatadas frequentemente tanto em pessoas quanto em animais, e a dificuldade de acesso a curativos pode tornar o tratamento do paciente longo, caro e com sequelas tanto físicas quanto psíquicas. Portanto, estudos e desenvolvimento de produtos com capacidade de abreviar o tempo de cicatrização, promover conforto e segurança ao paciente, com baixo custo, reaproveitando subprodutos da agroindústria e utilizando extratos naturais são de extrema importância médica e sustentável.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade e segurança de membranas de celulose vegetal incorporadas com alginato sódio em feridas cutâneas em ratos Wistar.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a eficácia e segurança das membranas de celulose vegetal incorporadas com alginato de sódio em aplicações *in vivo*;

Comparar a ação da membrana de celulose vegetal incorporada com alginato de sódio com a membrana de celulose bacteriana (Membracel®) disponível comercialmente.

3. HIPÓTESES

A membrana celular vegetal incorporada com alginato de sódio constitui uma opção de tratamento para feridas cutâneas com ação superior ou equivalente à membrana de celulose bacteriana (Membracel®) disponível comercialmente.

3.1. Hipótese Positiva

A membrana celular vegetal incorporada com alginato de sódio constitui uma opção de tratamento para feridas cutâneas.

3.2. Hipótese Negativa

A membrana celular vegetal incorporada com alginato de sódio não constitui uma opção de tratamento para feridas cutâneas.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL INCORPORADA COM ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS

2.1 INTRODUÇÃO

O tratamento de feridas é um grande desafio para os profissionais da área de saúde, em especial as feridas traumáticas derivadas de queimaduras (BALASUBRAMANI *et al*., 2001; GIORDANI *et al*., 2016). Além disso, os procedimentos terapêuticos para esse tipo de ferida exigem acompanhamento multiprofissional (SANTOS *et al*, 2017). Estima-se que no Brasil ocorram cerca de um milhão de acidentes envolvendo queimaduras por ano, no entanto apenas 10% desses pacientes procuram os serviços de saúde e, desse percentual, aproximadamente duas mil pessoas chegam ao óbito por questões diretas ou indiretamente relacionadas às feridas (GIORDANI *et* al., 2016).

As feridas crônicas também têm grande importância hospitalar, em especial as úlceras em membros inferiores, que têm apresentado crescimento significativo em todo cenário mundial. As úlceras afetam significativamente a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que essas lesões causam dores em diferentes níveis, além de dificultar e limitar a mobilidade. Além disso, esse tipo de lesão apresenta altos índices de reincidência. Nesses casos, é imprescindível que os curativos apresentem alto potencial de absorção do exsudato e capacidade de induzir rápida cicatrização (SILVA *et al*., 2017).

Muitos são os problemas causados pelo tratamento inadequado de feridas, embora os curativos componham um diversificado cenário no mercado farmacêutico, esses dispositivos apresentam custos elevados que acabam por torná-los inacessíveis a boa parcela de pacientes, em especial, aos que apresentam feridas crônicas. Há dificuldade entre os profissionais da saúde em estabelecer as estratégias mais eficientes a fim de apresentar resultados satisfatórios e atender às necessidades e características do paciente (RODRIGUES, 2018).

De maneira geral, os curativos que apresentam tecnologias mais avançadas, como os que fazem uso de nanotecnologias, possuem resultados bastante promissores, pórem constituem o grupo de materiais de custos mais elevados

encontrados no mercado. Além disso, é preciso considerar que os curativos precisam ser trocados com frequência, o que torna mais difícil o acesso e mais onerosa a sua utilização (LIMA *et al.,* 2016; DOLCI *et al*., 2017).Diante desse cenário, muitas têm sido as tentativas em desenvolver curativos à base de biomateriais que sejam menos onerosos tanto aos pacientes quanto às unidades hospitalares, a fim de possibilitar que essas ferramentas sejam utilizadas em longa escala em diversos pacientes e que possam apresentar resultados satisfatórios. Ademais, a obtenção desses dispositivos pode oferecer melhor qualidade de vida aos pacientes, em especial às vítimas de lesões cutâneas graves e feridas crônicas, favorecendo menor tempo para regeneração do tecido, menos sequelas e redução do tempo de internação. Esse último aspecto é bastante relevante uma vez que auxilia a diminuir os custos ao paciente e instituições de saúde (LIMA *et al*., 2016; DOLCI *et al*., 2017). Nesse contexto, o alginato de sódio emerge como excelente estratégia para servir como alternativa aos biomateriais já em vigência no mercado. O alginato corresponde a um polissacarídeo natural obtido de algas, geralmente, das algas marrons. Esse composto é amplamente utilizado nas indústrias têxtil, alimentícia e farmacêutica. Nesta última, o alginato é usado na formação de matrizes poliméricas que podem servir para encapsular fármacos e na constituição de curativos destinados a ferida exsudativas (RODRIGUES, 2018).

Por seus altos potenciais de biocompatibilidade e biodegradação, o alginato ganha vantagens quando comparado a curativos constituídos por materiais sintéticos. Além disso, sua estrutura molecular confere à substância formação de géis de alta porosidade e propriedade mucoadesiva (RODRIGUES, 2018).

A membrana de celulose vegetal tem se destacado como uma alternativa aos curativos de alto custo (CLARO, 2017), podendo apresentar propriedades mecânicas iguais ou superiores quando comparado a outros biopolímeros como a quitosana e o colágeno. A membrana de celulose possui alto potencial de moldagem e mobilidade, por isso tem sido usada na constituição de tecidos cardiovasculares artificiais e cirurgias do sistema nervoso (MORAES, SASKA, GASPAR, 2012). Outro aspecto dessa película que merece destaque é a capacidade de promover permeabilidade de caráter seletivo, o que possibilida a passagem de vapor de água e impede a entrada de microorganismos (ANDREOZZI *et al*., 1992).

Embora muitos sejam os benefícios apresentados tanto pelo uso do alginato, quanto das membranas de celulose bacteriana, muitas investigações são necessárias a fim de possibilitar a comercialização deste novo recurso. Frente a esse cenário, o presente estudo se dedicou a avaliar a aplicabilidade de membranas de celulose vegetal incorporadas com alginato sódio em feridas cutâneas em ratos Wistar.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Delineamento da pesquisa científica

Estudo longitudinal randomizado controlado, os grupos experimentais foram submetidos aos mesmos critérios de inclusão e diferem somente pelo tratamento instituído em cada grupo. Para análise histológica foi realizado ensaio simples cego em que a leitura das lâminas foi feita por um patologista experiente, e as amostras não tinham identificação conhecida pelo patologista.

2.2.2 Preparo das membranas de celulose vegetal

As membranas de celulose vegetal foram desenvolvidas e produzidas em estudo prévio (CLARO, 2017) realizado no Laboratório de Tecnologia da Madeira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Florestas, Colombo – PR). Neste estudo, foi utilizada a polpa branqueada obtida da madeira de pinheiro (*Pinus sp*.), primeiramente homogeneizada em liquidificador laboratorial com água destilada para obtenção de uma pasta. Essa pasta foi inserida em moinho para a formação da suspensão de nanofibrilas de celulose (Figura 2.1) para preparo do gel de celulose nanofibrilada (GCN). O GCN foi processado a fim de produzir membranas base com gramatura objetivada de 20 a 60 g/m^2.

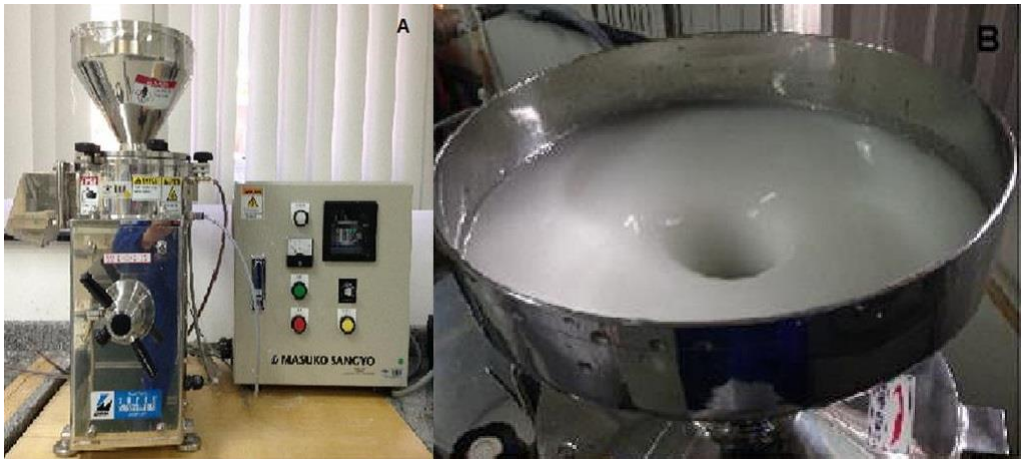

Figura 2.1 Imagem fotográfica do moinho Masscoloider Masuko Sangyo (A). Imagem do moinho em funcionamento para o preparo do gel de celulose nanofibrilada (B). Fonte: Claro (2017).

As membranas base foram submetidas aos seguintes testes físicos: a) Análise térmica por termogravimetria que foram feitas em analisador térmico com taxa de aquecimento de 10ºC/min em atmosfera inerte de N2 da temperatura ambiente até 600ºC; b) Avaliação da gramatura em que a massa em gramas foi relacionada com a área em metro quadrado de papel ou filme sendo, os filmes pesados em balança analítica e as massas relacionadas com áreas pré-definidas; c) Ensaios de tração e arrebentamento, que foram realizados utilizando máquina universal e dinamômetro com distância entre as garras ajustada para 100 mm e velocidade de ensaio de 10 mm/min. Determinou-se a resistência a tração (MPa) correspondente ao corpo de prova com largura de 1,5 cm. Utilizando equipamento Mullen foi determinada a resistência ao arrebentamento dos filmes obtidos das suspensões da polpa bruta e da polpa tratada; d) Determinação da espessura utilizando o equipamento micrômetro eletrônico da Regmed®; e) Avaliação da absorção de água pelo método Cobb que corresponde à massa de água absorvida por $1m^2$ do filme em determinado espaço de tempo, sendo adotado o tempo de 60 segundos, e f) Permeância a passagem de ar pelo método Gurley que mede a quantidade de tempo necessário para determinado volume de ar passar através do filme expresso em s/100 cm^3.

Todos os testes físicos foram realizados no laboratório de polpa e papel da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A avaliação das membranas por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.2.3 Incorporação de alginato de sódio à membrana

As membranas de celulose vegetal incorporadas com alginato de sódio foram confeccionadas com a mesma técnica de produção da membrana de celulose base (CLARO, 2017). As membranas base foram alocadas em placas de petri esterelizadas e recobertas com 0,5 ml de solução de casting.

Para a produção da solução de casting foi misturado 0,6 g de alginato sódico (Sigma) com 10 ml de água destilada, aquecidos a 100ºC por 1 hora até sua completa dissolução. Após o resfriamento, adicionou-se 0,1 ml de glicerol (Sigma) como agente plastificante ao volume fixo de 10 ml de solução, após, 0,1 ml de Tween 20 (Sigma) foi lentamente adicionado a solução. Após a aplicação desta solução as membranas permaneceram em placas de petri até a secagem completa por aproximadamente 24 horas.

As membranas obtidas possuiam gramatura de 20 g/m2, foram cortadas em discos de 3 cm de diâmetro e foram realizadas manualmente perfurações simétricas medindo 2mm com agulha 40x12 a fim de produzir poros semelhantes aos presentes nas membranas comerciais porosas. Após a realização dos poros os discos foram alocados em embalagem cirúrgica e esterilizados sob lâmpada UV para posterior utilização no experimento.

2.2.4 Grupos experimentais

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontíficia Universidade Católica do Paraná – Registro nº 01244 (Anexo 1) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo – Registro nº 475 (Anexo 2), seguindo as normas e principios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

A experimentação in vivo envolveu 117 ratos da espécie Wistar, machos, com idades entre 6-8 semanas, pesando aproximadamente 300 gramas. Os animais foram alocados em biotério e mantidos em gaiolas individuais com espaço suficiente para movimentação e descanso, tampa gradeada, forradas com maravalhas, sob temperatura e fotoperíodo controlados e com alimento e água ad libitum. Cada gaiola foi identificada com crachás de acordo com o grupo de cada animal.

Os animais foram identificados e distribuídos de forma aleatória em quatro grupos: Grupo 1 (Grupo Controle Negativo) - 36 animais submetidos a ferida

induzida e nela foi observada a cicatrização espontânea, sem aplicação de membrana; Grupo 2 (Grupo Controle Positivo) - 36 animais submetidos a ferida induzida com aplicação da membrana de celulose bacteriana comercial (MEMBRACELL®); Grupo 3 (Tratamento) - 36 animais submetidos a ferida induzida com aplicação da membrana de celulose vegetal com alginato de sódio.

O Grupo 4 (Implante Subcutâneo) foi constituído por nove animais com implantação de fragmento circular de 6mm de diâmetro da membrana de celulose vegetal com alginato (Figura 2.2).

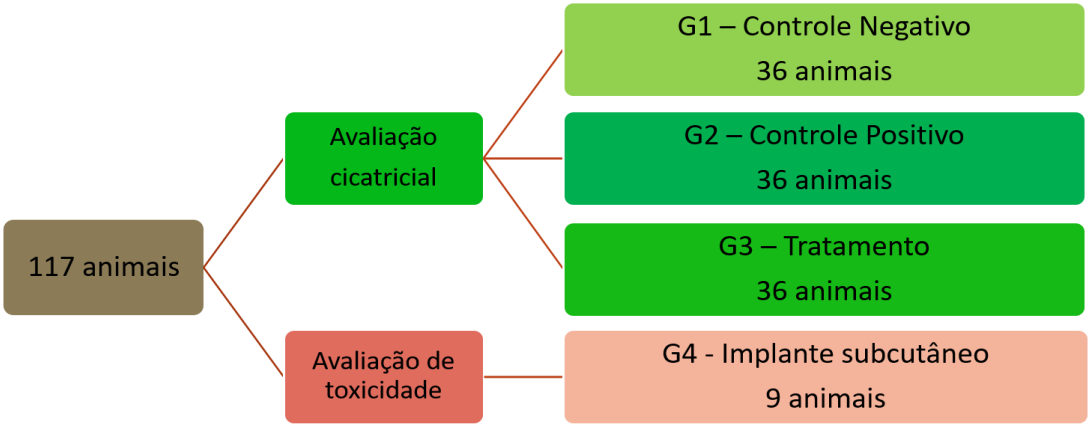

Figura 2.2 Identificação e distribuição em grupos dos animais utilizados no estudo.

2.2.5 Experimentação animal

As feridas cirúrgicas foram induzidas por procedimento cirúrgico antecedido por anestesia com associação de cloridrato de cetamina 10% na dose 60mg/kg e cloridrato de xilazina 2% na dose 8mg/kg, administrados por via intramuscular. Em seguida realizou-se ampla tricotomia no dorso dos animais e delimitação da área da lesão com caneta cirúrgica e molde circular de 3 cm de diâmetro (Figura 2.3). Foi realizada antissepsia com gaze estéril, álcool 70% e iodopovidona tópico a 10%. Em seguida foi realizada a exérese do segmento de pele e do tecido subcutâneo subjacente com tesoura cirúrgica Mayo Stille curva até a fáscia musculoaponeurótica do dorso dos animais.

Figura 2.3 Imagem fotográfica do molde circular metálico de 3 cm de diâmetro, utilizado para padronizar as feridas cutâneas cirúrgicas.

A membrana experimental foi aplicada no Grupo 3 diretamente no leito da ferida, após a aplicação foi realizada leve pressão nas bordas da ferida para completa adesão da membrana ao leito receptor (Figura 2.4).

Ao fim do procedimento cirúrgico, os animais foram transferidos para gaiolas isoladas e identificadas com cores de crachás distintas, com alimentação e água ad libitum. Diariamente os animais eram avaliados no tocante a ferida cirúrgica, comportamento e ingesta de água e ração.

Nos primeiros quatro dias todos os animais receberam, cloridrato de tramadol 12,5 mg/kg BID e enrofloxacina 10 mg/kg SID por via subcutânea. Os animais foram acompanhados diariamente e se necessário seria realizada analgesia de resgate. Aos quatro, sete, 11 e 14 dias de pós-operatório, nove animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para coleta de amostras histológicas.

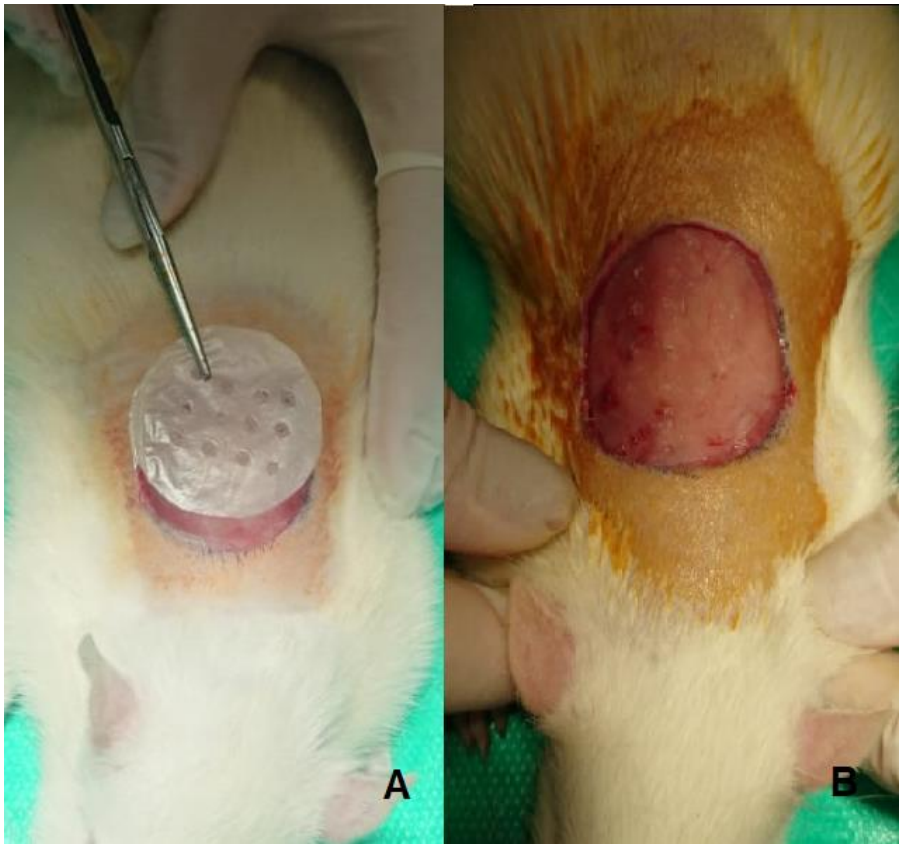

Figura 2.4 Imagens de rato Wistar com lesão cutânea de 3 cm de diâmetro, induzida experimentalmente. Em (A) observa-se a aplicação da membrana de celulose vegetal e alginato de sódio. E em (B) observa-se a boa aderência da membrana à lesão cutânea.

No Grupo 4 foi realizada incisão cirúrgica em região interescapular, implantado o fragmento de membrana em tecido subcutâneo (Figura 2.5) e realizada síntese de pele com ponto simples utilizando mononáilon 3-0. Esse procedimento foi realizado com intuito de avaliar possíveis reações do organismo à membrana. Diferentemente dos três primeiros grupos, os animais do G4 foram submetidos à eutanásia apenas após o 14º dia do implante. Neste período foi avaliada a presença de eritema, edema, fistulação, piodermite e o surgimento de abscessos, e possíveis sinais de desconforto, dor ou prurido.

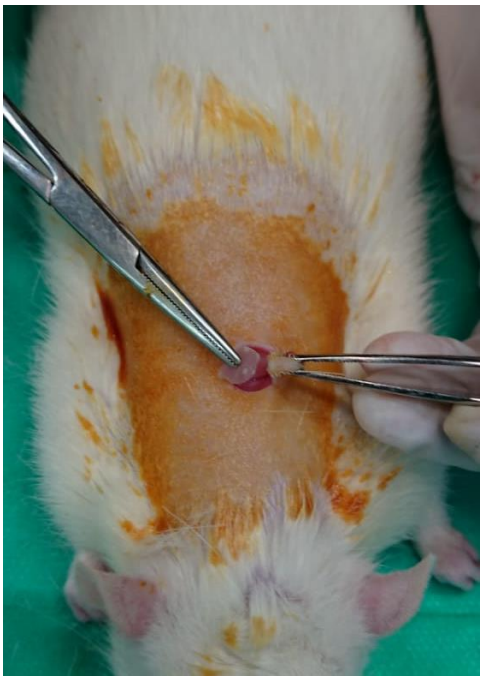

Figura 2.5 Imagem de rato Wistar submetido à incisão cutânea, para implantação de membrana de 6 mm de celulose vegetal e alginato no tecido celular subcutâneo.

Quanto ao processo de eutanásia, os animais foram submetidos a procedimento anestésico inalatório com isofluorano em campânula de acordo com a diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, resolução normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018. O óbito foi confirmado por avaliação do estado mental, pulso e ausculta respiratória e cardiovascular.

2.2.6 Avaliação macroscópica e retração cicatricial

Para realização das análises macroscópicas nos animais dos Grupos G1 a G3, os animais foram sedados com isoflurano em campânulas, nos dias 4, 7, 11 e 14 dias pós-lesão.

Sob sedação, foram realizadas as seguintes aferições:

a) Medição do diâmetro horizontal e vertical da área afetada utilizando um paquímetro digital calibrado;

b) Fotografia das lesões com auxílio de tripé instalado com distância de 15 cm da superfície do animal, a fim de produzir imagem para realização de planimetria das áreas de lesão com o programa IMAGE J 1.51K para posterior cálculo da porcentagem de retração da ferida de cada grupo, segundo fórmula utilizada por Xu R et al. (2017) (Figura 2.6);

c) Avaliação da porcentagem de membranas aderidas na ferida em cada grupo nos diferentes tempos avaliados;

d) Alterações visíveis na superfície da pele compatíveis com reação inflamatória excessiva, escoriações por prurido ou processo infeccioso como áreas de abscessos, fistulações, pústulas, piodermites.

Além das análises sob sedação, também foi realizada avaliação de alterações comportamentais nos animais compatíveis com dor e distresse, de acordo com os padrões estabelecidos pelo Guia Brasileiro para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (CAMPOS et al., 2016).

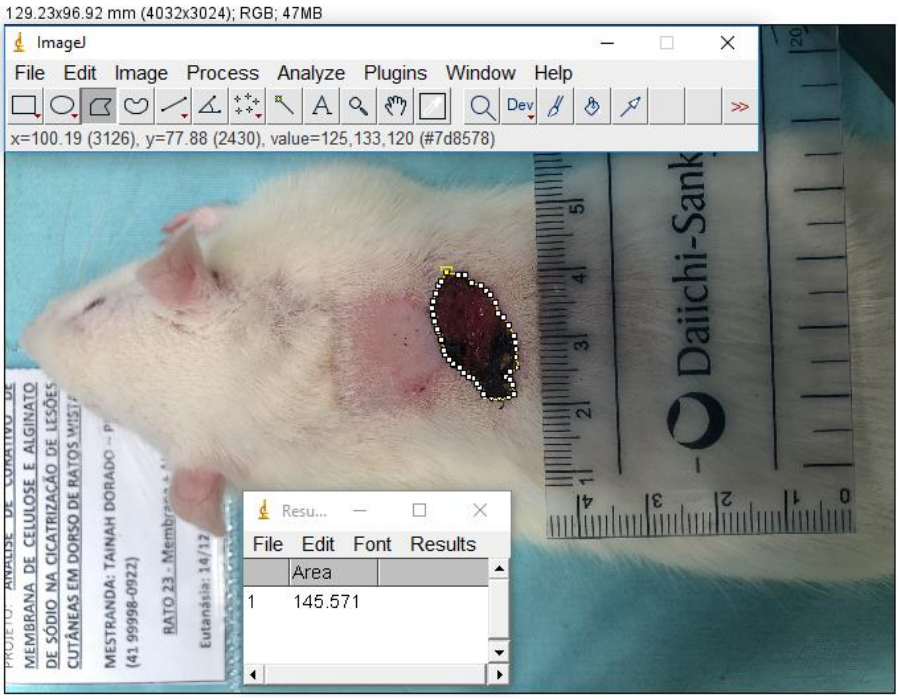

Figura 2.6 Planimetria para mensuração de área de ferida cutânea em rato Wistar, induzida experimentalmente, em programa de imagem IMAGE J 1.51K.

2.2.7 Avaliação histológica

Para esse procedimento foram removidos fragmentos de pele do dorso e, posteriormente, acondicionadas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas. Em seguida, essas amostras foram encaminhadas para processamento no laboratório de patologia experimental da PUCPR. Para tanto, as amostras foram clivadas longitudinalmente no centro da ferida, emblocadas em parafina e seccionadas em um micrótomo rotativo com navalhas com secções de 5μm de

espessura, sendo produzidas duas lâminas por lesão. A primeira lâmina foi corada em hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação histológica geral, avaliação da resposta inflamatória e reepitelização, enquanto que a segunda lâmina foi corada com tricrômio de Mallory para avaliação da angiogênese e produção de fibras de colágeno. Após a confecção, as lâminas foram avaliadas por patologista experiente utilizando-se os seguintes protocolos:

a) O grau de inflamação foi analisado conforme o escore de Cotran *et al*. (2000) em que a inflamação é classificada em:
    - Grau 1: Inflamação aguda com formação de membrana piogênica;
    - Grau 2: Predomínio de inflamação aguda difusa (predomínio de tecido de granulação);
    - Grau 3: Predomínio de inflamação crônica com início de profileração fibroblástica;
    - Grau 4: Cicatrização com desaparecimento de sinais de inflamação com células redondas ocasionais.
b) A reepitelização das bordas da ferida foi classificada segundo Sinha e Gallagher (2005):
    - Grau 0: Queratinócitos observados apenas na margem da ferida;
    - Grau 1: Reepitelização cobrindo área menor que 50% da ferida;
    - Grau 2: Reepitelização cobrindo mais que 50% da ferida;
    - Grau 3: Reepitelização cobrindo toda a ferida com espessura irregular;
    - Grau 4: Reepitelização cobrindo toda a ferida com espessura normal.
c) As fibras colágenas foram avaliadas por meio do escore definido por Garcia *et al*. (2010) adaptado para coloração de tricrômio de Mallory sendo:
    - Grau 1: Colágeno com coloração discreta comparada ao tecido adjacente saudável;
    - Grau 2: Colágeno com intensidade semelhante ao tecido adjacente saudável;
    - Grau 3: Colágeno com intensidade maior que o tecido adjacente saudável.
d) A Angiogênese foi avaliada também a partir de escore definido Garcia et al. (2010):

- Grau 1: Quantidade de neovasos menor que a observada no tecido saudável adjacente;
- Grau 2: Quantidade similar ao tecido adjacente;
- Grau 3: Quantidade maior que observada no tecido adjacente.

Em seguida a essas análises, as lâminas foram escaneadas em scanner Axio Zen 2.3 (Zeiss) e ampliadas de tamanho para demonstração dos resultados.

2.2.8 Avaliação da toxicidade do implante subcutâneo

Nos animais do Grupo 4, além das análises cutâneas macroscópicas, foram realizadas coletas de amostras sanguíneas por via intracardíaca para processamento de exames bioquímicos séricos para análise de perfis hepáticos (alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA)) e renais (ureia e creatinina) tendo como base estudo de Lima CM *et al.* (2014), com objetivo de verificar possível repercussão sistêmica do implante. Ademais, foram coletados fragmentos de pele e subcutâneo, os quais foram fixados e corados em HE para avaliação de possível reação inflamatória com significância clínica ao implante.

2.2.9 Análise estatística e modelagem matemática

Para comparação das porcentagens de retração da ferida foi utilizado o teste ANOVA comparando as médias e desvios padrão entre os grupos e entre tempos do mesmo tratamento utilizando grau de significância de $p< 0,05$. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre as medianas dos escores de inflamação, reepitelização, intensidade de colágeno e neoangiogênese entre tratamentos com grau de significância de $p<0,05$. Ainda, foi utilizado o teste exato de Fisher para comparação entre o prurido apresentado pelos pacientes em relação ao tempo de tratamento no G3. Para estas avaliações foi utilizado o programa STATGRAPHICS Centurion XVI versão 16.1.11.

O método de modelagem matemática foi empregado para determinar precisamente em qual data a retração cicatricial atingiu 50% da área inicial da ferida. A regressão não linear foi realizada com o auxílio do programa do programa Table Curve 2D v.5.01.02, pelo método de mínimos quadrados utilizandoprocedimento de Marquadt, a qualidade do ajuste foi observada por meio do erro padrão da estimativa Syx e coeficiente de determinação múltipla ajustado R^2aj (CHARNET, 1999).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Testes físicos com a membrana base

Os testes físicos com a membrana base utilizada para a inclusão do alginato de sódio apresentaram, ausência de poros à microscopia eletrônica (Figura 2.7), resistência à tração de 47 MPa, superior a curativos com base em celulose bacteriana e silicone, que apresentaram 10.32 MPa e 0.45 MPa respectivamente, e sua degradação térmica foi superior às temperaturas atingidas por processos de autoclavagem (121ºC) (Fu L *et al.,* 2012; Xu R *et al.,* 2015) (Tabela 2.1). A superfície da membrana base não sofreu alteração após inclusão de alginato permanecendo lisa, uniforme, transparente, de fácil manipulação e adaptável ao tamanho da ferida.

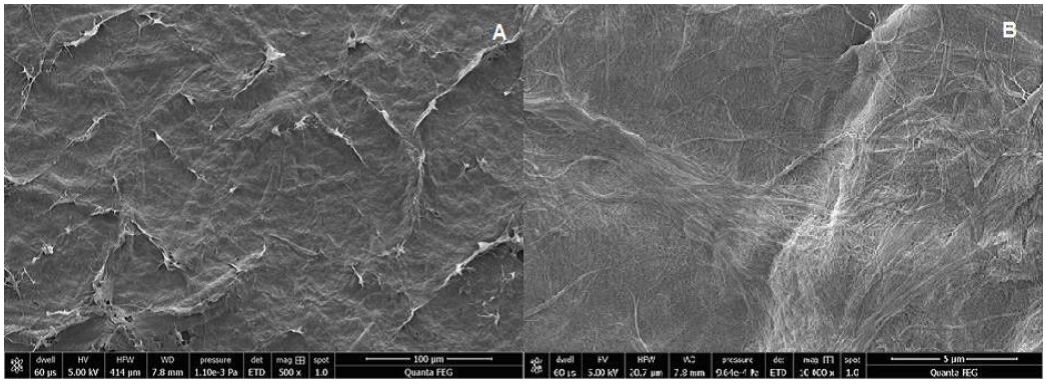

Figura 2.7 Microscopia eletrônica do filme de nanocelulose de Pinus (membrana base). Ampliação de 500x (A) e aumento de 10Kx (B). Fonte: Claro (2017).

As propriedades físicas da membrana base utilizada para incorporação com alginato, avaliadas por Claro (2017) foram compiladas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 Testes físicos da membrana-base de celulose vegetal.

Espessura (µm)	Gramatura (g.m-2)	Resistência à Tração (MPa)	Degradação Térmica (TGA)	Coob (g.m-2)	Gurley (s.100cm3)
45 ± 3	40 ± 2	47 ± 6	284 a 382 ºC	63 ± 9	0

Fonte: Claro (2017).

2.3.2 Avaliação macroscópica e da retração cicatricial

Não foram observadas alterações comportamentais nos animais utilizados no estudo durante o tempo avaliado, não houve demonstração de dor não sendo

necessária realização de analgesia de resgate após os quatro dias de pós-operatório, também não foram observadas alterações em relação a ingestão de água e ração, alterações compatíveis com distresse de acordo com os padrões estabelecidos pelo Guia Brasileiro para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (CAMPOS *et al*., 2016).

As avaliações macroscópicas foram realizadas por meio da observação do aspecto da ferida nos dias seguintes a realização do procedimento cirúrgico. Foi analisada a presença de crostas, exsudação e a aparência da membrana nos grupos tratados no decorrer dos 14 dias de experimento. O grupo G3 apresentou formação de crostas exuberantes, úmidas e com coloração escura a partir do 4º dia de tratamento em todos os animais do grupo. Em comparação, os grupos G1 e G2 apresentaram crostas delgadas e com coloração clara (Figura 2.8).

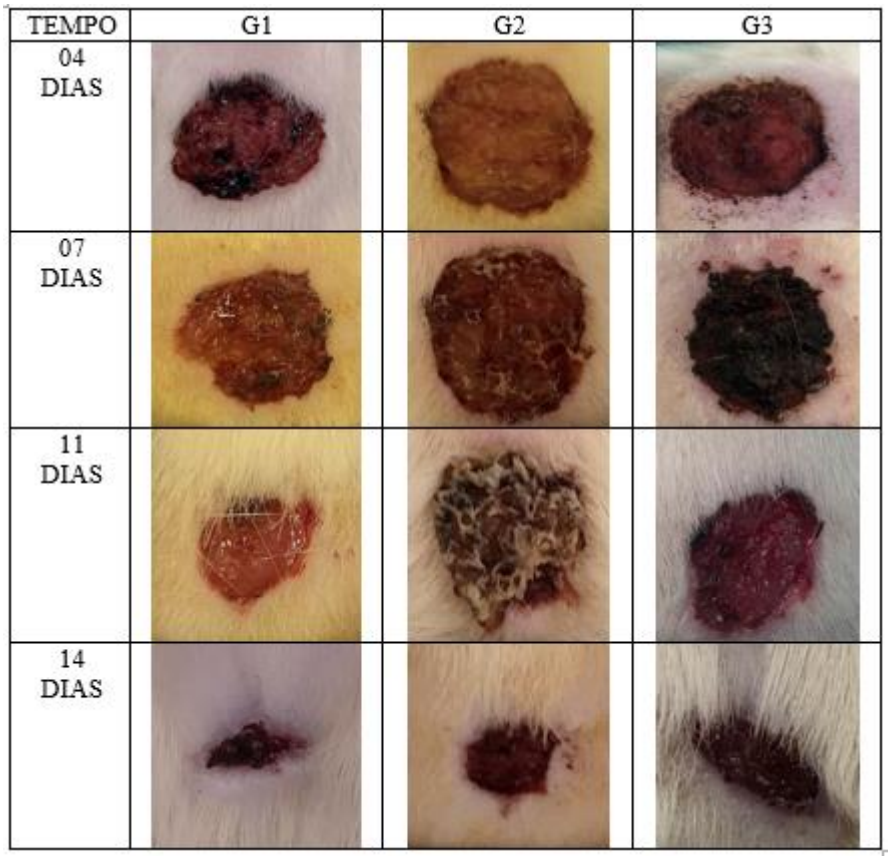

Figura 2.8 Imagens fotográficas das lesões cutâneas induzidas experimentalmente, em ratos Wistar pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 em diferentes tempos de observação (dias 4, 7, 11 e 14).

A degradação da membrana no grupo G2 foi observada em todos os animais após 11 dias de sua aplicação, a membrana do grupo G3 apresentou-se incorporada ao tecido até o 7º dia de tratamento, após esse período iniciou-se um

processo de desprendimento da membrana juntamente com a crosta formada, permanecendo no leito da ferida um tecido de granulação sem sinais de trauma em todos os animais aos 11 dias (Figura 2.9). Aos 14 dias nenhum animal de G2 ou G3 apresentaram membranas aderidas a lesão.

Figura 2.9 Imagens fotográficas das lesões cutâneas nos dias 7 e 11 em animal do grupo G3.

Os dados referentes a retração cicatricial estão presentes na Tabela 2.2. e Figura 2.10. Uma retração lesional significante foi observada entre os vários períodos de observação no G3 ($P < 0,05$), enquanto G1 e G2 apresentaram diferença a partir do 7° dia pós-lesão.

Não houve diferença ($P > 0,05$) na retração nos três grupos após o 11º dia de tratamento. A comparação entre grupos nos mesmos dias demonstra que, aos quatro dias houve retração maior em G2, aos sete e onze dias em G1 e aos quatorze dias não houve diferença entre os grupos.

Tabela 2.2 Médias das porcentagens de retração das lesões de G1 (controle negativo), G2 (controle positivo) e G3 (tratamento) nos dias 4, 7, 11 e 14. Os dados foram expressados em médias e desvios padrão utilizando um grau de significância de $p < 0,05$.

	4	**7**	**11**	**14**
G1	34,73 ± 12,57 ^{bC}	64,23 ± 5,81 ^{aC}	84,21 ± 3,79 ^{aB}	89,64 ± 5,27 ^{aA}
G2	41,48 ± 12,13 ^{aC}	55,37 ± 8,94 ^{bC}	77,53 ± 7,45 ^{bB}	84,77 ± 10,55 ^{aA}
G3	29,90 ± 7,49 ^{bD}	53,16 ± 6,13 ^{bC}	79,23 ± 5,47 ^{bB}	86,67 ± 5,52 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes demonstram diferenças entre grupos e maiúsculas entre tempos de um mesmo grupo.

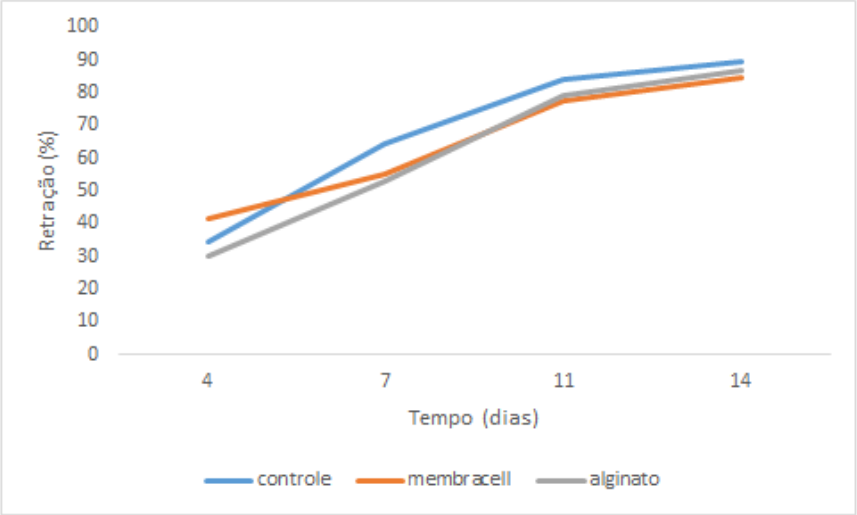

Figura 2.10 Porcentagem da retração cicatricial em função dos tempos avaliados (4, 7, 11 e 14) dos grupos G1 (controle negativo), G2 (controle positivo) e G3 (tratamento - alginato).

Não houve diferença de prurido em relação ao tempo de cicatrização nos animais do G3 nos dias analisados.

2.3.3 Modelagem matemática

As curvas obtidas pelo método de modelagem matemática demonstraram que a retração de 50% da lesão foi atingida respectivamente por G1, G2 e G3 aos 5.5, 5.7 e 6.7 dias, como observado na Figura 2.11. O valor de R^2aj de G3 foi 0,999 e o erro padrão Syx% = 0,74.

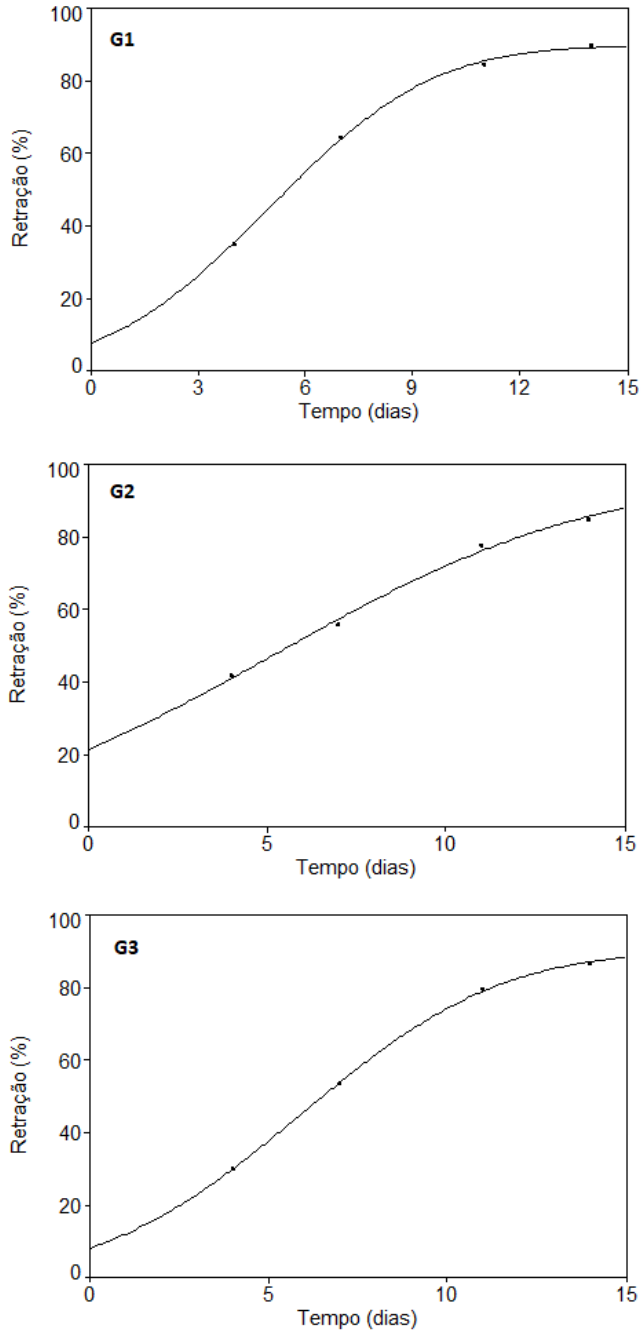

Figura 2.11 Curvas ajustadas para retração da lesão x tempo (linhas) próximas às porcentagens de tração observadas nos dias 4, 7, 11 e 14 (pontos) nos grupos G1 (controle negativo), G2 (controle positivo) e G3 (tratamento), obtidas pelo método de modelagem matemática, mostrando que G1, G2 e G3 atingiram 50% de retração cicatricial, em média aos 5.5, 5.7 e 6.7 dias, respectivamente.

2.3.4 Avaliação histológica

A análise do grau de inflamação demonstrou ao teste de Mann-Whitney diferença entre os grupos somente no 7° dia de tratamento, sendo que G3 apresentou escore inferior, com predomínio do Grau 2 (inflamação aguda difusa com predomínio de tecido de granulação) em relação ao predomínio do Grau 3

(inflamação crônica com início da proliferação fibroblástica) visto nos grupos G1 e G2.

Entre os dias 4 e 7 de tratamento todos os grupos apresentaram diferença, porém G1 e G2 não apresentaram progressão em relação ao grau de inflamação após o 7° dia, permanecendo em Grau 3 enquanto G3 apresentou diferença significativa entre 7° e 11° dias, quando houve a progressão de Grau 2 para o Grau 3 igualando-se então aos outros grupos. Nenhum grupo apresentou evolução ao Grau 4, correspondente a cicatrização com desaparecimento de sinais de inflamação (Figura 2.12).

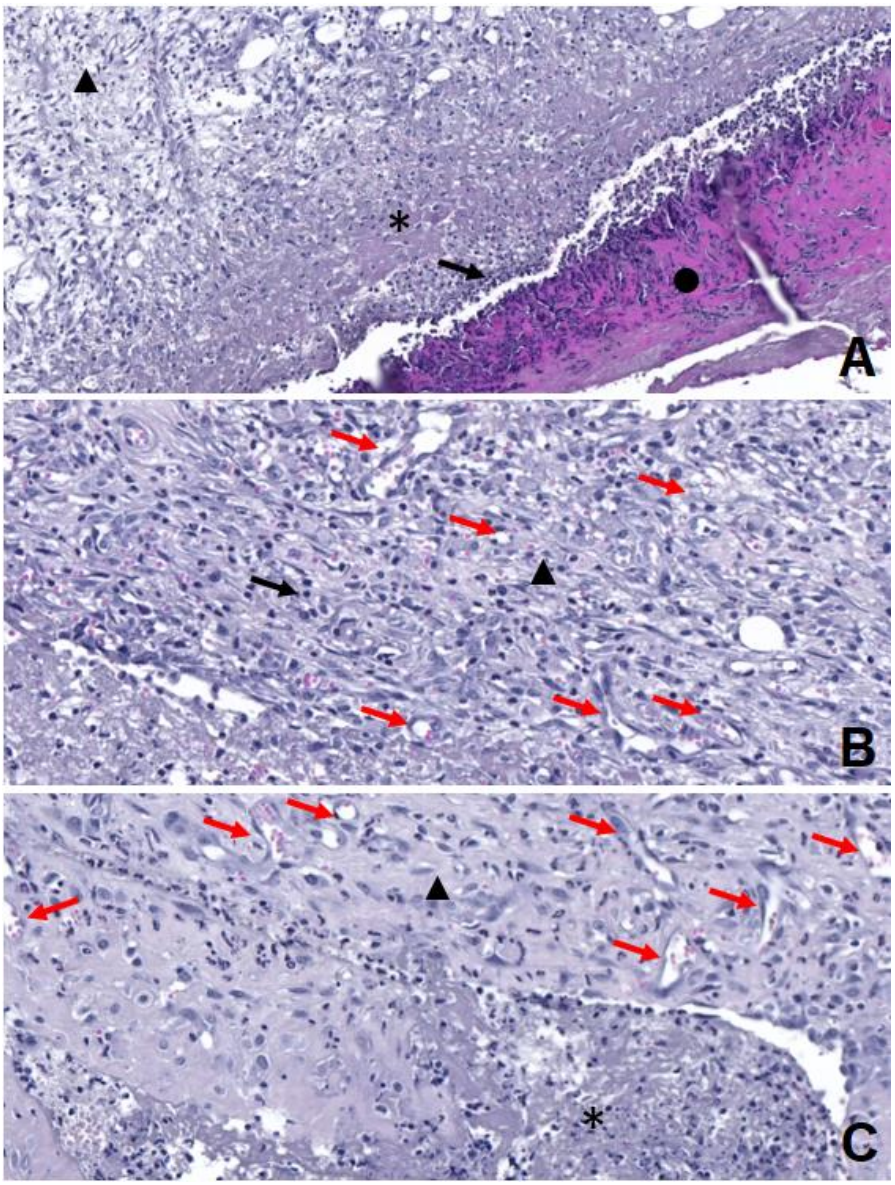

Figura 2.12 Secções histológicas (hematoxilina e eosina). Em (A) análise de tecido cicatricial com 4 dias de pós-lesão. Observa-se Grau 1 de inflamação. Nota-se extensa crosta serocelular (círculo), recobrindo foco de inflamação aguda, com

neutrófilos degenerados (seta) e necrose (asterisco), adjacente a início de organização de tecido de granulação (triângulo) (aumento de 5x). Em (B) análise de tecido cicatricial com 7 dias de pós-lesão. Observa-se Grau 2 de inflamação. É identificado extenso tecido de granulação em organização (triângulo), caracterizado pela presença de fibroblastos, angiogênese (setas vermelhas) e infiltrado linfocitário (seta preta) (aumento de 10x). Em (C) análise de tecido cicatricial com 14 dias de pós-lesão. Observa-se Grau 3 de Inflamação.

Não houve diferença entre os grupos no mesmo dia de tratamento em relação à análise de fibras colágenas, todos os grupos apresentaram predomínio do mesmo grau durante os mesmos dias, sendo Grau 1 aos 4 e 7 dias com predominância de colágeno com coloração discreta em comparação ao tecido adjacente ao não lesionado, e Grau 2 a partir do 11º dia com aumento da intensidade do colágeno se igualando ao tecido saudável (Figura 2.13). Porém ao analisar a evolução durante os dias de tratamento, o G1 apresentou diferença somente no 14º dia, com predomínio do Grau 2, enquanto G2 e G3 apresentaram Grau 2 após o 11º dia de tratamento.

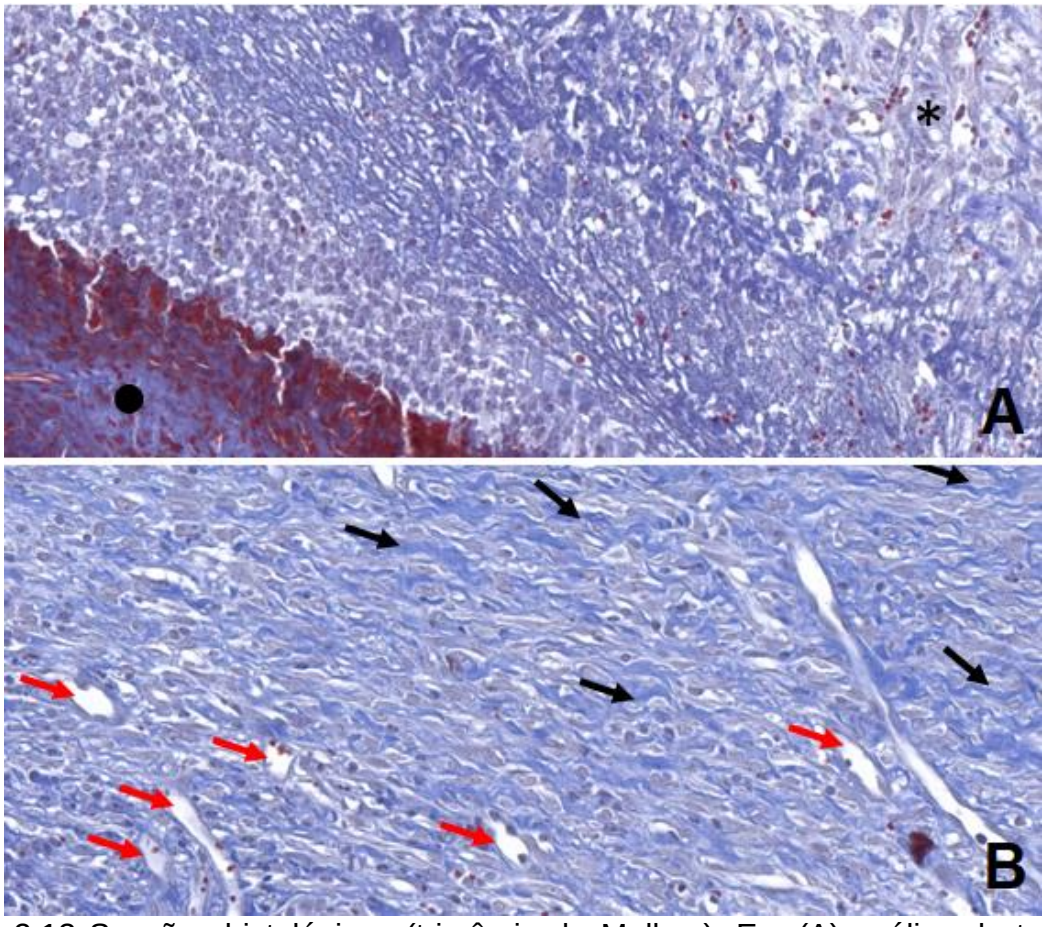

Figura 2.13 Secções histológicas (tricrômio de Mallory). Em (A) análise de tecido cicatricial com 7 dias de pós-lesão. Nota-se produção e organização de colágeno

grau 1. Observa-se a ferida recoberta por crosta serocelular (círculo) e início de formação de tecido de granulação com escassa produção de colágeno (asterisco) (aumento de 10x). Em (B) análise de tecido cicatricial com 14 dias de pós-lesão. Nota-se a produção e organização de colágeno grau 2. Presença de fibras colágenas de espessura moderada (setas pretas) em quantidade semelhante à da borda da lesão e se organizando horizontalmente. São observados múltiplos vasos sanguíneos (setas vermelhas) grau 2 de angiogênese (aumento de 20x).

A análise da angiogênese pela coloração de tricrômio de Mallory não demonstrou diferença entre os grupos nos mesmos dias de acompanhamento, com Grau 1 aos 4 dias, apresentando quantidade inferior de neovasos em comparação ao tecido saudável adjacente e evolução ao Grau 2 a partir do 7° dia com aumento da quantidade de neovasos (Figura 2.13). Em comparação aos dias de tratamento em cada grupo foi observado que nos três grupos (G1, G2 e G3) houve diferença somente até o 7° dia de tratamento.

Em relação ao escore de reepitelização, foi obtido Grau 0 em todos os grupos nos tempos avaliados, sendo observado queratinócitos apenas nas bordas das feridas até o 14° dia de tratamento (Figura 2.14).

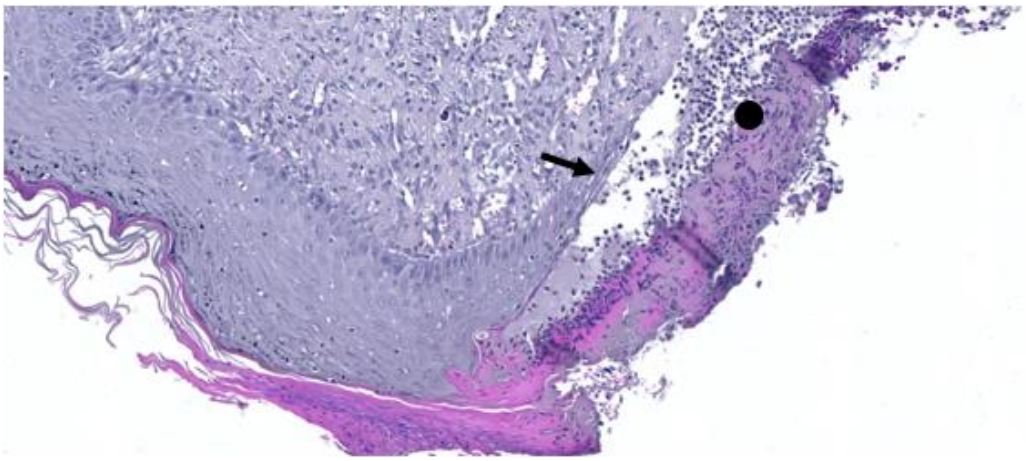

Figura 2.14 Secção histológica (hematoxilina e eosina) de tecido cicatricial com 14 dias de pós-lesão. Nota-se Grau 0 de reepitelização, com ferida recoberta por crosta serocelular (círculo), sendo observados queratinócitos remanescentes na borda da lesão (seta preta) (aumento de 10x).

2.3.5 Avaliação da toxicidade do implante subcutâneo

Em análise macroscópica não foi observado nenhum efeito adverso ao implante subcutâneo, nenhum animal apresentou prurido, eritema, edema, migração do implante ou fistulação durante o período avaliado. Após eutanásia, foram avaliados os parâmetros de bioquímica sérica (alanina aminotransferase,

fosfatase alcalina, creatinina e ureia) e todos os resultados encontraram-se dentro da normalidade em todos os animais do grupo G4. Na avaliação histológica em HE foi observada a presença de material levemente basofílico amorfo compatível com fragmentos da membrana e a formação de granuloma no local, demonstrando que aos 14 dias a membrana apresentou-se em processo de degradação porém ainda com reação local à sua implantação (Figura 2.15).

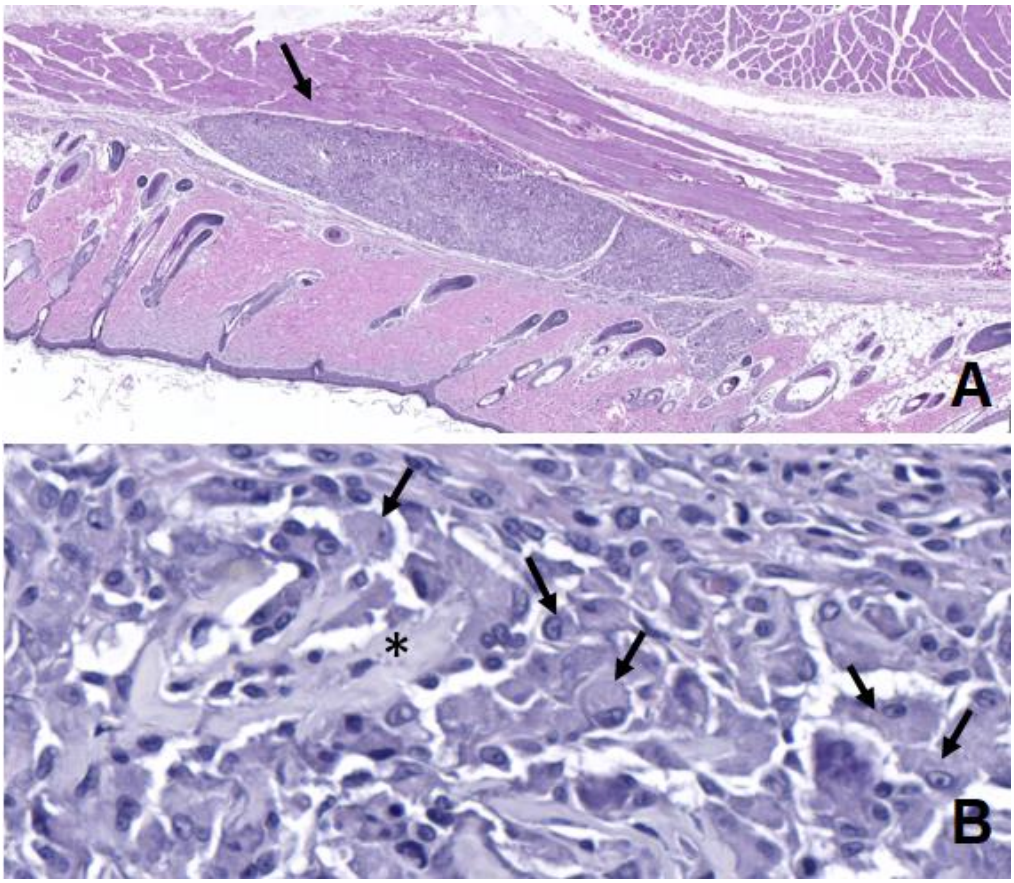

Figura 2.15 Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, de implante subcutâneo de membrana de celulose vegetal, 14 dias após a implantação. Em (A) nota-se granuloma em tecido subcutâneo (seta preta) (aumento de 5x). Em (B) aproximação da imagem de (A) com aumento de 40x, são identificados inúmeros macrófagos epiteioides (seta preta) associados à material levemente basofílico inerte. Ainda é possível perceber a presença da membrana (asterisco).

2.4 DISCUSSÃO

A membrana base para incorporação do alginato de sódio apresentou boas características mecânicas e uma resistência à tração superior à membrana oriunda de celulose bacteriana conforme estudos prévios (Xu R *et al.,* 2015), além de ter uma fina espessura, capacidade de moldagem às necessidades da ferida (CLARO,

2017) e possibilidade de esterelização por autoclavagem ou luz UV, dois métodos de fácil acesso e baixo custo operacional (NASCIMENTO *et al*., 2012).

Após adição de alginato de sódio foi observada manutenção do aspecto macroscópico da membrana base, permanecendo com uma superfície lisa, uniforme, transparente, de fácil aplicação e ajustável ao tamanho da ferida a ser tratada. Características que devem ser mantidas ao adicionar outros compostos à membrana a fim de não comprometer os aspectos positivos já existentes em sua composição inicial. O alginato é um composto de fácil acesso e custo baixo, tornando sua incorporação à membrana uma vantagem para a comercialização e utilização na rotina médica, tanto em animais quanto em humanos (OLIVEIRA *et al*., 2011; BUENO, 2015).

A ausência de poros microscópicos evidenciada em microscopia eletrônica confere, devido a maior densidade entre as nanofibras de celulose, resistência à tração, porém a inexistência de poros macroscópicos impede a drenagem de exsudato, a formação de crosta e a troca gasosa com o ambiente, requisitos primários a um curativo ideal segundo estudo de Bueno (2015). Dessa forma, foram confeccionados poros padronizados e uniformemente distribuídos em todas as membranas tendo como base os poros de 2 mm já delimitados em membranas vendidas comercialmente consideradas porosas. Esses poros permitiram a drenagem do exsudato da ferida, trocas gasosas com o meio, formação de crosta e manutenção da umidade no leito da ferida.

Apesar de ser relatada melhor retração cicatricial em membranas sem poros, devido à pouca formação crostosa (FU *et al*., 2012), isto não foi observado no presente estudo. Possivelmente, a formação da crosta nos animais do G3 proporcionou a manutenção da umidade na ferida e condições fisiológicas da matriz extracelular, o que pode ter possibilitado a troca de gases com o meio e evitado a proliferação de microrganismos (BOATENG *et al*., 2008).

A presença do alginato na membrana utilizada neste estudo pode ser observada logo após a sua aplicação, já que ao ser alocada no leito da ferida, parte da membrana tornou-se um gel e proporcionou à absorção de exsudato e formação de crosta, corroborando com estudos realizados por Franco e Gonçalves (2008) e Oliveira et al. (2008), que justificaram a aplicação do alginato em curativos devido a sua capacidade de alterar sua estrutura à medida que reage com o exsudato da ferida e, essa nova estrutura, ser capaz de absorver o exsudato inflamatório e

favorecer a hemostasia primária, por meio da formação de um tampão em gel (FRANCO; GONÇALVES, 2008; OLIVEIRA *et al*., 2011). Essa adaptação também eliminou a possibilidade de deslocamento, dobradura ou remoção da membrana após sua aplicação. A melhor aderência da membrana devido à incorporação do alginato e a sua degradação entre 7 e 11 dias indica uma reposição do curativo neste período sem necessidade de troca do curativo anterior, promovendo maior conforto ao paciente e evitando novas lesões causadas pelas trocas de curativo (LALAU *et al*., 2002).

Em relação ao prurido não significativo apresentado pelos animais do G3, os resultados podem estar relacionados à formação gelificante do alginato após entrar em contato com o exsudato da ferida impedindo o ressecamento do leito e consequentemente irritação local e prurido ao longo dos dias (BOATENG et al., 2008). A flexibilidade da película de gel formada após a aplicação, proporcionou conforto ao animal em comparação a outros curativos menos flexíveis e com forte aderência como por exemplo a gaze (MOURA *et al*., 2013).

Nos animais de G3 foi observada intensa formação de crosta a partir do 4º dia de tratamento, as quais se fixavam às feridas até o 7º dia e se desprendiam do 7º ao 11º dia de tratamento, o que indica a necessidade de troca de curativo após este período, como observado no estudo de Oliveira *et al.* (2011). Essa formação abundante de crosta a partir do 4º dia de tratamento foi também observado em estudo de Vieira (2018).

Após o desprendimento entre 7 e 11 dias foi observada permanência de tecido de granulação em todas as feridas, sem indícios de trauma ou piora da lesão após o desprendimento da crosta. Apesar da ausência da membrana entre 7 e 11 dias, o G3 apresentou retração significativa após os 11 dias de tratamento, em comparação ao G2, o que denota que mesmo após degradação da membrana, o processo cicatricial não foi interrompido ou retardado.

A retração cicatricial nos animais do G3 mostrou-se contínua em relação ao tempo em comparação aos animais dos grupos G1 e G2. O G3 apresentou diferença significativa na retração em todos os dias analisados, enquanto que G1 e G2 apresentaram diferença somente após o 7º dia. A diferença apresentada por G3 em relação aos tempos analisados demonstra que houve uma continuidade no processo de retração neste grupo. Importante fato se comparado com os dados evidenciados pela modelagem matemática, que revelaram uma retração de 50% da

ferida, mais lenta nos animais do grupo G3. A retração contínua apresentada por estes animais é semelhante ao observado por Vieira (2018) que cita decréscimo significativo em relação a área da ferida ao longo do tempo, principalmente entre 7 e 14 dias, em ratos tratados com extrato hidroalcoólico de ameixa do mato.

Em relação a avaliação histológica da inflamação, o fato dos animais do G3 terem evoluído ao Grau 3 somente no 11º dia em comparação a evolução no 7º dia de G1 e G2 pode explicar a retração cicatricial mais lenta apresentada por este grupo, que atingiu 50% de retraçã, em média, aos 6,7 dias em comparação aos 5.5 e 5.7 dias dos animais dos grupos G1 e G2. Apesar do prolongamento da fase inflamatória da cicatrização observada no G3, não houve comprometimento no tempo do processo cicatricial pois nenhum dos grupos apresentou diferença após o 11º dia e não houve progressão para o Grau 4 de inflamação. Este fato corrobora com estudo realizado por Araujo *et al.* (1998) que ao comparar o uso de Trigliceril e Agarol em feridas cutâneas em ratos, concluíram que houve aumento da fase inflamatória nos animais tratados com Trigliceril, porém sem diferença entre os grupos após o 14º dia de estudo.

A perda de diferença entre os grupos após o 14º dia foi justificada pela cicatrização fisiológica, em que a fase inflamatória com deposição de fibroblastos na região lesionada é iniciada, independente de fatores externos (ISAAC *et al*., 2010).

A formação de maior quantidade de fibras colágenas nos animais dos grupos G2 e G3 em comparação aos resultados apresentados nos animais do grupo G1 demonstram ação semelhante entre a membrana de celulose bacteriana e celulose vegetal na estimulação de colágeno das feridas, demonstrando vantagens em relação a uma ferida não tratada, como em G1. Essa estimulação de fibras colágenas indica grande proliferação fibroblástica, que é associada a um ótimo ambiente para cicatrização, minimizando possibilidade de cicatrizes cutâneas exuberantes. Esse resultado é semelhante ao observado por Gil *et. al.* (2013) em que feridas tratadas com curativos a base de biomateriais também apresentaram fibras colágenas mais densas e intensamente mais coradas em comparação aos demais grupos estudados.

A formação de neovasos foi a mesma em todos os grupos nos dias acompanhados, demonstrando que apesar do uso de tratamento nos animais do G2 e G3, não houve, por meio das membranas, estimulação à formação de novos

vasos, em discordância à estudo realizado por Vieira (2018) que apesar de não observar diferença entre os grupos em relação a angiogênese observou decréscimo no número de vasos formados ao longo dos dias analisados.

A não evolução em relação ao grau de reepitelização pemanecendo em Grau 0 em todos os grupos, sugere que os animais não atingiram a fase final de cicatrização, a fase de remodelamento. Em estudos realizado por Batista *et al.* (2010) e Fu *et al*. (2012) foram observadas alterações macroscópicas significativas e achados histológicos característicos da etapa final de cicatrização a partir do 14º dia de pós-operatório em feridas menores do que as realizadas neste estudo com maior tempo de acompanhamento das lesões. Essas observações também corroboram com estudo realizado por Vieira (2018) com acompanhamento de feridas até os 21 dias de pós-operatório, apresentando grau de reepitelização a partir dos 14 dias com reepitelização completa das feridas aos 21 dias. O grau 0 de reepitelização em todos os grupos, pode estar relacionado ao tempo experimental de 14 dias estabelecido no presente estudo, tempo que mostrou-se ser insuficiente para detalhamento de todas as fases cicatriciais, visto que em outros estudos a reepitelização foi observada justamente após esse período.

Para lesões cutâneas extensas, como as deste estudo, recomenda-se maior tempo de observação, de 21 a 30 dias para que características como retração total da ferida, evolução inflamatória e deposição de colágeno sejam melhor avaliadas.

Em relação à aplicação da membrana em região subcutânea não foi observado nenhum efeito adverso tegumentar e sistêmico demonstrando segurança e atoxidade em seu uso. Após 14 dias, foram observados fragmentos de membrana em tecido subcutâneo envoltos em granuloma local, sugerindo o seu encapsulamento prévio e início de degradação antes dos 14 dias, em concordância com os resultados macroscópicos que indicam a degradação do curativo entre 7 e 11 dias.

2.5 CONCLUSÃO

A membrana de celulose vegetal acrescida de alginato de sódio demonstrou-se segura ao uso tópico e interno, sustentável e com baixo custo de produção. Sua aplicação é simples, promoveu a ferida uma cicatrização contínua e sem indícios de irritação local. Apresentou-se degradada entre 7 e 11 dias indicando a reposição

do curativo neste período para evitar redução dos seus benefícios e similaridade com a cicatrização espontânea.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grupo tratado com a membrana de celulose vegetal apresentou resultados semelhantes ao grupo tratado com a membrana comercial, indicando similaridade entre seus mecanismos de ação e estimulando a continuidade dos estudos com esta membrana base no intuito de disponibilizar aos pacientes um tratamento tão eficaz quanto a membrana comercial por um custo muito menor.

A adição de alginato de sódio a membrana de celulose vegetal permitiu melhor aderência da membrana à ferida, a mudança de sua estrutura para um gel após a aplicação permitiu a absorção total da membrana entre 7 e 11 dias, dispensando a troca de curativo no tempo determinado, indicando assim a sua reposição, causando deste modo maior conforto ao paciente e evitando novas lesões causadas por trocas de curativos.

Devido aos resultados obtidos neste estudo indica-se a adição de outros compostos a membrana de celulose vegetal com alginato de sódio com objetivo de melhorar as propriedades já existentes nesta membrana base, indica-se estimulantes cicatriciais de origem natural como óleos essenciais que poderiam ser uma boa inclusão à composição já existente, sem elevar significativamente o custo de sua produção.

REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review**. Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

ANDREOZZI, R. et al. Quinoline ozonation in aqueous solution. **Water Research**, v. 26, n. 5, p. 639-643, 1992.

ARAUJO, C. F. R. Efeitos do algarol e do trigliceril sobre a cicatrização de pele: Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 231-236, 1998.

BALASUBRAMANI, M. ; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 27, n. 5, p. 534, 2001.

BATISTA, J. S.; SILVA, A. E.; RODRIGUES, C. M. F.; COSTA, K. M. F. M.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; OLINDA, R. G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (Caryocar coriaceum wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p. 441-447, 2010.

BLANES, L.; DUARTE, I. D. S.; CALIL, J. A.; FERREIRA, L. M. Avaliação clínica e epidemiológica das úlceras por pressão em pacientes internados no Hospital São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v. 50, n. 2, p. 182-7, 2004.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BOATENG, J.S.; MATTHEWS, K.H.; STEVENS, H.N.E.; ECCLESTON, G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2892–2923. 2008.

BORGES, E. L.; SAAR, S. R. C.; LIMA, V. L. A. N.; GOMES, F. S. L.; MAGALHÃES, M. B. B. **Feridas: Como tratar.** 2.ed. Belo Horizonte: Editora Coopmed, 2007.

BRITO-JUNIOR, L. C. de; FERREIRA, P. de L. Cicatrização de feridas contaminadas tratadas com papaína*. **Medicina (Ribeirao Preto, Online),** Ribeirão Preto, v. 48, n. 2, p. 168-174, 2015. ISSN 2176-7262.

BUENO, C. Z. Desenvolvimento e análise das propriedades de membranas de quitosana e alginato contendo polihexametileno biguanida para o tratamento de

lesões de pele. Universidade Estadual de Campinas. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**. 2015.

CABRAL, L. M.; GATTAZ, M. D.; FACTORE, L. A. P.; MATTAR, J. A.; DIAMENT, D.; OLIVEIRA, A. M. D. Curativo biológico no tratamento do grande queimado: apresentação de caso. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 77, n. 6, p. 383-9. 1987.

CAMARGO, M. C. Aplicabilidade de uma película de celulose cristalina no tratamento de feridas cutâneas induzidas em ratos wistar. Universidade do Oeste Paulista. **(Dissertação),** 2011.

CAMPOS, A. D. S.; DIAZ, B. L.; RIVERA, E. A. B.; GRANJEIRO, J. M.; BRAGA, L. M. G. D. M.; FRAJBLAT, M.; STEPHANO, M. A. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral. **Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2016.

CAMPOS, D. L. P.; SOLLA, M. F.; SUGIYAMA, L. T.; DOS SANTOS, N. B.; GONELLA, H. A.; RODRIGUES, J. M. Estudo experimental comparativo entre curativo a base de sulfadiazina de prata e o biopolímero de poliuretano e quitosana em queimaduras de espessura parcial superficial. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, 19(Supl.), 2017.

CAMPOS, D.; FRAGADOLLI, L.; GIMENES, G.; RUIZ, R.; ORGAES, F.; GONELLA, H. Uso de curativo com prata nanocristalina sobre enxerto em malha em queimaduras colonizadas por cepas multirresistentes. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 4, p. 471-478, 2009.

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DONADI, E. A. HLA-G alleles and HLA-G 14 bp polymorphisms in a Brazilian population. **Tissue antigens**, v. 70, n. 1, p. 62-68, 2007.

CIRILLO, G.; GIANFRANCO, U.; CURCIO, ; SPATARO, T.; PICCIO, N.; FIORE, P. N.; IEMMA, F. Cotton gauze-hydrogel composites: Valuable tools for electrically modulated drug delivery, **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, n. 9, p. 442 -450, 2016.

CLARO, F. C. Elaboração e caracterização de filmes a partir de nanofibrilas de celulose vegetal. Curitiba. **Dissertação [Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais]** – Universidade Federal do Paraná, 2007.

COTRAN R. S., KUMAR V., COLLINS T. Reparación de los tejidos: Regeneración celular y fibrosis. In: Robbins C, ed. **Patologia estructural y funcional** (6th ed). Madrid: MacGraw-Hill Interamericana, p. 112-117, 2000.

CUNHA, I. L. R.; FERREIRA, L. A.; SILVA, J. H. C. Cuidados realizados pela equipe de enfermagem aos pacientes que sofreram queimaduras**. Revista Família, Ciclos de Vida e Saúde no Contexto Social**, v. 5, n. 3, p. 381-389, 2017.

CHARNET, R. Análise de modelos de regressão linear com aplicações. **Campinas: Editora da Unicamp**, 1999.

D'ACAMPORA, A.J.; TRAMONTE, R.; BURGER, D.; BURGER, P.J. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007.

DEALEY, C. **Cuidando de Feridas: um guia para as enfermeiras**. São Paulo, Atheneu Editora, 2ª edição, capítulo 3: p. 49-65, capítulo 4: p. 68-89; cap. 9: p. 200-207, 2001.

DIAS, L.D.F., OLIVEIRA A.F., JULIANO Y., FERREIRA L.M. Unidade de Tratamento de Queimaduras da Universidade Federal de São Paulo: estudo epidemiológico. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 30, n. 1, p. 86-92, 2015.

DOLCI, M. E.; MARGATHO, A. S.; SILVEIRA, R. C. C. P. Tempo de permanência do curativo gel de clorexidina no cateter venoso central em paciente crítico. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 21, n. 4, p. 1-8, 2017.

DUARTE, A. V.; PEREIRA, Y. T. G.; ALVES, B. T.; AGUILERA, K. C.; DE ANDRADE, A. M. L. C.; LIMA, R. B. N.; QUIDUTE, R. S. Progressos da nanotecnologia no tratamento tumoral: Uma revisão sistemática. **Revista de Psicologia**, v. 12, n. 40, p. 2, 2018.

ERENO D. Curativo de Borracha**. Revista Pesquisa Fapesp**, número 88, junho de 2003.

FIELD C.; KERSTEIN, M. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**, v. 167, p. 25-65, 1994.

FISCHER, M. R.; GARCIA, M. C. F.; NOGUEIRA, A. L.; PORTO, L. M.; SCHNEIDER, A. L. D. S.; PEZZIN, A. P. T. Biosynthesis and characterization of bacterial nanocellulose for tissue engineering. **Matéria (Rio de Janeiro) 22**, 2017.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.

FU L.; ZHANG Y.;, LI C.; WU Z.; ZHUO Q.: HUANG X.; QIU G.; ZHOU P.; YANG G.; Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. J. **Mater. Chem.**, v. 22, p. 12349-12357, 2012.

GARCIA V. G., LIMA M. A., OKAMOTO T., MILANEZI L. A., GUALBERTO J. E. C., FERNANDES L. A., ALMEIDA J. M., THEODORO L.H. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous thrid-degree-burn: histological study in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 25, p. 221-228, 2010.

GIL, E. S.; PANILAITIS, B.; BELLAS, E.; KAPLAN, D. L. Functionalized silk biomaterials for wound healing. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, p. 206−217, 2013.

GIORDANI, A. T, et al. Complicações em pacientes queimados: revisão integrativa. **Revista Eletrônica Gestão e Saúde**, n. 2, p. 535-548, 2016.

GUSTAFSON, L.; CHEW, M.; BELL, W.; WARMINGTON, H. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 194–198, 1998.

HAEKYUN, P.; CHUL-HO, J.; YONG, B. C.; CHEOL-HEE, C. Antibacterial Effect of Tea-tree Oil on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation of the Tympanostomy Tube: An *In Vitro* Study. **In Vivo**. v. 21, n. 6, p. 1027-1030, 2007.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina (São Paulo).** p. 125-131, 2010.

IURK, L. K.; OLIVEIRA, A. F.; GRAGNANI, A.; FERREIRA, L. M. Evidências no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 3, p. 95-99, 2010.

LALAU, J. D.; BRESSON, R.; CHARPENTIER, P.; COLICHE, V.; ERLHER, S.; HAVAN, G.; MAGALON,G.; MARTINI, J.; MOREAU, Y.; PRADINES, S.; RIGAL, F.; WEMEAU, J. L.; RICHARD, J. L. Efficacy and tolerance of calcium alginate versus vaseline gauze dressings in the treatment of diabetic foot lesions. **Diabetes & Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 223-229, 2002.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M.G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ARAÚJO A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus novergicus* linhagem

Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**. V. 10, p. 1-9, 2014.

MANDELBAUM, S.H; DI SANTIS, E.P; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MAURSTAD, G.; MØRCH, Y. A.; BAUSCH, A. R.; STOKKE, B. T. Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate–chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 672–681, 2008.

MAZZEO, A.; SANTOS, E. J. C. Nanotecnologia e as células progenitoras adultas multipotentes na Medicina Reparativa: perspectivas terapêuticas. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 4, 2018.

MCHUGH, M. P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 13, n. 2, p. 88-97, 2003.

MOLINA, F. P.; MAJEWSKI, M.; PERRELA, F. A.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA J. C.; JORGE, A. O. C. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de Candida albicans. **Ciência Odontológica Brasileira**; v. 11, n. 2, p. 86-93, 2008.

MORAES, P. R. F. de S. Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2013.

MORAES, P. R. F. de S.; SASKA, S.; GASPAR, A. M. M. Análise de curativo a base de membrana de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos. **COLAOB** – **Congresso Latino Americano de Orgãos Artificiais e Biomateriais**, Natal – RN, 2012.

MORESCHI, J. C. Processo para a obtenção de malhas de microfibrilas de celulose bacteriana para usos médicos e veterinários, e malhas de microfibrilas assim obtidas.**RPI,** 1204: 30, 1993.

MOURA, L. I. F.; DIAS, A. M. A.; CARVALHO, E.; DE SOUSA, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment – A review. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7093-7114, 2013.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L. D.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A.; MORGANTI, G. P.; MORGANTI, P.; PALOMBO, M.; PALOMBO, G.; BIAGINI, M. M.; BELMONTE, F.; GIANTOMASSI, F.; ORLANDI, C.; MUZZARELLI, C. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 3, p. 274-284, 2007.

NASCIMENTO, S. C. do; MORAIS, H. C. C. Tecnologia em saúde sobre o tratamento de feridas: Estratégia educativa na monitoria de enfermagem. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica** (EEDIC), v. 3, p. 1, 2017.

NETO, R. G.; GENEVRO, G. M.; MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. Obtenção e caracterização de membranas microestruturadas de quitosana e glocomanana para produção de curativos**. Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 2231-2236, 2015.

NITZ, A. C.; ELY, J. B.; D'ACAMPORA, A. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, B. P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: Coronopu didymus e Calendula officinali. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006.

NOGUEIRA, M. T. Extração e caracterização de alginato de sódio da macroalga Sargassum cymosum C. Agardh. **Dissertação (mestrado)**, UNESP – Universidade Estadual Paulista, 2017.

OLIVEIRA, C. M. B. D., SAKATA, R. K., ISSY, A. M., GEROLA, L. R., & SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas , v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte–MG. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

OLYVEIRA, G. M. de. Nanocompósitos naturais de celulose bacteriana para medicina regenerativa. Universidade Estadual de São Paulo. **Doutorado em Química**. (Tese), 2016.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M.S. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARENTE, L. M. L. Activities angiogenic, anti-inflammatory, antibacterial and healing from the ethanolic extract and fractions of flowers of Calendula officinalis L.

Cultivated in Brazil. **Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)**, Universidade Federal de Goiás, 2008.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

PENFOLD, A. R.; GRANT, R. The germicidal values of some Australian essential oils and their pure constituents: together with those for some essential oil isolates and synthetics. **Government Printer**, 1926.

PENFOLD, A. R.; MORISSON, F. R. Technological Museum (N.S.W.). Australian tea trees of economic value. A. J. Kent, **Government Printer**, Sydney, 1967.

PINHEIRO, L. da S.; BORGES, E. L.; DONOSO, M. T. V. Uso de hidrocolóide e alginato de cálcio no tratamento de lesões cutâneas**. Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 66, n. 5, 2013.

PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJÁ, P. F. Utilização de película de celulose (Biofill) como curativo biológico. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 78, n. 5, p. 317-326, 1988.

RIBEIRO, A. J. A. M.; GOMES, A. C.; CAVACO-PAULO, A. M. Developing scaffolds for tissue engineering using the Ca2+ -induced cold gelation by an experimental design approach. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 100B, p. 2269–2278, 2012.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397–430, 2008.

RODRIGUES, A. P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato 152 para aplicação na terapia de lesões. **Tese (Doutorado).** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

SANTOS, G. P.; FREITAS, N. A.; BASTOS, V. D.; CARVALHO, F. F. Perfil epidemiológico do adulto internado em um centro de referência em tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 16, n. 2, p. 81-6, 2017.

SILVA, C. G. da; CROSSETTI, M. da G. O. Curativos para tratamento de feridas operatórias abdominais: uma revisão sistemática. **Revista gaúcha de enfermagem.** v. 33, n. 3, p. 182-189, 2012.

SILVA, S. H. T. e. Confecção e caracterização físico-química e da atividade antimicrobiana de biofilmes nanocompósitos à base de alginato contendo nanopartículas de ZnO. **Tese (Mestrado em Engenharia Química)**. Universidade Estadual de Campinas, 2017.

SINHA U. K., GALLAGHER L. A. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. **Laryngoscope**, v. 113, p.228-236, 2003.

SOARES, S. M. S., BACHION, M. M., SANTOS, Q. R., NUNES, C. A. B., GOMES S. M.; GUITTON, B. R. B. O. Úlceras venosas: caracterização clínica e tratamento em usuários atendidos em rede ambulatorial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 65, n. 4, 2012.

STEPHEN-HAYNES, J., GIBSON, E., GREENWOOD, M. Chitosan: a natural solution for wound healing. **Journal of Community Nursing**, v. 28, n. 1, p. 48-53, 2014.

TANAKA, R. Y., MONTEIRO, D. D. R., & MENEGON, D. B. O uso de polihexametileno biguanida (PHMB) associada ao curativo de alginato de prata em um paciente com úlceras venosas de membros inferiores durante internação em um hospital universitário. **Semana de Enfermagem (29.: 2018: Porto Alegre, RS). Liderança sustentável e comprometida com o direito humano à saúde: desafios da Enfermagem;[anais][recurso eletrônico].** Porto Alegre: HCPA, UFRGS, Escola de Enfermagem, 251 p., 2018.

VELASQUEZ, W. S., CABANILLAS, F., SALVADOR, P., MCLAUGHLIN, P., FRIDRIK, M., TUCKER, S., SWAN, F. Effective salvage therapy for lymphoma with cisplatin in combination with high-dose Ara-C and dexamethasone (DHAP). **Blood**, v. 71, n. 1, p. 117-122, 1998.

VIEIRA, J. C., BADIN, A. Z. D., CALOMENO, L. H. A., TEIXEIRA, V., OTTOBONI, E., BAILAK, M., SALLES-JÚNIOR, G. Membrana porosa de celulose no tratamento de queimaduras. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n.1, p. 94-97, 2007.

VIEIRA, M. G. F. Aspectos morfológicos e morfométricos de feridas cutâneas em ratos tratadas com extrato hidroalcoólico de ameixa-do-mato (Ximenia americana) a 10%. Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Mestrado em Biociência Animal. (Dissertação),** 2018.

VOLPATO, A. M. de M. Avaliação do potencial antibacteriano de Calendula officinalis (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Doutorado em Química Orgânica. (Tese),** 2005.

WANG, L., KHOR, E., WEE, A., LIM, L. Y. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, p. 610-618, 2002.

WIEGAND, C., HIPLER, U. C. Polymer-based biomaterials as dressings for chronic stagnating wounds. **Macromolecular Symposia**, v. 294-II, p. 1-13, 2010.

WIEGAND, C., SCHÖNFELDER, U., ABEL, M.; RUTH, P., KAATZ, M., HIPLER, U. C. Protease and pro-inflammatory cytokine concentrations are elevated in chronic compared to acute wounds and can be modulated by collagen type I in vitro. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 6, p. 419-428, 2010.

YAGUISHITA, N. Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 2, p. 193-194, 2007.

YAN, X. L.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 58, p. 358-365, 2001

YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I. V. Modern wound dressings: Manufacturing and properties. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 2, p. 85, 2006.

ZHANG, X, XU R, HU X, LUO G, WU J, HE W. A systematic and quantitative method for wound-dressing evaluation. **Burns & Trauma**. v. 3, n. 15, p. 1-8, 2015.

ANEXO 1

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 14 de junho de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **01244 – 1ª versão**

TÍTULO DO PROJETO: *ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE E ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EM DORSO DE RATOS WISTAR*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

JOSÉ ADEMAR VILLANOVA JR.

EQUIPE DE PESQUISA

TAINAH DORADO CEREJA DE SOUZA, LUCIANO JOSÉ EIGIO ISAKA, BRUNO MASSA DE VIVEIROS, JAIR RODINI ENGRACIA FILHO, WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES, FRANCINE CECCON CLARO

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	Junho/2018 a Julho/2018	**QUANTIDADE DE ANIMAIS**	*66*
ESPECIE/LINHAGEM	*Rattus norvegicus*	**Nº SISBIO** (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	**ATIVIDADES** (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	4 – 8 semanas de vida / 300 a 350 gr	**ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS** (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Biotério UFPR	**LOCAL (IS)** (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,
Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO 2

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 475

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

IDENTIFICAÇÃO
ANÁLISE DE CURATIVO DE MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL E ALGINATO DE SÓDIO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EM DORSO DE RATOS WISTAR

PROFESSOR ORIENTADOR
REBECA BACCHI

INSTITUIÇÃO DO PESQUISADOR
Universidade Positivo

ALUNOS ENVOLVIDOS
REBECA BACCHI

OBJETIVO
OBJETIVO GERAL Avaliar a aplicabilidade de membranas de celulose vegetal com alginato de sódio em feridas cutâneas em dorso de ratos wistar, comparar sua ação com a membrana de celulose bacteriana (Membracel®) disponível comercialmente. OBJETIVOS ESPECÍFICOS • Observar o aspecto estrutural microscópico do tecido cicatricial, e qualidade das fibras de colágeno na ferida limpa e contaminada; • Observar se há absorção da membrana no tecido cicatricial; • Observar a reação imunológica local da implantação da membrana no tecido subcutâneo; • Observar as alterações imunológicas e metabólicas renais e hepáticas séricas do emprego da membrana; Observar se há efeito aditivo na redução do tempo de cicatrização ou redução do processo inflamatório/infeccioso pela adição de alginato de sódio à formulação da membrana de celulose vegetal.

SÍNTESE DO PROJETO

UNIVERSIDADE POSITIVO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 475

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

Serão utilizados 66 ratos da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (G1 e G2 já foram utilizados em estudo anterior, aprovado pelo CEUA/PUCPR 01117/2017 e seus resultados serão utilizados no presente trabalho para comparação com G3 e G4):
- G1:controle negativo – será retirado segmento de pele e de subcutâneo de diâmetro de 2,4cm de 36 animais. A cicatrização irá ocorrer por segunda intenção.
- G2: controle positivo - será retirado segmento de pele e de subcutâneo de diâmetro de 2,4cm de 36 animais. A ferida será recoberta com membrana de celulose bacteriana comercial.
- G3: membrana de celulose vegetal e alginato de sódio - será retirado segmento de pele e de subcutâneo de diâmetro de 2,4cm de 42 animais. A ferida será recoberta com membrana de celulose vegetal e alginato de sódio.
A eutanásia em G3 será realizada em nove animais de cada grupo nos dias 4, 7, 11 e 14 para coleta de amostra e avaliação histológica da ferida. A eutanásia será realizada pela overdose de solução anestésica de pentobarbital sódico em dose de 100mg/kg por via intraperitoneal.
- G4: implante subcutâneo de membrana – este grupo será composto por 24 animais divididos em dois subgrupos, nos quais a membrana de celulose vegetal com e sem alginato será implantada no tecido subcutâneo do animal com o intuito de avaliar a reação do organismo a mesma. A eutanásia deste grupo será realizada no décimo primeiro após o implante para observação macroscópica e colheita de amostra sanguínea para análise bioquímica, da mesma forma como citado anteriormente.
Para o procedimento cirúrgico os animais serão anestesiados com cetamina na dose de 65mg/kg e xilazina na dose de 8mg/kg por via IM. A incisão para retirada do segmento de pele e subcutâneo será realizada por meio de molde medindo 2,4cm de diâmetro e será realizada no dorso do animal. Como analgesia os animais receberão tramadol na dose de 12,5mg/kg BID SC por 4 dias. Antibioticoterapia será realizada com enrofloxacina na dose de 10mg/kg SID SC. Em todos os grupos curativo de esparadrapo e faixa não compressiva será realizado após o procedimento cirúrgico.
Todos os animais serão anestesiados com isoflurano em campânulas nos dias 4, 7, 11 e 14 para aferição de medidas morfométricas de cicatrização, verificação de viabilidade da membrana, verificação de complicações e verificação de alterações comportamentais condizentes com dor e estresse. O autor cita ponto final humanitário de acordo com as normativas apresentadas pelo Guia Brasileiro de Produção ou Manutenção de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Concea.

COMENTÁRIOS DO RELATOR
Projeto bem justificado e com relevância científica para a área. Após as adequações este Ceua aprova sua realização.

PARECER
Recomenda a Aprovação