

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAOLA MARTINS SCHWAB

**EFEITO DE MEMBRANAS DE CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO
NANOCÁPSULAS COM ÁCIDO FERÚLICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM
RATOS DIABÉTICOS**

PONTA GROSSA

2019

PAOLA MARTINS SCHWAB

EFEITO DE MEMBRANAS DE CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO
NANOCÁPSULAS COM ÁCIDO FERÚLICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM
RATOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientador: Prof. Dr. Leandro C. Lipinski

PONTA GROSSA

2019

S398 Schwab, Paola Martins
Efeito de membranas de carboximetilcelulose contendo nanocápsulas com ácido ferúlico na cicatrização de feridas em ratos diabéticos. / Paola Martins Schwab. Ponta Grossa, 2019.
78 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski.

1. Nanopartículas. 2. Diabetes mellitus experimental. 3. Cicatrização. 4. Compostos fenólicos. 5. Estreptozocina. I. Farago, Paulo Vitor. II. Lipinski, Leandro Cavalcante. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 616.462

PAOLA MARTINS SCHWAB

EFEITO DE MEMBRANAS DE CARBOXIMETILCELULOSE
CONTENDO NANOCÁPSULAS COM ÁCIDO FERÚLICO NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 13 de setembro de 2019.



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Orientador
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Vanessa Cristina Godoy Jasinski
Doutora em Ciências Farmacêuticas
CESCAGE



Profa. Dra. Carla Luiza da Silva
Doutora em Enfermagem
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho a minha querida Mãe Ione, de algum lugar eu sei que ela olha por mim, é quem continua sendo minha maior força e minha principal inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, sem ele nada existiria ou seria possível, agradeço incansavelmente por todas as oportunidades que me proporcionaram para chegar até aqui e todas as outras que ainda estão guardadas para mim.

Minha eterna gratidão ao meu Pai Mario Jorge Schwab, por todos os ensinamentos.

À minha irmã Nataly, meu grande amor sem explicação, sempre estivemos juntas nos melhores e piores momentos, foi quem manteve a alegria na minha vida quando o mundo desabou sobre nós, exemplo de força e dedicação.

Infinitos agradecimentos as minhas amadas tias que sempre buscaram nos dar o melhor, por todos os conselhos que só me fizeram crescer ainda mais.

Ao meu esposo Willian Mattos, eterno companheiro, grande amor. Durante esta jornada aguentou as mais variadas emoções em um só dia, me deu forças e abrigo quando mais precisei, é quem pronuncia palavras de incentivo diariamente e acredita fielmente em meu potencial.

Ao meu orientador Prof Dr. Paulo Vitor Farago por toda paciência e sabedoria, por nunca ter desistido de me orientar, por todas as valiosas contribuições com seu amplo conhecimento.

Ao meu coorientador Prof Dr. Leandro Lipinski por toda a amizade e ajuda nos experimentos. Confiou quando mais precisei, me resgatou quando pensei em desistir.

Ao Prof Dr. Eduardo Campagnoli por dedicar parte do seu tempo e conhecimento auxiliando nas avaliações histológicas sempre com muita alegria e disposto.

Aos mestrandos e doutorandos que cruzaram meu caminho e nunca hesitaram em me auxiliar, em especial, ao Guilherme Camargo, Adriana Koga, Bruna Carletto, Lillian Fernandes e Larissa Krambeck.

A minha amiga Margarete Oliveira que me acompanhou durante o mestrado, juntas enfrentamos as dificuldades e lutamos por este sonho.

As profissionais responsáveis pelo laboratório de farmacologia, laboratório de técnica operatória e pelo biotério, meu sincero agradecimento por toda ajuda.

E a todas as pessoas que estiveram comigo, apoiando, pronunciando palavras de incentivo para que eu não desistisse.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes. (Martin Luther King)

SCHWAB, P. M. **Efeito de membranas de carboximetilcelulose contendo nanocápsulas com ácido ferúlico na cicatrização de feridas em ratos diabéticos.** Ponta Grossa, 2019. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica e em rápida ascensão especialmente nos países em desenvolvimento, suas complicações podem ser graves e são causas frequentes de afastamento do trabalho e hospitalizações o que gera onerosos gastos aos cofres públicos. Uma das complicações decorrentes do diabetes é o pé diabético e feridas crônicas de difícil cicatrização que podem levar nos casos mais graves à amputação. Este estudo teve por objetivo o desenvolvimento de uma membrana inovadora de carboximetilcelulose (CMC) incorporada com nanocápsulas de ácido ferúlico (nano_AF) e a avaliação da sua efetividade na cicatrização de feridas em região dorsal de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) 60mg/kg. As membranas foram avaliadas através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), testes de resistência mecânica à tração e Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Trata-se de um estudo experimental com uma amostra de 90 ratos *Wistar* fêmeas, os animais foram divididos em seis grupos de tratamentos e avaliados por 21 dias, onde semanalmente foi coletado amostras de sangue e retirado fragmento da lesão dos animais. Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos da experimentação animal e foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA). Os resultados demonstram o grande potencial cicatrizante e do ácido ferúlico em lesões de ratos *Wistar*, onde nota-se uma redução da área da lesão ao fim do tratamento quando comparada aos outros grupos. A CMC devido seu potencial de reter líquidos ocasionou excesso de umidade nas lesões provocando um retardo na cicatrização nos primeiros 7 dias de tratamento nos grupos CMC, nano_0 e nano_AF. O grupo que utilizou membrana de CMC com AF livre apresentou resultado superior desde a primeira semana de tratamento em comparação aos outros grupos e comprovado através de análises histológicas em Hematoxilina – eosina (HE). Acredita-se que tal resultado esteja associado ao potencial de modulação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do fator do crescimento derivado de plaquetas humanas (PDGF). Os valores bioquímicos de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), ureia e creatinina não sofreram grandes alterações decorrentes dos tratamentos instituídos quando comparados com os valores de outros biotérios e a mesma linhagem de ratos. Este estudo buscou uma nova perspectiva de tratamento para feridas decorrentes do diabetes. O AF pode ser uma opção futura para o tratamento, aponta-se a necessidade de mais estudos acerca da incorporação de nanocápsulas em membranas.

Palavras-chave: Nanopartículas; Diabetes Mellitus Experimental; Cicatrização; Compostos Fenólicos; Estreptozocina; Anti-Inflamatórios.

SCHWAB, P. M. **Effect of carboxymethylcellulose membranes containing nanocapsules with ferulic acid in wound healing in diabetic rats.** Ponta Grossa, 2019. Dissertation (Pos graduation program in Health Sciences). Ponta Grossa State University, Ponta Grossa, 2019.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic disease and rapidly rising especially in developing countries, its complications can be severe and are frequent causes of absenteeism and hospitalizations, which generates costly expenditures to public safe. One of the complications resulting from diabetes is the diabetic foot and chronic wounds of difficult healing that can lead to more severe cases of amputation. This study aimed to develop an innovative membrane of carboxymethylcellulose (CMC) incorporated with ferulic acid nanocapsules (nano_AF) and the evaluation of its effectiveness in the healing of wounds in the dorsal region of diabetic rats induced by Streptozotocin (STZ) 60mg/kg. The membranes were evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), mechanical tensile strength and electronic scan microscopy (MEV) test. It is about an experimental study with a sample of 90 female *Wistar* rats, the animals were divided into six treatment groups and evaluated for 21 days where blood samples were collected weekly and removed fragments of the animal injury. All procedure followed the ethical principles of animal experimentations and were authorized by CEUA. The results demonstrated the great healing potential and ferulic acid in the *Wistar* rats lesions area at the end of the treatment when compared to the other groups. CMC due to its potential to retain liquids caused excess moisture to the lesions taunting a delay in healing in the first 7 days of the treatment in the groups CMC, nano_0 and nano_AF. The group that used CMC membrane with free AF presented superior results from the first week of treatment compared to the others groups and proved through histological analysis in HE. It is believed that this result is associated with the potential of modulation of the growth factor of the vascular endothelium (VEGF) and the growth factor derived from human platelets (PDGF). The biochemical values of oxalacetic glutamic transaminase (TGO) Glutamic-Pyruvic transaminase (TGP), urea and creatinine did not undergo major alterations due to the treatments instituted when compared with the values of other Bioterians and the same rat line lineage. This study sought a new perspective of treatment for wounds resulting from diabetes. Ferulic acid may be a future option for treatment, it is pointed out the need for further studies on the incorporation of nanocapsules into membranes.

Keywords: Nanoparticles; Diabetes Mellitus Experimental; Wound Healing; Phenolic Compounds; Streptozocin; Anti-Inflammatory Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fases da cicatrização de feridas e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.	23
Figura 2 – Estrutura molecular do ácido ferúlico (AF).	28
Figura 3 – Fluxograma experimental referente as etapas desta pesquisa.	34
Figura 4 – Representação esquemática do método para obtenção de nanocápsulas nano_0 e nano_AF.....	35
Figura 5 – A) Solução para produção das membranas sob agitação magnética. B) Placa de petri com 20 g do gel de CMC. C) Armazenamento das membranas após retirar da estufa. D) Banho de ultrassom para degaseificar o gel.....	38
Figura 6 – A) Equipamento universal de testes mecânicos. B) Corpo de prova no equipamento.....	39
Figura 7 – Bandagem utilizada como cobertura secundária aos tratamentos.....	41
Figura 8 – Formulação para obtenção das nanocápsulas, efeito Tyndall.	44
Figura 9 – Fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Nanocápsulas de Ácido Ferúlico, aumento de 10.9 kX. B) Nanocápsulas livres de fármaco, aumento de 12 kX.	45
Figura 10 – A) Membrana nano_0, B) Membrana CMC, C) Membrana AF livre, D) Membrana nano_ AF.....	46
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura das membranas desenvolvidas, aumento entre 100 e 200x. A) CMC+ nano_0. B) CMC. C) CMC + nano_ AF. D) CMC + AF livre.	47
Figura 12 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das membranas com nano_0, nano_AF, ácido ferúlico livre, mistura física (AF+CMC), CMC, PCL e AF em pó.....	49
Figura 13 – Imagens de regressão das feridas dos seis grupos de tratamentos nos D01, D7, D14 e D21.....	54
Figura 14 - Lâminas histológicas em HE dos 6 grupos no D07 e D21 de tratamento.	66
Figura 15 – Imagens em coloração de Tricrômio de Masson dos grupos que obtiveram melhor e pior desempenho no D07 e D21.....	67

Quadro 1 – Curativos utilizados no tratamento clínico de feridas sua composição, mecanismo de ação, indicação e desvantagens.	25
Quadro 2 – Características avaliadas nas lâminas com coloração em HE.	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Força estatística – ANOVA.	40
Gráfico 2 – Espessura das membranas de cada grupo.	50
Gráfico 3 - Resistência mecânica à tração da membrana contendo nanocápsulas de AF.....	50
Gráfico 4 – Resistência mecânica à tração da membrana de AF livre.	51
Gráfico 5 - Resistência mecânica à tração da membrana contendo nanocápsulas livres de fármaco.	51
Gráfico 6 – Força expressa em Newton (N) suportada por cada tipo de membrana.	52
Gráfico 7 - Tensão máxima suportada por cada tipo de membrana em MPa.	52
Gráfico 8 - Deformação máxima para cada tipo de membrana em mm.	53
Gráfico 9 - Porcentagem de cicatrização das feridas para cada grupo no D7.	57
Gráfico 10 - Porcentagem de cicatrização das feridas para cada grupo no D14.....	58
Gráfico 11 - Porcentagem de cicatrização das feridas para cada grupo no D21.....	59
Gráfico 12 - Valores bioquímicos de TGO e diferença estatística.	60
Gráfico 13 - Valores bioquímicos de TGP e diferença estatística.	61
Gráfico 14 - Valores bioquímicos de ureia e diferença estatística.....	61
Gráfico 15 - Valores bioquímicos de creatinina.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos de tratamentos utilizados.....	40
Tabela 2 – Espessura das membranas de cada grupo.....	49
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos encontrados expressos em média para cada tratamento utilizado.....	63
Tabela 4 – Características avaliadas nas lâminas histológicas em HE que apresentaram diferença estatística no D7 de tratamento.....	64
Tabela 5 – Características avaliadas nas lâminas histológicas em HE que apresentaram diferença estatística no D21 de tratamento.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido Ferúlico
Af	Área final
AgNP	Nanopartículas de Prata
Ai	Área Inicial
AR	Área de Retração
CIPP	Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-Graduação
CMC	Carboximetilcelulose
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DM	Diabetes Mellitus
EE	Eficiência de Encapsulação
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HE	Hematoxilina Eosina
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia
iNOS	Óxido Nítrico Síntase Induzível
KBr	Brometo de Potássio
MAF	Membrana de Ácido Ferúlico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mistura Física
MMPs	Metaloproteinases
MNAF	Membrana com nanocápsulas de Ácido Ferúlico
MNO	Membrana com nanocápsulas livres
Nano_0	Nanocápsulas
Nano_AF	Nanocápsulas de ácido ferúlico
OH	Hidroxila
PCL	Policaprolactona
PDGF	Fator de crescimento derivado de Plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVA	Acetato de Polivinila
rhEGF	Fator de Crescimento Epidérmico Recombinante Humano
SAP	Superabsorventes
SDs	Dispersões sólidas
SF	Soro fisiológico
STZ	Estreptozotocina
TGF- β	Fator de crescimento de transformação beta
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 DIABETES	18
2.2 FERIDAS	19
2.3 CICATRIZAÇÃO	20
2.3.1 Tipos de Curativos utilizados na cicatrização	23
2.3.2 Tipos de polímeros utilizados na cicatrização	26
2.4 O ÁCIDO FERÚLICO E SUAS PROPRIEDADES	27
2.5 UTILIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	33
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
4.2.1 Obtenção das nanocápsulas	34
4.2.2 Caracterização	35
4.3 PREPARO DAS MEMBRANAS	36
4.4 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS DAS MEMBRANAS	38
4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura	38
4.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	38
4.4.3 Testes de resistência mecânica à tração	39
4.5 APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS MEMBRANAS	39
4.5.1 Análise de cicatrização da lesão	39
4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA	42
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	42
4.7.1 Hematoxilina - eosina	42
4.7.2 Tricrômio de Masson	42
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO	44
5.1.1 Obtenção das nanocápsulas	44
5.1.2 Caracterização	44
5.2 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICA DAS MEMBRANAS	45
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura	46
5.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	47
5.2.3 Testes de resistência mecânica à tração	49
5.3 APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS MEMBRANAS	54
5.3.1 Análise de cicatrização da lesão	54
5.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	59
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	63
5.5.1 Hematoxilina – eosina	64
5.5.2 Tricrômio de Masson	67
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO ANIMAL	76
ANEXO B – PROTOCOLOS DE PREPARO E COLORAÇÃO DAS LÂMINAS	77

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 20% das internações realizadas de indivíduos com diabetes ocorrem por lesões situadas nos membros inferiores. A recorrência na incidência de problemas nos pés durante a vida de diabéticos é estimada em 25%. Segundo o Ministério da Saúde 85% das amputações no Brasil ocorrem em indivíduos diabéticos, na maioria dos casos são precedidas de ulcerações, constando como principais fatores associados ao traumatismo, as deformidades no pé e a neuropatia periférica (SILVA *et al.*, 2018; DELGADO *et al.*, 2018).

Devido a pele apresentar importante função de barreira, sustentação e estética, o tratamento de feridas ganha relevância e destaque nos estudos acerca da cicatrização (OYARZUN - AMPUERO *et al.*, 2015). A cicatrização de feridas é um processo complexo com diversos processos sequenciais, de maneira geral inicia-se imediatamente após a ruptura da pele. Primeiramente ocorre a hemostasia que por sua vez é seguida da fase inflamatória, após proliferação e por fim acontece o remodelamento (WANG *et al.*, 2018).

A fisiologia dos eventos da cicatrização pode ser prejudicada por diversos fatores e morbidades dentre eles o Diabetes, fazendo com que esse processo se prolongue e a lesão torne-se crônica (MIHAI *et al.*, 2019). As feridas crônicas tendem a ser extremamente onerosas ao sistema de saúde e não há valores absolutos de quanto isso significa na economia do país devido diversos fatores que dificultam o levantamento de todos esses dados pois está associado a mortalidade, afastamento de atividades laborais, internamentos entre outros que causam impacto diretamente na economia, família e paciente (TOSCANO *et al.*, 2018).

Assim, a busca incessante para este problema de ordem mundial fez com que diversos estudos surgissem, mais recentemente pesquisas envolvendo nanopartículas dos mais variados materiais, ganharam força por apresentarem características específicas e potencialmente efetivas na cicatrização de feridas (OYARZUN – AMPUERO *et al.*, 2015). Outro material amplamente atrativo e explorado são os polissacarídeos por apresentarem qualidades especiais acerca da cicatrização de feridas (BUENO *et al.*, 2015a).

Os produtos a serem aplicados para promover a reparação cutânea devem ser dotados de determinados requisitos funcionais e estruturais, tais como

favorecer a diferenciação e a migração das células epiteliais, facilitar tanto a colonização de parte das células estromais como a síntese de glicoproteínas, não desencadear reação inflamatória e não apresentar potencial de toxicidade (SANTOS *et al.*, 2012).

Nenhum curativo será capaz de possuir todas as qualidades por isso uma avaliação profissional é necessária a fim de identificar o melhor tratamento para cada momento da fisiologia cicatricial. Busca-se qualidades como por exemplo: segurança e eficácia, prevenção de contaminação, proteção contra odor, conforto para o paciente, segurança e facilidade de remoção ou de aplicação, criando uma relação positiva de custo/benefício com a aplicação clínica do produto (DEUTSCH; EDWARDS; MYERS, 2017).

O ácido ferúlico é um ácido fenólico que pode ser encontrado amplamente no Reino Vegetal, apresenta propriedades conhecidas como anti-inflamatória, antioxidante, apresenta um papel protetor para as estruturas da pele capaz de aumentar a angiogênese e conseqüentemente a cicatrização (ZDUŇSKA *et al.*, 2018). É dotado de efeitos terapêuticos úteis para o tratamento de diversos tipos de doenças – inclusive, do diabetes (GHAISAS *et al.*, 2014).

Embora o ácido ferúlico manifeste potencial cicatrizante conhecido, ele apresenta limitações sendo uma delas sua fácil oxidação (PAIVA *et al.*, 2013). Assim, o uso de nanocápsulas poliméricas, que são sistemas carreadores de liberação modificada de fármacos, podem permitir um efeito mais prolongado na pele, favorecendo a cicatrização de feridas.

Esta pesquisa descreve a criação de uma membrana de carboximetilcelulose contendo nanocápsulas com ácido ferúlico e avaliação da aplicação deste material na cicatrização de feridas em ratos *Wistar* diabetizados com estreptozotocina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES

O Diabetes Mellitus (DM) é uma condição crônica que tem apresentado um maior e rápido crescimento em especial nos países em desenvolvimento fazendo com que esses países enfrentem desafios ainda maiores e uma maior sobrecarga do sistema tendo em vista que a maioria ainda enfrenta problemas no controle de doenças infecto contagiosas. Além da gravidade de suas complicações como cegueira, insuficiência renal crônica e amputações não traumáticas dos membros inferiores, o diabetes está associado ao aumento de hospitalizações, torna - se um problema de saúde pública em função dos fatores contributivos para a sua expansão, como, por exemplo, o envelhecimento populacional, a maior urbanização, a prevalência crescente de sedentarismo, excesso de peso e a maior sobrevivência dos diabéticos (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017).

A quantidade de pessoas diagnosticadas com DM também é fator alarmante. Em 2017, somente no Brasil, 12,5 milhões de pessoas apresentavam diagnóstico, colocando o país em 4º lugar dentre os 10 países com maior número de casos da doença. A população de 20 a 79 anos apresenta até 8% de prevalência de diabetes, registrando-se em indivíduos com mais de 65 anos prevalência de 19% da doença. Esse quadro é agravado pelo fato de que, em alguns casos, demora-se a obter o diagnóstico, favorecendo, assim, o surgimento de complicações (IDF, 2017).

A DM é uma síndrome metabólica que se caracteriza pela manifestação de hiperglicemia em função de disfunção que se verifica na secreção da insulina ou em sua ação no organismo. Em casos nos quais ocorre hiperglicemia crônica é possível que aconteça disfunção e falência de diversos órgãos, como olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos e coração, tornando-se necessário, assim, rápido diagnóstico e início precoce do tratamento para prevenir a ocorrência de tais eventos (MARWICK *et al.*, 2009).

Embora se contemple a DM como uma doença que vem apresentando números cada vez mais expressivos, atingindo boa parte da população, é certo, porém, que muitos não têm conhecimento suficiente sobre a doença para identificar os sintomas em si mesmo, tampouco sabem como proceder em relação

ao tratamento. Desse modo, atualmente, os esforços vêm sendo direcionados no sentido de promover divulgação sobre informações relativas à prevenção da doença, fornecendo, subsídios aos indivíduos para que estes conheçam como agir e a necessidade de buscar estratégias com maior adequação para a prevenção e o tratamento da doença (GHAISAS *et al.*, 2014).

Os tipos mais comuns de DM são o tipo 1, que recebe também a denominação de insulino-dependente, refletindo um estado em que o paciente apresenta absoluta deficiência de insulina e de hormônios pancreáticos diversos; e o tipo 2, também chamado não-insulino-dependente, que, ao contrário do tipo 1, não apresenta dependência da insulina, mas apresenta anormalidade em relação à sua secreção e resistência às suas ações, com registro de elevados e anormais níveis de insulina plasmática (GHAISAS *et al.*, 2014; VÊSCOVI *et al.*, 2017).

O tipo de DM com maior incidência registrada é a diabetes tipo 2, cerca de 90% dos casos diagnosticados. No passado, o grupo de risco da doença abrangia pessoas de meia idade e idosos. Atualmente, contudo, é possível verificar um aumento considerável em relação ao número de casos em que jovens, incluindo crianças e adolescentes acometidos pela doença (VÊSCOVI *et al.*, 2017).

O aumento expressivo de pessoas portadoras de DM apresenta impacto direto no surgimento de complicações crônicas destacando as neuropatias e vasculopatias, sendo estas as principais causas do aparecimento de feridas nos membros inferiores (OLIVEIRA, 2019).

2.2 FERIDAS

As feridas são como alterações ou lesões de ordem celular, normalmente visíveis sobre a superfície da pele, podendo ou não estar relacionadas a fatores desencadeadores variados da lesão, como, por exemplo, tumores, respostas imunológicas, danos externos ao corpo, dentre outras variadas etiologias (MOURA *et al.*, 2014).

Normalmente, são classificadas em crônicas ou agudas, sendo as primeiras as que exigem maior tempo para o processo de cicatrização, normalmente mais do que 21 dias. Em associação às feridas, comumente a população adulta é assolada por doenças sistêmicas e crônicas, como infecção, imunodeficiência, desnutrição,

hipertensão arterial e diabetes. Estas são consideradas pela literatura as principais causas sistêmicas do retardo provocado no processo de reparação tecidual (LEAL; CARVALHO, 2014).

É possível também que se classifique as feridas a partir de suas características. Assim, quanto à causa, pode-se afirmar que existem feridas cirúrgicas, causadas por incisão, excisão ou punção; ulcerativas; e traumáticas, causadas por fenômenos mecânicos, físicos ou químicos (MOURA *et al.*, 2014).

Já quanto ao conteúdo microbiano, é possível classificá-las como limpas, assim consideradas aquelas que estão em condições assépticas; limpas contaminadas, podendo ser consideradas somente as que não têm contaminação significativa, com tempo inferior entre o atendimento e o trauma de 6 horas; contaminadas, que são as que extrapolam o tempo de atendimento a 6 horas, não podendo haver sinal de infecção; e infectadas, quando se tem a presença de agente infeccioso ou, então, reação inflamatória intensa, com a presença ou não de patógenos (MOURA *et al.*, 2014).

Nas feridas infectadas, o tratamento assume importante relevância no meio médico, especialmente na prática cirúrgica, em uma época na qual o uso indiscriminado dos antimicrobianos vem dificultando o tratamento hospitalar dos pacientes, repercutindo, assim, no surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos. Para este fim, há várias terapias alternativas que vêm sendo testadas, estando dentre elas o uso tópico de substâncias com osmolaridade elevada, considerando-se o açúcar e seus derivados como agentes antimicrobianos e cicatrizantes (LEAL; CARVALHO, 2014).

As feridas decorrentes de neuropatia diabética geralmente estão associadas a alterações sensitivo-motora e autonômica que levam ao enfraquecimento muscular, alterações anatômicas e neurológicas periféricas dos pés. Essas feridas apresentam atraso no processo de cicatrização e decorrem de pequenos traumas que não são percebidos pelo diabético, devido à diminuição ou perda da sensibilidade dolorosa (SBD, 2017).

2.3 CICATRIZAÇÃO

Logo após uma agressão à continuidade da pele, desde superficial até profunda, processos específicos são desencadeados para promover a cicatrização e reparar o tecido lesado. Tal reestruturação da pele ocorre por mecanismos complexos,

em que vários fatores extrínsecos (frio, calor, umidade) ou intrínsecos (doenças crônicas, imunidade comprometida, nutrição) contribuem ou retardam a cicatrização. Muito embora se trate a reparação tecidual de um processo sistêmico, é preciso que se ofereça condições locais para tornar o processo fisiológico viável, o que se consegue com terapia tópica adequada. Para tanto, tem-se intensificado as pesquisas de produtos naturais capazes de auxiliar a cicatrização (COELHO, 2010).

O custo de um tratamento de feridas crônicas com deficiência de cicatrização, em associação com o envelhecimento populacional e com um significativo aumento na incidência de obesidade e diabetes em todo o mundo, faz com que se aumente a relevância dos estudos que são conduzidos em busca de curativos e medicamentos que possam interagir com o tecido lesado, objetivando acelerar o processo (VÊSCOVI *et al.*, 2017).

A cicatrização de feridas é um processo complexo, que abrange a matriz extracelular, sinais químicos e organização de células para a reparação do tecido. O tratamento de feridas é procedimento adotado para promover o rápido fechamento da lesão, buscando-se obter cicatriz esteticamente satisfatória e funcional (ALMEIDA *et al.*, 2018).

A regeneração do tecido é iniciada com a hemostasia por meio da vasoconstrição e formação de coágulo, fazendo com que o sangramento cesse. A hemostasia é obtida a partir da cascata de coagulação e das plaquetas (MEDEIROS, 2017).

A fase inflamatória tem o seu início logo após a lesão, momento em que são liberadas, pelas membranas celulares, substâncias de caráter vasoconstritor, especialmente prostaglandinas e tromboxano A₂. As plaquetas e o endotélio lesado estimulam a cascata da coagulação, desempenhando papel fundamental no processo de cicatrização (CAMPOS *et al.*, 2007).

Buscando-se a hemostasia, tal cascata tem o seu início, e há liberação de grânulos das plaquetas, sendo estas dotadas de fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), tromboxanos, prostaglandinas, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Seu mecanismo de atuação atrai neutrófilos à ferida. O colágeno, a trombina e as plaquetas atuam na formação do coágulo, servindo, também, como reservatório proteico para realizar a síntese de citocinas e de fatores de crescimento, maximizando os seus efeitos. Com isso, dá-se

início à resposta inflamatória com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo, assim, a quimiotaxia, que é a migração, para a ferida, de neutrófilos (CAMPOS *et al.*, 2007)

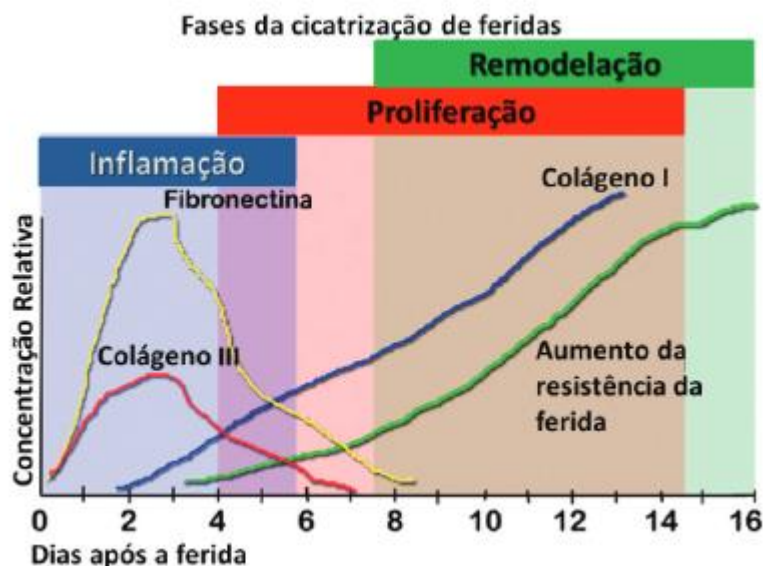
A fase proliferativa é a segunda fase do processo de cicatrização, ocorre entre o 3º e 10º dia, com extensão de até três semanas. Esta fase caracteriza-se pelo processo de deposição de colágeno, os macrófagos atraem os fibroblastos para produção de fibra de colágeno, elastina e proteoglicanos para reconstrução do tecido, que confere a resistência da ferida. Porém, a atividade dos fibroblastos depende de oxigênio e nutrientes, aminoácidos e vitamina C (PETZ, 2015).

Assim, outra característica da fase proliferativa é o crescimento de novos vasos sanguíneos denominado angiogênese, formação de tecido de granulação, no qual as células endoteliais dos capilares lesados aumentam a divisão mitótica e os capilares não danificados estimulam o crescimento das células. Dessa maneira, a angiogênese forma arcos nos capilares, fornece oxigênio e nutrientes e promove a proliferação capilar. Este conjunto de capilares é conhecido como tecido de granulação, composto por macrófagos, fibroblastos, colágeno e ácido hialurônico (BORGES *et al.*, 2008).

Por fim, a última fase chamada de maturação ou remodelamento tem como característica de maior relevância a deposição de colágeno de forma organizada, por esta razão é a mais importante sob o ponto de vista clínico. O colágeno que é inicialmente produzido apresenta-se mais fino do que aquele que está presente na pele normal, orientando-se em paralelo à pele (CAMPOS *et al.*, 2007).

Com o passar do tempo, contudo, o colágeno inicial, que é o colágeno tipo III, passa por um processo de reabsorção, sendo produzido um colágeno mais espesso (colágeno tipo I), que é organizado ao longo das linhas de tensão. Tais mudanças proporcionam aumento da força tênsil da ferida, revelando-se, assim, a reorganização da nova matriz, um processo de grande relevância para a cicatrização. Leucócitos e fibroblastos secretam colagenases que atuam promovendo a lise da matriz antiga. O processo de cicatrização é considerado exitoso, quando se consegue um equilíbrio entre a lise da matriz antiga e a síntese da nova matriz, sendo maior o sucesso quando a deposição também é maior. Contudo, mesmo após um ano de sua formação, a ferida ainda terá um colágeno menos organizado em comparação com o da pele integra, não retornando mais a 100%, atingindo aproximadamente 80% após três meses (CAMPOS *et al.*, 2007). As fases descritas acima estão simplificadas na Figura 1.

Figura 1 – Fases da cicatrização de feridas e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.



Fonte: ISAAC C, *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med (São Paulo)**. V. 89 n. 3/4, p. 25-31, jul - dez. /2010.

Além da idade, fator sistêmico que provoca a cicatrização tardia das lesões em função de alterações nas características da pele, outros aspectos podem alterar esse processo, como, por exemplo, em pacientes diabéticos (SILVA; ALMEIDA; ROCHA, 2014). Neles, a lentidão no processo de cicatrização de feridas é em razão da coexistência de diversos fatores, dentre eles, infecção bacteriana secundária, deformidade do pé, neuropatia periférica, doença arterial periférica, deficiências do sistema imunológico e hiperglicemia persistente (SILVA *et al.*, 2018; OZKAYA, 2019). Diante do orquestrado e complexo processo que é a cicatrização curativos inteligentes estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados com as mais diversas qualidades e características.

2.3.1 Tipos de Curativos utilizados na cicatrização

Em 1962 Winter publicava estudo afirmando que uma ferida necessita de um ambiente úmido e cobertura para obter sucesso na cicatrização mas por muitos anos e eventualmente nos dias de hoje ainda acredita-se que deixar as feridas expostas é benéfico à fisiologia da cicatrização.

Segundo Eberhardt *et al.* (2015), o tratamento de feridas cutâneas é bastante dinâmico, sendo determinado pela evolução das fases de reparação tecidual. Em seu estágio inicial realiza-se o tratamento clínico, especialmente com o uso de coberturas ou curativos. A intervenção cirúrgica, conforme os autores, somente é recomendado quando o tratamento se mostrar ineficaz ou com o surgimento de complicações mais graves onde não exista outra opção.

A escolha do curativo ideal é uma tarefa que exige conhecimento baseado na fisiopatologia relacionando com as funções inerentes à cada produto e ainda associado ao quadro sistêmico do paciente (SMANIOTTO *et al.*, 2012). A ampla busca por materiais que auxiliam no processo fez com que esse mercado apresentasse crescimento exponencial e o desenvolvimento de uma variedade considerável de produtos, diante dessa variedade a escolha acerca do melhor produto torna-se ainda mais difícil (LANDRISCINA; ROSEN; FRIEDMAN, 2015).

O produto ideal deve ser escolhido de modo que apresente capacidade de acelerar a cicatrização, manter um ambiente úmido, proteger da proliferação de patógenos, consiga absorver e drenar exsudato e auxilie na formação rápida de tecido de granulação. Essas propriedades podem ser traduzidas como eficácia, segurança e versatilidade, que juntas propiciam também o conforto do paciente, a facilidade de aplicação ou remoção, a segurança médica e a relação positiva do custo/benefício com o uso clínico do produto (SANTOS *et al.*, 2012). Curativos tradicionais como a gaze, amplamente utilizada nos serviços de saúde em virtude do baixo custo, apresenta diversas desvantagens como por exemplo: fácil aderência aos tecidos, propiciando a destruição de tecidos de regeneração e acúmulo de exsudato favorecendo proliferação de microrganismos.

Smaniotto *et al.* (2010) apresentam interessante quadro com a sistematização dos curativos inteligentes utilizados atualmente para o tratamento clínico das feridas, estando este retratado no Quadro 1.

Quadro 1 – Curativos utilizados no tratamento clínico de feridas sua composição, mecanismo de ação, indicação e desvantagens.

(Continua)

Curativos	Composição	Mecanismo de ação	Indicações	Desvantagens
Curativo não-aderente com silicone	Tela de poliamida com silicone	Livre fluxo de exsudato e remoção não traumática; proporciona meio úmido; possibilita menor número de trocas de curativo	Queimaduras parciais, áreas doadoras e receptoras de enxertos e lacerações	Não deve ser usado na presença de infecção e de grande quantidade de exsudato
Espuma polimérica com ou sem prata	Matriz de poliuretano e silicone com ou sem prata	Absorção com isolamento térmico; ação bacteriostática da prata; possibilita trocas menos frequentes	Feridas exsudativas, profundas, úlceras residuais com colonização bacteriana crônica pós-enxertia de pele	Não deve ser utilizado em feridas simples e secas
Hidrogel	Polímero de álcool de polivinil, poliácridamidas e polivinil	Mantém o meio úmido, promove a liquefação de materiais necróticos e desbridamento autolítico	Queimaduras e feridas com tecidos desvitalizados (esfacelos e necrose úmida)	Não deve ser usado na presença de infecção e de exsudato
Alginato de cálcio	Fibras de algas marinhas impregnadas com cálcio	O cálcio induz hemostasia; capacidade de absorver exsudatos; desbridamento autolítico	Feridas abertas exsudativas, cavitárias e com presença de sangramento	Não deve ser utilizado em feridas simples e secas
Carvão ativado com prata	Fibras de carvão ativado impregnado com prata 0,15%	O carvão ativado adsorve o exsudato e diminui o odor; e a prata possui função bacteriostática	Feridas fétidas, exsudativas e infectadas	Não deve ser usado em feridas simples e secas

Quadro 1 – Curativos utilizados no tratamento clínico de feridas sua composição, mecanismo de ação, indicação e desvantagens. (Conclusão)

Curativos	Composição	Mecanismo de ação	Indicações	Desvantagens
Malha com prata	Malha com sais de prata	Prata iônica causa precipitação de proteínas, agindo na membrana citoplasmática da bactéria (bacteriostática)	Feridas com infecção; queimaduras profundas e extensas	Não deve ser usada em pacientes com hipersensibilidade à prata

Fonte: Adaptado de: SMANIOTTO, P. H. D. S. *et al.* Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-626, jan. /2012.

2.3.2 Tipos de polímeros utilizados na cicatrização

Polímeros naturais tais como polissacarídeos e derivados (por exemplo, alginatos, quitosana, heparina e celulose), proteoglicanos e proteínas (por exemplo, colágeno, gelatina, fibrina, queratina) são amplamente utilizados no tratamento de feridas por apresentarem biodegradabilidade, biocompatibilidade, solubilidade em água, abundância, baixo custo, respeito ao meio ambiente e semelhança às macromoléculas que são geralmente reconhecidas pelo corpo humano (CAPANEMA *et al.*, 2018).

Devido os polissacarídeos apresentarem uma grande quantidade de grupos hidroxilas (OH) em sua composição leva a formação de pontes de hidrogênio intra e inter cadeias que por sua vez reduz a solubilidade formando agregados do composto, qualidade positiva na formação de filmes (RINAUDO, 2008).

Outra qualidade dos polissacarídeos é a sua capacidade de proteger fármacos, por esse motivo, esta amplamente sendo utilizado no campo da liberação controlada, enquanto o fármaco é liberado para desempenhar o papel esperado no organismo o polissacarídeo já esta sendo absorvido (MANJANNA; KUMAR; SHIVAKUMAR, 2010).

A quitosana é o segundo polissacarídeo biocompatível, biodegradável e bioativo mais encontrado na natureza, é proveniente do exoesqueleto de crustáceos, insetos entre outros. Já é utilizada comercialmente em curativos, hidrogéis, *scaffolds*, nanopartículas, por apresentar potencial cicatrizante onde a aderência de fibroblastos

ao curativo, favorece a proliferação de queratinócitos, ajudando na regeneração epidérmica e minimizando cicatrizes (JAYAKUMAR *et al.*, 2011).

Outro polissacarídeo amplamente utilizado é o alginato, proveniente de três espécies de algas marrons que se proliferam em regiões costeiras dos oceanos (COVIELLO *et al.*, 2007). Esse composto apresenta estrutura similar à de matrizes extracelulares de tecidos sendo a principal vantagem sua fácil modulação no desempenho de diversos papéis. O grande sucesso no tratamento de feridas crônicas ocorre devido sua capacidade de minimizar infecções bacterianas e promover ambiente úmido propiciando a efetiva cicatrização (LEE; MOONEY, 2012).

Entre várias alternativas de polímeros naturais como as citadas anteriormente, a celulose e seus derivados têm sido amplamente utilizada também como fonte natural para a produção de hidrogéis e compósitos em muitos campos, incluindo curativos, distribuição de medicamentos e engenharia de tecidos. A carboximetilcelulose (CMC) é um derivado de celulose com um grande número de grupos carboximetil no esqueleto da celulose, que tem sido amplamente utilizado como um ingrediente natural para hidrogéis principalmente devido a estas vantagens. A CMC foi desenvolvido para várias aplicações, incluindo engenharia de tecidos, administração de medicamentos, curativos e melhoramento de plantas. Em particular, na última década, uma nova classe de hidrogéis, denominada hidrogéis superabsorventes (SAP) baseados em polímeros naturais, como celulose e derivados, foi desenvolvida para aplicações biomédicas. Essencialmente, os hidrogéis SAP são polímeros tridimensionais reticulados hidrofílicos, lineares ou ramificados com a capacidade de absorver grandes quantidades de água, soluções salinas ou fisiológicas em comparação com materiais absorventes gerais. (CAPANEMA *et al.*, 2018)

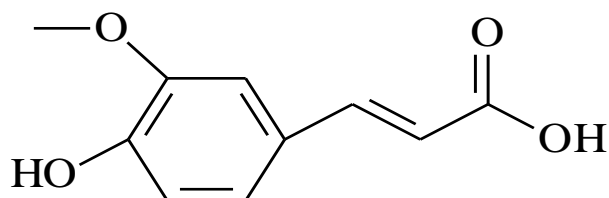
Em meio a tantos produtos obtidos pela modificação da celulose, a CMC, destaca-se pelas suas características solúveis e retentoras de água que conferem a este polímero um potencial cicatrizante quando em contato com uma ferida, visto que mantém um meio úmido em sua superfície, estimula a síntese do colágeno e acelera o crescimento e a migração das células epiteliais. (FERREIRA *et al.*, 2017)

2.4 O ÁCIDO FERÚLICO E SUAS PROPRIEDADES

O ácido ferúlico (AF) ou ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico (Figura 2) é um metabólito secundário mais comumente encontrado em grãos integrais, espinafre,

salsa, uvas, ruibarbo e sementes de cereais, principalmente trigo, aveia, centeio e cevada. A sua atividade antioxidante e as propriedades biológicas do AF são bem reconhecidas e estudadas. Em 1991, o método de preparação de AF proveniente do farelo de arroz em larga escala foi relatado por Taniguchi, Hayashi (1991). Este processo de produção em massa do AF facilitou o seu uso como matéria-prima para o desenvolvimento de alimentos funcionais, medicamentos e cosméticos. Anteriormente já foi relatada a atividade hipoglicêmica do AF em camundongos diabéticos induzidos por Estreptozotocina (STZ) (TANIGUCHI *et al.*, 2004).

Figura 2 – Estrutura molecular do ácido ferúlico (AF).



O AF pode ser encontrado amplamente no reino vegetal, dotado de efeitos terapêuticos úteis para o tratamento de doenças cardiovasculares e pulmonares, câncer e diabetes. Além disso, possui efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, fotoprotetores, neuroprotetores e hepáticos. Pode-se atribuir o potencial farmacêutico do AF à capacidade que ele possui de sequestrar radicais livres (PAIVA *et al.*, 2013).

Entretanto, em estudos recentes, verificou-se que o AF também possui propriedades farmacológicas com acentuada atividade antioxidante, servindo como um agente angiogênico aumentando a angiogênese tanto *in vitro* como *in vivo* através da modulação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator do crescimento derivado de plaquetas humanas (PDGF) e o fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) (GHAISAS *et al.*, 2014; ZDUŃSKA *et al.*, 2018).

Um dos papéis mais importantes dos ácidos fenólicos, é a sua atividade antioxidante, que depende principalmente no número de grupos hidroxila e metoxi ligado ao anel fenilo. O AF é mais facilmente absorvido pelo corpo e permanece no sangue por mais tempo do que qualquer outro ácido fenólico. O AF é considerado ser um antioxidante superior, tem baixa toxicidade e possui muitas funções fisiológicas, incluindo anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-arrítmico, e atividade antitrombótica.

Também tem demonstrado efeitos antidiabéticos e imunoestimulantes ajudando a reduzir o dano à células nervosas e pode ajudar a reparar células danificadas (ZDUŃSKA *et al.*, 2018).

O AF promove a proliferação de células endoteliais através da modulação da ciclina D1 e VEGF, esta relacionado ao aumento de plasma ao nível de insulina elevando a atividade e produção de glucoquinase e de glicogênio no fígado. Tem ainda atividade antiinflamatória, pois pode diminuir os níveis de respostas inflamatórias mediada pela expressão de Prostaglandina E2 (PGE2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), iNOS, atividade antimicrobiana e antibacteriana. (GHAISAS *et al.*, 2014)

Entre os primeiros eventos da doença de Alzheimer está o estresse oxidativo e a disfunção das mitocôndrias. O uso de antioxidantes naturais pode ser uma alternativa de sucesso no tratamento desta doença. Picone *et al.* (2009) estudaram nanopartículas lipídicas sódicas contendo AF aplicadas a células de neuroblastoma e identificaram diversos eventos benéficos da utilização do ácido como por exemplo modular uma proteína anti - oxidativa, a peroxirredoxina.

Nadal *et al.* (2016) utilizaram o AF através de dispersões sólidas (SDs) com o objetivo de melhorar seu potencial antioxidante e seu potencial de antiagregante plaquetário *in vivo*. Os resultados demonstraram efetividade propondo uma alternativa futura no tratamento de eventos trombóticos.

Panwar *et al.* (2016) revelaram que o AF é capaz de reduzir a atividade metabólica da *Candida albicans* ao desenvolverem nanopartículas de quitosana com ácido ferúlico. A nanoformulação foi capaz de reduzir quase 23% a mais da atividade do fungo quando comparada ao AF natural ou as nanopartículas livres de ativo.

Já em 2018, Panwar *et al.* apresentaram pesquisa onde foi desenvolvido através do processo de gelificação ionotrópica nanopartículas de quitosana contendo AF e aplicados via oral em ratos wistar em condições de saúde normais e diabetizados com STZ, os resultados apontam que este sistema pode ser efetivo pois houve a redução da hiperglicemia persistente, melhora no perfil lipídico apesar do ganho de peso dos ratos diabetizados.

Diante de todo o potencial terapêutico do AF já explorado e descoberto, torna-se de grande importância seguimento nas pesquisas em busca de novas descobertas e aplicações como é o objetivo deste trabalho.

2.5 UTILIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A nanotecnologia é uma ciência capaz de manipular a matéria à escala atômica e molecular, criando novos materiais e desenvolvendo novos produtos à escala nanométrica. Materiais e produtos com tamanhos desta ordem de grandeza geralmente exibem características funcionais únicas, não encontradas em matérias similares à escala macro (DELGADO, 2013).

As nanocápsulas têm em sua constituição um invólucro polimérico que é disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo-se ter o fármaco adsorvido à parede polimérica e/ou dissolvido neste núcleo, essa estrutura permite proteger o fármaco da degradação, conferindo a ele estabilidade física nos fluídos biológicos e durante o armazenamento, propiciando interessantes propriedades *in vivo*, como distribuição otimizada e diferenciada, a maior capacidade de transposição de barreiras biológicas e o aumento da sua absorção. Desse modo, tratam-se de estratégias de alto desempenho para o prolongamento da liberação do fármaco, potencializando, em consequência, o tempo de meia-vida nos compartimentos biológicos. (OPPENHEIM, 1981; ALLÉMAN *et al.*, 1993; SCHAFFAZICK, 2003)

Ainda, estudos demonstram que nanocápsulas poliméricas são capazes de evitar a permeação e o risco de absorção sistêmica de substâncias lipofílicas, como os filtros solares. Essa característica está relacionada ao fato de ser controlada a permeação cutânea e o maior tempo de retenção nas camadas superficiais da pele, devido à distribuição homogênea das nanocápsulas pela pele, bem como sua deposição nos folículos pilosos. (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Chu *et al.* (2010) utilizaram nanopartículas de fator de crescimento epidérmico humano recombinante (rhEGF) em feridas de ratos diabéticos e demonstraram que a liberação controlada de rhEGF acelerou o tempo de cicatrização estimulando a proliferação celular.

Li *et al.* (2016) promoveram a encapsulação da curcumina, que apresenta um grande potencial antioxidante, à fim de formar um hidrogel potente na cicatrização de feridas, os autores concluíram que a formulação desenvolvida promoveu aumento na formação de tecido de granulação, colágeno e angiogênese sendo assim um gel biocompatível.

Já Karri et al. (2016) utilizaram a curcumina impregnada em nanopartículas de quitosana promovendo uma melhor estabilidade e biodisponibilidade deste antioxidante natural na aplicação de feridas em ratos diabéticos. Em relação ao estudo in vivo sugeriram que os animais tratados com nanopartículas apresentaram uma retração da ferida mais eficiente.

Singla et al. (2017) em seu estudo mostraram que AgNP juntamente com nanocristais de celulose utilizados na forma de filme e pomada foram capazes de absorver água e promover atividade antibacteriana com grande eficiência sendo assim, uma boa opção para o reparo do tecido lesado.

Arafa; El – Kased e Elmazar (2018) produziram um gel termo resistente com nanopartículas de ouro e hidroxipropilmetilcelulose com propriedades antibacterianas capaz de promover uma melhor cicatrização em modelos de ratos que apresentavam feridas por queimadura.

Mohseni et al. (2019) desenvolveram dois filmes, de Policaprolactona (PCL) e Acetato de Polivinila (PVA), ambos impregnados com sulfatiazida de prata e AgNP em diferentes concentrações para avaliar a cicatrização. Ambos os filmes apresentaram resultados satisfatórios de atividade antimicrobiana. Em relação a cicatrização, demonstraram que os filmes desenvolvidos com AgNP apresentaram uma epitelização final extremamente superior aos demais filmes utilizados.

Shao et al. (2019) elaboraram uma membrana à base de quitosana impregnada com AgNP, estas partículas são altamente exploradas devido seu grande potencial antibacteriano, porém raramente apresentam efeitos para acelerar a cicatrização. Ressalta - se ainda no estudo que não existe um consenso sobre a eficácia e segurança na incorporação das AgNP diante da sua toxicidade.

Tendo em vista o potencial de cicatrização já comprovado com outros produtos encapsulados torna-se de extrema relevância esse estudo com o AF encapsulado a fim de avaliar seu benefício frente a cicatrização de feridas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma membrana de carboximetilcelulose contendo nanocápsulas com ácido ferúlico e aplicar em feridas de ratos diabéticos induzidos por Estreptozotocina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obter nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) contendo ácido ferúlico pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação), método já caracterizado anteriormente;
- 2) Caracterizar a membrana desenvolvida através de análises físico – químicas;
- 3) Realizar análises macroscópicas e histológicas sobre o efeito cicatrizante *in vivo* de uma membrana contendo nanocápsulas com ácido ferúlico, frente aos demais grupos de estudo;
- 4) Verificar possíveis alterações bioquímicas *in vivo* (Transaminase glutâmico oxalacética, transaminase glutâmico-pirúvica, ureia e creatinina) por meio de amostras de sangue;
- 5) Analisar a possibilidade de diferença estatística entre os dados obtidos de cada grupo.

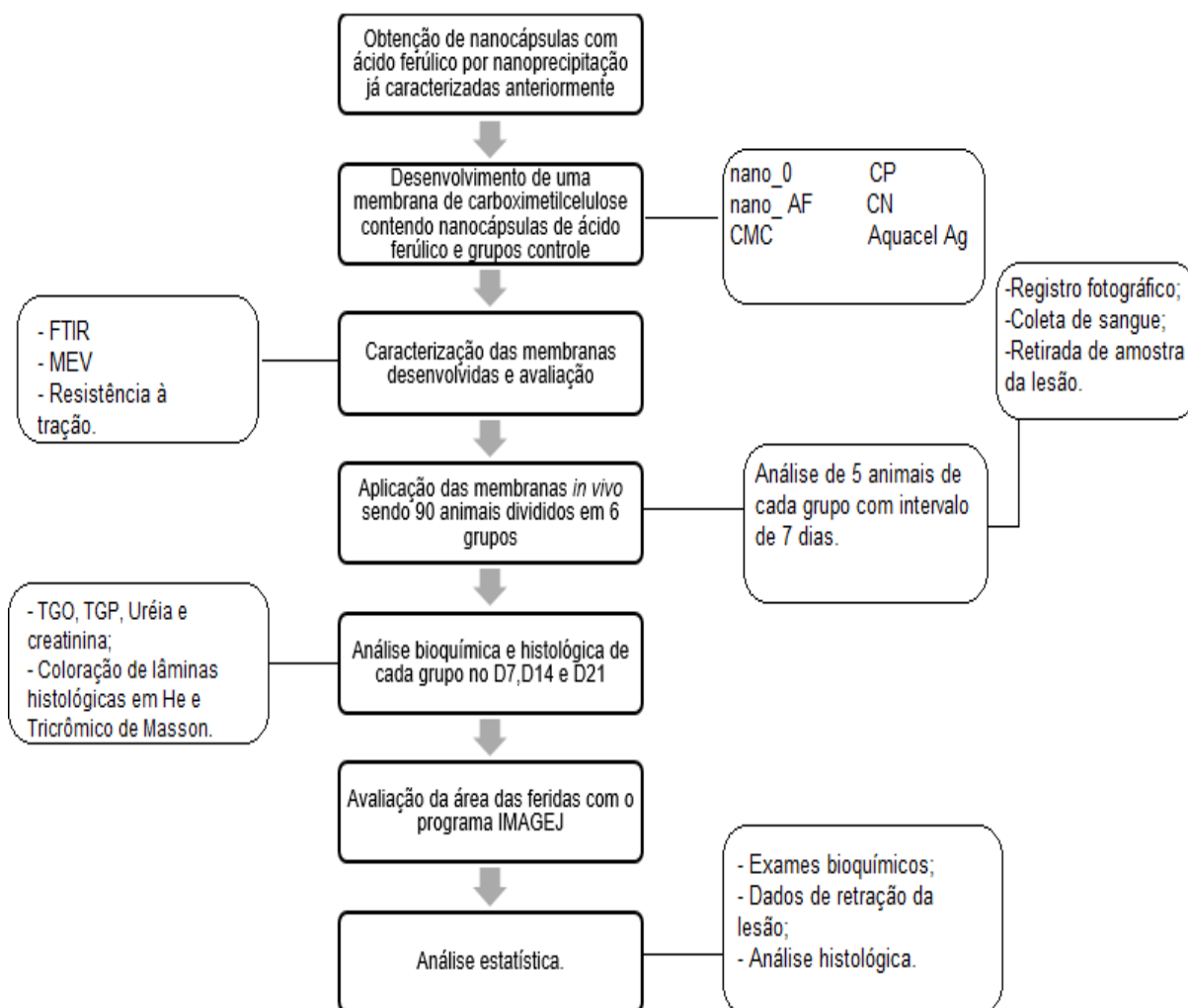
4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental desenvolvida entre os meses de abril de 2017 a maio de 2019 na Universidade Estadual de Ponta Grossa no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Inicialmente realizou-se o preparo das nanocápsulas com ácido ferúlico (nano_AF) e nanocápsulas livres de fármaco (nano_0) pelo método da deposição interfacil do polímero pré-formado. Utilizando carboximetilcelulose (CMC), produziu-se uma membrana capaz de incorporar as nano_AF e nano_0 e então se procedeu com a caracterização. As membranas com ambos os tipos de nanocápsulas foram avaliadas juntamente com mais 4 tipos de tratamento em lesões na região dorsal de 90 ratos divididos em 6 grupos. Os curativos foram aplicados e após 7 dias retirou-se de todos os animais deixando as lesões abertas. A avaliação da cicatrização ocorreu no 7^o, 14^o e 21^o dia de tratamento. Para a avaliação foi realizado imagens das lesões, coletas de sangue dos animais e retirada de fragmentos histológicos. Posteriormente os resultados obtidos foram comparados por softwares estatísticos. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma experimental referente as etapas desta pesquisa.



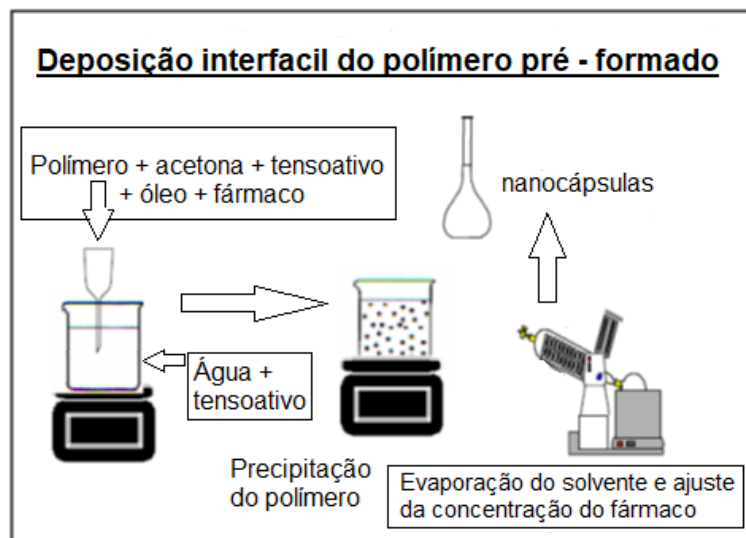
Fonte: A autora.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Obtenção das nanocápsulas

Para a obtenção das nanocápsulas de ácido ferúlico (nano_AF) e nanocápsulas livres de fármaco (nano_0) utilizou-se o polímero policaprolactona (PCL) e o AF e então preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 4) descrito por Fessi et al. (1989).

Figura 4 – Representação esquemática do método para obtenção de nanocápsulas nano_0 e nano_AF



Fonte: Adaptado de: SCHAFFAZICK, Scheila Rezende. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina**. 2006. 252f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

Para a fase orgânica foi solubilizado 0,10 g de PCL, 0,08 g de ácido ferúlico, 0,07 g de Span 80® e 0,30 g de triglicerídeos de ácido caprílico em 27 mL de acetona, com o auxílio de um agitador magnético aquecido à 40°C em temperatura controlada. A solução orgânica resultante foi gotejada por meio de uma bureta em 53 mL de água destilada com 0,077 g de Tween 80®, elementos que constituem a fase aquosa do processo. Após 10 minutos (min) do término do gotejamento, retirou-se a solução resultante e, então, a acetona foi eliminada da nanossuspensão sob pressão reduzida em rotaevaporador até 10 mL de volume final.

4.2.2 Caracterização

A caracterização das nanocápsulas impregnada nas membranas utilizadas neste estudo foi realizada anteriormente em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, elaborado por Bertocco (2014), e os dados foram utilizados com autorização prévia dos integrantes da pesquisa.

As nanocápsulas de PCL foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulação por meio de espectrometria na região do ultravioleta.

Realizou-se a determinação do pH em potenciômetro hidrogeniônico digital das formulações assim que produzidas e após 100 dias, à fim de avaliar a estabilidade química.

Determinou-se o diâmetro médio e o potencial *Zeta* com o auxílio do Zeta – sizer Nano Series. A amostra para determinar o diâmetro médio foi preparada realizando a diluição das nanopartículas em água deionizada 1:500 e para se determinar o potencial *Zeta*, a água deionizada foi substituída por uma solução salina 0,001%.

A morfologia das nanossuspensões contendo nano_0 e nano_AF, foi caracterizada, utilizando microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV – FEG) da TESCAN, modelo MIRA 3, Brno, República Checa, em aumentos de 20 a 200 kx. Uma fina camada da amostra foi depositada sobre o *stub* limpo e posteriormente recobertas com uma fita de ouro usando o equipamento de recobrimento (QUORUM Technologies Ltd, modelo SC7620, East Sussex, BN8 6BN, Reino Unido), durante 1 min e 10 mA.

Para realizar a análise de difração de raios X, as nanopartículas foram gotejadas sobre uma lamínula de vidro e secas em estufa à temperatura controlada, o processo foi repetido, em média, cinco vezes, até formação de um filme.

Outra avaliação foi na região do infravermelho utilizando espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da marca SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão, onde aproximadamente 4 mg de cada amostra foram depositadas em pastilhas de 196 mg de Brometo de Potássio (KBr) com a finalidade de avaliar interações moleculares através de alterações de banda.

Por fim, Bertocco (2014) realizou estudo de permeação *in vitro* do AF utilizando orelha de porco como uma membrana natural e uma solução tampão com pH 7,4 foram testadas as nanossuspensões nano_0 e nano_AF, bem como, o AF livre em concentrações equivalentes.

4.3 PREPARO DAS MEMBRANAS

Na formação das membranas de CMC, foi utilizada a massa de 4 g de CMC em um béquer com 200 mL de água purificada. Esta fase permaneceu em agitação magnética sob aquecimento de 60°C por aproximadamente 2 horas até a obtenção de um gel homogêneo. Após esta etapa, o gel foi degaseificado em banho de ultrassom por 30 min. Posteriormente, foi acrescentado 20 mL de uma solução reticuladora de

ácido cítrico à 10%. Após a adição, a solução foi novamente homogeneizada em agitação magnética a 200 rpm por 5 min. Em sequência, a mesma permaneceu em temperatura ambiente por 30 min. Para a formação das membranas de CMC 20 g do gel resultante foi depositado em placas de petri com 8 cm de diâmetro, e então permaneceram em estufa a 37°C por 48 h. Após a secagem, foram retiradas as membranas das placas de Petri e então foram armazenadas em papel alumínio, livre de exposição à luz e umidade, processo ilustrado na Figura 5. Esta membrana de CMC foi utilizada como controle frente as demais membranas no estudo *in vivo*.

Para as membranas contendo AF livre, realizou-se o mesmo processo anterior e 2 g do AF foram adicionados lentamente no gel resultante. Para as membranas contendo nano_AF e nano_0, ao invés da água purificada, o CMC foi dissolvido em 200 mL de nanosuspensão contendo as nanocápsulas, esta fase permaneceu em agitação magnética sob aquecimento de 60°C por aproximadamente 2 h até a obtenção de um gel homogêneo. Após esta etapa, o gel foi degaseificado em banho de ultrassom por 30 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 20 mL de uma solução reticuladora de ácido cítrico à 10 %. Após a adição, a solução foi novamente homogeneizada em agitação magnética a 200 rpm por 5 min. Em sequência, a mesma permaneceu em temperatura ambiente por 30 min. Para a formação das membranas de CMC 20 g do gel resultante foi depositado em placas de petri com 8 cm de diâmetro, e então permaneceram em estufa a 37°C por 48 h. Após a secagem, foram retiradas as membranas das placas de Petri e então foram armazenadas em papel alumínio, livre de exposição à luz e umidade.

Figura 5 – A) Solução para produção das membranas sob agitação magnética. B) Placa de petri com 20 g do gel de CMC. C) Armazenamento das membranas após retirar da estufa. D) Banho de ultrassom para degaseificar o gel.



Fonte: A autora.

4.4 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS DAS MEMBRANAS

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar as características das membranas, foi utilizado MEV com o aparelho MIRA3 TESCAN, com um aumento entre 100 – 200 x, à uma distância aproximada de 10 mm, aumentos maiores causaram danos à amostra.

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As amostras em forma física de pó foram impregnadas em pastilha de KBr e as amostras em forma de membrana foram adicionadas em pastilha de KBr e realizado a secagem em estufa por 36 horas para posteriormente realizar-se a avaliação. A leitura foi realizada no modo Transmitância com 64 scans/min⁻¹, resolução de 2 cm⁻¹ e o intervalo de 400 – 4000 cm⁻¹ em FTIR da marca SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão.

4.4.3 Testes de resistência mecânica à tração

No Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-Graduação (CIPP), utilizando o equipamento universal de testes mecânicos SHIMADZU AG – I (Figura 6), foram avaliadas as membranas de CMC livre e impregnadas com AF livre, nano_AF, nano_0. Todas os corpos de prova medindo aproximadamente 2 cm por 6 cm foram avaliados à uma velocidade de 12 mm/s. Antes da realização do experimento, fez – se a medição manual com paquímetro da espessura de todas as amostras.

Figura 6 – A) Equipamento universal de testes mecânicos. B) Corpo de prova no equipamento.



Fonte: A autora.

4.5 APLICAÇÃO *IN VIVO* DAS MEMBRANAS

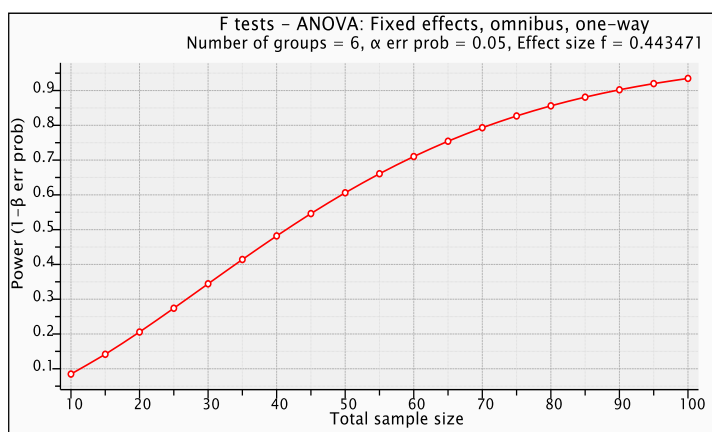
Para a realização do experimento *in vivo* o projeto desta pesquisa foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA/UEPG) e aprovado sob o nº do processo 040/2018 (Anexo A). Os protocolos foram conduzidos respeitando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sob a supervisão do Prof^o Dr. Leandro Lipinski.

4.5.1 Análise de cicatrização da lesão

O número da amostra foi calculado com base nos dados dos artigos de Castelo Branco Neto *et al.*, 2006 e Caetano *et al.*, 2014. Sendo adotado um nível de

significância de $p = 0,05$. Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder de teste em 95 %, usando o programa GPower 3.1.9.2 (Gráfico 1). Observou-se que com 90 animais a força estatística da pesquisa seria maior que 90%.

Gráfico 1 – Força estatística – ANOVA.



Fonte: A autora, 2017.

Os animais selecionados, ratos *Wistar* fêmeas, pesavam entre 180 e 280 gramas com tempo médio de vida entre 2 e 3 meses, os mesmos foram divididos em 6 grupos com tratamentos distintos conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos de tratamentos utilizados.

Grupos	Tratamentos
1	CMC
2	CMC + AF livre
3	CMC + nano_AF
4	CMC + nano_0
5	Controle Positivo (Aquacel Ag®)
6	Controle Negativo

Fonte: A autora, 2018.

Realizou-se a pesagem de todos os animais e então foi administrado STZ 40 mg/kg em todos os animais através de uma injeção intraperitoneal. Após 2 dias, verificou-se a glicemia capilar de todos os animais e constatou-se que os mesmos

ainda não estavam hiperglicêmicos. O procedimento de aplicação do medicamento foi repetido na dosagem de 20 mg/kg nesta segunda etapa.

Após, sob efeito de anestésico administrado via intraperitoneal, com cloridrato de cetamina a 2% (40 mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2 % (5 mg/kg), foi realizado a confecção da ferida na região dorsal com um molde medindo 2 cm x 2 cm, imediatamente realizou-se curativo com os tratamentos instituídos e aplicou-se bandagem elástica para garantir a permanência dos mesmos conforme Figura 7.

Figura 7 – Bandagem utilizada como cobertura secundária aos tratamentos



Fonte: A autora.

Ao término do procedimento, os animais foram transferidos para o biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa em condições ideais de abrigo e foram alojados em gaiolas individuais. Receberam água e ração habitual utilizada pela instituição sem interferência na dieta.

No 7º dia após o procedimento, retirou-se a bandagem com os curativos de todos os grupos em estudo. A membrana de CMC ganhou um aspecto de gel em contato com a umidade da ferida, as membranas de nano_AF, nano_O, AF livre, ficaram aderidas a lesão. O curativo comercial Aquacel Ag® estava saturado, mas não aderido e por fim o controle negativo que não recebeu tratamento algum apresentava aderência da bandagem utilizada como cobertura secundária, após a retirada das bandagens não ocorreu qualquer tipo de aproximação das bordas sendo que a cicatrização ocorreu por segunda intenção.

Todas as lesões foram fotografadas no 1º dia após a confecção e em cada dia de eutanásia com distância padronizada e a mesma câmera.

4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Nos dias 7, 14 e 21 foram coletadas amostras de todos os animais. Para este procedimento os animais foram anestesiados com isoflurano por via inalatória. Para a análise foi coletado entre 2 a 5 ml de sangue através de punção pericárdica e acondicionados em tubos *falcons* devidamente identificados, posteriormente as amostras foram centrifugadas para a separação do plasma e elementos do sangue e acondicionadas em freezer -4°C. Ao término da pesquisa, as amostras foram encaminhadas ao laboratório escola da UEPG para avaliar transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), ureia e creatinina individualmente com o objetivo de avaliar possíveis danos hepáticos e renais decorrentes do produto desenvolvido.

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.7.1 Hematoxilina - eosina

Nos dias 7, 14, e 21 após parada cardio - respiratória confirmada, retirou - se fragmentos da lesão com auxílio de lâmina de bisturi, no D7 devido ao tamanho da lesão retirou-se metade do tecido e no D14 e D21 como a maioria das feridas já apresentavam diminuição significativa do tamanho optou-se por retirar a lesão inteira. Após a retirada os fragmentos de pele os mesmos foram armazenados em formol 10%, cortadas e acondicionas em cassetes. Ao término do experimento as amostras foram encaminhadas para um laboratório profissional de Patologia onde ocorreu a confecção e coloração das lâminas em Hematoxilina – eosina (HE). As lâminas foram analisadas em ordem aleatória sem identificação apenas enumeradas aleatoriamente à fim de evitar viés. Os cortes histológicos foram analisados por treze características distintas de cicatrização com scores padronizados. Por fim, após análise foi selecionado uma lâmina de cada grupo nos dias 7,14 e 21 para realização de fotomicrografias com microscópio Olympus BX41.

4.7.2 Tricrômio de Masson

Esta coloração foi utilizada para avaliações referentes ao tipo de colágeno existente em cada fase de cicatrização e grupo de tratamento. O método de coleta das amostras seguiu o mesmo da coloração anterior. As lâminas foram preparadas

no mesmo laboratório profissional terceirizado, porém, a desparafinização e coloração foram realizadas no laboratório de histologia do curso de Odontologia da UEPG, com kit comercial WCOR[®], sob a supervisão do Prof^o Dr. Eduardo Campagnoli.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por meio do programa ImageJ[®], todas as imagens registradas durante o procedimento experimental foram medidas no programa e os valores resultantes das áreas foram comparadas utilizando ANOVA, seguida de pós – teste de Tukey.

Após a obtenção dos resultados bioquímicos, os valores foram avaliados pelo teste de Kruskal – Wallis à fim de avaliar a distribuição e então sofreram análises múltiplas por ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

Os testes estatísticos foram realizados com os programas Graph Pad Prism[®] versão 7 e SPSS.

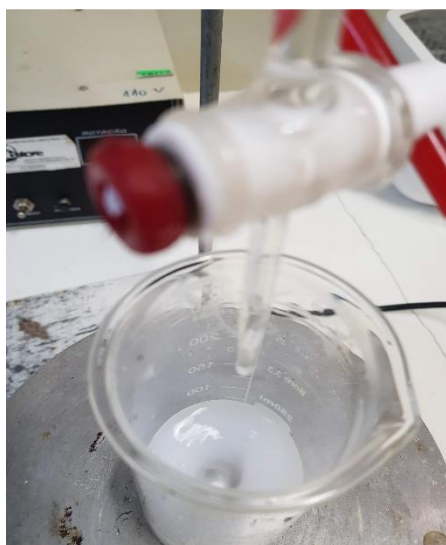
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO

5.1.1 Obtenção das nanocápsulas

O método de deposição interfacial de polímero (nanoprecipitação) aplicado se mostrou adequado no preparo das nanocápsulas. Imediatamente após adicionar a fase orgânica sobre a fase aquosa, todas as formulações se tornaram opacas, leitosas e azuladas conforme mostra a Figura 8, sendo uma característica originada no efeito Tyndall que resulta da reflexão de luz pela formação das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 8 – Formulação para obtenção das nanocápsulas, efeito Tyndall.



Fonte: A autora.

5.1.2 Caracterização

Segundo Bertocco (2014), a nanoformulação caracterizada apresentou uma eficiência de encapsulação (EE) de 80%.

O pH manteve-se praticamente inalterado quando comparado do dia 0 até 100 dias após a produção, tanto das nano_0 quando nano_AF. O AF acidificou levemente a formulação.

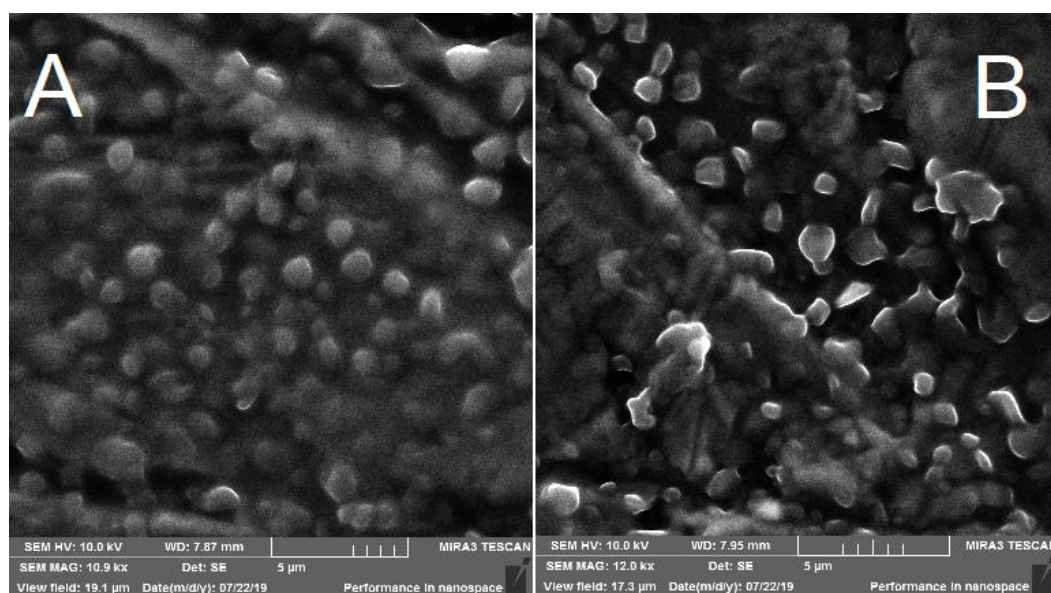
As partículas obtidas nano_0 apresentaram um diâmetro médio (nm) e potencial *Zeta* (mV) aproximado de 380 nm e -51 mV, enquanto as nano_AF aproximadamente 200 nm e -32 mV.

Fotomicrografias obtidas das nano_0 e nano_AF demonstraram a existência das mesmas em dimensões manométricas, conforme Figura 9.

Quanto a análise na região do infravermelho as bandas encontradas comprovam a encapsulação do fármaco devido as formulações nano_0 e nano_AF apresentarem uma mesma banda característica.

A avaliação *in vitro* trouxe evidências que a encapsulação do fármaco é capaz de atravessar barreiras cutâneas proporcionando uma liberação lenta. A formulação de nano_AF apresentou um total de aproximadamente 34 % de permeação cutânea e aumentou no decorrer do tempo do teste, o fármaco livre disperso em um gel de hidroxietilcelulose ao final de 12 horas havia permeado apenas 0,50 %.

Figura 9 – Fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Nanocápsulas de Ácido Ferúlico, aumento de 10.9 kX. B) Nanocápsulas livres de fármaco, aumento de 12 kX.



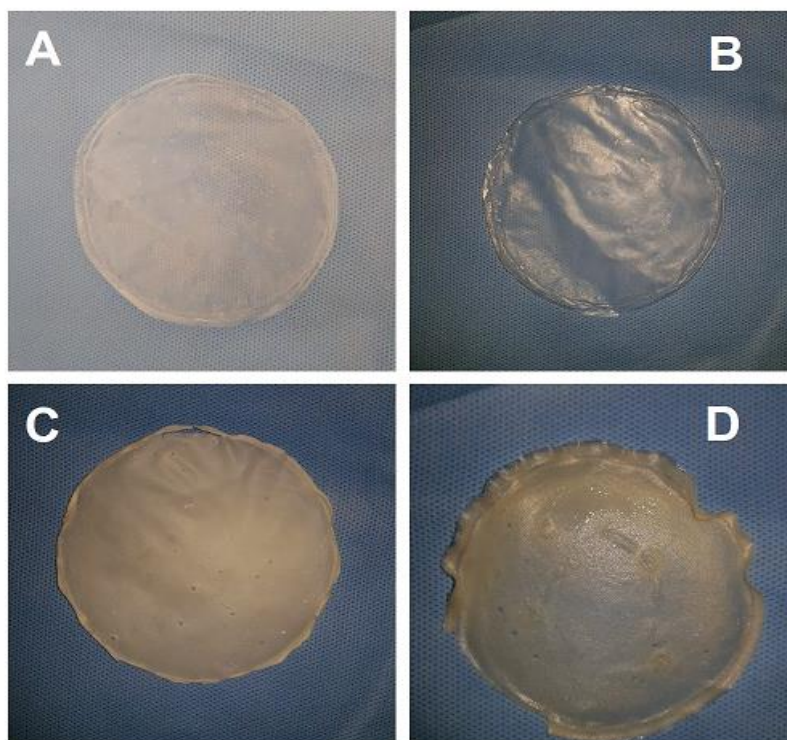
Fonte: LABMU – UEPG.

5.2 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICA DAS MEMBRANAS

As membranas de CMC desenvolvidas estão ilustradas abaixo na Figura 10. Quanto as características macroscópicas as membranas nano_0, nano_AF e AF livre apresentaram coloração esbranquiçada, de característica plástica, porém não resistente a deformação. A membrana de CMC apresentou-se transparente plástica,

resistente a deformação e com menor espessura. Quando em contato com a lesão, as membranas ganharam aspecto de gel.

Figura 10 – A) Membrana nano_0, B) Membrana CMC, C) Membrana AF livre, D) Membrana nano_AF.

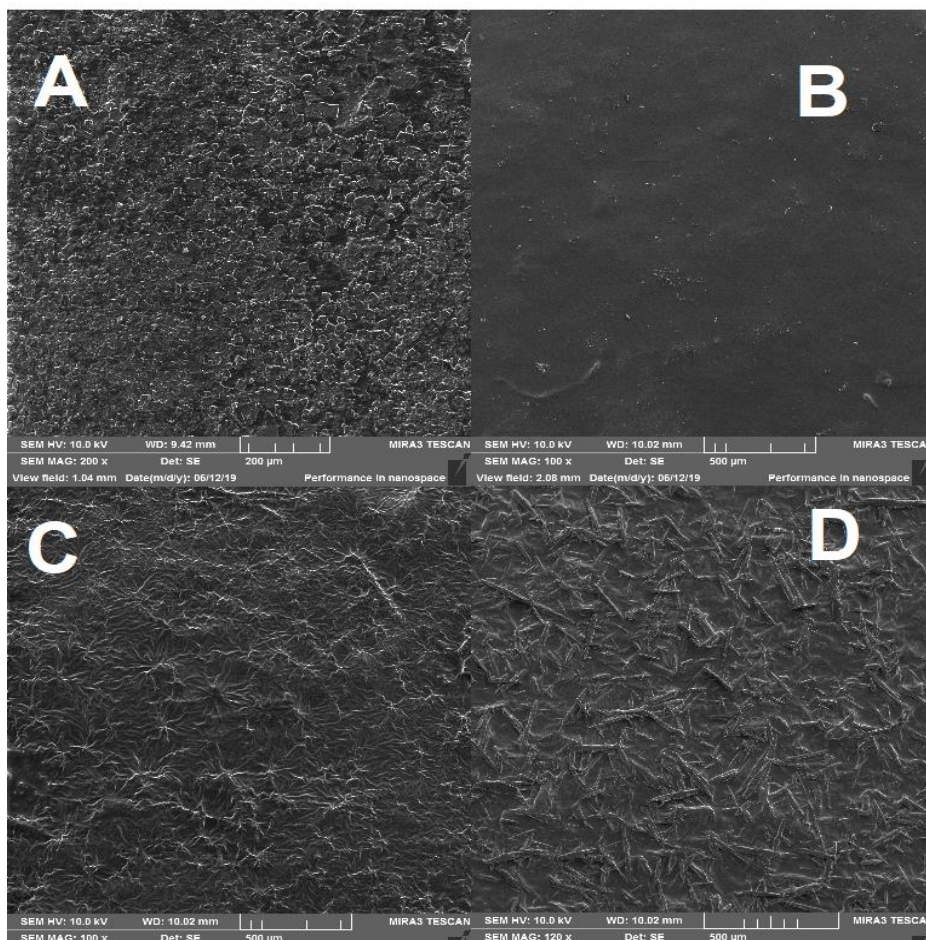


Fonte: A autora.

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação por MEV demonstrou que as membranas apresentam uma distribuição uniforme dos compostos (Figura 11), não foi possível obter imagens das nanocápsulas impregnadas na amostra devido ocorrer danos com a aproximação do aparelho.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura das membranas desenvolvidas, aumento entre 100 e 200x. A) CMC+ nano_0. B) CMC. C) CMC + nano_ AF. D) CMC + AF livre.



Fonte: LABMU – UEPG

5.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para o AF livre (pó) foi possível detectar vibração de estiramento OH em 3346 cm^{-1} . Em 3015 a 3078 cm^{-1} há vibrações de estiramento que corresponde as ligações C = C e C – H. O grupo C – C está presente nas bandas 2969 e 2941 cm^{-1} . A ocorrência de uma banda em 2840 cm^{-1} corresponde ao grupo O – CH₃. Em 1691 cm^{-1} apresenta-se a carbonila do ácido carboxílico. Por fim, entre 1589 a 1620 cm^{-1} corresponde à uma vibração de alongamento C = C de anel aromático. Dados muitos semelhantes foram descritos por Panwar *et al.* (2018), Nadal *et al.* (2016).

Quanto ao PCL é possível encontrar vibrações de estiramento de ligação C – C em 2948, 2899 e 2865 cm^{-1} e a presença em 1729 cm^{-1} de carbonila de éster (Gomes, 2015).

Para a CMC foi apresentado no espectro vibrações de estiramento OH na banda 3441 cm^{-1} , entre as bandas 2930 e 2879 cm^{-1} encontra-se os alongamentos das ligações C – C e O – CH₃. Em 1606 cm^{-1} está presente uma carbonila de ácido carboxílico (SIDDHANTA *et al.*; 2011; LAKSHMI; TRIVEDI; REDDY, 2017; WONG; RAMLI, 2014).

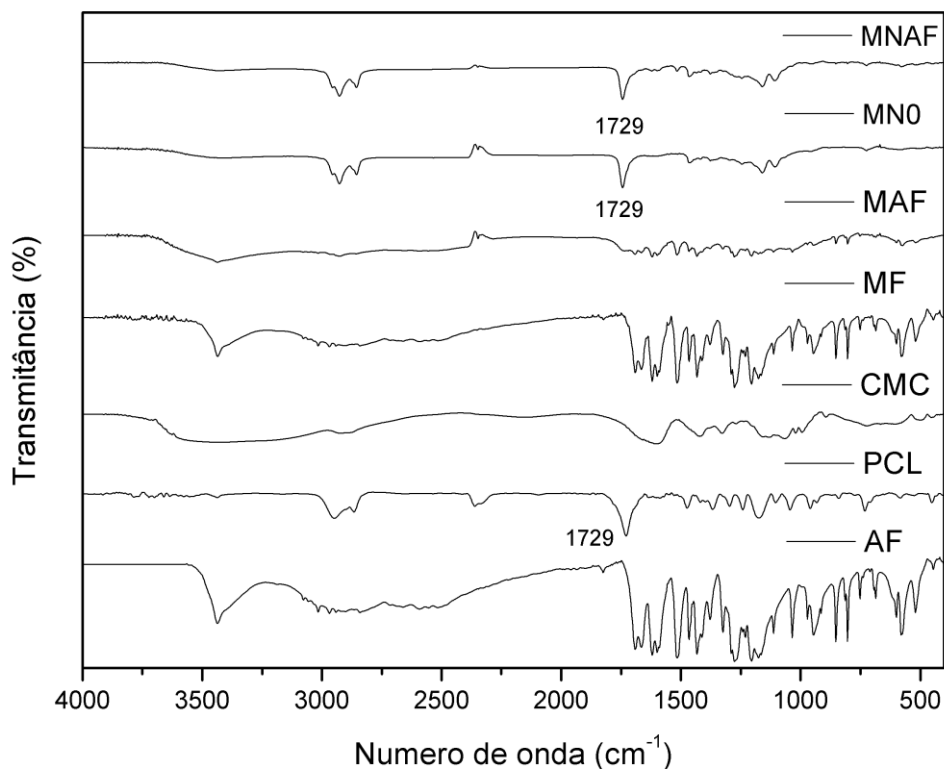
Ao analisar o espectro das membranas de CMC incorporadas com nano_AF e nano_0 observa-se as mesmas vibrações de estiramento em 1729 cm^{-1} correspondente a PCL e em 3441 cm^{-1} sinais indicativos da CMC.

Através do espectro obtido da mistura física (MF) de CMC e AF quando comparados isoladamente é possível verificar que não há interação entre eles pois no espectro obtido da MF contempla a banda de ambos.

É possível comprovar através do espectro da membrana de ácido ferúlico (MAF) que não há interações entre o fármaco, polímero e CMC pois ambos são semelhantes à mistura física.

As membranas impregnadas com nanocápsulas de ácido ferúlico e nano zero representada no espectro por MNAF e MN0 respectivamente, são muito semelhantes ao espectro do PCL e não há presença do fármaco livre o que comprova a sua encapsulação. Em menor intensidade observa-se presença da CMC em ambas as membranas, sua diminuição pode estar relacionada à maneira como as amostras foram preparadas predominando as nanocápsulas. Os dados descritos acima estão representados a seguir (Figura 12).

Figura 12 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das membranas com nano_0, nano_AF, ácido ferúlico livre, mistura física (AF+CMC), CMC, PCL e AF em pó.



Fonte: A autora.

5.2.3 Testes de resistência mecânica à tração

Antes da realização dos testes de tração foi verificado a espessura de cada corpo de prova com um paquímetro. A tabela 2 contempla a avaliação de espessura das membranas desenvolvidas.

Tabela 2 – Espessura das membranas de cada grupo.

Grupos	Espessura (mm)
CMC	0,05
CMC + AF	0,10
CMC + nano_0	0,25
CMC + nano_AF	0,13

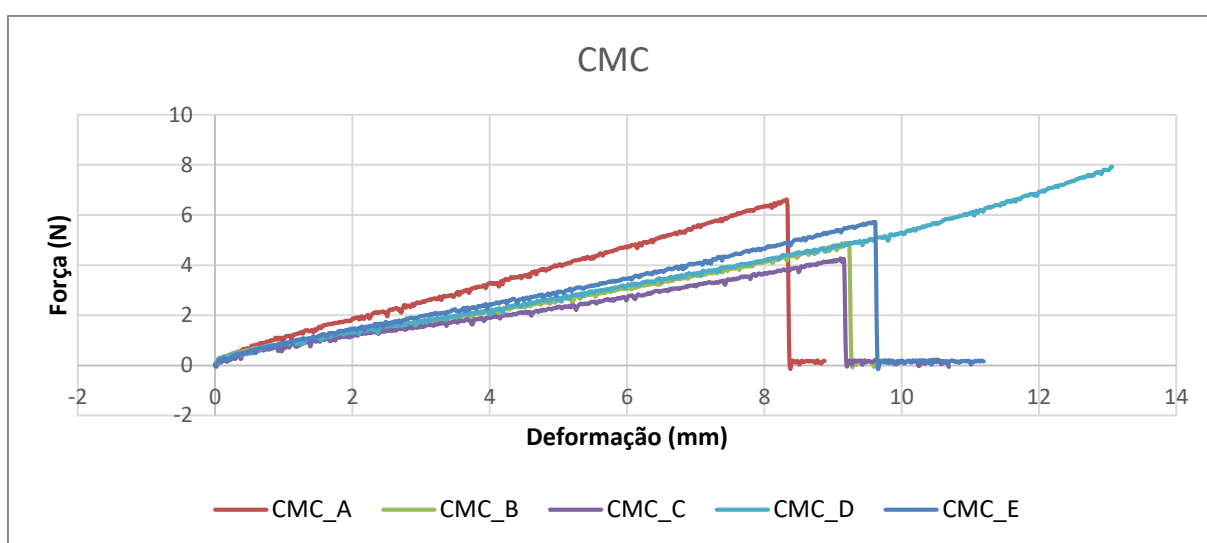
Fonte: A autora.

Bueno (2015b), desenvolveu membranas de quitosana e alginato entre 0,08 a 0,50 mm de espessura e considerou adequado conforme descrito em outras literaturas. Não há concordância da espessura ideal para um curativo. Assim, as

espessuras das membranas desenvolvidas neste trabalho também podem ser consideradas adequadas para aplicação dérmica.

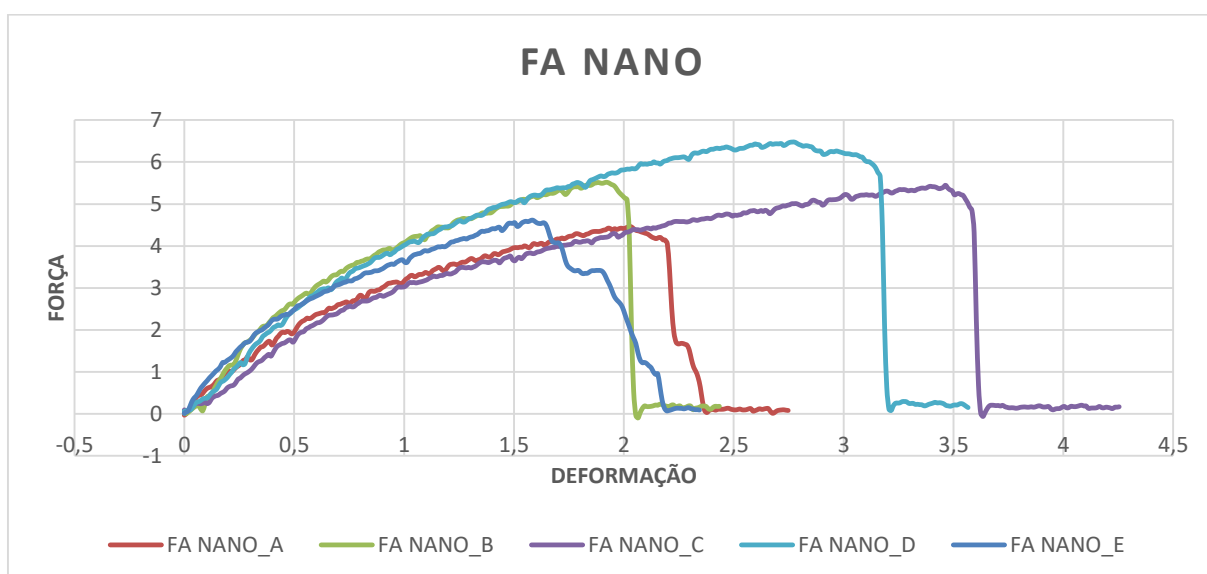
Para um curativo ser ideal ele deve possuir boas propriedades de elasticidade, resistência e plasticidade quando em contato com a pele. Abaixo está representado os gráficos dos testes de ruptura com cinco corpos de prova para cada membrana (Gráfico 2, 3, 4, 5) e gráficos referente à Força máxima, tensão máxima e deformação máxima (Gráfico 6, 7, 8).

Gráfico 2 – Espessura das membranas de cada grupo.



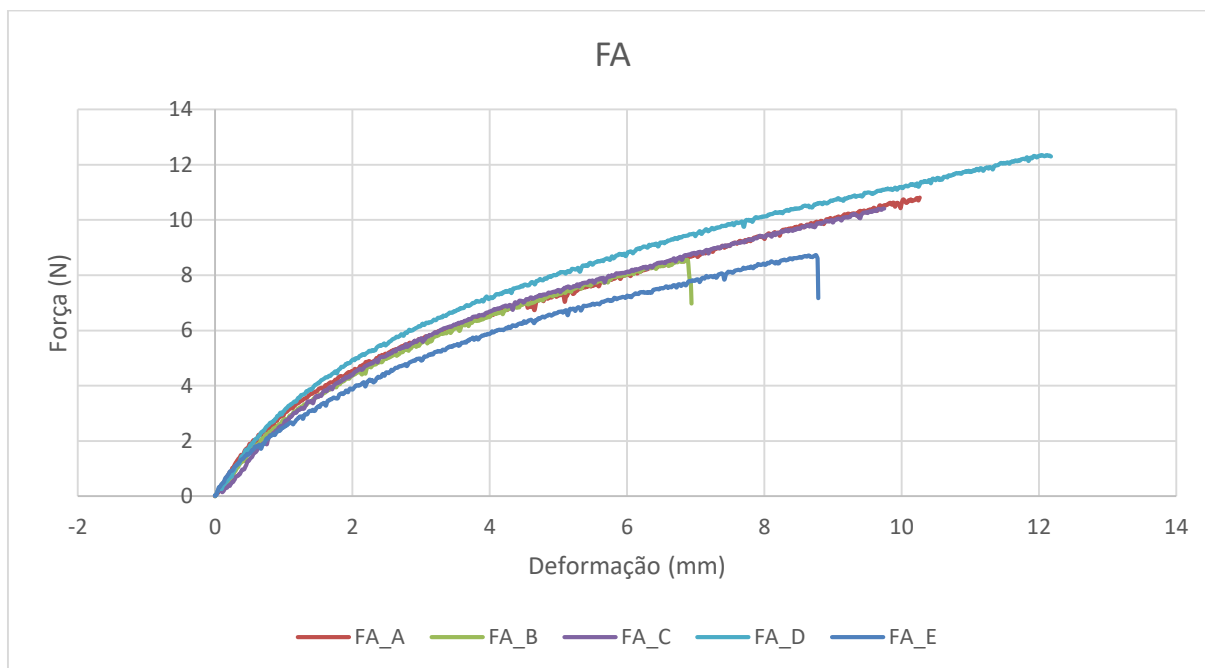
Fonte: A autora.

Gráfico 3 - Resistência mecânica à tração da membrana contendo nanocápsulas de AF.



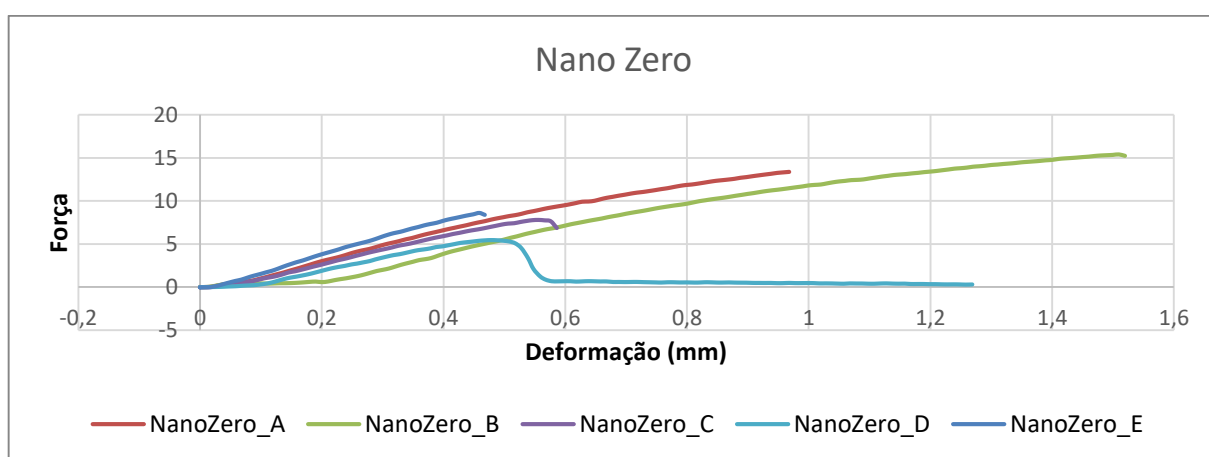
Fonte: A autora.

Gráfico 4 – Resistência mecânica à tração da membrana de AF livre.



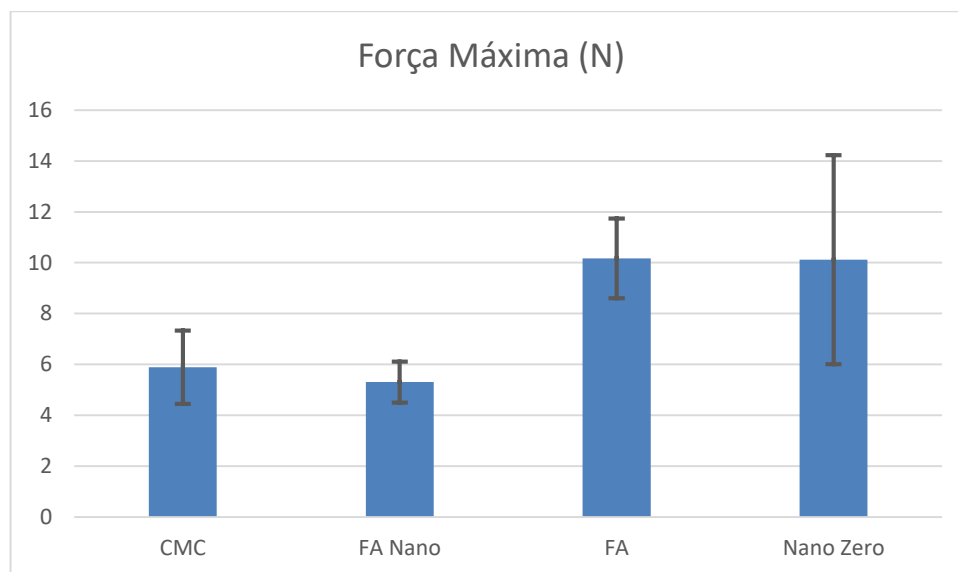
Fonte: A autora.

Gráfico 5 - Resistência mecânica à tração da membrana contendo nanocápsulas livres de fármaco.



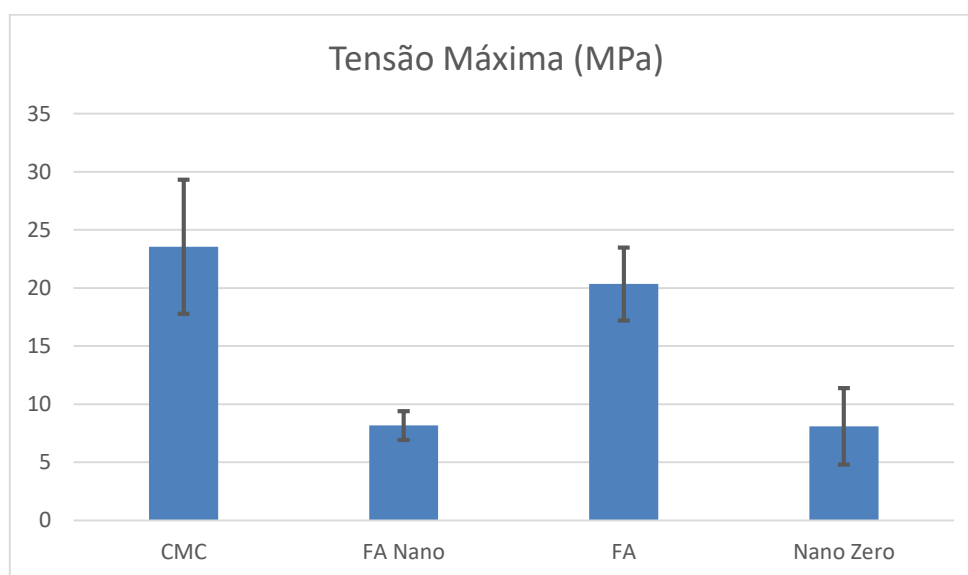
Fonte: A autora.

Gráfico 6 – Força expressa em Newton (N) suportada por cada tipo de membrana.



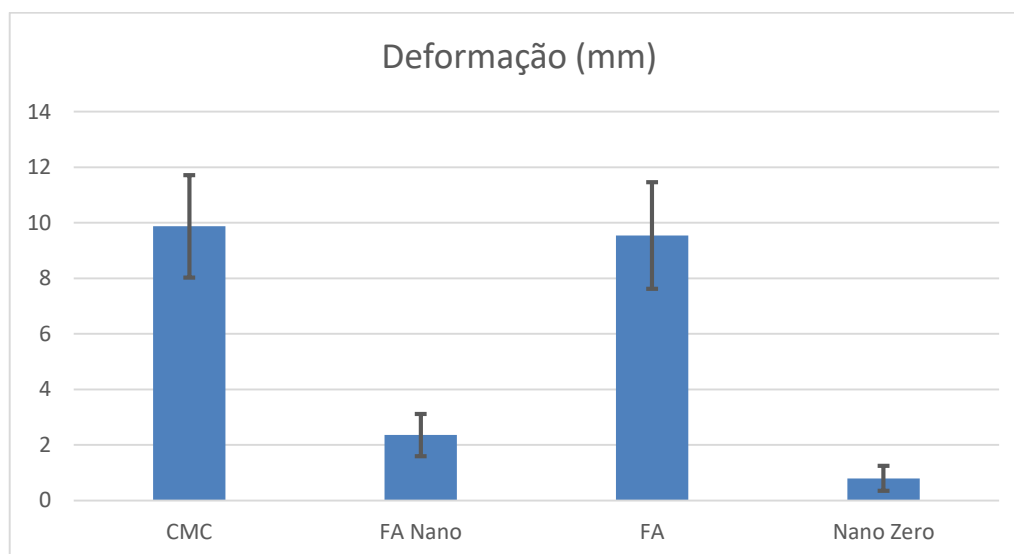
Fonte: A autora.

Gráfico 7 - Tensão máxima suportada por cada tipo de membrana em MPa.



Fonte: A autora.

Gráfico 8 - Deformação máxima para cada tipo de membrana em mm.



Fonte: A autora.

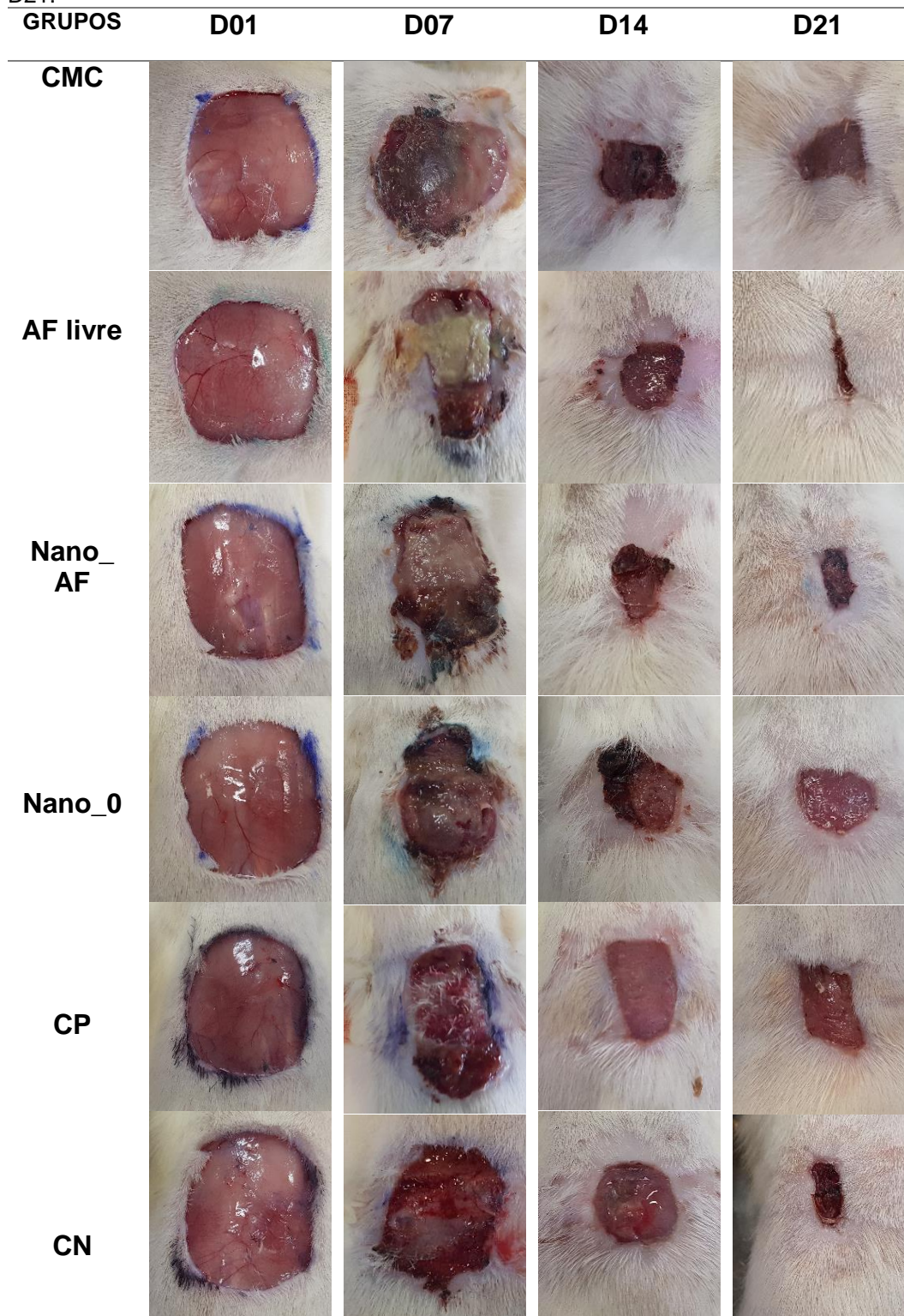
Com base nos dados obtidos, podemos considerar que as membranas do tipo CMC e FA são as melhores devido suportarem tensões maiores e próximas, considerando a faixa de incerteza. Além disso, apresentam deformações bem próximas. A membrana nano_AF apresentou uma deformação média muito baixa, o que deixou a tensão suportada abaixo dos outros tipos. Também, a nano_AF alcançou a tensão de ruptura mais facilmente. A nano_0, apesar de suportar uma força elevada, o desvio padrão entre as medições das amostras foi muito grande, o que leva a uma incerteza muito grande. Além de quase não apresentar deformação. Esses eventos eram esperados devido a porosidade destas membranas e ainda podem ser justificados devido as membranas nano_0 e nano_AF se apresentarem mais oleosas o que interferiu expressivamente nas avaliações realizadas pelo equipamento. Apesar da CMC apresentar uma tensão levemente superior à do tipo AF, a AF suportou uma maior força, sendo assim considerada a mais resistente para a aplicação. A propriedade ideal para um curativo pode variar com a região do corpo à ser aplicado e, portanto, não há na literatura um consenso acerca das propriedades mecânicas ideais. Sabe-se que os valores de resistência da pele normal, varia de 2,5 a 16 MPa (WANG *et al.*, 2002). Assim consideramos que o AF pode ser utilizado em membranas de CMC, porém quando encapsulado necessita de maiores estudos à fim de aperfeiçoar suas propriedades mecânicas.

5.3 APLICAÇÃO *IN VIVO* DAS MEMBRANAS

5.3.1 Análise de cicatrização da lesão

As imagens das lesões na Figura 13 estão organizadas em ordem cronológica para cada grupo de tratamento.

Figura 13 – Imagens de regressão das feridas dos seis grupos de tratamentos nos D01, D7, D14 e D21.



Fonte: A autora.

Ao analisar as lesões macroscopicamente observa-se que no D07 o grupo tratado com AF livre apresenta fibrina no leito da ferida, os grupos CP e CN apresentam tecido de granulação vivo e sangramento em pequena intensidade, já os demais grupos apresentaram escurecimento da lesão. Segundo Kierszenbaum (2004), nesta fase ocorre a hemostasia com a ação dos leucócitos e inicia-se a complexa cascata para o reparo tecidual onde primeiramente ocorre a redução do fluxo sanguíneo por vasoconstrição após com o extravasamento de sangue as plaquetas rapidamente são ativadas à fim de promover uma rápida homeostasia no tecido lesionado. Juntamente com as plaquetas outros fatores são ativados como o fibrinogênio para que este reparo seja efetivo o mais rápido possível.

No D14 todos os grupos apresentaram redução visível no tamanho da lesão sendo que os grupos controle negativo e positivo apresentam um tecido de granulação claro sem crostas. Nos demais grupos há presença de crostas e escurecimento da lesão. Acredita-se que nesta fase ocorre a migração e proliferação de fibroblastos juntamente com novos elementos da matriz extracelular, sendo que os fibroblastos sintetizam e são a maior parte constituinte da matriz extracelular. Na derme eles possuem função de extrema importância na produção de colágeno (SINGER; CLARK, 1999; KIERSZENBAUM, 2004). Os miofibroblastos começam a surgir, pois, no início da formação do tecido de granulação, sendo então formados pela ativação dos fibroblastos, tornando-se mais abundantes na fase de proliferação, desaparecendo possivelmente por apoptose (DARBY *et al.*, 2014). Ao término dos 21 dias de tratamento visualmente o ácido ferúlico livre e nano_AF apresentaram uma área de retração (AR) satisfatória. A contração da ferida se dá por meio de um movimento centrípeto de toda a espessura que circunda a pele, reduzindo, assim, progressivamente, o tamanho (CAETANO *et al.*, 2014).

Para o cálculo da área de retração (AR) das lesões foi realizado a transformação das áreas em porcentagem e posteriormente aplicou-se em fórmula descrita abaixo, sendo que AR final foi expressa em porcentagem.

Fórmula da área de retração final das feridas após tratamento.

$$AR = \frac{Ai - Af}{Ai} \times 100$$

AR – Área de Retração
Ai – Área inicial
Af – Área final

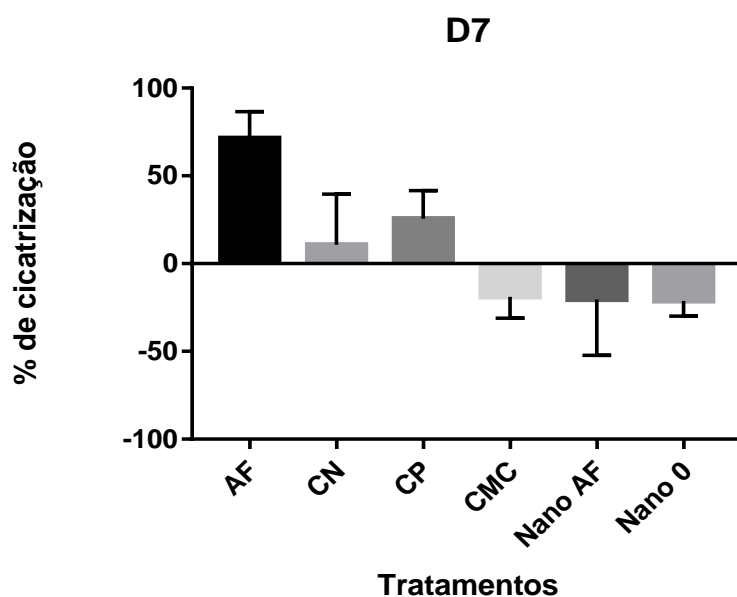
Após o cálculo da porcentagem de AR de todos os animais, utilizando software estatístico, obteve-se o gráfico dos D7, D14 e D21.

No 7º dia os grupos CMC, nano_AF, nano_0 apresentaram aumento na área da lesão (Gráfico 9), dentre os fatores que podem explicar tal fato é o excesso de umidade que ocasiona maceração das bordas e possivelmente favoreceu a proliferação de patógenos. Silva et. al. (2017) em sua revisão aponta que um dos motivos no atraso da cicatrização é a proliferação de patógenos. O grupo que apresentou melhor desempenho na primeira semana, foi o tratado com AF livre.

Como citado anteriormente o ácido ferúlico é um agente angiogênico pois é capaz de realizar a modulação do VEGF e PDGF, ambos os fatores estão presentes durante a fase inflamatória da cicatrização que ocorre nos primeiros dias após a agressão ao tecido. O PDGF promove a proliferação de fibroblastos diferenciando para miofibroblastos e realiza a degradação do colágeno tipo I e síntese do colágeno tipo III, já o VEGF é um potente fator angiogênico produtor de macrófagos e queratinócitos (ISAAC *et. al.*, 2010). Assim, com a modulação destes fatores produzido pelo AF pode-se explicar o desempenho superior obtido na primeira semana deste grupo.

Outro fator que pode ter auxiliado na cicatrização explica-se por espectroscopia pois as bandas obtidas da mistura física entre AF e CMC há uma grande semelhança nas características das bandas obtidas do AF isolado. Portanto, acredita-se que o potencial higroscópico do CMC foi reduzido quando em contato com o AF livre que é hidrofóbico.

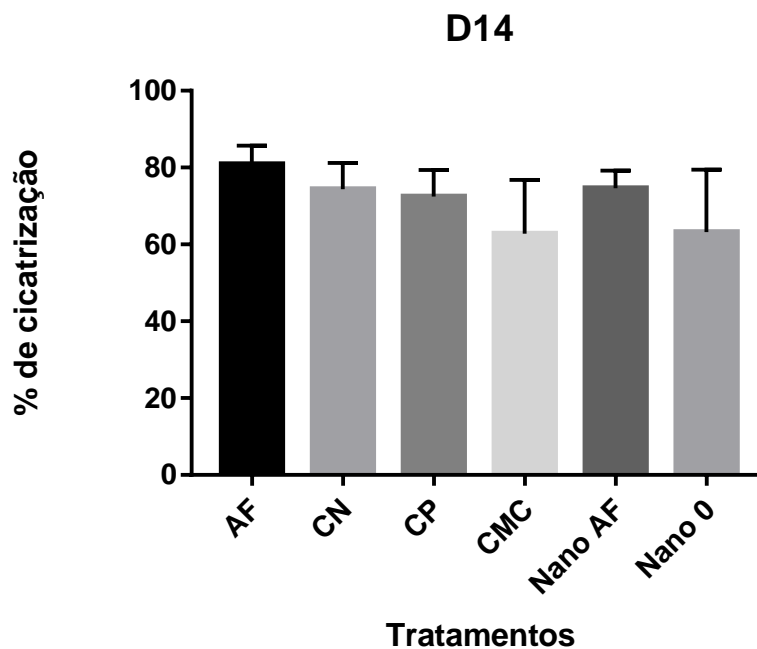
Gráfico 9 - Porcentagem de cicatrização das feridas para cada grupo no D7.



Fonte: A autora.

Ao 14^o dia todas as lesões apresentaram retração significativa, porém sem diferença estatística significativa entre os grupos, sendo que o grupo AF livre permaneceu com o melhor desempenho. O tratamento nano_AF também apresentou regressão satisfatória, segundo Mohsemi *et al.* (2019) a PCL, polímero utilizado na produção das nanocápsulas, apresenta nanofibras com componentes antimicrobianos podendo ter auxiliado na cicatrização dos grupos tratados com nanocápsulas nesta segunda semana de tratamento. O grupo CMC apresentou o pior desempenho (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Porcentagem de cicatrização das feridas para cada grupo no D14.

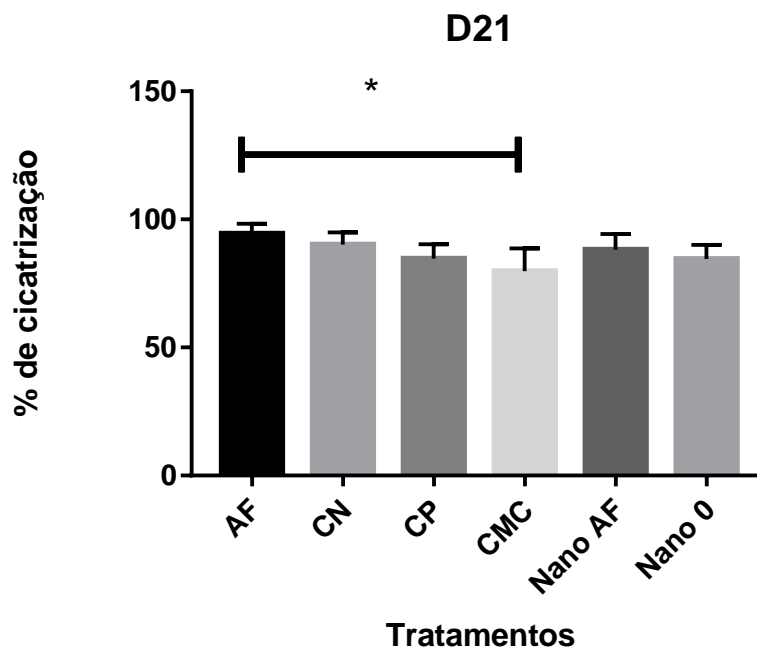


Fonte: A autora.

No 21º dia a retração do grupo AF foi estatisticamente significativo em relação ao grupo tratado somente com CMC. Os demais apresentaram desempenhos semelhantes (Gráfico 11).

Os dados obtidos com as AR e análise macroscópica das lesões são elucidados com a avaliação histológica onde resultados muito próximos foram encontrados.

Gráfico 11 - Porcentagem de cicatrização das feridas para cada grupo no D21.



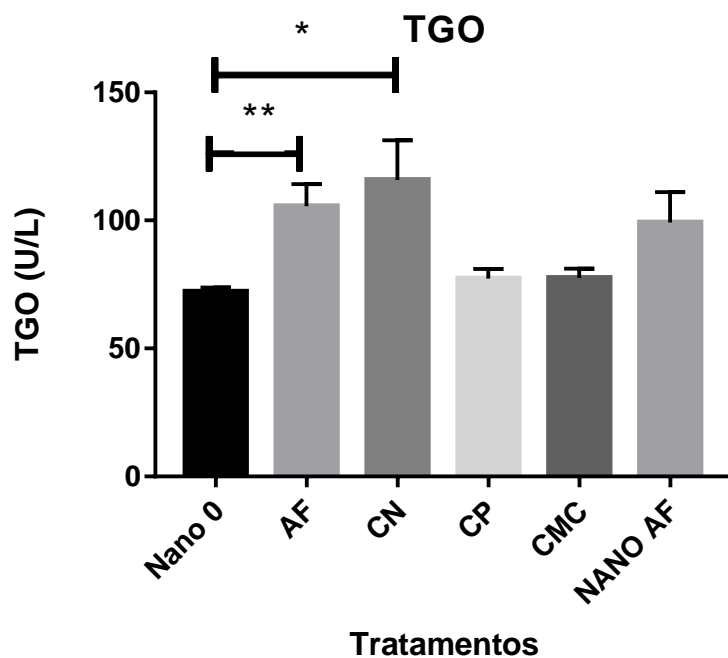
Fonte: A autora.

Nota: * - Representa diferença estatística

5.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Os valores de TGO dentre os grupos de tratamentos apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nano_0 quando comparados com AF livre e CN. O grupo nano_0 apresentou os menores valores de TGO e o grupo CN apresentou os maiores valores de TGO expressos no Gráfico 12 abaixo.

Gráfico 12 - Valores bioquímicos de TGO e diferença estatística.

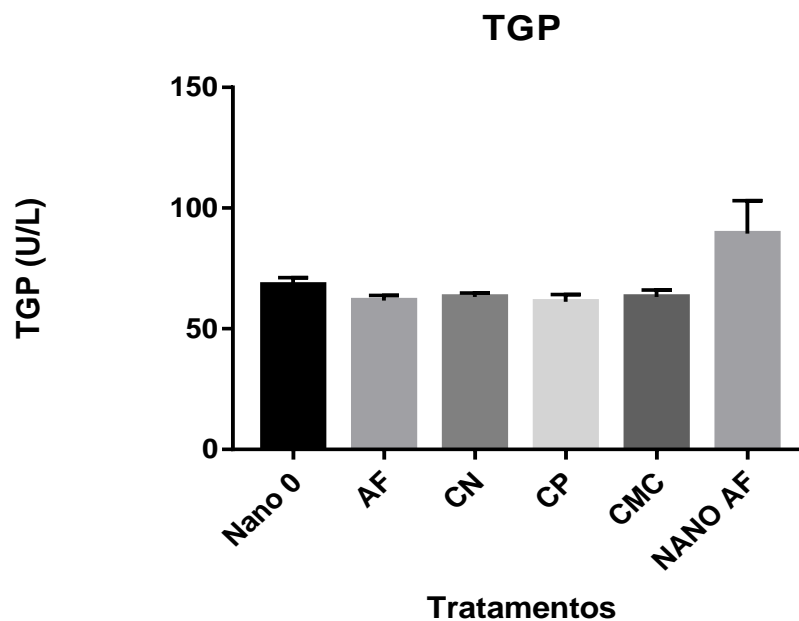


Fonte: A autora.

Nota: * - Representa diferença estatística

Os valores de TGP não evidenciaram diferença estatística significativa sendo que os valores apresentaram grande semelhança entre os grupos, exceto o grupo tratado com nano_AF que apresentou discreta elevação como demonstrado no Gráfico 13.

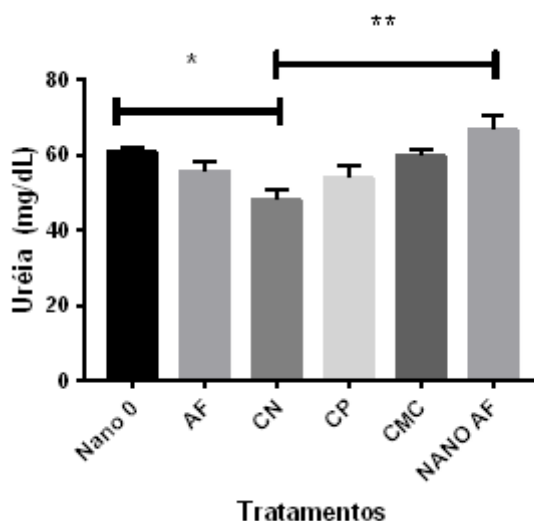
Gráfico 13 - Valores bioquímicos de TGP e diferença estatística.



Fonte: A autora

Os valores de ureia encontrados e ilustrados (Gráfico 14) demonstram elevação nos grupos tratados com nano_0 e nano_AF quando comparados com o CN, que apresentou os menores valores.

Gráfico 14 - Valores bioquímicos de ureia e diferença estatística.



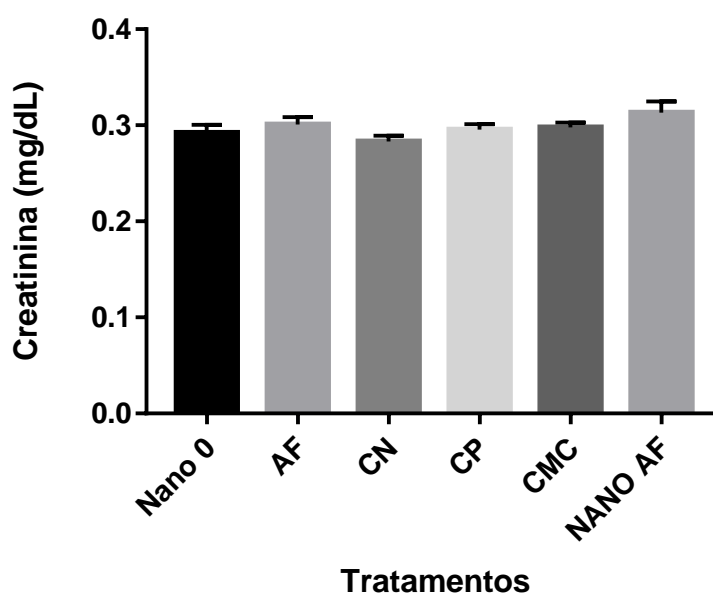
Fonte: A autora.

Nota: * - Representa diferença estatística

O gráfico 15 ilustra os valores de creatinina no grupo de estudo sendo que este parâmetro bioquímico apresentou valores próximos e sem grandes alterações entre

os tratamentos. Os maiores valores de creatinina foram encontrados no grupo nano_AF e os menores no grupo CN.

Gráfico 15 - Valores bioquímicos de creatinina.



Fonte: O autor

A seguir (Tabela 3) estão descritos os valores expressos em média para cada parâmetro bioquímico obtido entre os grupos de tratamento. Roberto et al. (2018) encontraram uma média de creatinina em seu estudo de 0,57 mg/dL, sendo que os ratos não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, a pesquisa foi realizada com a intenção de padronizar os valores de um determinado biotério. O valor encontrado foi superior ao do nosso estudo, porém condições de manipulação, técnicas e regiões geográficas podem causar interferência. Melo et al. (2012) realizaram estudo para valores de referência em ratos *Wistar* sendo que encontraram médias para TGO de 132 U/L, TGP de 41 U/L, creatinina de 0,5 mg/dL e ureia de 43 mg/dL sendo que TGO assemelha-se muito com o nosso estudo e creatinina apresenta elevação. Lima et al. (2014) ao pesquisarem os valores bioquímicos de determinado biotério encontraram valores médios em ratos *Wistar* fêmeas de TGP 45 U/L, TGO 107 U/L, creatinina 0,57 mg/dL, ureia 39,17 mg/dL. Arcaro (2018), que utilizou o mesmo biotério desse estudo em seu grupo controle encontrou valores médios para ureia de 40,37 mg/dl, creatinina 0,35 mg/dL, TGO 73,38 U/L, TGP 59,50 U/L. Diante dos estudos encontrados e ao comparar os valores médios dessa pesquisa com o grupo controle negativo, grupo que não foi submetido a nenhum

tratamento, sugere-se que os tratamentos utilizados não ocasionaram hepatotoxicidade e nefrotoxicidade tendo em vista que os valores são semelhantes ao controle negativo e aos demais estudos.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos encontrados expressos em média para cada tratamento utilizado.

Tratamentos	TGO (U/L)	TGP (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
CMC	80,50	64,85	61,92	0,29
CMC + AF livre	120,26	65,60	55,80	0,31
CMC + nano_AF	99,23	89,38	66,84	0,31
CMC + nano_0	74,86	66,80	62,93	0,30
Controle Positivo	85,66	64,00	54,53	0,29
Controle Negativo	133,42	63,35	68,00	0,28

Fonte: A autora.

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As análises histológicas em HE foram avaliadas sob 13 características distintas de reparo tecidual conforme quadro 2, sendo que para cada característica foram padronizados scores entre 1 e 5 pontos de diferença. As análises histológicas em Tricrômio de Masson foram avaliadas através de scores de 1 a 3 somente quanto a intensidade de colágeno presente.

Quadro 2 – Características avaliadas nas lâminas com coloração em HE.

1. Crosta – Bordas
2. Crosta – Centro
3. Epitélio sob a ferida
4. Característica do epitélio - BORDA
5. Característica do epitélio - CENTRO
6. Anexos cutâneos - ferida
7. Presença de coágulos
8. Hemácias extravasadas
9. Tec. Conjuntivo subjacente - CENTRO
10. Tec. Conjuntivo subjacente - BORDAS
11. Infiltrado Inflamatório
12. Presença de exsudato
13. Colônias Bacterianas

Fonte: A autora.

5.5.1 Hematoxilina – eosina

As análises histológicas em HE na 7ª semana de tratamento apresentaram diferença estatística em seis das treze características avaliadas. O grupo controle negativo apresentou o melhor score para todos os pontos avaliados sendo que para hemácias extravasadas e presença de exsudato menores scores representam melhores resultados conforme tabela 4.

Tabela 4 – Características avaliadas nas lâminas histológicas em HE que apresentaram diferença estatística no D7 de tratamento.

(Continua)

GRUPOS D07	Crosta - Bordas	Epitélio sob a ferida	Característica do epitélio - BORDA
Média +- DP			
CP	1,750 +- (0,500) ^a	1,750 +- (0,957) ^a	2,500 +- (1,291) ^a
CN	2,500 +- (0,707) ^{ab}	3,000 +- (0,000) ^{ab}	4,000 +- (0,000) ^{ab}
CMC	1,200 +- (0,447) ^{ab}	1,600 +- (0,548) ^a	2,200 +- (0,447) ^a
AF	2,000 +- (0,000) ^a	1,200 +- (0,447) ^{ab}	1,800 +- (0,447) ^{ab}
nano_0	1,670 +- (0,577) ^a	1,670 +- (0,577) ^a	2,330 +- (0,577) ^a
nano_AF	1,250 +- (0,500) ^{ab}	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,750 +- (0,500) ^{ab}

Tabela 5 – Características avaliadas nas lâminas histológicas em HE que apresentaram diferença estatística no D7 de tratamento.

(Continuação)

GRUPOS D07	Característica do epitélio - CENTRO	Hemácias extravasadas	Presença de exsudato
Média +- DP			
CP	1,750 +- (1,500) ^a	1,500 +- (0,577) ^a	2,500 +- (0,577) ^{ab}
CN	3,500 +- (0,707) ^{ab}	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,000 +- (0,000) ^{ab}
CMC	1,200 +- (0,447) ^{ab}	2,600 +- (0,548) ^a	2,600 +- (0,548) ^{ab}
AF	1,400 +- (0,894) ^a	2,800 +- (0,447) ^{ab}	2,800 +- (0,447) ^{ab}
nano_0	1,000 +- (0,000) ^{ab}	2,670 +- (0,577) ^{ab}	3,000 +- (0,000) ^{ab}
nano_AF	1,000 +- (0,000) ^{ab}	2,250 +- (0,957) ^a	3,000 +- (0,000) ^{ab}

*Letras diferentes nas colunas apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

A processo inflamatório é fundamental no processo de cicatrização pois é responsável em promover a exsudação de leucócitos que por sua vez fagocitam e destroem agentes lesivos, necrose e demais fatores que impedem a cicatrização, entretanto uma resposta inflamatória exacerbada prejudica significativamente este processo, inibe a proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e crescimento de patógenos (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Nas análises histológicas no 21º dia de tratamento em relação aos treze itens avaliados, 5 representaram diferença estatística nesta última fase da cicatrização. O

grupo tratado com AF apresentou os melhores scores em todos os itens (Tabela 5). Tais resultados se encontram com os obtidos nas avaliações macroscópicas e de AR. Bairagi et. al. (2018) em seu estudo demonstraram que o AF encapsulado em poli (ácido lático-co-ácido glicólico) e incorporado à um hidrogel de Carbopol mostrou-se eficiente na cicatrização de ratos diabetizados com STZ.

Tabela 6 – Características avaliadas nas lâminas histológicas em HE que apresentaram diferença estatística no D21 de tratamento.

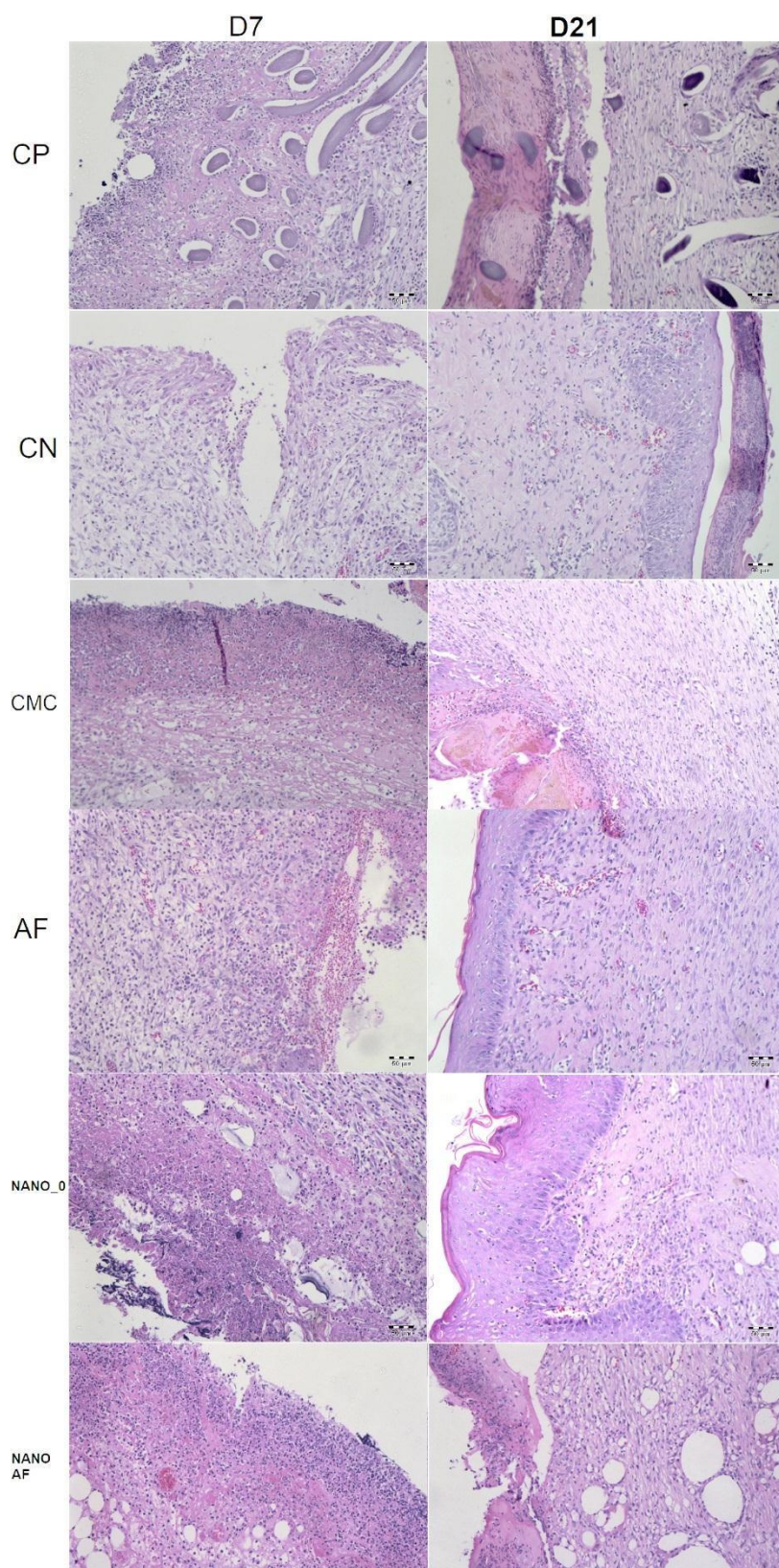
GRUPOS D21	Crosta - Bordas	Crosta - Centro	Epitélio sob a ferida
Média +- DP			
CP	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,400 +- (0,894) ^a
CN	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,500 +- (1,000) ^a
CMC	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,250 +- (0,500) ^a
AF	2,400 +- (0,894) ^{ab}	2,200 +- (1,095) ^{ab}	2,400 +- (0,894) ^{ab}
nano_0	1,200 +- (0,447) ^{ab}	1,200 +- (0,447) ^a	1,000 +- (0,000) ^{ab}
nano_AF	1,000 +- (0,000) ^{ab}	1,250 +- (0,500) ^a	1,000 +- (0,000) ^a

GRUPOS D21	Tec. Conjuntivo subjacente – CENTRO	Tec. Conjuntivo subjacente - BORDAS
Média +- DP		
CP	3,400 +- (0,894) ^a	2,800 +- (0,447) ^{ab}
CN	3,000 +- (0,816) ^a	2,500 +- (0,577) ^{ab}
CMC	2,250 +- (0,500) ^{ab}	3,000 +- (0,000) ^{ab}
AF	4,000 +- (0,707) ^{ab}	1,600 +- (0,548) ^{ab}
nano_0	2,800 +- (0,447) ^a	3,200 +- (0,447) ^{ab}
nano_AF	2,500 +- (0,577) ^{ab}	3,000 +- (0,000) ^{ab}

Fonte: A autora.

Ao avaliar as lâminas em HE (Figura 14) observa-se que no grupo CP as partículas de prata que possuem ação bacteriostática presente no curativo comercial penetram em todo o tecido lesionado. O CN na terceira semana apresenta um tecido organizado, mas ainda com presença de infiltrado inflamatório. No grupo CMC observa-se um tecido ainda pouco estruturado já no grupo AF é possível observar um tecido conjuntivo organizado com a lesão muito próxima de total epitelização, não há presença de infiltrado inflamatório. No grupo nano_0 e nano_AF o tecido conjuntivo encontra-se melhor organizado nas bordas em relação ao centro.

Figura 14 - Lâminas histológicas em HE dos 6 grupos no D07 e D21 de tratamento.

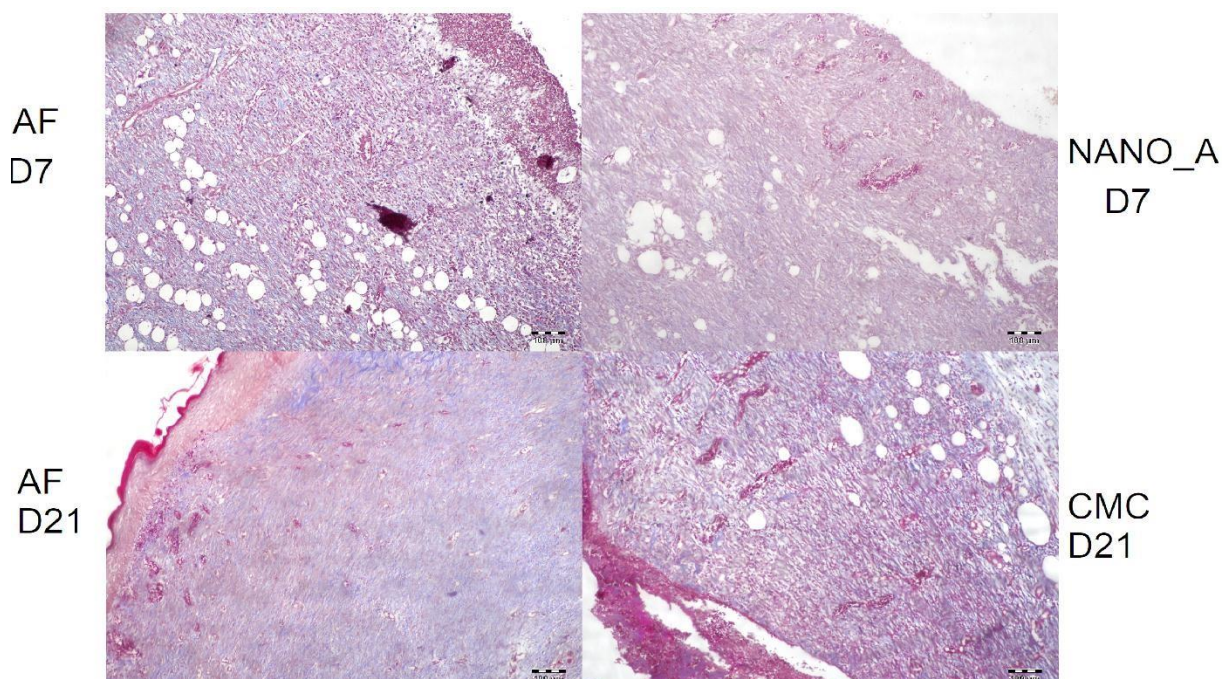


Fonte: A autora.

5.5.2 Tricrômio de Masson

Abaixo na Figura 15 através desta coloração observa-se a deposição de colágeno nos grupos que apresentaram melhor cicatrização nos dias 7 e 21 e os piores valores de cicatrização nos mesmos dias.

Figura 15 – Imagens em coloração de Tricrômio de Masson dos grupos que obtiveram melhor e pior desempenho no D07 e D21.



Fonte: A autora.

A última fase do processo de cicatrização compreende a remodelação sendo o colágeno o principal elemento da derme. Nesta etapa ocorre a degradação do colágeno tipo III e uma maior síntese do tipo I, a medida que ocorre a transição entre os tipos a organização também vai mudando onde fibras paralelas e finas dão espaço a fibras mais robustas e entrelaçadas, características que conferem maior resistência. A contração da ferida é controlada pela relação entre o PDGF, TGF- β , inibidores de metaloproteinases e em menor proporção das metaloproteinases de matriz (MMPs) (ISAAC et. al.; 2010).

6 CONCLUSÃO

Para os diferentes tipos de membranas desenvolvidas foi possível observar através das análises químicas realizadas, que a incorporação de um material ao outro não comprometeu a sua estrutura inicial.

A aplicação das membranas em modelo animal permitiu avaliar e diferenciar a evolução da cicatrização em cada grupo sendo que os resultados obtidos nas análises de AR condizem com os resultados histológicos encontrados ao fim desta pesquisa.

O grupo tratado com membrana de AF livre apresentou a melhor área de cicatrização, aumento expressivo de fibras colágenas e melhor organização do epitélio. O uso das nanocápsulas não apresentou desempenho superior como esperado fato que pode ser atribuído à algum dos componentes utilizados na sua produção.

Os biomateriais desenvolvidos apresentam segurança para a aplicação sob o ponto de vista nefrotóxico e hepatotóxico na população estudada apresentando valores muito semelhantes aos encontrados em outros estudos semelhantes.

Pesquisas acerca da encapsulação do AF com outros polímeros e em diferentes concentrações podem ser apontados como possibilidades futuras de investigação. O exsudato intenso característica de proliferação bacteriana sugere pesquisas com o uso adjuvante de agentes antibacterianos podendo gerar novas perspectivas e resultados ainda mais promissores.

REFERÊNCIAS

- ALLÉMAN, E. *et al.* Drug loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Holanda, v. 39, n. 5, p. 173-191, out. /1993.
- ALMEIDA, W. A. D. *et al.* Fatores associados à qualidade de vida de pessoas com feridas complexas crônicas. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 9-16, mar. /2018.
- ARAFÁ, M. G.; EL-KASED, R. F.; ELZAMAR, M. Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. **Scientific Reports**, v. 8, n. 13674, p. 1-16, set. /2018.
- ARCARO, Guilherme. **Mucilagem de Ocotea puberula (Rich.) NEES.: desenvolvimento de um fitomedicamento e testes “in vivo” para cicatrização de feridas.** 2018. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/2606>
- BAIRAGI U. *et al.* Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 44, n. 11, p.1783-1796, nov. / 2018.
- BERTOCCO, André Rabelo Peixoto. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da fotoestabilidade de nanocápsulas poliméricas contendo ácido ferúlico.** 2014. 55 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Bacharelado em Farmácia, Ponta Grossa, PR.
- BORGES, E. L. *et al.* **Feridas: Como tratar?** 2. ed. Médica Coopmed: Belo Horizonte, 2008. 130p.
- BUENO, C. Z. *et al.* Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais. In: **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados.** Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra 2015a, p. 67 – 110.
- BUENO, Cecília Zorzi. **Desenvolvimento e análise das propriedades de membranas de quitosana e alginato contendo polihexametileno biguanida para o tratamento de lesões de pele.** 2015b. 177 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266039>>.
- CAETANO, G. F. *et al.* Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2015 Jul;103(5):1013-22. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013-1022, set. /2014.

CAMPOS, A. C. L.; BRANCO, A. B.; GROTH, A. K. Alginate: properties and biomedical applications. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, nov. /2006.

CAMPOS, A. C. L.; BRANCO, A. B.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, set. /2007.

CAPANEMA, N. S. *et al.* Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, n. 1, p. 1218-1234, jan. /2018.

CASTELO BRANCO NETO, M. L. *et al.* Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Rev. Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 17-22, abr./2006.

CHU, Y. *et al.* Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. **Wound Repair Regen**, v. 18, n. 5, p. 499-505, out. /2010.

COELHO, J. M. *et al.* O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 45-51, jan. /2010.

COVIELLO, T. *et al.* Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 1, p. 5-24, mai. /2007.

DARBY, I. A. *et al.* "Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. " **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**. V.7, n. 6, p. 301-11, nov. /2014,

DELGADO, Jorge Miguel Ferreira. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa.** (Dissertação de Mestrado). Instituto Politécnico de Bragança. 2013. 117 f. Disponível em:<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/9219/1/Jorge%20Delgado.pdf>.

DELGADO-ENCISO, I. *et al.* Topical 5% Potassium Permanganate Solution Accelerates the Healing Process in Chronic Diabetic Foot Ulcers. **Biomedical Reports**, v. 8, n. 2, p. 156-159, jan. /2018.

DEUTSCH, C. J.; EDWARDS, D.; MYERS, S. G. Wound dressings. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 78, n. 7, p. 103-109, jul. /2017.

EBERHARDT, T. D. *et al.* Cicatrização de feridas: análise das tendências em teses e dissertações. **Revista de enfermagem da UFSM**, v. 5, n. 2, p. 387-395, jun./2015.

FERREIRA, E.S.; *et al.* **Curativo de carboximetilcelulose com prata: um biomaterial para uso em lesões infectadas.** Anais do 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO. Maresias – SP/ agosto 2017.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1-4, out. /1989.

GHAISAS, M. M.; KSHIRSAGAR, S. B.; SAHANE, R. S. Evaluation of wound healing activity of ferulic acid in diabetic rats. **International Wound Journal**, v. 11, n. 5, p. 523-532, out. /2014.

GOMES, Mona Lisa Simionatto. **Desenvolvimento tecnológico e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo Cilostazol**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2015. Disponível em <https://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/88>.

International Diabetes Federation. **IDF DIABETES ATLAS, 8TH EDN**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. <http://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 17 jul. 2019.

ISAAC C, *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med (São Paulo)**. V. 89 n. 3/4, p. 25-31, jul.-dez. /2010.

KARRI, V. V. S. R. *et al.* Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, n. 1, p. 1519-1529, dez. /2016.

KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.168-70.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, jun./2011.

LAKSHMI, D. S.; TRIVEDI N.; REDDY, C. R. K.; Synthesis and characterization of seaweed cellulose derived carboxymethyl cellulose. **Carbohydr Polym.** v.10; n.157, p. 1604-1610, feb. / 2017.

LANDRISCINA, A.; ROSEN, J.; FRIEDMAN, A. J. Systematic Approach to Wound Dressings. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 14, n. 7, p. 740-744, jul. /2015.

LEAL, E. C; CARVALHO, E. Cicatrização de feridas: o fisiológico e o patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 9, n. 3, p. 133-143, mar. /2014.

LEE, K. Y., MOONEY D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Prog Polym Sci**, v. 37, n. 1, p. 106-126, jan. /2012.

LI, X. *et al.* EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, n. 1, p. 3993-4009, ago. /2016.

LIMA, C. M. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, mar. /2014.

MANJANNA, K. M.; KUMAR, T. M. P; SHIVAKUMAR, B. B. Natural polysaccharide hydrogels a novel excipients for modified drug delivery systems: a review'. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 1, p. 509-525, jan. /2010.

MARWICK, T. H. *et al.* Exercise Training for Type 2 Diabetes Mellitus: Impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 119, n. 25, p. 3244-3262, jun./2009.

MEDEIROS, Aldo Cunha; FILHO, A. M. D. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical and Clinical Research**, Rio Grande do Norte, v. 7, n. 2, p. 87-102, mar. /2017.

MELO, M. G. D. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 9, p. 1-6, set. /2012.

MENDONCA, R. J. de; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 257-262, jul. / 2009.

MIHAI, M. M. *et al.* Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. **Materials**, v. 12, n. 13, p. 1-16, jul. /2019.

MOURA, L. I. *et al.* Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 1, p. 32-43, jan. /2014.

MOHSENI M. *et al.* A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. **Int J Pharm**, v. 10, n. 564, p. 350-358, jun. / 2019.

NADAL J. M. *et al.* Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: comparative analysis of three carriers, in vitro dissolution, antioxidant potential and in vivo anti-platelet effect. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 42, n. 11, p. 1813-24, nov. /2016.

NADAL, J. M. *et al.* Spray-dried Eudragit® L100 microparticles containing ferulic acid: Formulation, in vitro cytoprotection and in vivo anti-platelet effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 64, n. 1, p. 318-328, jun. /2016.

OLIVEIRA, José Egídio Paulo de; MONTENEGRO JUNIOR, Renan Magalhães; VENCIO, Sérgio. (org.). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017 – 2018. São Paulo Clannad, 2017.

OLIVEIRA, M. F. de *et al.* Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevivência. **Rev. Gaúcha Enferm**, Porto Alegre, v. 40, feb. /2019.

OPPENHEIM, R. C. Solid colloidal drug delivery systems: nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 217-234, mai. /1981.

OYARZUN-AMPUERO, F. A. *et al.* Spray-dried Eudragit® L100 Microparticles Containing Ferulic Acid: Formulation, In Vitro Cytoprotection And In Vivo Anti-platelet Effect. **Materials Science and Engineering**, v. 64, n. 1, p. 318-328, jul. /2016.

OYARZUN-AMPUERO, F. *et al.* Nanoparticles for the Treatment of Wounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 29, p. 4329-4341, ago. /2015.

ÖZKAYA, H. *et al.* Topical and Systemic Effects of N-acetyl Cysteine on Wound Healing in a Diabetic Rat Mode. **Wounds**, v. 31, n. 4, p. 91-96, fev. /2019.

PAIVA, L. B. D. *et al.* Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 395-411, set. /2013.

PANWAR, R. *et al.* Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, n. 1, p. 21-31, jun./2016.

PANWAR, R. *et al.* In-vivo sustained release of nanoencapsulated ferulic acid and its impact in induced diabetes. **Materials Science and Engineering: C**. v. 92, n. 1, p. 381-392, nov. /2018.

PETZ, Francislene de Fatima Cordeiro. **Terapia a laser na cicatrização da úlcera por pressão em adultos e idosos: revisão sistemática**. 2015. 143f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/41732>.

PICONE, P. *et al.* Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles. **Free Radical Research**, v. 43, n. 11, p. 1133-1145, out. /2009.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, n. 1, p. 397-430, out. /2008.

ROBERTO, J. V. B. *et al.* Parâmetros bioquímicos de referência de ratos wistar. De diferentes faixas de peso, provenientes do Biotério das Faculdades. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, Nova Esperança - PB, v. 16, n. 1, p. 81-87, jan. /2018.

SANTOS, V. *et al.* Wound healing: stagnant/chronic wounds particularity. **Journal of Aging & Innovation**, v. 1, n. 2, p. 32-39, jul. /2012.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, fev. /2003.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo**

melatonina. 2006. 252f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/15891>

SHAO, J. *et al.* Antibacterial effect and wound healing ability of silver nanoparticles incorporation into chitosan-based nanofibrous membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, n. 1, p. 1053-1063, mai. /2019.

SIDDHANTA, A. M. *et al.* The cellulose contents of Indian seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v.23, n. 5, p 919-923. Oct. /2011.

SILVA, P. N. D; ALMEIDA, O. A. E. D; ROCHA, I. C. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. **Revista Eletrônica Trimestral de Enfermaria**, v. 33, n. 1, p. 46-58, jan. /2014.

SILVA, M. M. P. D. *et al.* Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 1-10, jul. /2018.

SINGER A.D.; CLARK R. A. F. Cutaneous wound healing. **New Engl J Med**, v. 341, p. 738-46, 1999.

SINGLA, R. *et al.* In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, n. 1, p. 152-162, jan. /2017.

SIQUEIRA, N. *et al.* Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 3, p. 166-174, jan. /2011.

SMANIOTTO, P. H. D. S. *et al.* Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-626, jan. /2012.

SMANIOTTO, P. H. D. S. *et al.* Tratamento clínico das feridas – curativos. **Rev Med**, São Paulo, v. 89, n. 3, p. 137-141, jan. /2010.

TANIGUCHI H and C. HAYASHI, Japanese patent. No. 2095088, 1991.

TANIGUCHI, H. *et al.* Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice. **Biofactors**, v. 21, n. 1, p. 315-319, jan. /2004.

TOSCANO, C. M. *et al.* Annual Direct Medical Costs of Diabetic Foot Disease in Brazil: A Cost of Illness Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, p. 1-13, jan. /2018.

VÊSCOVI, S. D. J. B. *et al.* Aplicativo móvel para avaliação dos pés de pessoas com diabetes mellitu. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 6, p. 607-613, jan. /2017.

WANG, P. *et al.* Wound Healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 82, n. 1, p. 94-101, fev. /2018.

WINTER, George D. Formation of the scab and the rate of epitheliza-tion of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v. 193, n. 1, p. 293-294, jan. /1962.

WONG, T. W.; RAMLI, N. A., Carboxymethylcellulosefilm for bacterial wound infection control and healing, **Carbohydrate Polymers**, v.4, n.112 p.367-75.nov. / 2014.

ZDUNSKA, K.; AGNIESZKA, D.; ROTSZTEJN, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol*. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 6, p. 332-336, set. /2018.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO ANIMAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 04039/2018****Protocolo UEPG – 8495/2018****Título – Projeto de pesquisa "Avaliação cicatrizante de feridas utilizando nanocápsulas de ácido ferúlico em ratos diabéticos".****Interessados: Paola Martins Schwab/PPGCS – paolatms@hotmail.com – Prof. Paulo Victor Farago – pvfarago@gmail.com****Data de Entrada – 04/06/2018**

Prezado Paola

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 90 (noventa) ratos wistar – para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 28 de outubro de 2018.

I

ANEXO B – PROTOCOLOS DE PREPARO E COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

Preparo das lâminas

Amostra: Pele de rato

Fixação: Formol 10%.

Clivagem: Realizado Clivagem e armazenamento das amostras em cassetes plásticos com tampa.

Processamento: Desidratação, clarificação e infiltração pela parafina fundida a 65°C, em aparelho automatizado. Totalizando 14 horas de processo. (Equipamento: Processador de tecidos OMA - Modelo D40).

Inclusão: Blocagem em parafina fundida com temperatura de 65° C.

Microtomia: Desbaste das amostras em temperatura ambiente, posteriormente geladas em placa refrigerada a -04° C. Velocidade de corte rotativo manual, seccionado a seco com espessura de 04 micrômetros, utilizada navalha descartável perfil alto (marca Leica), no ângulo de 45°, estendidas em banho histológico, contendo água com temperatura de 50° C. Os cortes foram aderidos em lâmina de vidro e encaminhados para estufa a 65°C. (Equipamento: Micrótomo Rotativo Manual American Optical - Modelo: 820 - Série: 54637).

Coloração em Hematoxilina Eosina

- 1) Desparafinar: Emergir as lâminas em Xilol I e Xilol II por 10 minutos respectivamente;
- 2) Hidratar: Pôr e tirar as lâminas em Álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70% e álcool 50%;
- 3) Realizar duas trocas em água de torneiro e duas trocas em água destilada;
- 4) Corar com Hematoxilina de Mayer por 15 minutos;
- 5) Lavar em água corrente;
- 6) Diferenciar em água corrente por 15 minutos;
- 7) Álcool 80% por 2 minutos;
- 8) Corar com eosina – Floxina por 2 a 5 minutos;
- 9) Pôr e tirar em Álcool absoluto I;
- 10) Pôr e tirar em Álcool absoluto II;
- 11) Pôr e tirar em Álcool absoluto III;

- 12) Diafanizar em Xilol por 3 minutos;
- 13) Colocar em Xilol para montagem por 3 minutos;
- 14) Montar as lâminas com lamínulas e Balsamo do Canadá;

Coloração em Tricrômio de Masson com kit comercial

- 1) Desparafinar: Emergir as lâminas em Xilol I e Xilol II por 10 minutos respectivamente;
- 2) Hidratar: Pôr e tirar as lâminas em Álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70% e álcool 50% e lavar em água corrente;
- 3) Pingar quantidade suficiente para recobrir a lâmina do corante B (Hematoxilina de Harris) e deixar por 5 minutos;
- 4) Corante C (água destilada) por 10 minutos;
- 5) Pingar quantidade suficiente para recobrir a lâmina do corante E (Escarlate Biebrich) e deixar por 2 minutos;
- 6) Lavar em água corrente;
- 7) Pingar quantidade suficiente para recobrir a lâmina do corante F (Masson) e deixar por 10 minutos;
- 8) Pingar quantidade suficiente para recobrir a lâmina do corante G (Azul de Anila) e deixar por 1 minuto;
- 9) Após, lavar novamente em água corrente;
- 10) Pôr e tirar em Álcool absoluto I;
- 11) Pôr e tirar em Álcool absoluto II;
- 12) Pôr e tirar em Álcool absoluto III;
- 13) Diafanizar em Xilol por 3 minutos;
- 14) Colocar em Xilol para montagem por 3 minutos;
- 15) Montar as lâminas com lamínulas e Balsamo do Canadá;