

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

BRUNO MASSA DE VIVEIROS

**RETRAÇÃO CICATRICAL E ATOXIDADE DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE
VEGETAL INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *CALENDULA OFFICINALIS*
EM RATOS**

(Wound contracture and non-toxicity of vegetal nanocellulose films incorporated with
Calendula Officinalis essential oil in rats)

CURITIBA

2018

BRUNO MASSA DE VIVEIROS

**RETRAÇÃO CICATRICAL E ATOXIDADE DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE
VEGETAL INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *CALENDULA OFFICINALIS*
EM RATOS**

(Wound contracture and safety of vegetal nanocellulose films incorporated with *Calendula
Officinalis* essential oil in rats)

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 em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. José Ademar Villanova Jr.

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
DEDICATÓRIA.....	viii
AGRADECIMENTOS.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.2 HISTOLOGIA DA PELE.....	2
1.3 FISIOLOGIA DO PROCESSO CICATRICIAL.....	3
1.3.1 FASE DE HEMOSTASIA.....	4
1.3.2 FASE INFLAMATÓRIA.....	5
1.3.3 FASE PROLIFERATIVA E DE REPARO.....	7
1.3.4 FASE DE REMODELAMENTO.....	8
1.4 FERIDAS CUTÂNEAS.....	8
1.5 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE FERIDAS.....	9
1.6. CURATIVOS PASSIVOS E MEMBRANAS INTERATIVAS/BIOATIVAS.....	10
1.6.1 MEMBRANAS DE CELULOSE.....	12
1.7 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	13
1.8 ALGINATO SÓDICO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
3. HIPÓTESES.....	19

CAPÍTULO 2

RETRAÇÃO CICATRICAL E ATOXIDADE DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE VEGETAL INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALENDULA OFFICINALIS EM RATOS.....20

2.1 INTRODUÇÃO.....20

2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....24

2.2.1. OBTENÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL.....24

2.2.2. IMPREGNAÇÃO COM ÓLEO ESSENCIAL.....26

2.2.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA BACTERIANA *IN VITRO*.....27

2.2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....28

2.2.5 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....29

2.2.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DA RETRAÇÃO CICATRICAL.....30

2.2.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....31

2.2.8 ATOXIDADE AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO.....32

2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA33

2.2.10 MODELAGEM MATEMÁTICA.....33

2.3. RESULTADOS.....34

2.3.1. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA BACTERIANA *IN VITRO*.....34

2.3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DA RETRAÇÃO CICATRICAL.....34

2.3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA.....37

2.3.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....38

2.3.5. SEGURANÇA SISTÊMICA AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO.....41

2.4. DISCUSSÃO.....42

2.5 CONCLUSÃO.....47

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....48

REFERÊNCIAS.....50

ANEXO 1.....64

ANEXO 2.....66

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPITULO 1	
Figura 1.1. Corte histológico das camadas cutâneas.....	3
Figura 1.2. Fases interponentes da cicatrização tecidual	4
Figura 1.3. Ilustração representativa do processo cicatricial inicial.....	6
CAPITULO 2	
Figura 2.1. Moinho Masscoloider Masuko Sangyo.....	25
Figura 2.2. Filtração da suspensão de nanocelulose e do sistema de filtração.....	25
Figura 2.3. Fotomicrografias do filme de nanocelulose de Pinus. Ampliação de 500x (A), e ampliação 10 Kx (B).....	26
Figura 2.4. membrana de celulose vegetal antes e depois de impregnada com <i>casting</i> de calêndula/alginato.....	27
Figura 2.5 –molde de 3 cm de diâmetro e da lesão circular.....	29
Figura 2.6 – Planimetria em programa de imagem IMAGE J 1.51K.....	30
Figura 2.7 – Aplicação da membrana de celulose vegetal com calêndula no espaço subcutâneo.....	33
Figura 2.8. Imagens fotográficas do halo de inibição em cultura de <i>S.aureus</i> (A), do halo de inibição em cultura de <i>E.coli</i> (B).....	34
Figura 2.9. Imagens fotográficas das cicatrizes cutâneas dos grupos em diferentes dias avaliados.....	35
Figura 2.10. Membrana de GMO parcialmente aderida à lesão.....	35
Figura 2.11. Porcentagem da retração cicatricial nos tempos avaliados.....	36
Figura 2.12. Curvas ajustadas para retração da lesão x tempo.....	37
Figura 2.13. Gráfico representativo da análise de resíduos em porcentagem.....	38
Figura 2.14. Corte histológico corado em HE, sob magnificação de 20x aos 4 e 7 dias.....	39
Figura 2.15. Acima: corte histológico corado em tricrômio de Mallory, sob magnificação de 20x aos 4 e 7 dias.....	40
Figura 2.16. Corte histológico corado em HE, sob magnificação de 20x evidenciando a presença de queratinócitos.....	41
Figura 2.17. Imagem de granuloma encapsulando membrana de celulose.....	42

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPITULO 2	
Tabela 2.1. Testes físicos da membrana-base de celulose vegetal.....	26
Tabela 2.2 Número de animais nos grupos experimentais.....	28
Tabela 2.3. Médias das porcentagens de retração das lesões.....	36
Tabela 2.4. Porcentagem de membranas aderidas à ferida de GM e GMO.....	36

LISTA DE ABREVIATÓES

IL-1 α : interleucina um alfa

IL-1 β : interleucina um beta

IL-6: interleucina seis

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TGF- β : fator de crescimento tecidual beta

TGF- α : fator de crescimento tecidual alfa

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

FGF básico: fator de crescimento fibroblástico básico

MEC: matriz extra celular

FDA: agência federal de drogas e alimentos (Estados Unidos da América)

CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo

α -SMA: actina muscular lisa alfa

OE – óleos essenciais

GMO – Grupo membrana de celulose vegetal com óleo essencial de calêndula

GC – Grupo controle

GM – Grupo membrana de celulose bacteriana

ALT – Alanino amonotransferase

FA – Fosfatase Alcalina

Rpm – Rotações por minuto

CTFA - *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

GRAS – substâncias generalizadamente reconhecidas como seguras

ATCC – American Type Culture Collection

UV – Ultra Violeta

Dedico esta dissertação aos animais nela estudados, pois sem eles perguntas jamais teriam respostas. Que o seu sacrifício beneficie o caminho de futuros pesquisadores e pacientes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a todos os animais utilizados nessa pesquisa e os profissionais responsáveis por criá-los e fornecê-los, na pessoa da bioterista Luana da Silva Mazepa, do biotério da UFPR-Curitiba. Ao bioterista Rafael Zotz e funcionários Douglas, José e Antônia, por cuidarem de seu bem-estar durante o experimento no biotério da PUCPR, Campus Curitiba.

À equipe executora desse estudo: os pesquisadores da EMBRAPA-florestas, Prof. Washington Luiz Esteves Magalhães e MSc. Francine Ceccon Claro, pelo desenvolvimento das membranas utilizadas e diversas conversas e dúvidas elucidadas; aos amigos e colegas médicos veterinários MSc. Luciano José Eigio Isaka e M.V. Tainah Dorado por toda ajuda nos diversos procedimentos realizados e parceria indispensável durante o mestrado. Ao meu orientador, Prof. José Ademar Villanova Jr., por guiar os meus passos durante os últimos dois anos, me ensinando e lapidando sempre que possível.

Agradeço também aos profissionais envolvidos na realização deste estudo, os funcionários Misael Gomes Barbosa por todo o auxílio e simpatia durante os procedimentos no laboratório de técnica operatória, Lúcia Retka Renzi, pelo processamento das amostras histopatológicas e frequente auxílio no laboratório, à amiga M.V. MSc. Patologista Iara Brandão pela leitura de lâminas e avaliação histopatológica desse estudo, à M.V. Jéssica Fagundes do Reis pelo processamento de amostras bioquímicas, ao biólogo Seigo Nagashima pela digitalização de lâminas histopatológicas, à Farmacêutica Salete Haluche Paul pelo processamento de materiais utilizados e disponibilização de seu laboratório. Ainda, ao Prof. Saulo Henrique Webber pela execução da análise estatística e modelagem matemática e Profa. Kung Dahr Chi por toda a ajuda, ensinamentos e disponibilização do Laboratório de Microbiologia da Clínica Veterinária Escola (CVE) da PUCPR e ao Prof. Jair Rodini Engracia Filho pela disponibilização do laboratório de Patologia da CVE e auxílio durante o processamento de amostras histopatológicas.

Agradeço imensamente a meus pais, por sempre apoiarem meus estudos, desde os primeiros degraus e me incentivarem sobremaneira a buscar o conhecimento ao longo da minha caminhada.

Acima de tudo, gostaria de agradecer a minha esposa Carolina por todo o apoio nos dias mais difíceis, e pelo carinho e compreensão por todas as horas nas quais não pude estar ao seu lado. Sem você tudo seria mais difícil.

RESUMO GERAL

O retardo cicatricial constitui um desafio clínico e cirúrgico extremamente recorrente, culminando em limitações físicas, sofrimento emocional e maiores custos de tratamento aos sistemas de saúde por todo o mundo. Estudos recentes buscam diferentes materiais que permitam acelerar o processo de reparação tecidual, interagindo com o leito vascular e carreando propriedades terapêuticas, dentre eles a celulose vegetal. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, o estímulo cicatricial e segurança ao emprego de membranas de celulose vegetal acrescidas de óleo essencial de Calêndula em lesões cutâneas de ratos. Uma membrana de celulose vegetal previamente desenvolvida foi revestida por uma solução de calêncula e alginato pelo método *casting*. Após a secagem, discos de 6mm foram cortados e a atividade antiproliferativa contra cepas bacterianas padrão de *S. aureus* e *E. coli* foi determinada pelo método de disco difusão. A retração cicatricial foi avaliada em 117 ratos Wistar machos com idade padronizada, aleatoriamente divididos em três grupos de 36 animais: Grupo GC (controle negativo), Grupo GM (controle positivo com membrana comercial de celulose bacteriana) e GMO (grupo tratamento com membrana de celulose vegetal e calêndula). Cada grupo foi anestesiado e uma lesão cutânea padrão de 3 cm de diâmetro foi criada cirurgicamente no dorso dos animais, que foram acompanhados durante 14 dias, durante os quais foram novamente anestesiados para a tomada de fotografias para planimetria da lesão pelo software *Image J* aos 4, 7, 11 e 14 dias e determinação da retração de 50% da ferida pelo método de modelagem matemática. Nas mesmas datas, nove animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para a coleta de amostras histopatológicas e avaliação por escores, sob coloração de HE dos graus de inflamação, reepitelização e Tricrômio de Mallory para neovascularização e deposição de colágeno. A biossegurança ao seu emprego foi avaliada pelo implante de discos de 6mm no tecido subcutâneo de nove animais, acompanhados durante 15 dias, quando foram submetidos à eutanásia para coleta de amostra histopatológica e sérica. Os resultados demonstraram halo de inibição de $8,03 \pm 0,13$ mm e $8,70 \pm 0,7$ mm para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A retração cicatricial de GMO foi estatisticamente maior aos quatro dias com $49.87 \pm 4.73\%$ com $p < 0,05$, atingindo 50% de retração aos 4.46 dias, não havendo diferença entre grupos nos demais dias. Não houve diferença estatística entre os escores histopatológicos ou observadas alterações séricas ao implante subcutâneo. A membrana de celulose vegetal acrescida de calêndula demonstrou potencial uso terapêutico, segurança ao seu implante e promoveu aceleração cicatricial até quatro dias, sugerindo a sua reposição após essa data. A atividade antiproliferativa *in vitro* foi observada, sugerindo futuros ensaios em feridas contaminadas.

Palavras-chave: Cicatrização, Óleos Essenciais, Biotecnologia, Curativos Hidrocolóides, Antibacteriano.

ABSTRACT

Recent studies have searched for different materials that could accelerate the repairing process, interacting with wound milieu and hauling therapeutic cargo, among them vegetal cellulose membrane. The present study evaluated the antiproliferative activity, wound contracture and safety at use of a vegetal nanocellulose dressing, with the addition of calendule essential oil, on a skin wound model in rats. A previously developed cellulose film was coated by a dry casting solution of the volatile oil and sodium alginate. Antiproliferative action was determined against standard bacterial strains by disk-diffusion method. Full thickness, 3 cm in diameter, circular wounds were produced at the dorsum of 108 rats. Wound contraction was determined by digital planimetry at 4, 7, 11 and 14 days comparing three randomly divided groups: CG (negative control group), BC (positive control group, commercial bacterial cellulose film) and VCE (vegetal cellulose and essential oil film). Histological samples were obtained and HE and Mallory stained sections were evaluated to obtain inflammatory, reepithelization, amount of collagen fibers and neoangiogenesis scores. Atotoxicity was evaluated through the subcutaneous implant of VCE. Serum biochemistry and histological samples were collected after 15 days, and possible adverse reactions observed all through. Results showed bacterial growth inhibition, better wound contraction of VCE at 4 days and no serum changes, nor adversal effects. The VCE films demonstrated potential wound therapeutic use and safety, suggesting bacterial prevention and avoidance of daily dressing changes.

Keywords: Wound Healing, Essential Oils, Biotechnology, Hydrocolloid Dressings, Anti-Bacterial Agents.

CAPITULO 1

1.1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

A pele é o maior e mais exposto órgão do corpo, e conseqüentemente sua parte mais lesada. Ela constitui uma interface contínua entre o meio externo e o organismo, protegendo-o contra estímulos nocivos e perdas volêmicas, além de exercer uma variedade de funções essenciais bioquímicas, imunológicas, de proteção mecânica e adaptativas (Sood et al., 2014, Lin et al., 2018).

A estrutura da pele é formada por três camadas em ordem de profundidade: epiderme queratinizada em camadas, com o extrato córneo superficial à epiderme nucleada de quatro camadas; a derme, um tecido conjuntivo rico em colágeno de onde originam-se a maioria dos apêndices cutâneos; e a hipoderme, rica em vasos sanguíneos e tecido adiposo (Proksch et al., 2008, Borena et al., 2015).

Quando este órgão é ferido, o tecido conjuntivo fica exposto, deflagrando uma complexa série de eventos celulares e bioquímicos necessários para restaurar sua integridade como barreira, fenômeno denominado cicatrização (Irion, 2005; Thakare, 2011). Porém, em situações onde as etapas cicatriciais não operam adequadamente, seja por influência de fatores externos como presença de patógenos ou intrínsecos ao hospedeiro, o tratamento de feridas se torna imperativo para acelerar a reparação, o que evita distúrbios mais graves e melhora a qualidade de vida de pacientes (Andreau et al., 2015).

A importância do tratamento de feridas é reconhecida desde o Egito antigo, onde a limpeza de leito e aproximação das bordas eram realizadas, bem como a utilização de unguentos com mel e óleos que visam acelerar o processo cicatricial (Sispos et al., 2004).

Na sociedade moderna, a fisiologia da cicatrização bem como o uso de curativos em feridas, continuam sendo alvo de pesquisas dadas as importâncias econômica e social, tendo em vista que complicações relacionadas às feridas constituem elevado custo para sistemas de saúde e bem-estar emocional de pacientes em todo o mundo (Andreau et al., 2015).

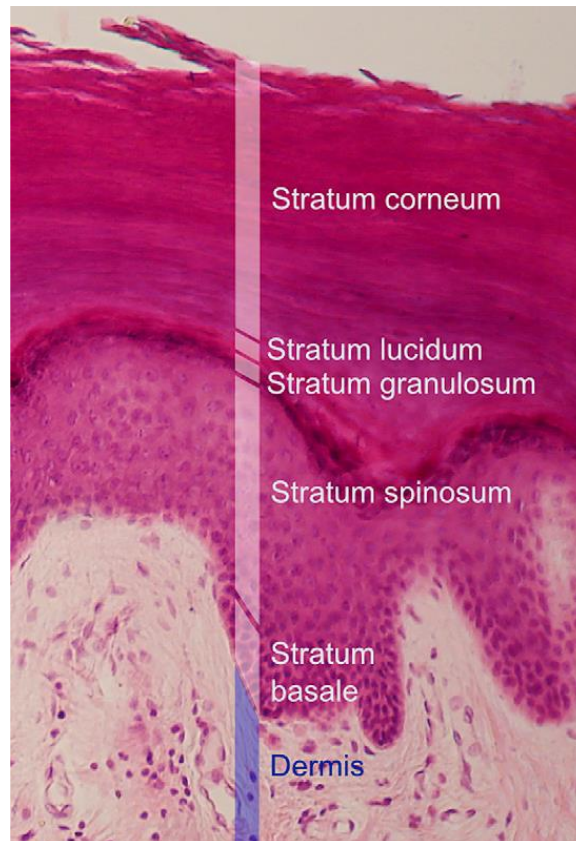
1.2 HISTOLOGIA DA PELE

Para o entendimento da fisiologia envolvida no processo cicatricial é importante que se conheça os estratos e células que compõe esse tecido. A estrutura da pele é separada em epiderme, derme e hipoderme (Reinke e Sorg et al., 2012).

A epiderme é composta 95% por queratinócitos, células nucleadas nutridas por difusão através da camada dermal. Os queratinócitos são responsáveis pela resposta epidermal primária a lesões e são originados por diferenciação a partir de células-tronco das unidades pilosebáceas e cristas epidermais na camada mais profunda da epiderme, área denominada de extrato basal (Gantwerker e Hom, 2011). Essas células-tronco são vitais para o processo cicatricial por apresentarem relativa indiferenciação, potencial proliferativo e de autorrenovação (Larouche et al., 2004). À medida que se replicam, os queratinócitos deslocam as células mais velhas para a superfície, passando pelos estratos espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, à medida que perdem progressivamente seu núcleo, assumem formato mais achatado até que descamam, sendo substituídas totalmente a cada 48 dias (Gantwerker e Hom, 2011). O extrato basal produz ainda interdigitações celulares que se intercalam com as camadas da derme, formando a crista epidermal, uma estrutura que aumenta a resistência mecânica, e normalmente é ausente em feridas de cicatrização recente, o que as torna mais sensíveis a traumas nessa fase.

Logo abaixo localiza-se a derme, camada responsável por abrigar a maior parte dos apêndices dermais (glândulas apócrinas e folículos pilosos) e vasos da microcirculação incluindo capilares sanguíneos da pele. É composta por derme superficial ou papilar e profunda ou reticular (Figura 1.1). Em geral lesões que atinjam essa camada provocam a formação de cicatrizes (Gantwerker e Hom, 2011).

Por último, localiza-se a hipoderme, camada composta por vasos sanguíneos de maior calibre e tecido adiposo (Gantwerker e Hom, 2011).



1
2
3
4
5
6
7
8
9

Figura 1.1. Corte histológico das camadas cutâneas. Da profunda à superficial: derme; estrato epidermal basal, interdigitando a crista epidermal, os estratos espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, a medida que se observa o achatamento celular dos queratinócitos e há perda de núcleo.

Fonte: Cortesia de Mikael Haggstrom, Uppsala, Suécia, baseado no trabalho de Wbensmith; sob a licença de livre documentação GNU. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Epidermal_layers.png.

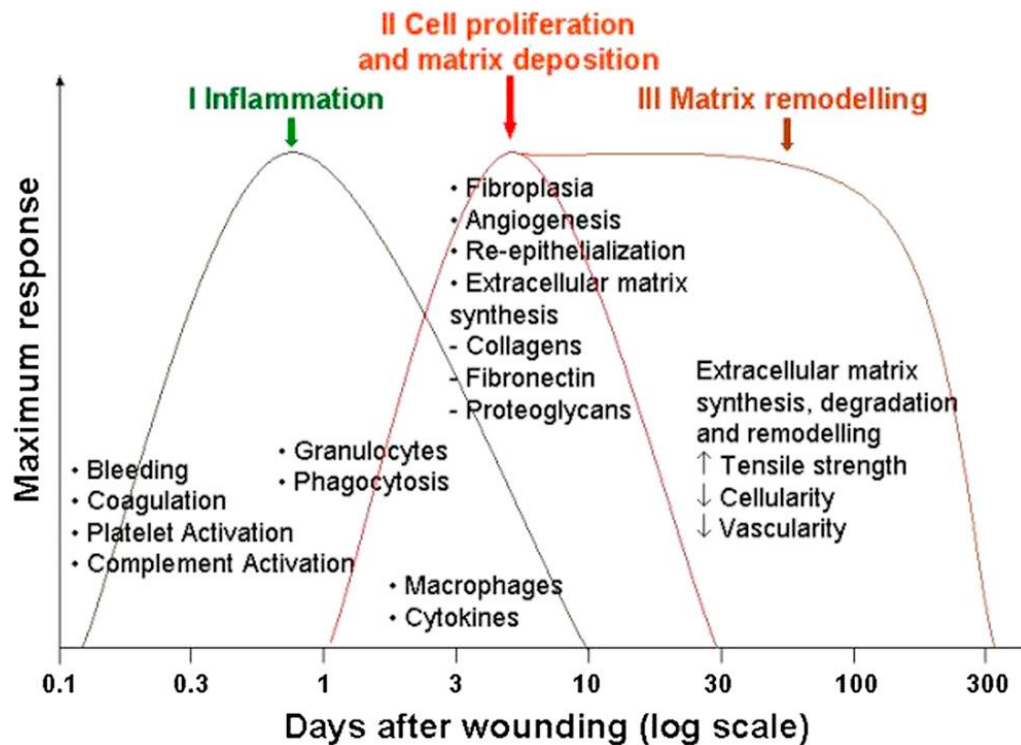
10 1.3 FISILOGIA DO PROCESSO CICATRICIAL

11 O fechamento da epiderme superficial ou mucosas ocorre por
12 regeneração, descrita pela substituição específica dos tecidos, já a derme
13 apresenta a cura por reparo, uma forma inespecífica de cicatrização através do
14 preenchimento da lesão por tecido fibrótico e a formação de cicatrizes, sendo a
15 forma predominante em tecido cutâneo adulto (Eming e Krieg et al., 2007).

16 O processo de cicatrização cutânea inicia-se imediatamente após a
17 perda de continuidade do tecido e pode ser dividido para melhor entendimento
18 em quatro fases, que na realidade se sobrepõe em tempo e região como
19 observado na Figura 1.2 (Epstein, 1999) e pode, inclusive, ocorrer em
20 diferentes fases, e em diferentes regiões de uma mesma lesão. Como uma
21 cascata de fatores que desencadeiam sucessivamente, interrupções desse
22 processo, podem perturbar as fases subsequentes, levando a atrasos na

1 cicatrização e até mesmo a formação de feridas crônicas ou cicatrizes. A
2 cicatrização cutânea é composta pelas fases: de hemostasia, inflamatória,
3 proliferativa/reparo e de remodelamento (Enoch e Leaper, 2005).

4



5

6 Figura 1.2. Fases interpostas da cicatrização tecidual ao longo do tempo em dias e os vários
7 processos que ocorrem em cada fase. I-inflamação, II-proliferativa e III-Remodelamento. A fase
8 de coagulação localiza-se no início da curva inflamatória.

9 Fonte: From Enoch S, Price P. Worldwide Wounds. Disponível em:

10 <http://www.worldwidewounds.com/2004/august/Enoch/Pathophysiology-Of-Healing.html>.)

11

12 1.3.1 FASE DE HEMOSTASIA

13 A primeira fase do processo cicatricial inicia-se de segundos a minutos
14 após o insulto inicial, completando-se após algumas horas. Ao atingir a camada
15 dérmica, vasos sanguíneos e linfáticos são rompidos debridando a região
16 traumatizada para a remoção de antígenos e microorganismos (Strodtbeck,
17 2001). Esta fase também é chamada de “fase-lag”, na qual o organismo recruta
18 células e fatores necessários à cicatrização e por isso a ferida ainda imatura
19 encontra-se sem resistência mecânica (Robson et al., 2001).

20 A hemorragia inicial expõe plaquetas aos receptores de colágeno do
21 subendotélio vascular trombogênico, ativando-as (sistema intrínseco) e
22 promovendo sua agregação e formação de coágulo inicial, juntamente com os
23 fatores de coagulação liberados pelo tecido lesado (sistema extrínseco)

1 (Gantwerker e Hom, 2011; Reinke e Sorg, 2012). Além da hemostasia primária,
2 as plaquetas ativadas liberam serotonina e catecolaminas que promovem a
3 vasoconstrição periférica reduzindo a perda sanguínea (Gantwerker e Hom,
4 2011).

5 Na sequência, ocorre uma vasodilatação e o coágulo formado preenche
6 o espaço ocasionado pela lesão, composto por fibrina, fibronectina, citocinas
7 compondo uma estrutura provisória para a infiltração celular (Robson et al.,
8 2001; Reinke e Sorg, 2012). A vasodilatação permite a agregação de
9 leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais à matriz formada
10 (Martin, 1997; Reinke e Sorg, 2012), além de servir como reservatório de
11 fatores de crescimento e citocinas liberados pelas plaquetas e leucócitos (IL-
12 1α , IL- 1β , IL-6 and TNF- α) que, por sua vez, atraem células inflamatórias,
13 predominantemente neutrófilos e macrófagos (Figura 1.3), dando sequência a
14 próxima fase do processo cicatricial (Gantwerker e Hom, 2011).

15

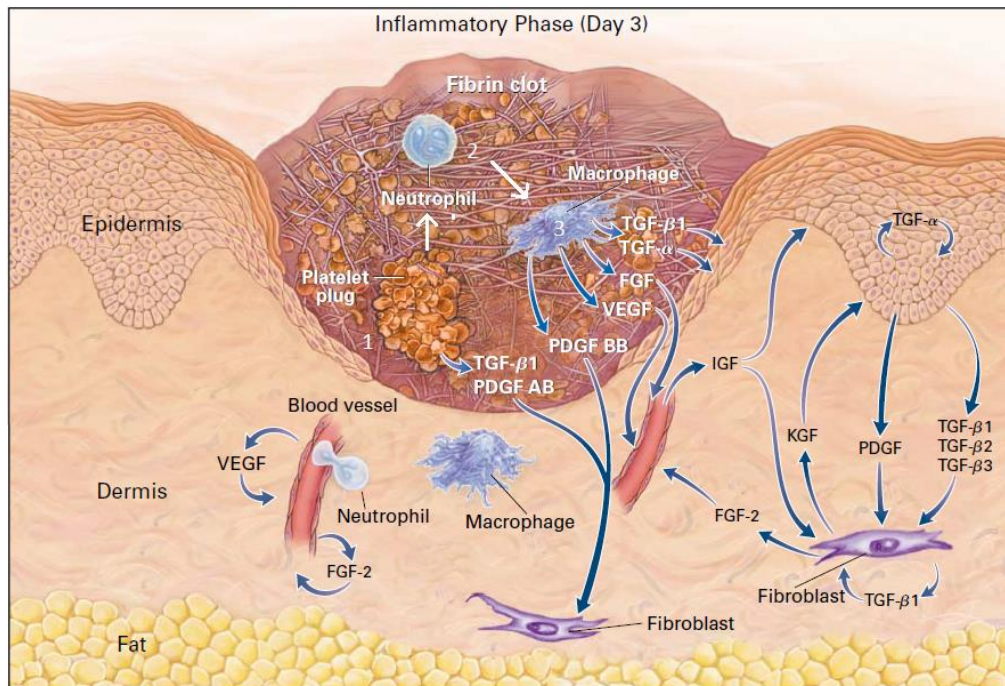
16 **1.3.2 FASE INFLAMATÓRIA**

17 Esta etapa é marcada pelo recrutamento de leucócitos para o sítio da
18 lesão e pode ser dividida simplificada em fases inicial e tardia
19 (Gantwerker e Hom, 2011).

20 Os neutrófilos são as primeiras células a aportar massivamente o local
21 lesionado durante as primeiras 24 horas. Atraídos pela degranulação
22 trombocitária e produtos da degradação bacteriana (Gantwerker e Hom, 2011;
23 Reinke e Sorg, 2012), permanecem por dois a cinco 2-5 dias, podendo se
24 estender por mais tempo em feridas infectadas. Sua função é iniciar a limpeza
25 da ferida ao secretar proteinases para degradar o tecido necrótico (elastase,
26 catépsina G, proteinase 3) e destruir bactérias por fagocitose e secreção de
27 antimicrobianos (peptídeos catiônicos e eicosanóides), além de atuar como
28 quimioatrativos para outras células inflamatórias, iniciando a fase tardia (Eming
29 et al., 2007). Dessa maneira, é uma fase muito importante para o combate de
30 infecções (Robson, 2003).

31 Atraídos por produtos da apoptose dos neutrófilos, macrófagos infiltram
32 o sítio de lesão aproximadamente três dias após injúria, auxiliando o processo
33 inflamatório instalado ao fagocitarem patógenos e restos celulares provenientes

1 de células apoptóticas (Tziotzios et al., 2012; Profyris et al., 2012),
2 permanecendo até a conclusão da fase inflamatória tardia, conforme a Figura
3 1.3.



4
5 Figura 1.3. Ilustração representativa do processo cicatricial inicial. 1- Agregação plaquetária
6 ativada pela exposição ao subendotélio e fatores de coagulação liberados pelo tecido lesado.
7 2-Plaquetas liberam citocinas e fatores de crescimento atraindo neutrófilos (fase inflamatória
8 inicial). 3- Produtos de apoptose dos neutrófilos atraem os macrófagos (fase inflamatória
9 tardia).

10 Fonte: Singer et al., 1999.

11

12 Além de sua função na limpeza da lesão e defesa do hospedeiro durante
13 a regeneração tecidual, os macrófagos são células chave ligadas à
14 reepitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese e contração da
15 ferida (Rodero e Khosrotehrani, 2010). Ao sintetizarem fatores de crescimento
16 como TGF- β , TGF- α , VEGF, PDGF e FGF básico, promovem a proliferação
17 celular e síntese de matriz extracelular pelas células residentes (DiPietro e
18 Polverini, 1993). Esses fatores de crescimento e citocinas mantêm, portanto, o
19 processo cicatricial inalterado, ativando a movimentação celular e tecidual
20 necessárias para as fases proliferativa e de reparo subsequentes (Gurtner et
21 al., 2008).

22 A inflamação é, portanto, uma etapa necessária à cicatrização e sua
23 inibição (por exemplo: através de anti-inflamatórios) pode acarretar em reparo
24 inadequado. Sua interrupção ou prolongamento pode produzir ferida crônica e

1 eventualmente formação de cicatrizes com maior tempo para a retração da
2 lesão. Fatores que aumentam essa fase incluem obesidade ou má nutrição,
3 carga bacteriana aumentada, trauma repetido, corpo estranho persistente,
4 movimentação de bordas e sítio da lesão (Thomas, 1997; Hom e Odland,
5 2000).

6

7 **1.3.3 FASE PROLIFERATIVA E DE REPARO**

8 Entre três e 10 dias, o foco do processo cicatricial se torna cobrir a
9 superfície da ferida, a restituição da trama vascular e a formação de granulação
10 (Reinke e Sorg, 2012).

11 A reepitelização inicia-se com células-tronco localizadas nas glândulas
12 apócrinas e folículos pilosos que diferenciam-se em queratinócitos,
13 repopulando o extrato basal e migrando às bordas da lesão junto dos
14 queratinócitos locais. Ao encontrarem a matriz extracelular (MEC) colágena,
15 fixam-se à borda interna da ferida. Lá, formam um assoalho sobre o qual se
16 depositará uma nova camada de queratinócitos, preenchendo defeitos e
17 digerindo a MEC através de proteases até que o contato com outro
18 queratinócito sinalize o fim da migração e digestão (Pilcher et al., 1999). Essa
19 película protege a ferida de infecção e a mantém úmida com exsudato
20 contendo fatores de crescimento, sendo que curativos inadequados nessa fase
21 podem destruir essa camada e atrasar a cicatrização.

22 Abaixo da nova camada epitelial, a MEC continua a ser depositada,
23 sendo, em feridas cicatrizadas por segunda intenção, formada por tecido de
24 granulação. Inicialmente, fibroblastos locais migram à rede de fibrina formada
25 na fase de hemostasia, onde mediados por citocinas como o TGF- β sintetizam
26 colágeno imaturo tipo III, fibronectina e outras substâncias que preenchem as
27 lacunas da lesão, aumentando a força mecânica da ferida (Reinke e Sorg, 2012
28 *apud* Madden e Peacock, 1971).

29 Sob a influência de VEGF e outros fatores de crescimento, a
30 neovascularização/angiogênese inicia por “brotamento” a partir das células
31 endoteliais de vasos sanguíneos periféricos à lesão, com o objetivo de
32 restaurar a perfusão. Essas células endoteliais ativadas por VEGF secretam
33 enzimas proteolíticas que dissolvem a lâmina basal, se desprendendo e

1 migrando ao sítio da lesão, orientadas por adesinas superficiais, se proliferando
2 e formando pequenas estruturas tubulares, os “brotos vasculares”, que se
3 interconectam e futuramente se diferenciam em vênulas e arteríolas (Sorg et
4 al., 2007). A angiogênese é bastante acelerada em feridas cicatrizadas por
5 primeira intenção, devido à aproximação desses brotos (Gantwerker, Hom,
6 2011).

7 Os fibroblastos, colágeno tipo III e neovasos formam o tecido de
8 granulação (Robson MC, 2003) com típica coloração vermelha devido à
9 angiogênese incompleta e fragilidade pela trama desorganizada de colágeno
10 (Reinke e Sorg, 2012). Ao final dessa fase, o número de fibroblastos é reduzido
11 por diferenciação em miofibroblastos e apoptose (Hinz, 2007).

12

13 **1.3.4 FASE DE REMODELAMENTO**

14 A última fase da cicatrização ocorre a partir dos 21 dias e pode durar até
15 um ano após a lesão, no ser humano. Inicia-se ainda durante a fase
16 proliferativa à medida que a MEC provisória e o colágeno tipo III são
17 substituídos por colágeno tipo I e as células remanescentes sofrem apoptose
18 (Gantwerker e Hom, 2011). Conforme o colágeno tipo I é depositado, a
19 elasticidade da ferida aumenta drasticamente, devido à sua disposição em
20 feixe de fibras paralelas. Devido à substituição do tecido granulomatoso
21 vascularizado e a redução da angiogênese, a ferida nessa fase perde sua
22 coloração avermelhada, tornando-se mais pálida e avascular (Greenhalgh,
23 1998). Finalmente, os miofibroblastos promovem a contração da cicatriz
24 através de suas múltiplas ligações com o colágeno e reduzem sua superfície.
25 Certos componentes subepidermais como folículos pilosos e glândulas
26 sudoríparas não se recuperarão após o fechamento da lesão (Tziotzios et al.,
27 2012; Profyris et al., 2012).

28

29 **1.4 FERIDAS CUTÂNEAS**

30 Feridas são definidas como uma interrupção ou defeito na continuidade
31 celular e integridade anatômica, com conseqüente perda de sua estrutura
32 funcional por lesão física, térmica, infecciosa ou imunológica à pele (Percival
33 NJ, 2002, Shah et al 2017). A cicatrização adequada é alcançada pela ativação

1 e infiltração de células inflamatórias, macrófagos e neutrófilos, produção de
2 citocinas pró-inflamatórias e consequente migração de fibroblastos ao sítio da
3 lesão (Portou et al., 2015), No entanto, esse processo pode ser prejudicado
4 pelo envelhecimento, e anormalidades metabólicas como hipertensão venosa,
5 obesidade ou *diabetes melitus* (Guo et al., 2010, Chhabra et al., 2016).

6 Independente de sua etiologia, a dissolução da continuidade do tecido
7 resulta em interrupção do fluxo sanguíneo, alteração na sensibilidade, acúmulo
8 de debris celulares e diferentes graus de contaminação (Magalhães et al.,
9 2008). Feridas cutâneas normalmente afetam apenas derme e epiderme, no
10 entanto, feridas profundas ou que se tornam profundas podem atingir
11 hipoderme, fáscia, tendões, ossos e vísceras, normalmente definidas como
12 úlceras (Crovetti et al., 2004).

13

14 **1.5 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE FERIDAS**

15 Em termos gerais, feridas podem ser classificadas como agudas,
16 comumente produzidas por trauma penetrante e que reparam anatômica e
17 fisiologicamente o tecido cutâneo no tempo esperado, tendo a inflamação papel
18 crucial na mobilização celular (Nicks et al., 2010), ou crônicas, onde a
19 restauração da estrutura e função da pele não é atingida com sucesso (Sen et
20 al., 2009), estacionando em uma das fases de cicatrização, normalmente a
21 inflamatória (Dabiri et al., 2014) Feridas crônicas podem ainda evoluir
22 progressivamente para os tecidos subjacentes, principalmente em pacientes
23 cuja hospitalização é prolongada e a mobilidade reduzida, tornando-se úlceras
24 dolorosas e predispostas a infecções, osteomielite, septicemia e até mesmo
25 óbito (Posnett et al., 2009).

26 O processo de cicatrização de feridas pode também ser classificado
27 segundo suas margens em três tipos - cura por primeira intenção, cura por
28 segunda intenção ou cura por terceira intenção. Em feridas cicatrizadas pela
29 primeira intenção, as margens são bem fechadas e a cicatriz remanescente é
30 mínima ou nenhuma. Por outro lado, a cicatrização de feridas por segunda
31 intenção envolve a formação de tecido de granulação, que preenche os
32 espaços entre as margens da ferida e está associada a uma perda significativa
33 de tecido, deixando pequenas cicatrizes. Feridas curadas por terceira intenção

1 são geralmente as que estão abertas durante três a cinco dias, normalmente
2 resultando na formação de uma cicatriz extensa (Thakare, 2011).

3 Grandes feridas da parede corpórea constituem desafio clínico e
4 cirúrgico, podendo culminar com complicações e limitações físicas. Essas
5 feridas caracterizam-se pela impossibilidade de seu fechamento primário, por
6 meio da tração de suas bordas. Elas são decorrentes de traumas,
7 queimaduras, neoplasias, úlceras por pressão, infecções, vasculopatias,
8 fraturas abertas, laparostomias, dentre outros e seu tamanho varia nas
9 diferentes regiões do corpo (Yaguishita, 2007).

10 Apesar da maioria das feridas cicatrizarem sem infecção, deiscência ou
11 outra anormalidade, aumentam a morbimortalidade e os custos de tratamento,
12 além de acarretarem dor e danos estéticos e funcionais permanentes (Mezadri
13 et al., 2009). Danos cutâneos podem ainda expor o organismo a fatores de
14 risco, como microrganismos patogênicos e causarem graves desequilíbrios
15 homeostáticos (Lauto et al., 2010).

16 Nas últimas décadas, o aumento da longevidade humana,
17 principalmente em países desenvolvidos, também acarretou em aumento na
18 casuística de feridas crônicas (Kim et al., 2015).

19 Os gastos com complicações relacionadas a feridas incluem tratamentos
20 longos e intensivos, requerindo maior pessoal, intervenções cirúrgicas e maior
21 tempo de internação nos leitos hospitalares (Posnett et al., 2009). Por exemplo,
22 estima-se que o mercado norte americano de manejo de feridas movimentou o
23 valor de 3,1 bilhões em 2012 e que deverá atingir 4.4 bilhões de dólares até
24 2019 (Dabiri 2014).

25 Apesar de frequentemente investigada, a abordagem da cicatrização de
26 feridas continua a desafiar os pesquisadores (Andrade et al., 2014) buscando
27 formas mais eficazes de promover uma cicatrização mais rápida, o que
28 reduziria substancialmente os gastos médicos e, sobretudo, melhoraria a
29 qualidade de vida de pacientes e familiares (Andreau et al., 2015).

30

31 **1.6. CURATIVOS PASSIVOS E MEMBRANAS INTERATIVAS/BIOATIVAS**

32 Por muitos anos, o objetivo do emprego de curativos passivos,
33 denominados dessa forma por meramente cobrir o leito da ferida, era formar

1 uma barreira à colonização bacteriana e manter a ferida seca. No entanto, a
2 impermeabilidade ao vapor pode resultar em umidade excessiva e maceração
3 ao redor da ferida, requerindo trocas frequentes (Sussman e Weller, 2006; Xu
4 et al., 2016).

5 Atualmente, o alvo das pesquisas em tratamento de feridas deve ser
6 identificar os fatores etiológicos de atraso ou impedimento da fisiologia
7 cicatricial, aplicando um curativo com características que controlem o estado
8 bioquímico e otimizem o processo de cura (Stojadinovic A et al., 2008, Dabiri G
9 et al 2014, Mir et al., 2018).

10 Para a progressão adequada da cicatrização de feridas complexas, são
11 indispensáveis o desbridamento do tecido desvitalizado, a presença de pouco
12 ou nenhum tecido necrótico, a manutenção da atividade endógena
13 antimicrobiana e proteolítica, além do controle da inflamação e exsudato
14 excessivos, para manutenção de um ambiente ótimo para os processos
15 fisiológicos (Strohal et al., 2013).

16 Para tanto, curativos ou membranas interativas têm sido desenvolvidos
17 no emergente campo da engenharia de tecidos. Sua denominação provém da
18 capacidade de modificar a fisiologia do leito da ferida e interagir com sua
19 superfície, por exemplo, promovendo a granulação e re-epitelização ou
20 reduzindo o exsudato graças à sua permeabilidade ao vapor de água e
21 oxigênio (Weller, 2009; Mayet et al., 2014; Sharma et al., 2014).

22 Uma membrana interativa ideal deve possuir propriedades como
23 proteção mecânica do leito; proteção à colonização bacteriana; manutenção da
24 umidade e hidratação; porosidade adequada promovendo angiogênese;
25 permeabilidade à passagem de gases; propriedade bactericida; absorção de
26 exsudação e sangue no leito da ferida; favorecer a multiplicação e proliferação
27 celular; reduzir a resposta inflamatória excessiva; boa degradabilidade e boa
28 biocompatibilidade com o hospedeiro; atoxicidade; fácil aplicação; baixa
29 aderência e fácil remoção; longa vida útil e baixo custo de produção (Seaman,
30 2002; Boateng et al., 2008; Jhong et al., 2014; Mayet et al., 2014).

31 O requisito básico para a utilização de um material é a
32 biocompatibilidade, que se refere a um polímero biodegradável que com o
33 tempo seja substituído por tecidos recém-regenerados (Kanani et al., 2010).

1 Colágeno, gelatinas, quitosana e alginatos são exemplos de membranas
2 interativas com propriedades similares aos tecidos dos mamíferos (Rajwade et
3 al., 2015).

4 Apesar dos esforços nos últimos anos, nenhuma membrana artificial foi
5 capaz de combinar todas as características previamente citadas (Andreau et
6 al., 2015). Neste contexto, a triagem de outros materiais mantém sua
7 importância (Lauto et al., 2010; Cherian et al., 2011; Andrade et al., 2014).

8

9 **1.6.1 MEMBRANAS DE CELULOSE**

10 Em relação às membranas biológicas, a celulose destaca-se por ser o
11 polímero mais abundante do planeta. Em 1886, o cientista Brown foi o primeiro
12 a produzir celulose a partir de processos fermentativos da bactéria *Acetobacter*
13 *xylinum* (Brown, 1886) e, atualmente, trata-se da fonte de celulose mais
14 amplamente utilizada para a produção de membranas curativas (Sulaeva et al.,
15 2015). Esta celulose bacteriana apresenta características favoráveis como seu
16 arranjo de fibras e porosidade, resistência mecânica, espessura fina, pureza e
17 cristalinidade superiores a celulose vegetal (Ul-Islam et al., 2012) e tem sido
18 empregada no manejo de feridas desde a década de 80 (Pitanguy et al., 1988).

19 No entanto, o elevado tempo de produção e alto custo das membranas
20 de celulose bacteriana levou à necessidade de novos estudos utilizando
21 membranas produzidas a partir de outras fontes de celulose, como as vegetais
22 (Singla et al., 2017).

23 A celulose vegetal pode ser amplamente encontrada não só no plantio
24 florestal, mas também em grande quantidade nos resíduos da produção de
25 diversos materiais, o que normalmente representa um problema na
26 agroindústria (Hoenich, 2006).

27 Em comparação com a membrana de celulose bacteriana, a membrana
28 de celulose vegetal possui baixo custo de produção, alta disponibilidade, rápido
29 isolamento, boas propriedades mecânicas, térmicas, elétricas,
30 biocompatibilidade e biodegradabilidade. Membranas sintetizadas a partir de
31 celulose vegetal tem apresentado sucesso no auxílio da cicatrização de feridas,
32 como o demonstrado por Cherian et al. (2011) e Singla et al. (2017).

1 Comparada a outros polímeros biodegradáveis como o colágeno,
2 quitosana e gelatina, a celulose vegetal apresenta propriedades mecânicas
3 superiores. Devido sua moldabilidade, a celulose vegetal também é utilizada
4 para compor tecidos cardiovasculares artificiais e em neurocirurgia. Essa
5 película, após o processamento, é dotada de permeabilidade seletiva,
6 possibilitando a passagem de vapor d'água, mas impedindo a passagem de
7 microrganismos (Cherian et al., 2011).

8 Mesmo com o uso de curativos acima citados, muitas feridas podem
9 ainda persistir. Em feridas complexas, abertas por longo período, como úlceras
10 traumáticas, feridas térmicas ou feridas crônicas, a inflamação excessiva
11 promove um ambiente úmido, quente e nutritivo, ideal para a colonização e
12 crescimento microbiano, interferindo com o processo cicatricial, aumentando a
13 resposta inflamatória e morbidade do hospedeiro (Gallant-Behm et al., 2005;
14 WUWHS, 2008; Leaper et al., 2012, Norman et al., 2016).

15 Nesses casos, membranas bioativas são estudadas para transportar
16 substâncias de uso tópico como antissépticos e antiinflamatórios, a fim de
17 alterar o ambiente da lesão, estimulando a cascata cicatricial (Sharma et al.,
18 2014; Zahedi et al., 2010).

19 Pela possibilidade de indução de resistência bacteriana, o uso de
20 antibióticos tópicos no tratamento de feridas deixou de ser recomendado pela
21 Academia Americana de Dermatologia, e antissépticos tópicos como a
22 clorexidina e iodo-povidona podem apresentar efeito citotóxico aos
23 queratinócitos, interferindo negativamente na regeneração tecidual (Totoraitis
24 et al., 2017).

25 Desta forma, a pesquisa de outros antissépticos com pouca ou nenhuma
26 citotoxicidade permitiria a redução do processo inflamatório sem a destruição
27 de queratinócitos, sendo de extrema valia em cicatrização, principalmente por
28 2ª intenção, ao proteger o leito de infecções sem influenciar negativamente a
29 cascata cicatricial (Norman et al., 2016)

30 31 **1.7 ÓLEOS ESSENCIAIS**

32 Óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis extraídos de
33 plantas, cuja composição química depende da sazonalidade climática,

1 condições geográficas e das técnicas de destilação empregadas com a
2 utilização de diferentes solventes, através da compressão de frutos, folhas ou
3 raízes. Geralmente são altamente complexos, formados, às vezes, por mais de
4 uma centena de componentes químicos (Olajuyigbe e Ashafa, 2014).

5 Óleos como os de Melalêuca (*Melaleuca alternifolia*) e Babosa (*Aloe*
6 *vera*) são empregados desde a antiguidade no tratamento de feridas e
7 inflamações (Gazim et al., 2008) e atualmente utilizados em pesquisas, como
8 na produção de fibras curativas pela técnica de eletro-rotação (Rahman et al.,
9 2017). Entre eles, encontra-se o óleo da flor de Calêndula (*Calendula*
10 *officinalis*), uma planta da família Asteraceae, de crescimento anual e coloração
11 floral entre o amarelo e o laranja, encontrada amplamente na região do
12 Mediterrâneo.

13 Cultivada como alimento e para uso medicinal desde a Idade Média
14 como anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante, antiespasmódico, antiviral,
15 dentre outros, atualmente, seu uso é aprovado pela agência americana de
16 alimentos e drogas (FDA) como uma substância segura da lista GRAS
17 (substância generalizadamente reconhecida como segura) (Gazim et al., 2008).

18 A rica composição química de substâncias dessa planta biologicamente
19 ativas inclui flavonóides, ácido oleanóico, saponinas, mono, di e triterpenos,
20 carotenóides, glicosídeos e esteróis (Chakraborty, 2008; Abdullabekova et al.,
21 2014). O conteúdo total de flavonóides dessa planta depende da espécie e da
22 região de crescimento (Teske e Trentine, 1995).

23 Apesar de não completamente elucidada sua atividade biológica, tem
24 sido amplamente estudada ao longo dos anos.

25 Pesquisas realizadas demonstraram sua atividade antiinflamatória
26 mediada sobretudo pelos monoésteres de faradiol (Della et al., 1994; Citadini-
27 Zanette et al., 2012; Dinda et al., 2015) e pela inibição da lipoxigenase,
28 observada em citosol de células pulmonares de ratos, induzida pela molécula
29 Isorhamnetina 3-glicosídeo (Arora et al., 2013).

30 Sua atividade antioxidante também foi observada, relacionada ao
31 carotenóide Lycopene (Efstratiou et al., 2012) e moléculas de Fe²⁺ e ácido
32 ascórbico atuando sobre a peroxidação lipídica lipossomal (Arora et al., 2013).

1 Diversos estudos também relacionados à atividade antimicrobiana e
2 antiproliferativa demonstraram ação antifúngica sobre 23 fungos testados pela
3 presença de isômeros do flavonóide cadineno, bem como sobre bactérias
4 Gram negativas e Gram positivas, entre elas *Candida Albicans*, *S. Aureus*,
5 *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Efstratiou et al., 2012,
6 Chakraborty, 2008, Bissa e Bohra, 2011, Gazim et al., 2008), tendo como
7 grande vantagem o pequeno impacto no desenvolvimento de resistência
8 bacteriana e susceptibilidade em relação a outros compostos biocidas (Hammer
9 et al., 2012; Walsh et al., 2003).

10 A ação cicatrizante da calêndula também tem sido comprovada
11 cientificamente, principalmente relacionada à presença de triterpenóides. Sua
12 tintura produziu um aumento na média de fibroblastos sobre feridas cutâneas
13 experimentais em coelhos (Citadini-Zanette et al., 2012), e na linhagem
14 fibroblástica NIH-3T3 *in vitro* (Dinda et al. 2015), inibição da degradação de
15 colágeno em fibroblastos, mediada pelo flavonóide Quercertina (Nicolaus et al.
16 (2017) e o estímulo da angiogênese em membranas corioalantóicas de ovos
17 embrionados, fatores diretamente relacionados com as fases proliferativa e de
18 maturação do processo de reparo (Patrick et al., 1996).

19 Leach (2008), observou ainda soma dos efeitos antioxidante e
20 antimicrobiano influenciando positivamente no tempo de cicatrização cutânea,
21 quando empregada a calêndula tópica a 2%.

22 Foram observados ainda os efeitos imunomodulatórios (Attard e
23 Cuschieri, 2009), antivirais (Kalvatchev et al., 1997) e antitumorais (Ukiya et al.,
24 2006) demonstrando uma ampla e variada atividade fitoquímica.

25 Várias espécies da família *Asteracea* são reconhecidas por causarem
26 reações de hipersensibilidade tardia. Porém, este efeito é relativamente raro
27 com extratos de *Calendula officinalis*. A *Cosmetic, Toiletry and Fragrance*
28 *Association* (CTFA) alega que o uso de extrato de calêndula em preparações
29 cosméticas apresentou resultados negativos para ensaios de sensibilização
30 dérmica. A CTFA também realizou testes de irritação cutânea, que revelaram
31 baixo potencial de irritação. Um teste com o extrato de calêndula à 10%,
32 realizado em nove coelhos, apresentou índice primário de irritação dérmica de
33 0% (Fiume, 2001; Ministério da Saúde e ANVISA., 2014).

1 No entanto, apesar de apresentarem importantes características
2 fitoquímicas favoráveis ao processo cicatricial, a volatilidade dos compostos
3 presentes nos óleos essenciais pode ser um empecilho ao seu emprego em
4 membranas bioativas. Bilia et al. (2002) observaram através da cromatografia
5 de tintura alcoólica de calêndula uma estabilidade do flavonóide Isorhamnetin-
6 3-O-glicosídeo, a 25°C de apenas 72 dias, durante os quais sua assinatura
7 cromatográfica reduziu progressivamente. Similarmente, Zdoryk et al. (2014)
8 observaram, a partir de um mês, o desaparecimento ou redução na intensidade
9 de zonas cromatográficas referentes à calendulosídeos e flavonóides em uma
10 formulação tópica à base de vaselina. A meia vida a 25°C chegou a um mês e
11 dois meses a 5°C em frasco âmbar, não atingindo 14 dias quando expostos à
12 luz.

13 Uma membrana bioativa deve liberar seus compostos de forma lenta e
14 sustentada durante todas as diferentes etapas da cicatrização, mas a alta
15 volatilidade dos óleos essenciais pode produzir perda ou liberação inicial muito
16 rápida desses compostos ativos, limitando sua eficácia (Andreau et al., 2015).

17 Algumas estratégias para fixar os óleos essenciais a curativos incluem,
18 desde a sua simples imersão em soluções com princípios ativos, ao
19 encapsulamento de princípios ativos nas fibras poliméricas, que constituem a
20 matriz do curativo em questão (Andreau et al., 2015).

21

22 **1.8 ALGINATO SÓDICO**

23 O carregamento de óleos essenciais pode ser realizado através do
24 “casting”, método através do qual soluções de óleo essencial são associadas a
25 hidrocolóides, que, após secos, produzem filmes aderindo à superfície
26 desejada.

27 Essa técnica tem sido amplamente utilizada na indústria alimentícia para
28 a produção de filmes de revestimentos comestíveis, que além de barreira física,
29 albergam características antioxidativas com o objetivo de aumentar o tempo de
30 prateleira de alimentos como frutas e pães (Fakhreddin et al., 2013).

31 O polímero natural alginato enquadra-se nessa categoria devido ao seu
32 status de substância generalizadamente reconhecida como segura (GRAS),
33 de fácil disponibilidade, custo baixo, além de sua capacidade de micro

1 encapsulamento e transporte de agentes fitoquímicos e antimicrobianos.
2 (Córdova et al., 2015; Alacrón-Moyano et al., 2017), inclusive sendo aplicado
3 na administração transdermal e transmucosa controlada de substâncias ativas
4 (Liakos et al., 2013).

5 Entre os alginatos, o Alginato Sódico (NaAlg) é o polissacarídeo
6 derivado de algas mais utilizado. Composto por cadeias de β -d-manuronato (M)
7 e α -l-guluronato (G) conectadas por ligações covalentes, é um composto
8 biodegradável e biocompatível capaz de absorver de 200 a 300 vezes seu peso
9 em água (Gardner, 2004; Liakos et al., 2013), podendo ser absorvida pela pele
10 sem nenhum efeito tóxico, liberando os compostos ativos por contato durante
11 sua absorção (Sachan et al., 2009).

12 Diversos estudos investigaram a aplicação de formulações baseadas em
13 alginato para a produção de membranas curativas como NaALg-quitosana-
14 fibrina, nanofibras de alginato, NaAlg-óxido de polietileno, alginato-gelatina
15 (Pandima et al., 2013; Leung et al., 2014; Boateng et al., 2015).

16 Filmes de alginato pelo método de *casting* foram produzidos não só para
17 sua utilização na indústria alimentícia, mas também como transportadores de
18 óleos essenciais, antibióticos e antissépticos, apresentando atividade
19 antiproliferativa *in vitro* contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*,
20 demonstrando seu potencial emprego como constituinte de membranas
21 interativas/bioativas (Alacrón-Moyano et al., 2017; Liakos et al., 2013; Cossu et
22 al., 2015; Ng e Leow 2015).

23 Vários estudos de toxicidade aguda envolvendo extratos de *Calendula*
24 *officinalis*, administrados por via oral (gavagem) a ratos ou camundongos,
25 comprovaram a ausência de toxicidade em doses de até 5g/kg de peso, porém,
26 os resultados destes estudos não são diretamente correlacionáveis devido ao
27 uso da calêndula ser majoritariamente tópico (Ministério da Saúde e ANVISA.,
28 2014).

29 Embora uma série de benefícios sejam descritos a partir do emprego de
30 membrana de celulose vegetal e óleo essencial de calêndula, a avaliação de
31 seus efeitos associados sobre o processo cicatricial, bem como a resposta
32 imunológica local e a sistêmica, devem ser investigados.

1 A possibilidade de adição do óleo de calêndula à matriz das membranas
2 de celulose vegetal representa uma inovação ainda maior em relação às
3 membranas de celulose provenientes de outras fontes, como a bacteriana, uma
4 vez que permite agregar propriedades que reduzam o tempo ou melhoram a
5 qualidade do processo cicatricial. Associada às características como
6 resistência mecânica, presentes nos filmes de celulose vegetal, produz uma
7 membrana interativa, bioativa e de baixo impacto ambiental, sendo sintetizada
8 a partir de resíduos agroflorestais a custos baixos.

9 10 **2. OBJETIVOS**

11 **2.1 OBJETIVO GERAL:**

12 Avaliar a eficácia e segurança do emprego de membranas de celulose
13 vegetal com óleo essencial de calêndula em sua formulação, sobre a
14 cicatrização de feridas cutâneas.

15 16 **2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

17 **Os objetivos do presente estudo foram avaliar:**

- 18 • O aspecto macro e microscópico da ferida após o uso da membrana:
 - 19 ○ Tecido cicatricial,
 - 20 ○ Qualidade e quantidade das fibras de colágeno,
 - 21 ○ Identificação de células inflamatórias,
 - 22 ○ Proliferação fibroblástica,
 - 23 ○ Angiogênese;
- 24 • A atividade antiproliferativa da membrana sobre o crescimento de
- 25 microorganismos padrão (ATCC) *in vitro*;
- 26 • Se há absorção da membrana pelo tecido cicatricial;
- 27 • Se há degradabilidade da membrana após sua aplicação sobre a lesão
- 28 cutânea;
- 29 • A reação imunológica local da implantação da membrana no tecido
- 30 subcutâneo aos 15 dias;
- 31 • Se há alterações metabólicas tóxicas (renais e hepáticas) séricas 15
- 32 dias após o implante subcutâneo da membrana;

- 1 • A redução no tempo de cicatrização pela adição de óleo de calêndula à
2 formulação da membrana.

3

4 **3. HIPÓTESES**

- 5 • As membranas de celulose vegetal apresentam melhor atividade
6 cicatricial se comparadas ao grupo controle negativo e às membranas
7 obtidas por celulose de fermentação bacteriana (grupo controle positivo);
- 8 • As membranas de celulose vegetal produzem halo de inibição
9 bacteriana *in vitro* para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- 10 • As membranas de celulose vegetal não produzem toxicidades renal ou
11 hepática ao organismo; citotoxicidade ao uso tópico e não produzem
12 reação imunológica local com significância clínica ao implante
13 subcutâneo.

14

CAPITULO 2

Retração cicatricial e atoxidade de membranas de nanocelulose vegetal incorporadas com óleo essencial de *Calendula officinalis* em ratos (Artigo científico que será submetido a publicação do periódico Carbohydrate Polymers)

2.1. INTRODUÇÃO

Feridas são definidas como interrupção ou defeito na continuidade celular e integridade anatômica, com conseqüente perda de sua estrutura funcional por lesão física, térmica, infecciosa ou imunológica à pele (Percival NJ, 2002, Shah et al 2017). A cicatrização adequada é alcançada pela ativação e infiltração de células inflamatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias e conseqüente migração de fibroblastos ao sítio da lesão (Portou et al., 2015). No entanto, esse processo pode ser prejudicado pelo envelhecimento, anormalidades metabólicas, distúrbios circulatórios, obesidade ou diabetes melitus, entre outras condições (Guo et al., 2010, Chhabra S et al., 2016).

A cicatrização inicia-se imediatamente após a perda de continuidade do tecido e pode ser dividida nas fases interponentes de hemostasia, inflamação, proliferação, de maturação e remodelamento (Enoch S e Leaper JD, 2005).

Apesar da maioria das feridas cicatrizar sem infecção, deiscência ou outra anormalidade, aumentam a morbimortalidade e os custos de tratamento, além de acarretarem dor e potencial dano estético e funcional permanente (Yaguishita, 2006; Mezdari et al., 2009). Danos cutâneos podem, ainda, expor o organismo a fatores de risco como microrganismos patogênicos e causarem graves desequilíbrios homeostáticos (Lauto et al., 2010, Hsiao T e Council M, 2017), principalmente em grandes feridas que se caracterizam pela impossibilidade de seu fechamento primário, por meio da tração de suas bordas, ou cicatrização por terceira intenção (Chhabra S et al., 2016).

Em situações onde as etapas cicatriciais não operam adequadamente, seja por influência de fatores externos como a presença de patógenos ou mesmo intrínsecos ao hospedeiro, torna-se imperativo o tratamento da ferida para acelerar a reparação, melhorando a qualidade de vida de pacientes (Andreau V et al., 2015).

1 Atualmente, o alvo do tratamento de feridas deve ser identificar os
2 fatores etiológicos de atraso ou impedimento da fisiologia cicatricial, aplicando
3 curativo com características que otimizem o processo de reparação tecidual
4 (Stojadinovic A et al., 2008, Dabiri G et al 2014). Para isso, membranas que
5 interajam com o leito cicatricial, promovendo tecido de granulação,
6 reepitelização, absorção exsudativa, têm sido desenvolvidas (Weller C, 2009;
7 Mayet N et al., 2014; Sharma S, Dua A, Malik A, 2014).

8 Uma membrana interativa ideal deve possuir propriedades como
9 proteção mecânica do leito; proteção à colonização bacteriana; manutenção da
10 umidade e hidratação; microporosidade adequada promotora de angiogênese;
11 permeabilidade seletiva à passagem de gases, mas não de microrganismos;
12 absorção de exsudação e sangue no leito da ferida; deve favorecer a
13 multiplicação e proliferação celular; reduzir resposta inflamatória excessiva;
14 possuir boa degradabilidade e boa biocompatibilidade com o hospedeiro;
15 atoxicidade; fácil aplicação; baixa aderência e fácil remoção; alto tempo de vida
16 útil estando embalada e baixo custo de produção (Seaman S, 2002; Boateng
17 JS et al., 2008; Jhong JF et al., 2014; Mayet N et al., 2014).

18 Por isso, a pesquisa de novos materiais como curativos mantém sua
19 importância (Lauto A et al., 2010; Cherian et al., 2011; Andrade et al., 2014),
20 visto que, apesar dos esforços nos últimos anos, nenhuma membrana
21 interativa foi capaz de combinar tais características em um único composto
22 (Andreau V et al., 2015).

23 A celulose destaca-se por ser o polímero natural mais abundante do
24 planeta (Hoenich NA, 2006) e, atualmente, a celulose bacteriana trata-se da
25 fonte de celulose mais amplamente utilizada para a produção de membranas
26 curativas (Sulaeva I et al., 2015). A celulose bacteriana apresenta
27 características favoráveis como seu arranjo de fibras e porosidade, espessura
28 fina, pureza e cristalinidade superiores a celulose vegetal (UI-Islam M, Khan T e
29 Park J, 2012).

30 No entanto, o elevado tempo de produção e o alto custo das membranas
31 de celulose bacteriana dão margem a novos estudos utilizando membranas
32 produzidas a partir de outras fontes de celulose, como as vegetais (Singla R et
33 al., 2017), amplamente encontradas não só no plantio florestal, mas também

1 em grande quantidade nos resíduos da produção de diversos materiais, o que
2 normalmente representa um problema na agroindústria (Hoenich NA, 2006)

3 Em feridas complexas, abertas por longo período, como úlceras
4 traumáticas, feridas térmicas ou crônicas, a inflamação excessiva promove um
5 ambiente úmido, quente e nutritivo ideal para a colonização e crescimento
6 microbiano, aumentando a resposta inflamatória e morbidade do hospedeiro
7 (Jones SA et al., 2004; Gallant-Behm CL et al., 2005; WUWHS 2008; Leaper
8 DJ et al., 2012).

9 Membranas bioativas podem ser aplicadas nesses casos, transportando
10 substâncias de uso tópico como antissépticos e antiinflamatórios, o que altera o
11 leito da lesão e estimula a cascata cicatricial (Sharma S et al., 2014; Zahedi P
12 et al., 2010).

13 Pela possibilidade de indução de resistência bacteriana, o uso de
14 antibióticos tópicos no tratamento de feridas deixou de ser recomendado pela
15 Academia Americana de Dermatologia, salvo em feridas infeccionadas, cujo
16 retardo cicatricial e maior morbidade justificam o emprego. Antissépticos
17 tópicos como clorexidina e iodo-povidona podem apresentar efeito citotóxico
18 aos queratinócitos, interferindo negativamente na regeneração tecidual
19 (Totoraitis K et al., 2017).

20 Desta forma, a pesquisa de outros antissépticos com pouca ou nenhuma
21 citotoxicidade permitiria a redução do processo inflamatório sem a indução de
22 degeneração de queratinócitos ao uso tópico.

23 Entre eles, encontra-se o óleo essencial (OE) da flor de calêndula
24 (*Calendula officinalis*), cultivada para uso medicinal desde a Idade Média como
25 anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante, antiespasmódico e antiviral,
26 aprovada pela agência americana de alimentos e drogas (FDA) como
27 substância segura da lista GRAS (Substância generalizadamente reconhecida
28 como segura) (Gazim ZC et al., 2008).

29 Estudos demonstraram sua ação antiproliferativa mediada pelos
30 isômeros do flavonóide cadineno, sobre fungos, bactérias Gram negativas e
31 Gram positivas como *Candida albicans*, *S. aureus*, *Escherichia coli* e
32 *Pseudomonas aeruginosa* (Efstratiou E et al., 2012, Chakraborty GS, 2008,
33 Bissa S e Bohra A, 2011, Gazim ZC et al., 2008), com a vantagem de

1 apresentar pequeno impacto no desenvolvimento de resistência bacteriana e
2 suscetibilidade em relação a outros compostos biocidas (Hammer KA, Carson
3 CF, Riley TV, 2012; Walsh SE et al., 2003).

4 Sua ação cicatricial, mediada pelo flavonóide quercertina foi observada
5 em diferentes estudos (Saini P et al., 2012; Dinda M et al., 2015; Nicolaus C et
6 al., 2017), bem como a atividade antiinflamatória mediada sobretudo pelos
7 monoésteres de faradiol e pelo flavonóide Isorhamnetin 3-glicosídeo (Della LR
8 et al., 1994; Citadini-Zanette et al., 2012; Arora D et al., 2013) tornando atrativo
9 seu emprego em lesões.

10 Uma membrana bioativa deve liberar seus compostos de forma lenta e
11 sustentada durante todas as diferentes etapas da cicatrização (Andreau V et
12 al., 2015), mas a alta volatilidade dos óleos essenciais pode produzir perda ou
13 liberação inicial muito rápida desses compostos ativos, e limitar sua eficácia
14 (Alarco'n-Moyano JK et al., 2017).

15 O carregamento de óleos essenciais pode ser realizado pelo método de
16 *casting*, no qual uma solução é produzida em associação a hidrocolóides, e
17 após seca, produz filmes aderentes à superfície desejada, amplamente
18 utilizados na indústria alimentícia para a produção de filmes de revestimento
19 comestíveis, com o objetivo de aumentar o tempo de prateleira de alimentos
20 como frutas e pães (Fakhreddin S et al., 2013). O polímero natural alginato é
21 amplamente empregado nessas soluções, devido ao seu status de substância
22 generalizadamente reconhecida como segura (GRAS), de fácil disponibilidade,
23 custo baixo, além de sua capacidade de microencapsulamento e transporte de
24 agentes fitoquímicos (Co'rdova K et al., 2015; Alacrón-Moyano JK et al., 2017),
25 inclusive sendo aplicado na administração transdermal e transmucosa
26 controlada de substâncias ativas (Liakos I et al., 2013).

27 Diversos estudos investigaram a aplicação de formulações baseadas em
28 alginato para a produção de membranas curativas (Pandima DM et al., 2013;
29 Leung V at al., 2014; Boateng J et al., 2015) e como transportadores de óleos
30 essenciais, antibióticos e antissépticos, apresentando atividade antiproliferativa
31 *in vitro* contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*, o que demonstra seu
32 potencial emprego como constituinte de membranas interativas/bioativas

1 (Alacrón-Moyano JK et al., 2017; Liakos I et al., 2013; Cossu A et al., 2015; Ng
2 SF e Leow HL 2015).

3 Dessa forma, a adição do óleo de calêndula à matriz das membranas de
4 celulose vegetal representa uma inovação ainda maior já que permite associar
5 propriedades que reduzam o tempo ou melhorem a qualidade do processo
6 cicatricial à resistência mecânica e biocompatibilidade, produzindo uma
7 membrana bioativa, de baixo impacto ambiental e sintetizada a partir de
8 resíduos agroflorestais a custos reduzidos.

9 O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade
10 antiproliferativa bacteriana *in vitro*, a retração cicatricial cutânea *in vivo* e a
11 segurança ao uso tópico e interno de uma membrana de nanocelulose vegetal
12 associada ao *casting* de alginato e óleo essencial de calêndula.

13

14 **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

15 **2.2.1 OBTENÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOSE VEGETAL**

16 As membranas de nanocelulose vegetal provenientes do pinheiro (*Pinus*)
17 foram desenvolvidas e produzidas no Laboratório de Tecnologia da Madeira da
18 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Florestas, Colombo-
19 PR) em um estudo prévio (Claro, FC 2017).

20 Neste estudo, utilizou-se polpa branqueada pelo processo *Kraft*, obtida
21 da madeira de *Pinus*., primeiramente homogeneizada em liquidificador
22 laboratorial com água destilada. A pasta obtida foi inserida na concentração de
23 3% em base seca no moinho Super Masscoloider Masuko Sangyo, sob rotação
24 de 1500 rpm e 20 passes para a formação da suspensão de nanofibrilas de
25 celulose (Figura 2.1) para preparo do gel de Celulose Nanofibrilada (CNF).

26

27



Figura 2.1. Imagem fotográfica do moinho Masscolloider Masuko Sangyo (A), em funcionamento (B), e do disco de pedra rotativo necessário para o preparo de celulose nanofibrilada.

Fonte: Claro FC et al., 2017.

A massa necessária para a produção de membranas com gramatura objetivada de 20 a 60 g/m² foram calculadas. Considerando 0,0294 m² a área de cada filme, as suspensões foram diluídas em água destilada à 3x10⁻³ g.mL⁻¹ e agitadas por um minuto, até completa homogeneização. Em seguida a suspensão foi filtrada sobre membrana de nylon de 22 μm em peneira de 60 mesh e prensada com placa de vidro. O conjunto peneira, suspensão e placa de vidro foi secado em estufa a 60 °C por 24 h (Figura 2.2).



Figura 2.2. Imagem fotográfica da filtração da suspensão de nanocelulose (a) e do sistema de filtração (B).

Fonte: Claro FC et al., 2017.

As membranas foram posteriormente submetidas à microscopia eletrônica de varredura no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e análise térmica por termogravimetria, ensaio de tração e arrebentamento, espessura por micrômetro eletrônico, avaliação da

1 gramatura, avaliação da absorção de água pelo método Cobb e permeância a
2 passagem de ar pelo método Gurley no Laboratório Polpa e Papel da mesma
3 universidade.

4 A propriedades físicas da membrana base utilizada para a impregnação
5 com óleo de calêndula, avaliadas por Claro FC et al. (2017) foram compiladas
6 na tabela 2.1.

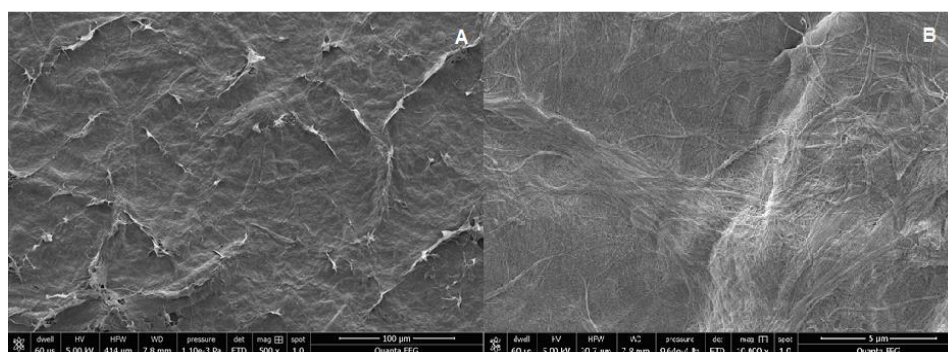
7
8 **Tabela 2.1.** Testes físicos da membrana-base de celulose vegetal.

Espessura (μm)	Gramatura (g.m^{-2})	Resistência à Tração (MPa)	Degradação Térmica (TGA)	Cobb (g.m^{-2})	Gurley (s.100cm ³)
45 \pm 3	40 \pm 2	47 \pm 6	284 a 382 °C	63 \pm 9	0

9

10 A superfície da membrana à microscopia eletrônica revelou a ausência
11 de porosidade como se pode observar na Figura 2.3.

12



13

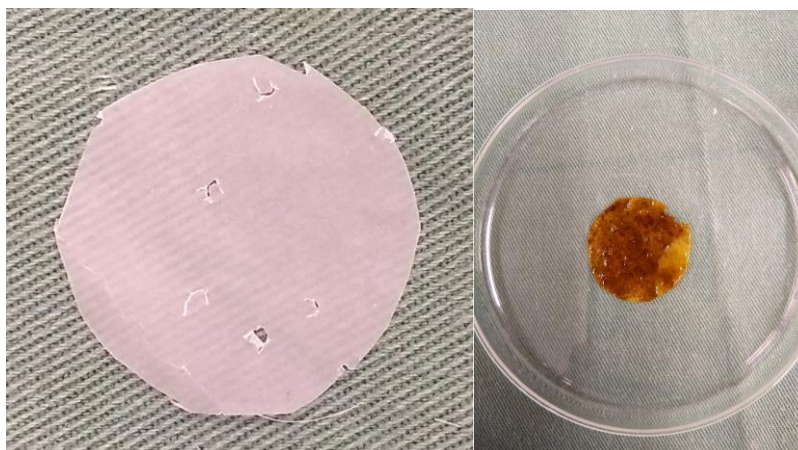
14 **Figura 2.3.** Fotomicrografias do filme de nanocelulose de Pinus. Ampliação de
15 500x (A), e aumento de 10 Kx(B). Fonte: Claro FC et al., 2017.

16

17 **2.2.2. IMPREGNAÇÃO COM ÓLEO ESSENCIAL**

18 As membranas obtidas foram cortadas em discos de 3cm de diâmetro,
19 perfuradas múltiplas vezes com agulha hipodérmica 40x12 para a produção de
20 poros macroscópicos e esterilizadas em papel grau em autoclave a 121°C por
21 15 minutos. Os discos foram colocados em placas de petri de vidro
22 previamente esterelizadas e recobertos pela solução de Óleo
23 essencial/Alginato conforme Liakos et al. (2013), onde permaneceram, em
24 capela de fluxo laminar, abrigados de luz, por 24h até sua secagem.

1 Posteriormente, os discos foram embalados com plástico filme
2 previamente esterelizado sob lâmpada UV, onde permaneceram até o dia da
3 aplicação (Figura 2.4).



5
6 **Figura 2.4.** Imagem fotográfica da membrana de celulose vegetal antes e
7 depois de impregnada com *casting* de calêndula/alginato.

8
9 A solução de *casting* foi produzida em ambiente controlado em farmácia
10 de manipulação (BioLev Ltda.). Para tanto, em uma proveta, misturaram-se 0,6
11 g de alginato sódico (Sigma) a 10mL de água destilada e aquecidos a 100°C
12 por aproximadamente uma hora até sua completa dissolução. Após o
13 resfriamento da solução viscosa à temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL
14 de glicerol (Sigma) como agente plastificante ao volume fixo de 10 mL de
15 solução. Por último, 1,0 mL de óleo de calêndula (Lazlo) e 0,1 mL de Tween 20
16 (Sigma) foram lentamente adicionados à solução e homogeneizados. Utilizando
17 uma pipeta, derramou-se 0,5 mL da solução final sobre cada membrana já
18 cortada, em placa de petri, onde permaneceram até a secagem por
19 aproximadamente 24h.

20 21 **2.2.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA BACTERIANA *IN VITRO***

22 Os testes de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de
23 Microbiologia da Clínica Veterinária Escola (CVE) da Pontifícia Universidade
24 Católica do Paraná (PUCPR), em capela de fluxo laminar, cinco dias após o
25 preparo das membranas.

26 Avaliou-se a atividade antimicrobiana das membranas pelo método de
27 disco difusão de Kirby-Bauer, contra duas cepas bacterianas padrão (ATCC),

1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023, Newprov[®]) Gram positiva e *Escherichia*
2 *coli* (ATCC 0039, Newprov[®]) Gram negativa. As cepas liofilizadas foram
3 dissolvidas e cultivadas por 24 horas a 37°C em caldo BHI (Newprov[®]), em
4 seguida, diluídos em solução de NaCl 0,9% a 10⁶ UFC/ml e semeados com
5 swab estéril sobre placas contendo ágar Muller-Hinton (Newprov[®]).

6 Logo em seguida, um disco de membrana com calêndula e um disco de
7 celulose vegetal sem adição do OE utilizado como controle, cortados em 6 mm
8 de diâmetro, foram colocados sobre o meio. As placas foram então tampadas e
9 incubadas a 37°C por 24 horas. Placas semeadas e não semeadas foram
10 incubadas como controle negativo e positivo. Realizou-se a leitura do halo de
11 inibição produzido com um paquímetro digital, efetuando os testes em triplicata.
12 A atividade antimicrobiana é registrada quando a zona de inibição for maior que
13 6 mm (Goun EG et al., 2003).

14

15 **2.2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

16 A experimentação animal foi iniciada após a aprovação do Comitê de
17 Ética em Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob o protocolo número
18 01117/2017.

19 Para o desenvolvimento experimental, utilizou-se 126 ratos Wistar,
20 machos, pesando aproximadamente 300g, com idade entre 6-8 semanas,
21 provenientes do biotério da UFPR. Os animais foram mantidos no biotério da
22 PUCPR em gaiolas individuais com tampa gradeada, forradas com maravalha
23 absorvente, trocada duas vezes ao dia, sob temperatura e fotoperíodo
24 controlados com disponibilidade de água e comida *ad libitum*. Os animais foram
25 aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais conforme a tabela
26 2.2.

27

28 Tabela 2.2. Número de animais nos grupos experimentais: GC (grupo controle
29 negativo), GM (grupo controle positivo), GMO (grupo tratamento) e GS (grupo
30 implante subcutâneo), totalizando 126 animais.

GC	GM	GMO	GS	Total
36	36	36	36	126

31

2.2.5 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os procedimentos cirúrgicos foram executados no laboratório de técnica operatória da PUCPR, conduzidos por médicos veterinários.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina 2% (Cristália), na dose de 8 mg/kg e cetamina 10% (Cristália), na dose de 60 mg/kg, por via intramuscular, não ultrapassando 0,4 ml totais. Logo após, uma ampla tricotomia envolvendo toda região dorsal do animal, foi realizada a assepsia com Iodopolividona tópica 10% (Rioquímica®).

Em seguida, uma lesão circular com molde de 3 cm de diâmetro foi produzida na região interescapular com bisturi, removendo-se pele e tecido subcutâneo adjacente até o limite da fáscia muscular. Os animais foram tratados aleatoriamente conforme cada grupo experimental (Figura 2.5).

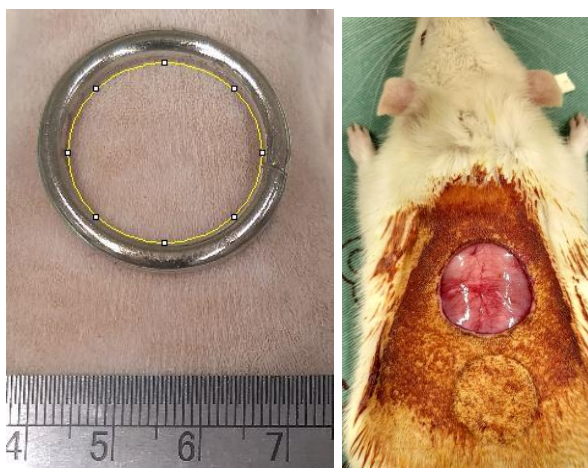


Figura 2.5 – Imagem fotográfica do molde circular de 3 cm de diâmetro (esq.), e da lesão circular que atingiu pele e tecido subcutâneo, sendo preservada a fáscia muscular (dir.).

Dividiram-se os animais em três grupos: Grupo GC (Grupo Controle Negativo) - cicatrização espontânea, por segunda intenção, sem a aplicação de membrana; Grupo GM (Grupo Controle positivo) - aplicação de membrana de celulose bacteriana (Membracell®), cobrindo toda a extensão da ferida e Grupo GMO (Grupo Tratamento) – aplicação de membrana de celulose vegetal impregnada com óleo essencial de calêndula, cobrindo toda a extensão da ferida. Após completado o procedimento, todos os animais receberam curativo fixado por gaze estéril e faixa não compressiva ao redor do tronco, removido após dois dias.

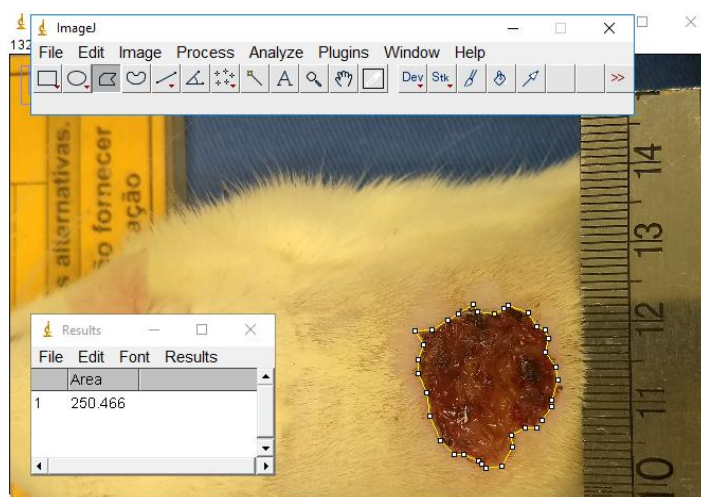
1 Ao fim dos procedimentos cirúrgicos, medicaram-se todos os animais
2 com antibiótico enrofloxacina na dose de 5mg/kg e cloridrato de tramadol
3 12,5mg/kg, ambos a cada 12 horas, no dia do procedimento e por três dias
4 consecutivos.

6 2.2.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DA RETRAÇÃO CICATRICIAL

7 Os animais de todos os grupos foram sedados com Isoflurano (Cristália)
8 em campânula e fotografados a 15 cm da superfície do animal, com o auxílio
9 de um tripé e régua para escala nos dias 4, 7, 11 e 14, produzindo 268
10 imagens. Para realização de planimetria das áreas de lesão, o programa
11 IMAGE J 1.51K foi utilizado, por avaliador cego (Figura 2.6). A fotos foram
12 utilizadas ainda para a observação macroscópica do aspecto lesional. Os
13 critérios utilizados foram a formação de crostas, presença de exsudato e
14 debris, eritema e processo infeccioso.

15 Posteriormente, efetuou-se o cálculo da porcentagem de retração da
16 ferida de cada grupo segundo a fórmula utilizada por Xu R et al. (2017), em que
17 AFi representa a área inicial da lesão e AFf a área da lesão no dia fotografado:

18 Taxa de Cicatrização (%) = $(AFi - AFf) / AFi \times 100\%$



19
20 **Figura 2.6** – Planimetria em programa de imagem IMAGE J 1.51K .
21

22 As fotos também foram utilizadas para a verificação da porcentagem de
23 membranas presentes em cada grupo, nos diferentes tempos avaliados, a fim
24 de observar sua adesão ao leito da ferida. Foram consideradas como aderidas
25 apenas as membranas ocupando visualmente mais que 25% da área da lesão.

2.2.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Nos dias 4, 7, 11, e 14 após o procedimento cirúrgico, nove animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia, seguida da coleta de amostras para processamento, avaliação histológica da ferida e comparação da celularidade cicatricial e atividade inflamatória. As eutanásias foram realizadas com superdosagem da associação do cloridrato de xilazina e cetamina por via intramuscular e administração de cloreto de potássio 10% por via intracardiaca.

Após, fragmentos de pele e tecido subcutâneo com margem de 0,5 cm ao redor da lesão foram obtidos, sendo acondicionados em formol tamponado a 10% por 24h e encaminhados para processamento no laboratório de patologia da CVE.

As amostras foram clivadas longitudinalmente no centro da ferida, emblocadas em parafina e seccionadas em um micrótomo rotativo com navalhas em cortes de 5 µm de espessura, preparando-se duas lâminas por lesão. Uma das secções foi corada com Hematoxilina e Eosina (HE) para a avaliação da inflamação e reepitelização e a segunda com coloração de Tricrômio de Mallory para avaliação da angiogênese e produção de fibras de colágeno.

Após a confecção, as lâminas foram avaliadas de forma cega por um médico veterinário patologista e a resolução das fases inflamatórias avaliada conforme o escore de Cotran RS et al. (2000). A inflamação foi classificada em: Grau 1, inflamação aguda (formação da membrana piogênica); Grau 2, predomínio de inflamação aguda difusa (início da formação do tecido de granulação); Grau 3, predomínio de inflamação crônica (início da proliferação fibroblástica); Grau 4, cicatrização (desaparecimento de sinais de inflamação com células redondas ocasionais).

A reepitelização dos bordos da ferida foi classificada segundo Sinha UK e Gallagher LA (2003) sendo: Grau 0, queratinócitos observados apenas nas margens da ferida; Grau 1, reepitelização cobrindo área menor que 50% da ferida; Grau 2, reepitelização cobrindo mais de 50% da ferida; Grau 3, reepitelização cobrindo toda a ferida com espessura irregular; Grau 4, reepitelização cobrindo toda a ferida com espessura normal.

1 As fibras colágenas e neoangiogênese foram avaliadas através do score
2 definido por Garcia VG et al., (2010) adaptado para a coloração de Tricrômio
3 Mallory sendo: Grau 1, colágeno com coloração discreta comparada ao tecido
4 adjacente saudável; Grau 2, colágeno com intensidade semelhante ao tecido
5 adjacente saudável; Grau 3, colágeno com intensidade maior que o tecido
6 adjacente saudável. A angiogênese foi avaliada também a partir do escore
7 definido por Garcia VG et al. (2010), sendo: Grau 1, quantidade de neovasos
8 menor que a observada no tecido saudável adjacente; Grau 2, quantidade
9 similar; Grau 3, quantidade maior que a observada no tecido adjacente.

10 Posteriormente, as lâminas utilizadas para a demonstração dos
11 resultados foram digitalizadas em scanner Axio Zen 2.3 (Zeiss) em
12 amplificação de 20x.

14 **2.2.8 ATOXIDADE AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO**

15 Nove animais foram anestesiados sob protocolo descrito anteriormente e
16 fragmentos de membrana com adição de calendula de 6 mm de diâmetro foram
17 implantados em seu tecido subcutâneo. Os animais foram diariamente
18 observados quanto à possibilidade de reações cutâneas como eritema, edema,
19 prurido e fistulação durante 15 dias, quando foram novamente anestesiados
20 para coleta de 5 mL de sangue, por punção intracardíaca, em tubo seco para
21 as avaliações bioquímicas. O objetivo foi verificar possível repercussão
22 sistêmica ao implante. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a
23 3500 rpm para separação do soro e quantificação das concentrações séricas
24 de Ureia (método colorimétrico, Labtest), Creatinina (método cinético,
25 Laborclin), [Alanina aminotransferase](#) (ALT) (método cinético, Labtest) e
26 Fosfatase Alcalina (FA) (ensaio de ponto final, Labtest) processados no
27 analisador QuickLab (Drake). Após a coleta, foi realizada a eutanásia para
28 coleta de fragmentos de pele e subcutâneo, os quais foram fixados e corados
29 em HE para avaliação de possível presença de reação imunológica local com
30 significância clínica ao implante (Figura 2.7).



1

2 **Figura 2.7** – Aplicação da membrana de celulose vegetal com calêndula no
3 espaço subcutâneo.

4

5 **2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

6 Para a comparação das porcentagens de retração da ferida foi
7 empregado o teste ANOVA, comparando as médias e desvios padrão entre
8 grupos e entre tempos do mesmo tratamento, utilizando um grau de
9 significância de $p < 0.05$. As porcentagens de membranas aderidas à lesão em
10 cada tempo foram comparadas entre GM e GMO através do teste-*t* para duas
11 amostras. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as medianas
12 dos escores de inflamação, reepitelização, intensidade de colágeno e
13 neoangiogênese entre tratamentos, com grau de significância de $p < 0.05$. Para
14 estas avaliações utilizou-se o programa *STATGRAPHICS Centurion XVI*,
15 versão 16.1.11.

16

17 **2.2.10 MODELAGEM MATEMÁTICA**

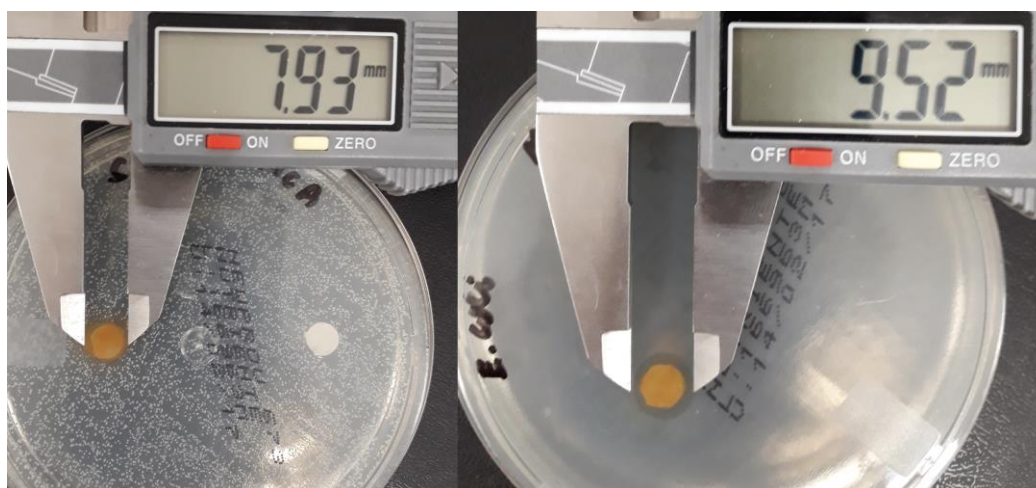
18 O método de modelagem matemática foi empregado para determinar
19 precisamente em qual data a retração cicatricial atingiu 50% da área inicial da
20 ferida, através do programa *Table Curve 2D v.5.01.02*. Os dados obtidos foram
21 ajustados a um modelo utilizando a curva de Gauss cumulativa através do
22 procedimento de Marquidt e avaliação de mínimos quadrados. Na avaliação da
23 qualidade do ajustamento das equações, considerou-se o coeficiente de

1 determinação ajustado (R^2_{aj}), o erro padrão da estimativa em porcentagem
2 ($Sy_x\%$) e análise de resíduos com o intuito de determinar uma curva de
3 progressão da retração da ferida ao longo do tempo que fosse
4 matematicamente representativa.

5 6 **2.3. RESULTADOS**

7 **2.3.1. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA BACTERIANA *IN VITRO***

8 As membranas produziram halos de inibição nas culturas de *S. aureus* e
9 *E. coli* com médias e desvios padrão de $8,03 \text{ mm} \pm 0,13$ e $8,70 \text{ mm} \pm 0,7$
10 respectivamente. O disco-controle de membrana celulósica vegetal não
11 produziu halo de inibição (Figura 2.8).



14 **Figura 2.8.** Imagens fotográficas do halo de inibição em cultura de *S. aureus*
15 (A), do halo de inibição em cultura de *E. coli* (B).

16 17 **2.3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DA RETRAÇÃO CICATRICIAL**

18 O Grupo GMO produziu feridas com crostas mais delgadas e úmidas
19 que os demais grupos, não sendo observada sua formação em alguns animais.
20 Já em GC as crostas eram exuberantes semelhantemente à GM (figura 2.9). A
21 aderência de GMO foi menos uniforme, com maior presença de membranas
22 aderidas parcialmente ao leito, enrugadas ou dobradas (Figura 2.10).

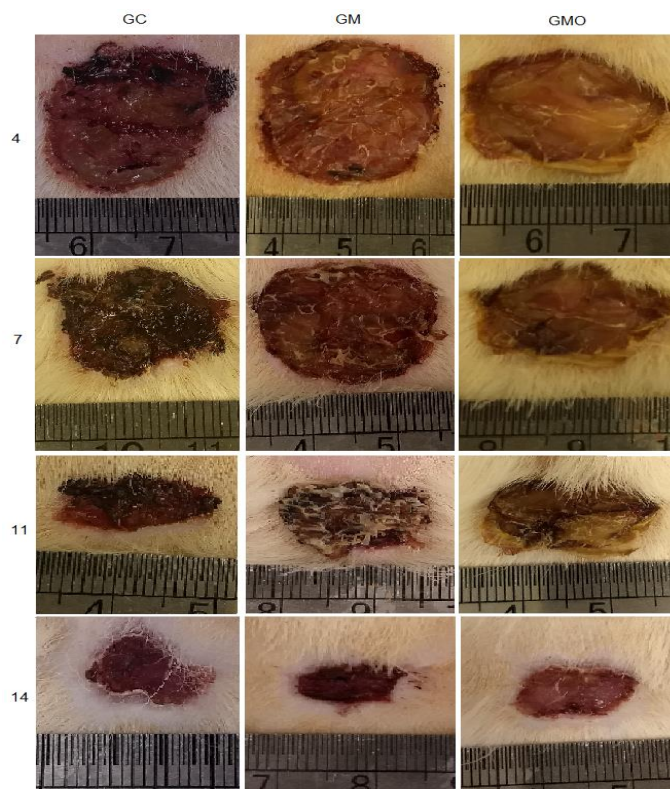


Figura 2.9. Imagens fotográficas das cicatrizes cutâneas dos grupos GC – Grupo controle negativo, GM- Grupo membrana de celulose bacteriana e GMO – Grupo de membrana de celulose vegetal e óleo de calêndula, em diferentes tempos de observação (dias 4, 7, 11 e 14).

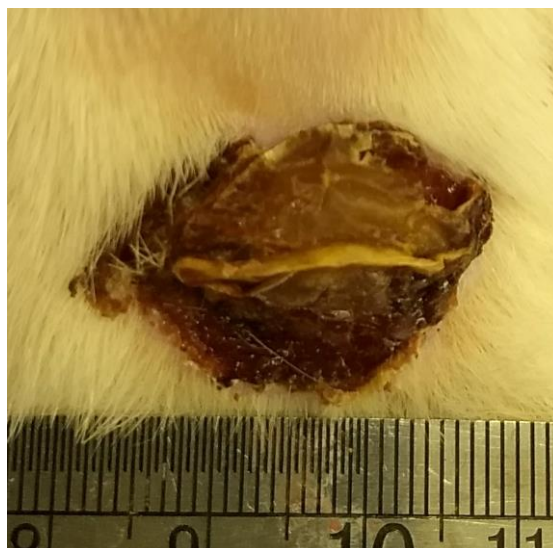


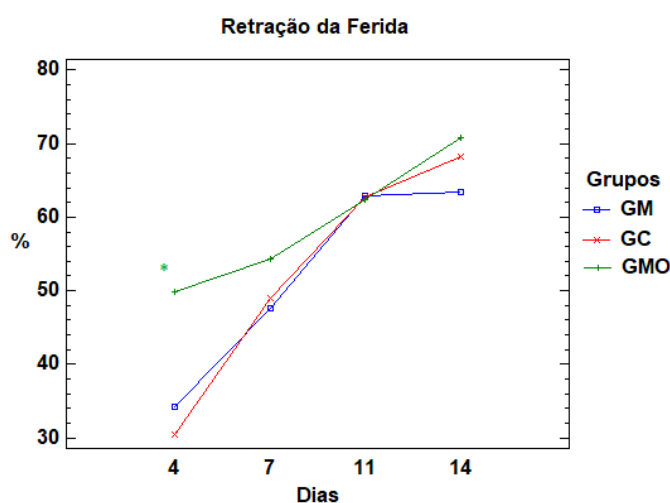
Figura 2.10. Membrana de GMO parcialmente aderida à lesão.

Os dados da retração cicatricial são apresentados na Tabela 2.2 e na Figura 2.11. Foi observada significância estatística do grupo GMO em relação aos outros grupos com maior retração cicatricial aos quatro dias ($p = 0.0068$) e entre tempos de GM entre sete e 11 dias ($p = 0.043$).

1 **Tabela 2.3.** Médias das porcentagens de retração das lesões de GC (grupo controle
 2 negativo), GM (grupo controle positivo) e GMO (grupo tratamento) nos dias 4, 7, 11 e
 3 14. Os dados foram expressados em médias e desvios padrão utilizando um grau de
 4 significância de $p < 0.05$. As letras minúsculas demonstram as relações entre grupos e
 5 maiúsculas entre tempos de um mesmo grupo. O asterisco indica diferença
 6 significativa entre grupos ($p = 0.0068$).

	GC	GM	GMO
4	30.47 ± 15.03 ^{aA}	34.27 ± 7.57 ^{abA}	49.87 ± 4.73 ^{c*A}
7	48.99 ± 18.30 ^{aAB}	47.58 ± 11.88 ^{aA}	54.37 ± 10.45 ^{aA}
11	62.71 ± 19.17 ^{aBC}	62.82 ± 16.34 ^{aB}	62.30 ± 18.43 ^{aAB}
14	68.25 ± 23.37 ^{aC}	63.48 ± 19.89 ^{aB}	70.88 ± 17.60 ^{aB}

7



8

9 **Figura 2.11.** Porcentagem da retração cicatricial em função dos tempos
 10 avaliados (4, 7, 11, 14 dias) dos Grupos GC, GM e GMO. O asterisco indica
 11 diferença estatística de GMO em relação aos demais grupos aos 4 dias.

12

13 As porcentagens de membranas aderidas ao leito da ferida nos dias
 14 avaliados encontram-se na Tabela 2.3. Aos 14 dias nenhum animal de GM ou
 15 GMO apresentou membrana aderida à lesão. GM apresentou porcentagens de
 16 aderência significativamente maiores em todos os tempos avaliados.

17

18 **Tabela 2.4.** Porcentagem de membranas aderidas à ferida de GM e GMO em
 19 4, 7 e 11 dias. $p < 0.05$ indica diferença estatística entre os grupos. Aos 4 dias p
 20 = 0.038, aos 7 dias $p = 0.029$ e aos 14 dias $p = 0.022$.

Tempos	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias
GMO	70.83%	49.60%	24.20%	0%
GM	91.66%	81.48%	61.11%	0%

21

22

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 GC, GM e GMO aos 7.32, 7.28 e 4.46 dias, como observado na figura 2.12.

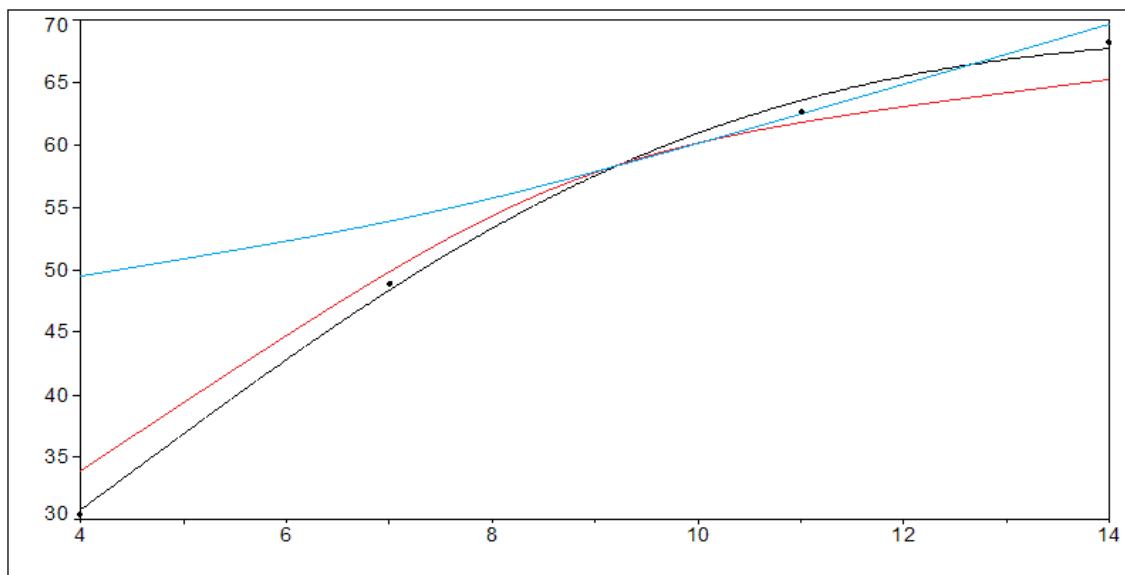
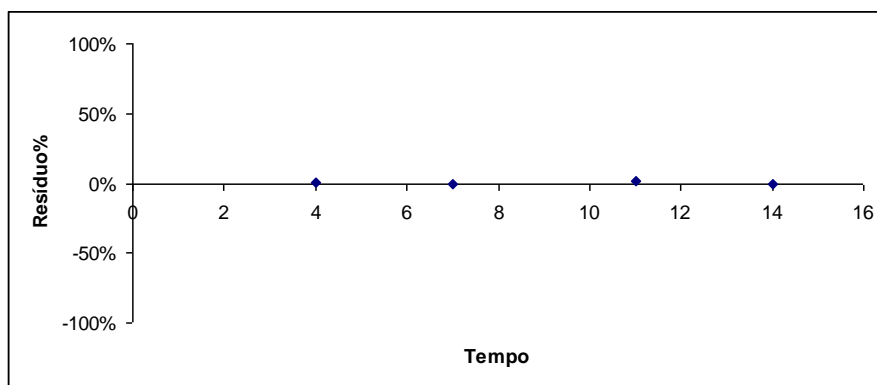


Figura 2.12. Curvas ajustadas para retração da lesão x tempo (linhas) próximas às porcentagens de retração observadas nos dias 4, 7, 11, 14 (pontos) nos grupos: GC – Grupo controle negativo (linha preta), GM - Grupo membrana de celulose bacteriana (linha vermelha) e GMO – Grupo membrana de celulose vegetal e óleo de calêndula (linha azul), obtidas pelo método de modelagem matemática, mostrando claramente o GMO atingindo 50% de retração cicatricial antes dos demais grupos.

O valor de R^2_{aj} de GMO foi 0.9750228051 e o erro padrão $Syx\% = 1.4608225122$. A análise da porcentagem de resíduos ao longo do tempo, revelou um ajuste confiável muito próximo ao 0% (Figura 2.13). Todos os valores supracitados demonstram baixa probabilidade de erro, portanto, um ajuste fidedigno do modelo utilizado à curva obtida pela coleta de dados de retração cicatricial, permitindo inferência de resultados cicatriciais em dias não observados pelo estudo.



1

2 **Figura 2.13.** Gráfico representativo da análise de resíduos em porcentagem
 3 nos dias 4, 7, 11 e 14. Observa-se resíduo muito próximo a 0 em todos os
 4 tempos, indicando que o modelo de curva ajustada pela modelagem representa
 5 matematicamente, de forma fiel, a curva de retração de feridas obtida pelo
 6 estudo.

7

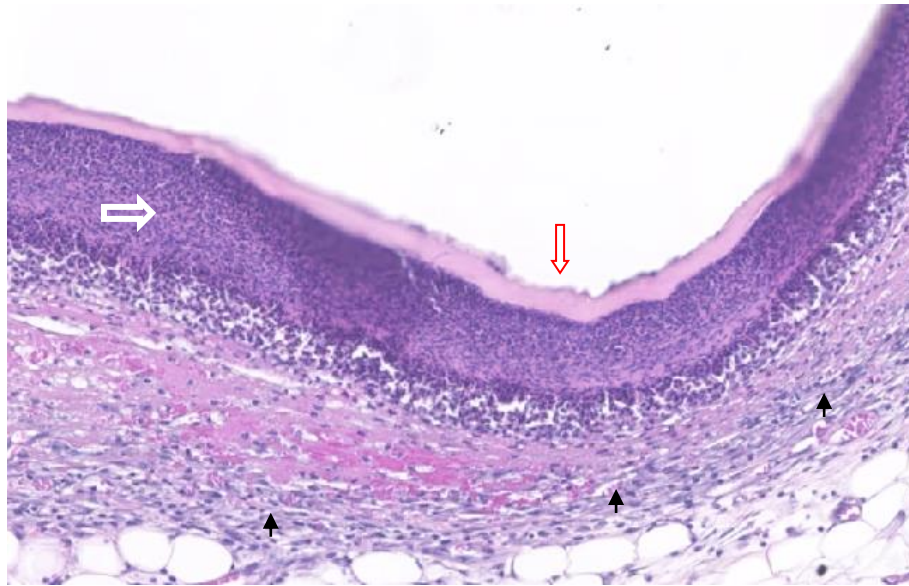
8 **2.3.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

9 A avaliação do processo inflamatório, presença de colágeno,
 10 neovascularização e reepitelização foi significativamente igual ao teste de
 11 Kruskal-Wallis entre os grupos.

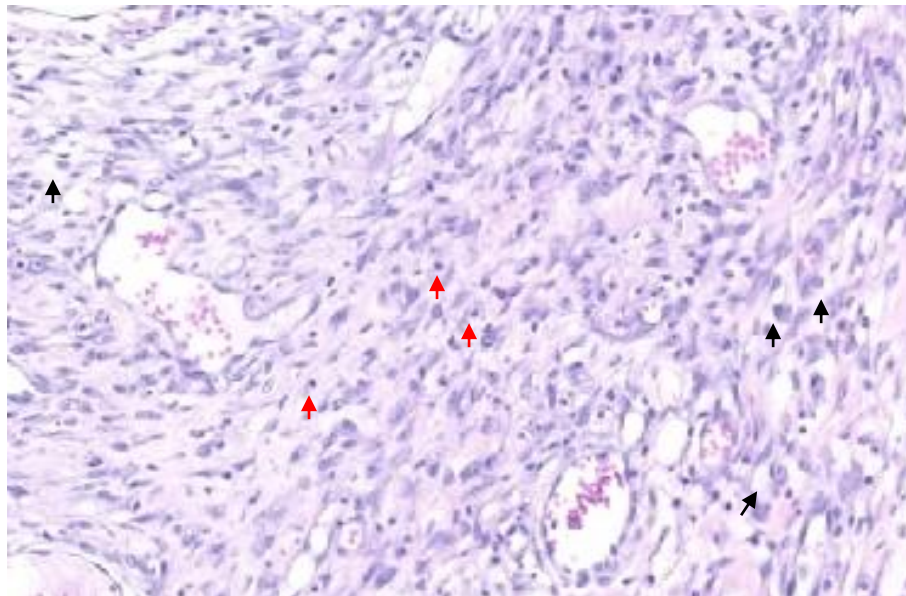
12 O processo inflamatório na coloração de HE apresentou o predomínio do
 13 Grau 1 (formação de membrana piogênica) no dia 4 e Grau 3 (inflamação
 14 crônica com início de proliferação fibroblástica) do dia 7 em diante, não
 15 atingindo Grau 4 (desaparecimento de sinais de inflamação) (figura 2.14).

16 A presença de fibras colágenas na coloração de Tricrômio de Mallory
 17 iniciou em Grau 1 (discreta) no dia 4, progredindo a Grau 2 (moderada) apenas
 18 no dia 14. A neovascularização pela coloração de Tricrômio de Mallory foi
 19 classificada como Grau 1 (discreta) aos 4 dias, passando a Grau 2 (moderada)
 20 a partir do dia 7 em diante (figura 2.15). O escore de reepitelização obtido foi
 21 Grau 0 em todos o grupos e tempos avaliados, sendo observada a presença de
 22 queratinócitos apenas nas bordas das feridas até os 14 dias (figura 2.16).

23 No Grupo GMO foram observados focos com granuloma subcutâneo
 24 contendo material basofílico amorfo; sem no entanto, presença de material
 25 celulósico fagocitado em nenhum momento, assim como observado
 26 posteriormente no grupo subcutâneo.

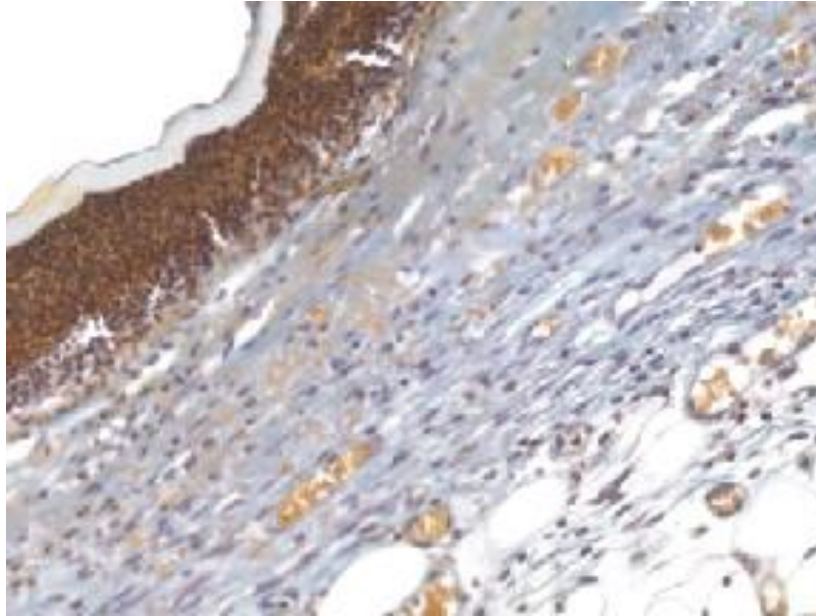


1

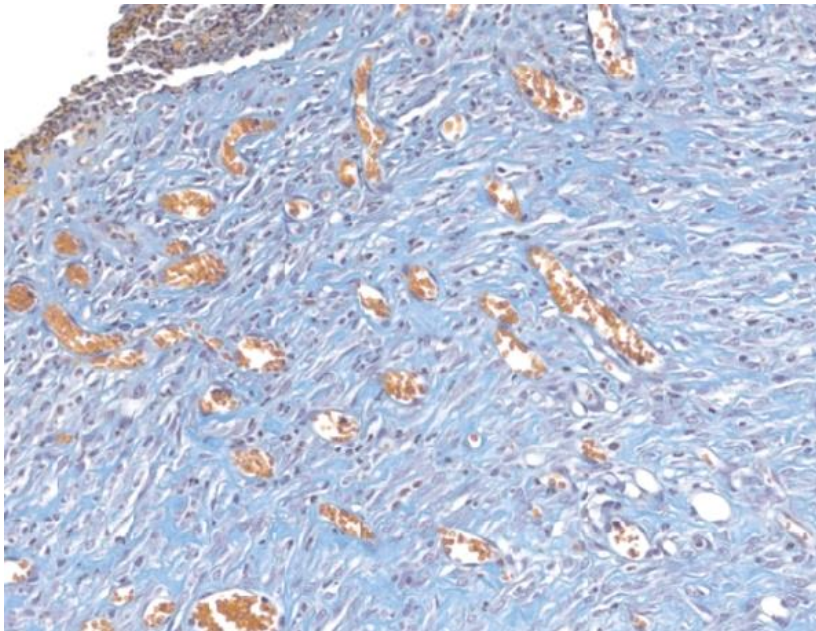


2

3 Figura 2.14. Acima: corte histológico corado em HE, sob amplificação de 20x
4 aos 4 dias, demonstrando membrana de celulose (seta vermelha), crosta
5 serocelular (seta branca) e formação de infiltrado inflamatório agudo (setas
6 pretas), configurando Grau 1. Abaixo: corte sob mesma técnica aos 7 dias,
7 demonstrando inflamação crônica com presença de macrófagos (setas pretas)
8 e fibroblastos (setas vermelhas), configurando Grau 2.



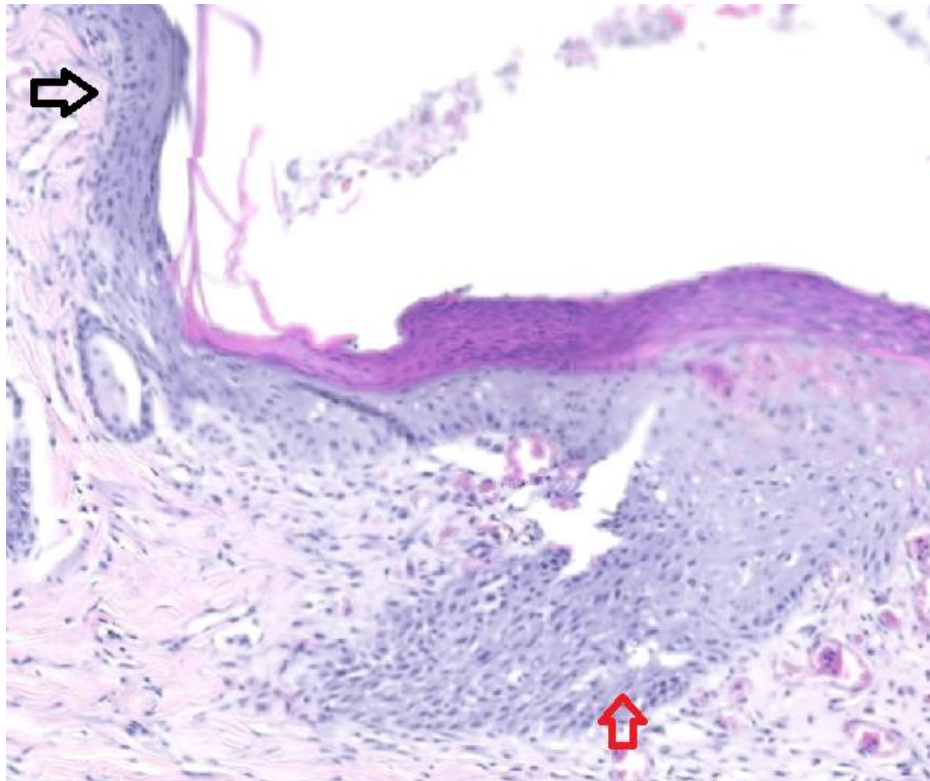
1



2

3 **Figura 2.15.** Acima: corte histológico corado em tricrômio de Mallory, sob
4 amplificação de 20x aos 4 dias, representando intensidade leve de colágeno e
5 angiogênese (Grau 1) Abaixo: corte sob mesma técnica aos 14 dias,
6 representando intensidade moderada de colágeno e angiogênese (Grau 2)

7



1

2 **Figura 2.16.** Corte histológico corado em HE, sob amplificação de 20x
3 evidenciando a presença de queratinócitos no tecido saudável adjacente (seta
4 preta) e no bordo do leito (seta vermelha).

5

6

7 **2.3.5. SEGURANÇA SISTÊMICA AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO**

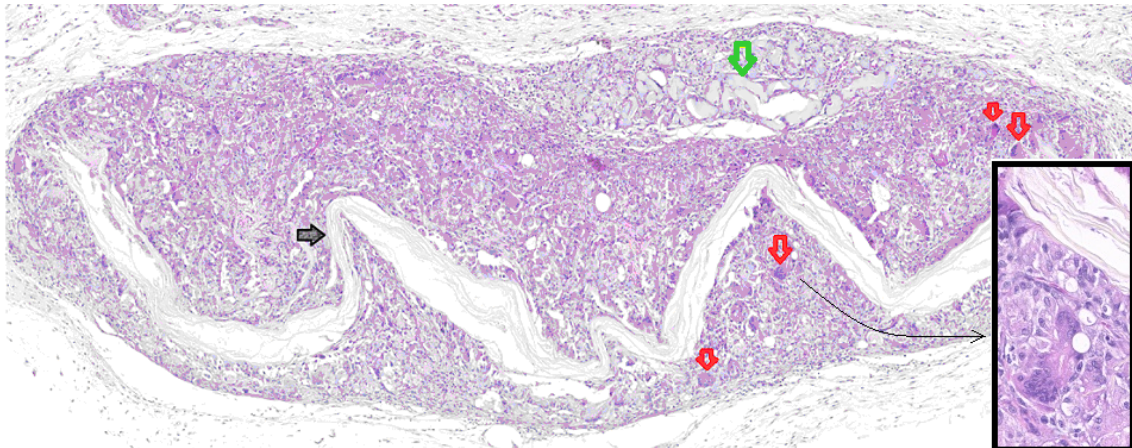
8

9 Ao implante subcutâneo não foi observado nenhum efeito adverso
10 macroscópico como prurido, eritema, edema, migração do implante ou
11 fistulação durante o período avaliado. Os parâmetros bioquímicos séricos
12 encontraram-se dentro da normalidade em todos os animais, comparados com
13 Lima CM et al. (2014).

13

14 As médias e desvios padrão obtidos foram: ALT 60.58 ± 14.93 , FA 68.66
15 ± 21.10 , Ureia 55.59 ± 4.6 e Creatinina 0.67 ± 0.06 . Na avaliação histológica
16 em HE foi observada a formação de granuloma por corpo estranho
17 encapsulando a membrana celulósica com a presença de células gigantes
18 multinucleadas. A presença de material basofílico atribuiu-se à solução de
19 *casting* utilizada (Figura 2.17).

19



1

2 **Figura 2.17.** Imagem de granuloma encapsulando membrana de celulose (seta
 3 preta) (aumento de 20x). Nota-se a presença de material basofílico (seta
 4 verde), associado aos compostos da solução do *casting*; as setas vermelhas
 5 indicam a presença de células gigantes multinucleadas características do
 6 processo imunológico local de reação ao corpo estranho (em aumento de 40x
 7 no retângulo ao canto direito).

8

9 2.4. DISCUSSÃO

10 A membrana de celulose utilizada no presente estudo como base para a
 11 incorporação de óleo essencial de calêndula apresentou boas propriedades
 12 mecânicas, como observado anteriormente em estudos com celulose (Moon RJ
 13 et al., 2011). Sua resistência à tração de 47 MPa foi superior à de outros
 14 curativos estudados, como celulose bacteriana (10.32 MPa) (Fu L et al., 2012)
 15 e silicone (0,45 MPa) (Xu R et al., 2015), o que confere boa proteção a
 16 possíveis traumas consecutivos ao frágil tecido de reepitelização, mesmo com
 17 sua fina espessura e gramatura pequena (Claro FC et al., 2017).

18 Sua resistência à degradação térmica foi superior às temperaturas
 19 atingidas pelo processo de autoclavagem (121°C) comumente utilizados para a
 20 esterilização de materiais cirúrgicos em unidades médicas pela simplicidade
 21 operacional e baixo custo, facilitando seu emprego na rotina clínica.

22 A superfície lisa, esteticamente uniforme, transparente e de fácil
 23 aplicação, caracterizam aspectos positivos da membrana ao permitir a
 24 visualização da lesão e sua evolução sem a necessidade de remoção do
 25 curativo. A soma desses fatores permitiria o emprego em regiões irregulares
 26 como, por exemplo, queimaduras em face de pacientes humanos onde
 27 curativos como enxertos de pele são evitados por produzirem um impacto
 28 estético negativo após sua degradação.

1 A impermeabilidade à passagem de ar e baixa absorção de água
2 observados por Claro et al. (2017) podem ser explicados através da ausência
3 de porosidade evidenciada pela microscopia eletrônica, o que também reduz
4 consideravelmente a área de superfície em relação ao volume do material e
5 consequentemente sua capacidade absorviva.

6 Sem a presença de poros, a resistência à tração aumenta devido a
7 maior proximidade (densidade) entre as nanofibras que compõe o curativo.
8 servindo também como barreira à microorganismos externos (Andreau V et al.,
9 2015).

10 No entanto, uma alta porosidade microscópica pode influenciar a
11 aderência celular, ao conferir alta área de superfície ao material e
12 subsequentemente favorecer a proliferação e diferenciação celulares (Xu R et
13 al., 2015).

14 A permeabilidade à vapor de água de um curativo pode influenciar
15 diretamente o processo cicatricial. Em 1962 George Winter postulou que um
16 dos maiores problemas para pacientes sofrendo de defeitos de peles sérios
17 seria a desidratação total da superfície da ferida (Queen D et al., 1987).

18 Após uma injúria a perda evaporativa na superfície da ferida pode ser
19 até 20 vezes maior que a da pele íntegra, e ao ser diretamente exposta ao ar
20 crostas compostas de plaquetas, sangue e fibrina se formam para evitar a
21 desidratação e consequente perda da vitalidade celular. As crostas contêm
22 ainda uma carga de microorganismos maior que a do tecido subjacente,
23 sugerindo também a função de aprisionamento de patógenos (Queen D et al.,
24 1987; Van der pol E et al., 2016).

25 No entanto, sob um curativo oclusivo adequado, a mobilidade celular
26 epidermal através do exsudato úmido formado pode ser até três vezes mais
27 rápida do que sob uma crosta ressecada (Winter G, 1962; Winter G, 2006).

28 Por outro lado, a retenção excessiva de fluidos na superfície da ferida
29 pode resultar em maceração dos tecidos adjacentes e predispor à maior carga
30 bacteriana, resultando em uma cicatrização inadequada.

31 Por isso, a umidade balanceada é necessária para uma cicatrização
32 ótima (McColl D et al., 2007). Em estudos recentes a taxa de transmissão de
33 vapor de água (WVTR) tem sido estudada como parâmetro para determinação

1 de umidade ótima sob curativos, associada à melhora da reepitelização e
2 contratura das feridas cirúrgicas (Xu R et al., 2016).

3 No grupo GM, a ausência de diferença estatística em relação ao GC
4 pode ser explicada pela porosidade da celulose bacteriana associada à
5 presença de furos de 2mm, as quais reduziram, através da absorção e
6 drenagem do exsudato ao meio externo, a umidade ótima da ferida a um nível
7 semelhante ao GC no modelo estudado, resultando em ressecamento do leito
8 e formação de crostas de maneira semelhante.

9 Talvez uma membrana com furos menores ou ausentes fosse suficiente
10 para drenar apenas o excesso de exsudato do leito, como observado no estudo
11 de Fu et al. (2012), onde uma membrana de celulose bacteriana sem furos
12 produziu melhor retração, com pouca formação crostosa, mantendo a umidade
13 da ferida.

14 Em estudo clínico, a membrana utilizada em GM foi empregada em
15 pacientes com lesões por queimaduras, com trocas sugeridas aos sete dias, o
16 que produziu bons resultados, no entanto houve associação tópica de
17 digluconato de clorexidine 4% em dias intercalados, o que pode ter favorecido
18 a umidade média da lesão e a baixa carga patogênica do leito (Vieira JC et al.
19 2007).

20 Uma maior retração da lesão entre sete e 11 dias foi observada em GM,
21 acompanhada de aumento do escore de neovascularização maior presença de
22 fibroblastos a partir do 7º dia. A queda mais abrupta na porcentagem de
23 animais com curativo aderido ocorreu após o 11º dia de 61,11% para 0,
24 sugerindo, troca de curativo entre sete e 11 dias e corroborando com Vieira et
25 al. (2007).

26 Já em GMO uma retração das lesões estatisticamente maior foi
27 observada ao 4º dia, atingindo 50% do fechamento da lesão, segundo a
28 modelagem matemática, com 4.46 dias, contra 7.32 e 7.28 dias em GC e GM
29 respectivamente. A reparação mais rápida foi atribuída à melhor manutenção de
30 uma umidade ótima desse grupo. A proteção contra perda evaporativa, devido
31 à impermeabilidade e presença de furos menores da membrana de celulose
32 vegetal (1,2 mm), produziu uma camada exsudativa consistente evidenciada

1 pela formação de crostas úmidas e delgadas, acelerando a mobilidade celular
2 do leito como demonstrado por Winte (2006).

3 Ademais, o exsudato excessivo foi drenado, o suficiente para evitar
4 umidade excessiva no leito e conseqüente retardo cicatricial por maceração do
5 tecido adjacente (Ousey K et al., 2016).

6 A partir do sétimo dia não mais foi observada significância entre GMO e
7 os demais grupos estudados. Esse fato foi acompanhado pela abrupta queda
8 no número de membranas aderidas à lesão (de 70.83% para 49.6%), o que
9 justifica a redução da umidade ótima do leito de quase metade dos animais
10 estudados. O ressecamento do leito e ausência da proteção mecânica, nesse
11 caso, tanto do curativo quanto das crostas permitiram a desvitalização celular e
12 retardo na movimentação e proliferação celulares (Winter G 2006).

13 Conseqüentemente foi observado atraso da curva de retração cicatricial
14 de GMO, demonstrando menos de 1/3 das porcentagens retraídas por GC e
15 GM entre quatro e sete dias, tornando os grupos estatisticamente semelhantes
16 adiante.

17 O descolamento em maior número das membranas de GMO poderia ser
18 explicado pelos furos menos numerosos e não uniformemente distribuídos
19 comparados aos do GM, o que pode ter influenciado em sua aderência ao
20 produzir uma drenagem heterogênea do exsudato presente, visto que em
21 alguns animais de GMO, as membranas encontravam-se dobradas ou
22 enrugadas, limitando-se à uma pequena porção do leito.

23 A presença do óleo de calêndula na composição final do curativo foi
24 evidenciada pela atividade antiproliferativa *in vitro*. Apesar do halo menor que o
25 observado por outros estudos, como 14 mm para *S. aureus* (Chandurkar P et
26 al., 2015) o total de óleo do presente estudo foi de 7,1 mg/cm² contra 16
27 mg/cm² anterior. Além disso, o objetivo do curativo é ocluir toda a superfície da
28 lesão e mesmo uma pequena zona de inibição alcançaria além das bordas do
29 leito, inibindo a colonização microbiana.

30 O filme de alginato produzido demonstrou sua eficácia como carreador
31 dos compostos voláteis da calêndula mesmo após a secagem, tornando
32 bioativa a membrana de celulose vegetal.

1 Nicolaus et al. (2017) relataram uma inibição da colagenase *in vitro*,
2 apresentando maior intensidade de fibras colágenas ao tratamento com
3 calêndula. No entanto, a maior retração cicatricial não pôde ser associada à
4 atividade da calêndula de GMO, visto que o escore de colágeno avaliado não
5 diferiu de GC pelo método subjetivo utilizado. Uma maior retração inicial de
6 GMO poderia ser justificada pela deposição precoce de outros constituintes da
7 matriz extracelular como a fibronectina (Chantre CO et al., 2018), não avaliados
8 no presente estudo ou através da mensuração objetiva da espessura da
9 camada colágena como a realizada por Zhang X et al., 2015, para uma
10 comparação mais exata entre grupos.

11 Outra justificativa seria a baixa concentração de calêndula do curativo
12 após diluída com o exsudato do leito o que pode ter tornando sua ação
13 inexpressiva, visto que os volumes utilizados na produção do curativo foram
14 pequenos em comparação a outros estudos e o conteúdo drenado ao curativo
15 com gaze nos primeiros dias era abundante.

16 A reepitelização maior que Grau 0 não foi observada em nenhum grupo
17 até os 14 dias, sugerindo que os animais não atingiram a fase cicatricial de
18 remodelamento. Esse fato pode ser justificado pela ausência de força
19 mecânica da ferida, que aumenta exponencialmente com a deposição de
20 colágeno (Gantwarker EA e Hom DB, 2011), observado apenas em
21 quantidade moderada até os 14 dias de estudo. Associado a esse fato, a
22 mobilidade extrema do leito da lesão no modelo estudado, evidenciada pelo
23 número de membranas ausentes ou dobradas, podem ter promovido um
24 desbridamento da lesão, restringindo a frágil camada de queratinócitos em
25 diferenciação aos bordos, predominando o tecido de granulação nas demais
26 áreas, em todos os grupos nos dias avaliados.

27 As feridas cutâneas do presente estudo tinham 3cm², e foram avaliadas
28 por até 14 dias, e este período pode ser insuficiente para detalhamento de toda
29 a formação cicatricial; Fu et al. (2012) avaliaram feridas cutâneas de 1cm², e
30 observaram que a fase de remodelamento e fechamento completo da lesão
31 ocorreu apenas aos 14 dias.

32 Apesar do maior grau de desafio proposto neste estudo, uma lesão de
33 ~7 cm² sobre uma região constantemente articulada, não foi observado retardo

1 do processo cicatricial pelo emprego das membranas de celulose vegetal com
2 calêndula em nenhum momento estudado, demonstrando a aplicabilidade em
3 regiões articulares. A ausência de necessidade de trocas diárias representa
4 ainda outra facilidade ao seu emprego.

5 Os escores inflamatórios iguais entre GMO e GC demonstraram a
6 ausência de atividade pró-inflamatória excessiva das membranas, sem interferir
7 com a celularidade imunológica avaliada e subseqüentes etapas cicatriciais e
8 permitindo conforto aos animais, apresentando comportamento e consumo de
9 ingesta normais, apesar da lesão extensa.

10 Ao implante subcutâneo não foi observado nenhum efeito adverso
11 macroscópico ou alterações bioquímicas séricas, o que demonstra atoxidade,
12 segurança ao emprego e sugere uso interno. A membrana não foi, todavia,
13 absorvida pelos macrófagos locais como esperado, mas encapsulada formando
14 granuloma, o que sugere que sua degradabilidade tópica ocorra por atrito e
15 queda de seus fragmentos.

16

17 **2.5 CONCLUSÃO**

18 A membrana de celulose vegetal acrescida de óleo essencial de
19 calêndula mostrou-se segura ao uso tópico e subcutâneo, de fácil feitura,
20 sustentável e com baixo custo de produção. Sua aplicação de maneira simples
21 permitiu uma cicatrização inicial precoce e os estudos antimicrobianos *in vitro*
22 indicam potencial uso em feridas contaminadas. Entretanto, por estes
23 resultados, sugere-se a reposição dos curativos a cada quatro dias para a
24 sustentação do estímulo cicatricial positivo até a reparação completa da lesão,
25 caso contrário, haverá redução significativa dos seus benefícios e similaridade
26 com a cicatrização espontânea.

27

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A membrana de celulose vegetal acrescida de óleo essencial de calêndula mostrou-se segura ao uso tópico e interno, de fácil feitura, sustentável e com baixo custo de produção. Sua aplicação de maneira simples permitiu uma cicatrização inicial precoce e os estudos antimicrobianos *in vitro* indicam potencial uso em feridas contaminadas. Entretanto, por estes resultados, sugere-se a reposição dos curativos a cada quatro dias para a sustentação do estímulo cicatricial positivo até a reparação completa da lesão, caso contrário, haverá redução significativa dos seus benefícios e similaridade com a cicatrização espontânea.

O Grupo GMO (grupo de membrana de celulose com óleo de calêndula) apresentou melhor retração cicatricial na fase inicial da cicatrização (até quatro dias pós-lesão) e mostrou retração de 50% da área, cerca de três dias antes dos demais grupos, resultados que são bastante animadores, sugerindo troca de curativo no período de quatro dias para a possível preservação do benefício observado e até potencialização do processo cicatricial.

O Grupo GM (Grupo membrana de celulose bacteriana) apresentou alta porcentagem de aderência até sete dias em região articulada constantemente, atribuída à sua uniformidade de furos e capacidade absorviva.

Uma similar padronização do tamanho e distribuição dos furos em GMO produziria maior maleabilidade e superfície de contato do curativo, bem como a uniforme drenagem do exsudato, evitando mobilidade e aderência dos curativos. A capacidade absorviva, por sua vez, permitiria maior incorporamento da solução de *casting*.

O *casting* de alginato e óleo de calêndula apresentou atividade antibacteriana contra Gram + e Gram – favorável sob o ponto de vista antimicrobiano, no entanto sua presença na ferida foi provavelmente diluída, abaixo do nível terapêutico, pelo exsudato do leito, o que inferiu ausência de ação anti-inflamatória e cicatricial observáveis microscopicamente.

1 Para maior efetividade, talvez seja uma opção, a concentração da carga
2 de óleo de calêndula, ao reduzir o volume fixo final de água destilada,
3 consequentemente será necessário menor volume de solução por membrana.
4 Com isso maior concentração de óleo de calêndula seria absorvida pelo
5 curativo e permaneceria sobre o leito, mesmo após diluir-se à umidade da
6 lesão.

7 A absorvabilidade e maior superfície de contato, produzida por
8 porosidade média, propiciaria ainda melhor aderência ao leito ao absorver o
9 exsudato excessivo.

10 Alguns parâmetros de porosidade ideal como WVTR e porcentagem de
11 porosidade foram determinados por Xu R et al., 2016 e poderão ser utilizados
12 como parâmetros para ensaios futuros com a mesma membrana vegetal,
13 busca-se um ponto médio entre a ausência de porosidade de GMO, que
14 conferiu resistência mecânica e boas propriedades físicas, e a alta porosidade
15 que acelera a retração cicatricial ao favorecer a adesão e proliferação
16 celulares, todavia reduzindo a resistência do curativo.

17

REFERÊNCIAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

Abdullabekova, V. et al. Essential oil of *Calendula officinalis*. European Medical, Health and Pharmaceutical Journal, v. 7, n. 2, p. 34–37, 2014.

Alarco'n-Moyano JK, Bustos R, Herrera ML, Matiacevich SB. Alginate edible films containing microencapsulated lemongrass oil or citral: effect of encapsulating agent and storage time on physical and antimicrobial properties. J Food Sci Technol. 2017, 54(9):2878-2889.

Andrade DRM, Mendonça MH, Helm, CV, Magalhães WLE, Muniz GIB, Kestur SG. Assessment of Nano Cellulose from Peach Palm Residue as Potential Food Additive: Part II: Preliminary Studies. Journal Food Science and Technology. 2014; 52(9): 5641-5650.

Andreau V, Mendoza G, Arruebo M, Irusta S. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds. Materials 2015, 8, 5154-5193.

Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. Pharmacognosy Reviews. 2013. 7: 179-187.

Attard A, Cuschieri A (2009). In vitro immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. J. Med. Plant. Res., 3(6): 457-461.

Bilia AR, Bergonzi MC, Gallori G, Mazzi G, Vincieri FF. Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passion flower tinctures by LC-DAD and LC-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30 (2002) 613–624.

Bissa S, Bohra A. Antibacterial potential of pot marigold. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 2011, 3: 51-54.

- 1 Boateng, J.; Burgos-Amador, R.; Okeke, O.; Pawar, H. Composite alginate and
2 gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound
3 healing. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 79, 63–71.
- 4
- 5 Boateng, J.S.; Matthews, K.H.; Stevens, H.N.E.; Eccleston, G.M. Wound
6 healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97,
7 2892–2923.
- 8
- 9 Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L., Spaas
10 JH. Regenerative skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth
11 factor and stem cell based treatments. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015, 36, 1–23.
- 12
- 13 Brown, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the*
14 *Chemical society, transactions*, 49, 432-439, 1886.
- 15
- 16 Chakraborty GS. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Calendula*
17 *officinalis* (Linn.). *J Herbal Med Tox* 2008;2(2):65-6.
- 18
- 19 Chantre CO, Campbell PH, Golecki HM, Buganza AT, Capulli AK, Deravi LF,
20 Dauth S, Sheehy SP, Paten JA, Gledhill K, Doucet YS, Abaci HE, Ahn S, Pope
21 BD, Ruberti JW, Hoerstrup SP, Christiano AM, Parker KK. Production-scale
22 fibronectin nanofibers promote wound closure and tissue repair in a dermal
23 mouse model. *Biomaterials.* 2018; 166 (1): 96-108.
- 24
- 25 Cherian BM, Leão AL, Souza SF, Costa LMM, Olyveira GM, Kottaisamy ER,
26 Thomas S. Cellulose nanocomposites with nanofibres isolated from pineapple
27 leaf fibers for medical applications. *Carbohydrate*; 2011 86(4): 1790-1798.
- 28
- 29 Citadini-Zanette, V.; Negrelle, R. R. B.; Borba, E. . *Calendula Officinalis L.*
30 *(Asteraceae): aspectos botânicos, ecológicos e Usos. Visão Acadêmica*
31 *Curitiba*, v. 13, n. 1, 2012.
- 32
- 33 Chandurkar P, Murab T, Ahakey N, Tripathi N, Choudhary A. Antimicrobial
34 activity of aqueous, acetone and methanol extracts of *Calendula officinalis L.*
35 *(Marigold) flower. Int. J. Pure App. Biosci.* 2015; 3 (2): 386-388.
- 36

- 1 Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound Healing Concepts in Clinical
2 Practice of OMFS. J. Maxillofac. Oral Surg. 2016;4:403-423.
- 3
- 4 Claro FC. Elaboração e caracterização de filmes a partir de nanofibrilas de
5 celulose vegetal. Curitiba. Dissertação [Mestrado em Engenharia e Ciência dos
6 Materiais] – Universidade Federal do Paraná; 2007.
- 7
- 8 Cordova K, Tello F, Bierhalz A. Protein adsorption on to alginate-pectin
9 microparticles and films produced by ionic gelation. J Food Eng. 2015. 154:17–
10 24.
- 11
- 12 Cossu A, Wang MS, Chaudhari A, Nitin N. Antifungal activity against *Candida*
13 *albicans* of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in
14 suspension and calcium alginate films. Int J Pharm. 2015. 493(1-2):233-42.
- 15
- 16 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Reparación de los tejidos: regeneración celular
17 y fibrosis. In: Robbins C, ed. Patología estructural y funcional (6th ed). Madrid:
18 McGraw-Hill Interamericana, 2000: pp 112–7.
- 19
- 20 Croveti, G.; Martinelli, G.; Issi, M.; Barone, M.; Guizzardi, M.; Campanati, B.;
21 Moroni, M.; Carabelli, A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds.
22 Transfus. Apher. Sci. 2004. 30: 145–151.
- 23
- 24 Dabiri G, Damstetter E, Phillips T. Choosing a Wound Dressing Based on
25 Common Wound Characteristics. Adv Wound Care (New Rochelle).
26 2014;5,1:32-41.
- 27
- 28 Della LR, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac D. The role of
29 triperpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis*
30 flowers. Planta Med 1994. 60:516-20.
- 31
- 32 Dinda M, Dasgupta U, Singh N, Bhattacharyya D, Karmakar P. PI3K-Mediated
33 Proliferation of Fibroblasts by *Calendula officinalis* Tincture: Implication in
34 Wound Healing. Phytother Res. 2015. 29:607-16.
- 35
- 36 DiPietro LA, Polverini PJ: Role of the macrophage in the positive and negative
37 regulation of wound neovascularization. Behring Inst Mitt 1993; 92: 238–247.

1

2 Efstratios Efstratiou, Abdullah I. Hussain, Poonam S. Nigam, John E. Moore,
3 Muhammad A. Ayub, Juluri R. Rao. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*
4 petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive
5 clinical pathogens. *complementary Therapies in Clinical Practice*. 2012. 18:173-
6 176.

7

8 Eming SA, Krieg T, Davidson JM: Inflammation in wound repair: molecular and
9 cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007. 127: 514–525.

10

11 Enoch S, John Leaper D: Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*
12 2005. 23: 37–42.

13

14 Fakhreddin S, Zandi S, Rezaei M, Farahmandghavi F. Twostep method for
15 encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation,
16 characterization and in vitro release study. *Carbohydr Polym.* (2013)95(1):50–
17 55.

18

19 Fiume, M. Cosmetic ingredient review expert pannel. Final report on the safety
20 assessment of *Calendula officinalis* extract and *Calendula officinalis*. *Int J*
21 *Toxicol*, 2001.20: 13–21.

22

23 Fu L, Zhang Y, Li C, Wu Z, Zhuo Q, Huang X, Qiu G, Zhou P, Yang G. Skin
24 tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation
25 method. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 12349-12357.

26

27 Gallant-Behm, C. L., Yin, H. Q., Jui, S., et al. Comparison of in Vitro Disc
28 Diffusion and Time Kill-kinetic Assays for the Evaluation of Antimicrobial Wound
29 Dressing Efficacy, *Wound Repair Regen.* 2005. 13:412–421.

30

31 Gantwerker EA, Hom DB. *Skin: Histology and Physiology of Wound Healing*.
32 2011. *Facial Plast Surg Clin N Am.* 19, 441-453.

33

34 Garcia VG, Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Gualberto Jr. EC, Fernandes
35 LA, Almeida JM, Theodoro LH. 2010. Effect of photodynamic therapy on the
36 healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med*
37 *Sci* 25:221–228.

1
2 Gardner RL. 2004. Application of alginate gels to the study of mammalian
3 devel-opment. *Methods Mol. Biol.* 254, 383–392.
4
5 Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG. Antifungal
6 activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in
7 Brazil. *Braz J Microby* 2008;39:61e3.
8
9 Greenhalgh DG: The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*
10 1998; 30: 1019–1030.
11
12 Goun, E.G.; Cunningham, D.C.;N guyen Cand Miles, D. Antibacterial and
13 antifungal activity of Indonesian ethanomedical plants.2003: 74: 592-96.
14
15 Guo, S.; Dipietro, L.A. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* 2010, 89,
16 219–229.
17
18 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT: Wound repair and
19 regeneration. *Nature* 2008; 453: 314–321.
20
21 Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea
22 tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the
23 development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial
24 susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 909–915.
25
26 Hinz B: Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J*
27 *Invest Dermatol* 2007; 127: 526–537.
28
29 Hoenich, N. A. Cellulose for Medical Applications: Past, Present, and Future.
30 *BioResources*, v. 1, n. 2, p. 270–280, 2006.
31
32 Hom DB, Odland R. Prognosis for facial scarring. In: Harahap M, editor.
33 *Surgical techniques for cutaneous scar revision.* New York: Marcel Dekker;
34 2000. p. 25–37.
35

1 Hsiao T, Council M. Wound, Closure Techniques. Albert Einstein Medical
2 Center Last Update: November 6, 2017.
3
4 Irion, G. Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores. Rio de
5 Janeiro: Guanabara Koogan. 2005: 329 p.
6
7 Jhong, J. F., Venault, A., Liu, L., Zheng, J., Chen, S. H., Higuchi, A., et al.
8 Introducing mixed-charge copolymers as wound dressing biomaterials. ACS
9 Applied Materials & Interfaces, 6, p. 9858–9870, 2014.
10
11 Jones, S. A., Bowler, P. G., Walker, M., Parsons, D. Controlling Wound
12 Bioburden With a Novel Silver-containing Hydrofiber_dressing. Wound Repair
13 Regen. 2004.12:288–294.
14
15 Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula*
16 *officinalis* flowers. Biomed Pharmacother 1997;51:176-80.
17
18 Kanani, A. G., Bahrami, S. H., Taftei, H. A., Rabbani, S., Sotoudeh, M. Effect of
19 Chitosan-polyvinyl Alcohol Blend Nanofibrous Web on the Healing of Excision
20 and lincision Full Thickness Wounds. IET Nanobiotechnol. 2010. 4 (4):109–117.
21
22 Kim, D.J.; Mustoe, T.; Clark, R.A.F. Cutaneous wound healing in aging small
23 mammals: A systematic review. Wound Repair Regen. 2015, 23, 318–339.
24
25 Larouche D, Lavoie A, Germain L, et al. Identification of epithelial stem cells in
26 vivo and in vitro using keratin 19 and BrdU. Methods in Molecular Biology. In:
27 Turksen K, editor, Epidermal cells, vol. 289. Clifton (NJ): Humana Press; 2005.
28 p. 383–400.
29 Lauto, A., Mawad, D., Barton, M., Gupta, A., Piller, S. C., Hook, J.
30 Photochemical tissue bonding with chitosan adhesive films. BioMedical
31 Engineering OnLine. 2010. 9(47): 11-19.
32
33 Leach MJ C. *officinalis* and wound healing: A systematic review. Wounds. 2008.
34 20(8): 236-243.
35

1 Leaper, D.J.; Schultz, G.; Carville, K.; Fletcher, J.; Swanson, T.; Drake, R.
2 Extending the TIME concept: What have we learned in the past 10 years? Int.
3 Wound J. 2012, 9, 1–19.
4
5 Leung, V.; Hartwell, R.; Elizei, S.S.; Yang, H.; Ghahary, A.; Ko, F.
6 Postelectrospinning modifications for alginate nanofiber-based wound
7 dressings. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. 2014, 102, 508–515.
8
9 Liakos I Rizzello L, Bayer IS, Pompa PP, Cingolani R, Athanassiou A.
10 Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. Carbohydr
11 Polym. 2013, 92(1):176-83.
12
13 Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Leite BLS, Serafini MR,
14 Albuquerque-Júnior RLC, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e
15 bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do
16 biotério da Universidade Tiradentes. Scientia Plena. 2014, 10: 1-9.
17
18 Lin TK, Zhong L, Santiago JL. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects
19 of Topical Application of Some Plant Oils. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 70, pp 1-21.
20
21 Madden JW, Peacock EE: Studies on the biology of collagen during wound
22 healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal
23 wounds. Ann Surg 1971; 174: 511–520.
24
25 Magalhães, M. S. F., Fachine, F. V., Macedo, R. N., et al.. Effect of a
26 Combination of Medium Chain Triglycerides, Linoleic Acid, Soy Lecithin and
27 Vitamins A and E on Wound Healing in Rats. Acta Cir. Bras. 2008. 23:262–269.
28
29 Manikarna Dinda, Swagata Mazumdar, Saurabh Das, Durba Ganguly, Uma B
30 Dasgupta, Ananya Dutta, Kuladip Jana and Parimal Karmakar. The Water
31 Fraction of *Calendula officinalis* Hydroethanol Extract Stimulates In Vitro and In
32 Vivo Proliferation of Dermal Fibroblasts in Wound Healing. 2016. Phytotherapy
33 research.10:1696-1707.
34
35 Martin P: Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. Science 1997;
36 276: 75–81.
37

1 Mayet, N.; Choonara, Y.E.; Kumar, P.; Tomar, L.K.; Tyagi, C.; Du Toit, L.C.;
2 Pillay, V. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing
3 systems. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103, 2211–2230.

4

5 Mezdari, T. J., Leite, M. F., Staack Jr., M. C., Colchon, P. H., Balan, A. B.,
6 Zanatta, M. L., Costa, I. C., Perin, C., Tames, D. R., Sousa, J. P. B., Bastos, J.
7 K., Andrade, S. F. Evaluation of the Contraction of Cutaneous Wounds in Wistar
8 Rats Treated with Brazilian Green Propolis Gel. *Acta Farmacéutica*
9 *Bonaerense*. 2009. 28 (5):762-767.

10

11 McColl, D., Cartlidge, B. & Connolly, P. Real-time monitoring of moisture levels
12 in wound dressings in vitro: an experimental study. *Int J Surg.* 5, 316–322
13 (2007)

14

15 MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Calendula*
16 *officinalis* L. (CALÊNDULA). [s.l: s.n.].

17

18 Mir M, Ali MN, Barakullah A, Arshad AGM, Fatima S, Asad M. Synthetic
19 polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials*.
20 2018. 7:1–21

21

22 Moon, RJ. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and
23 nanocomposites. 2011 [s.l: s.n.]. v. 40.

24

25 Norman G, Dumville JC, Crosbie EJ. Antiseptics and Antibiotics for Surgical
26 Wounds Healing by Secondary Intention: Summary of a Cochrane Review.
27 *JAMA Dermatol.* 2016 152,11:1266-1268.

28

29 Ng SF, Leow HL. Development of biofilm-targeted antimicrobial wound dressing
30 for the treatment of chronic wound infections. *Drug Dev Ind Pharm.*
31 2015;41(11):1902-9.

32

33 Nicks, B.A.; Ayello, E.A.; Woo, K.; Nitzki-George, D.; Sibbald, R.G. Acute
34 wound management: Revisiting the approach to assessment, irrigation, and
35 closure considerations. *Int. J. Emerg. Med.* 2010, 3, 399–407.

36

- 1 Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. In vitro
2 studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis*
3 extracts. J Ethnopharmacol. 2017 20:94-103.
- 4
- 5 Olajuyigbe, O.; Ashafa, A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of
6 Essential Oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. Leaves from South Africa. Iran. J.
7 Pharm. Res. IJPR 2014, 13, 1417–1423.
- 8
- 9 Ousey K, Cutting KF, Rogers AA, Rippon MG. The importance of hydration in
10 wound healing: reinvigorating the clinical perspective. J Wound Care.
11 2016;3(122): 124-30
- 12
- 13 Pandima Devi, M.; Sekar, M.; Chamundeswari, M.; Moorthy, A.; Krithiga, G.;
14 Murugan, N.S.; Sastry, T.P. A novel wound dressing material—Fibrin-chitosan-
15 sodium alginate composite sheet. Bull. Mater. Sci. 2013, 35, 1157–1163.
- 16
- 17 Patrick Kfm, Kumar S, Edwardson Pad, Hutchinson Jj. Induction Of
18 Vascularisation By An Aqueous Extract Of The Flowers Of *Calendula Officinalis*
19 L. The European Marigold. Phytomedicine Vol. 3 (1), Pp. 11-18, 1996.
- 20
- 21 Percival NJ. Classification of wounds and their management. Surgery [Oxford]
22 2002;20(5):114–117. doi: 10.1383/surg.20.5.114.14626.
- 23
- 24 Pilcher BK, Wang M, Welgus HG, et al. Role of matrix metalloproteinases and
25 their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity.
26 Ann N Y Acad Sci 1999; 878:12–24.
- 27
- 28 Pitanguy, I.; Salgado, F.; Maracajá, P. F. de. utilização de película de celulose
29 (Biofill®) como curativo biológico. Revista Brasileira de Cirurgia. 1988. v. 78, n.
30 5, p. 317–326.
- 31
- 32 Portou, M.J.; Baker, D.; Abraham, D.; Tsui, J. The innate immune system, toll-
33 like receptors and dermal wound healing: A review. Vascul. Pharmacol. 2015,
34 71, 31–36.
- 35
- 36 Posnett, J.; Gottrup, F.; Lundgren, H.; Saal, G. The resource impact of wounds
37 on health-care providers in Europe. J. Wound Care 2009, 18, 154–161.

1

2 Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I: Cutaneous scarring: pathophysiology,
3 molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. J Am Acad Dermatol
4 2012; 66: 1–10.

5

6 Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.-M. The skin: An indispensable barrier.
7 Exp. Dermatol. 2008, 17, 1063–1072.

8

9 Queen, D., Gaylor, J. D., Evans, J. H., Courtney, J. M. & Reid, W. H. The
10 preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound
11 dressings. Biomaterials. 1987. 8, 367–371.

12

13 Rahman S, Carter P, Bhattarai N. Aloe Vera for Tissue Engineering
14 Applications. J. Funct. Biomater. 2017, 8(6): 1-17.

15

16 Rajwade, J. M., Paknikar, K. M., & Kumbhar, J. V. Applications of bacterial
17 Cellulose and its composites in biomedicine. Applied microbiology and
18 biotechnology, 99, 2491-2511, 2015.

19

20 Reinke JM, Sorg H. Wound repair and Regeneration. Eur Surg Res. 2012, 49:
21 35-43.

22

23 Robson MC, Steed DL, Franz MG: Wound healing: biologic features and
24 approaches to maximize healing trajectories. Curr Probl Surg 2001; 38: 72–140.

25

26 Robson MC. Proliferative scarring. Surg Clin North Am 2003; 83:557–69.

27

28 Rodero M, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages.
29 Int J Clin Exp Pathol 2010;3(7):643–53.

30

31 Sachan NK, Pushkar S, Jha A, Bhattacharya A... Sodium alginate: The wonder
32 polymer for controlled drug delivery. Journal of Pharmacy Research.2009.2(8),
33 1191–1199.

34

35 Saini P, Al-Shibani N, Sun J, et al.. Effects of *Calendula officinalis* on human
36 gingival fibroblasts. Homeopathy. 2012.101: 92–98.

1
2 Seaman, S. Dressing selection in chronic wound management. *J. Am. Podiatr.*
3 *Med. Assoc.* 2002, 92, 24–33.
4
5 Sen, C.K.; Gordillo, G.M.; Roy, S.; Kirsner, R.; Lambert, L.; Hunt, T.K.; Gottrup,
6 F.; Gurtner, G.C.; Longaker, M.T. Human skin wounds: A major and
7 snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.*
8 2009, 17, 763–771.
9
10 Shah A, Amini-nik S. The Role of Phytochemicals in the Inflammatory Phase of
11 Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1068-1085.
12
13 Sharma, S.; Dua, A.; Malik, A. Third generation materials for wound dressings.
14 *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2014, 5, 2113–2124.
15
16 Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of*
17 *Medicine.* 1999; 2(3): 738-746.
18
19 Singla R, Soni S, Kulurkar PM, Kumari A, Mahesh S, Patial V, Padwad YS,
20 Yadav YS, In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo
21 cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing,
22 *Carbohydr. Polym.*, 155. 2017. 152-162
23
24 Sinha UK, Gallagher LA. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 laser,
25 and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral
26 mucosa. *Laryngoscope* 2003; 113:228 –36.
27
28 Sipos P, Gyory H, Hagymasi K, et al. Special wound healing methods used in
29 Ancient Egypt and the mythological background. *World J Surg* 2004;28: 211–6.
30
31 Sood, A.; Granick, M.S.; Tomaselli, N.L. Wound dressings and comparative
32 effectiveness data. *Adv. Wound Care* 2014, 3, 511–529.
33
34 Sorg H, Krueger C, Vollmar B: Intravital insights in skin wound healing using the
35 mouse dorsal skin fold chamber. *J nat* 2007; 211: 810–818.
36

1 Stojadinovic, A.; Carlson, J.W.; Schultz, G.S.; Davis, T.A.; Elster, E.A. Topical
2 advances in wound care. *Gynecol. Oncol.* 2008, 111, S70–S80.

3

4 Strodtbeck F: Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs Rev* 2001; 1:
5 43–52.

6

7 Strohal, R.; Dissemond, J.; Jordan O'Brien, J.; Piaggese, A.; Rimdeika, R.;
8 Young, T.; Apelqvist, J. EWMA Document: Debridement. *J. Wound Care* 2013,
9 22, S1–S52.

10

11 Sulaeva I, Henniges U, Rosenau T, Potthast A. Bacterial cellulose as a material
12 for wound treatment: Properties and modifications. A review. 2015. *Biotechnol*
13 *Adv.* 8: 1547-71.

14

15 Sussman, G.; Weller, C. Wound dressings update. *J. Pharm. Pract. Res.* 2006,
16 36.

17

18 Teske, M.; Trentine, A. M. *Compêndio de fitoterapia.* Curitiba Ingra, p. 66–68,
19 1995.

20

21 Thakare, V. M.. International Standard Serial Number, Promotion of Cutaneous
22 Wound Healing by Herbal Formulation Containing *Azadirachta indica* and
23 *Cynodon dactylon* extract in wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical*
24 *Research & Development*, 2011.3 (4):80-86.

25

26 Thomas, J C., *Veterinary Pathology*, 6th edition, William's and Wilkin, Maryland,
27 USA, 1997, pp. 150-156.

28

29 Totoraitis K, Cohen JL, Friedman A. Topical Approaches to Improve Surgical
30 Outcomes and Wound Healing: A Review of Efficacy and Safety. *J Drugs*
31 *Dermatol.* 2017. 16 (3): 209-212.

32

33 Tziotzios C, Profyris C, Sterling J: Cutaneous scarring: pathophysiology,
34 molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. *J Am Acad Dermatol*
35 2012; 66: 13–24.

36

1 Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Anti-
2 inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of
3 marigold (*C. officinalis*) flowers. *J. Nat. Prod.* 2006. 69: 1692-1696.
4
5 UL-Islam, M., Khan, T., & Park, J. Water holding and release properties of
6 Bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate*
7 *polymers*, 88, 596-603, 2012.
8
9 Van der Pol E, Mudde YD, Coumans FA, van Leeuwen TG, Sturk A, Nieuwland
10 R. Wound scabs protect regenerating tissue against harmful ultraviolet
11 radiation. *Med Hypotheses.* 2016. 96:39-41.
12
13 Vieira Jc, Badin Az, Calomeno Lh, Teixeira V, Ottoboni E, Bailak M, Salles Jr G.
14 Membrana Porosa De Celulose No Tratamento De Queimaduras. *Arquivos*
15 *Catarinenses de Medicina.* 2007: 36, 94-97.
16
17 Walsh, S.E.; Maillard, J.-Y.; Russell, A.D.; Catrenich, C.E.; Charbonneau, D.L.;
18 Bartolo, R.G. Development of bacterial resistance to several biocides and
19 effects on antibiotic susceptibility. *J. Hosp. Infect.* 2003, 55, 98–107.
20
21 Weller, C. *Advanced Textiles for Wound Care*; Elsevier: Cambridge, UK, 2009.
22
23 Winter GD¹. Some factors affecting skin and wound healing. *J Tissue Viability.*
24 2006 May;16(2):20-3
25
26 Winter GD. Formation of thick scab and the rate of epithelisation of superficial
27 wound. in the skin of the young domestic pig. *Nature Lond.*1962. 193: 293-94.
28
29 World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). *Principles of Best*
30 *Practice: Wound Infection in Clinical Practice. An International Consensus*; MEP
31 *Ltd.: London, UK, 2008.*
32
33 Xu R, Bai Y, Zhao J, Xia H, Kong Y, Yao Z, Yan R, Zhang X, Hu X, Liu M, Yang
34 Q, Luo G, Wu J. Silicone rubber membrane with specific pore size enhances
35 wound regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 12(2):905-917.
36

- 1 Xu R, Xia H, He W, Li Z, Zhao J, Liu B, Wang Y, Lei Q, Kong Y, Bai Y, Yao Z,
2 Yan R, Li H, Zhan R, Yang S, Luo G, Wu J: Controlled water vapor transmission
3 rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction
4 enhancement. *Sci Rep.* 2016: 18, 6:24596.
- 5
- 6 Yaguishita N. Cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa
7 (Membracel®) em dorso de ratos. Dissertação (Mestrado em Princípios da
8 Cirurgia). Faculdade Evangélica do Paraná. Curitiba, PR. 2007.
- 9
- 10 Zahedi, P.; Rezaeian, I.; Ranaei-Siadat, S.-O.; Jafari, S.-H.; Supaphol, P. A
11 review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous
12 polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol.* 2010, 21, 77–95.
- 13
- 14 Zhang X, Xu R, Hu X, Luo G, Wu J, He W. A systematic and quantitative
15 method for wound-dressing evaluation. *Burns & Trauma.* 2015: 3(15): 1-8.
- 16
- 17 Zdoryk OA, Khokhlova KO, Georgiyants VA, Vyshnevskaya LL, Investigation of
18 Physical and Chemical Stability of Ointment with Herbals. *International Journal*
19 *of Pharmaceutical Compounding.* 2014 Vol. 18 No. 3 pp. 248-252.
- 20

ANEXO 1



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

Curitiba, 22 de junho de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **01117 – 2ª versão**

TÍTULO DO PROJETO: BIOSSEGURANÇA E ATIVIDADE DE MEMBRANAS DE CELULOSE VEGETAL COM OU SEM OLÉO ESSENCIAL DE CALÊNDULA NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

José Ademar Villanova Jr.

EQUIPE DE PESQUISA

Luciano José Eigio Isaka, Bruno Massa de Viveiros, Jair Rondini Engracia Filho, Washigton Luiz Esteves Magalhães, Francine Ceccon Claro

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO

Escola de Saúde e Biociências / Mestrado / Doutorado

VIGÊNCIA DO PROJETO	06/2017 a 10/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	198
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratos)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Adultos / 300 - 350g	ESPECIE - GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	BIOTÉRIO – PUCPR (Informamos que o Biotério está em uma nova fase de estruturação, sendo assim, informar logo que seja possível à CEUA outros locais de origem dos animais.	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 no dia **22.06.2017**.

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.

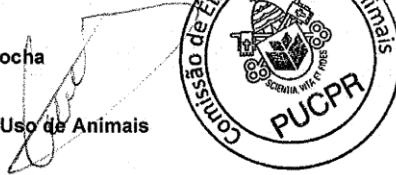
Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br



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

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. Lembramos ao pesquisador que é **obrigatório** encaminhar qualquer **alteração** no protocolo de pesquisa e o **Relatório Final** a esta CEUA.

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



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

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

- 1 ANEXO 2
- 2 Normas para submissão do artigo à revista



CARBOHYDRATE POLYMERS

A Journal Devoted to Scientific and Technological Aspects of Industrially Relevant Polysaccharides

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Note: The Aims and Scope of Carbohydrate Polymers must be complied with in order for submissions to be considered for review and possible publication. The Aims and Scope have been modified as of 21 June 2017.

Carbohydrate Polymers is a major journal within the field of glycoscience, and covers the study and exploitation of polysaccharides which have current or potential application in areas such as bioenergy, bioplastics, biomaterials, biorefining, chemistry, drug delivery, food, health, nanotechnology, packaging, paper, pharmaceuticals, medicine, oil recovery, textiles, tissue engineering and wood, and other aspects of glycoscience.

The role of the well-characterized carbohydrate polymer must be the major proportion of the work reported, not a peripheral topic. At least one named carbohydrate polymer must be cited and be the main focus of the paper and its title. Research must be innovative and advance scientific knowledge.

Characterization - For all polysaccharides, including those obtained from a supplier, essential structural information which will affect their behavior in the subsequent work should be given, along with a description of how that information was ascertained. Examples of such essential information include molecular weight, mannuronate/guluronate ratio for alginates, degree of esterification for pectin, degree of deacetylation for chitosan. Editors are unlikely to send papers for formal review with a statement such as "sodium alginate was purchased from XXX Inc." unless additional information is supplied. For papers involving synthesis, polysaccharide derivatives must also be well-characterized. For papers describing identity or application of newly-discovered polysaccharides, purity and monosaccharide composition are essential; some molecular size and linkage information is highly desirable.

Hypotheses - Nearly all scientific papers benefit from inclusion of a statement of hypothesis. Such statements should be concise, declarative, and should describe the one or more key hypotheses that the studies upon which the manuscript is based were intended to confirm or refute. Inclusion of a hypothesis statement makes it simple to contrast the hypothesis with the most relevant previous literature and point out what the authors feel is distinct about the current hypothesis (novelty). It also permits the authors to describe why they feel it would be important to prove the hypothesis correct (significance).

Topics of interest to the journal:

- structure-property relationships